

Review droes 2 november 2018

C. van Maanen¹, L. van den Wollenberg¹, E.W. Siegers² en M.M. Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan²

¹ Gezondheidsdienst voor Dieren, Deventer

² Departement Gezondheidszorg Paard, faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht

Inleiding

Als voorbereiding voor de Leidraad droes is een overzicht van de literatuur geschreven. Hierin is geprobeerd alle afwegingen zoals gegeven in de Leidraad zo goed mogelijk met literatuur te onderbouwen. In de Leidraad zijn echter, naast de literatuurgegevens ook de 'expert opinions' verwerkt om zo tot een zo goed mogelijk onderbouwde maar ook een voor Nederland passende Leidraad te komen. Immers niet alle in de literatuur genoemde uitkomsten of aanbevelingen zijn ook passend voor de Nederlandse omstandigheden. Dit betekent dat er tussen de Leidraad droes en dit literatuuroverzicht soms ook discrepanties te vinden zijn omdat de ervaringen onder Nederlandse omstandigheden niet altijd met de literatuur overeen komen.

Etiologie en pathogenese

De verschijnselen van droes werden al in 1251 door Jordanus Ruffus in detail beschreven, al zijn er aanwijzingen dat de ziekte daarvoor ook al bekend was (Waller, 2013). De verwekker van droes is de Lancefield groep C bacterie *Streptococcus equi* subspecies *equi* (verder in deze Leidraad *S. equi* genoemd). Daarnaast kunnen *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (verder in deze Leidraad *S. zooepidemicus* genoemd), *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* en *Streptococcus pneumoniae* type III ook pathogeen zijn voor paarden (Timoney, 2004). *S. equi* is zeer nauw verwant aan *S. zooepidemicus* (> 98% DNA homologie) en lijkt te zijn ontstaan uit een cluster *S. zooepidemicus* stammen die afkomstig waren uit uterusinfecties of abortusgevallen (Webb et al., 2008). *S. equi* beperkt zich tot paardachtigen, in tegenstelling tot *S. zooepidemicus*, een opportunistische pathogeen die geassocieerd wordt met een breed spectrum aan ziektebeelden bij paarden en andere diersoorten, inclusief de mens (Waller et al., 2011). *S. equi* heeft een aantal mechanismen ontwikkeld om zich bij gebrek aan diversiteit aan mogelijke gastheren toch te kunnen handhaven. Zo heeft de bacterie een uniek mechanisme om ijzer te kunnen binden (ijzer is essentieel voor alle pathogene bacteriën), gebruikt het een scala aan anti-fagocytair factoren om de specifieke immuunrespons te frustreren en onttrekt zich ook deels aan de specifieke immuunrespons (Waller et al., 2011). Daarnaast resulteren *S. equi* infecties in ongeveer 10% van de gevallen in korter of langer dragerschap, wat gezien wordt als het belangrijkste overlevingsmechanisme van deze bacterie (Boyle et al., 2018; Newton et al., 2000; Newton et al., 1997; Waller, 2013, 2014). *S. equi* wordt door direct contact tussen paarden of indirect contact (i.e. besmet drinkwater, tuig, handen van verzorgers etc.) via de neus of de mond opgenomen. Na opname gaan de bacteriën zich niet direct vermeerderen op de slijmvliezen van de neus en keelholte, maar hechten de bacteriën zich aan de epitheelcellen in de crypten van de tonsillen van tong, palatum molle en pharynx, waarvandaan ze binnen enkele uren getransporteerd worden naar de drainerende lymfeknopen (Timoney and Kumar, 2008). De bacteriën keren pas later terug op de slijmvliezen, daarom zijn neus/keel swabs of spoelingen in de eerste 24 uur na infectie vaak negatief en zijn de paarden dan ook nog niet infectieus. Uitscheiding via de neus begint in het algemeen 2-3 dagen na het begin van de koorts en stopt bij de meeste dieren na 2-3 weken, maar dit kan doorlopen tot 4-6 weken (Boyle et al., 2018). Abscesvorming van de lymfeknopen is, als het optreedt, macroscopisch niet eerder waarneembaar dan 3 – 5 dagen nadat de bacteriën de lymfeknopen binnengedrongen zijn (Muhktar and Timoney, 1988); de lymfeknopen breken over het algemeen 4 – 28 dagen na infectie extern of intern door (Boyle et al., 2018).

De retropharyngeale lymfeknopen zullen over het algemeen naar binnen in de luchtzakken toe doorbreken. Drainage van abcesinhoud via de luchtzakken naar de neusholte is deels verantwoordelijk voor de mucopurulente neusuitvloeiing die vaak bij droes wordt gezien. In een aantal gevallen vindt er geen of geen complete drainage van de luchtzakken plaats en kunnen zich na verloop van tijd zogenaamde chondroïden of ingedroogde puspropfen vormen waarin de bacterie zich kan handhaven. Echter, ook zonder visueel waarneembare pathologie van de luchtzakken kan er in de luchtzakken een biofilm aanwezig zijn, waarin de bacteriën zich langdurig weten te handhaven. Draggers kunnen de bacterie vaak intermitterend gedurende maanden tot jaren uitscheiden (Newton et al., 1997; Verheyen et al., 2000).

Jonge veulens zijn, na het verdwijnen van hun maternale antistoffen, op 4-5 maanden leeftijd zeer gevoelig voor *S. equi* infecties. Het doormaken van de infectie leidt niet altijd tot langdurige immuniteit: in een studie van Hamlen et al. (1994) ontstond bij 86 – 91% van de veulens in deze leeftijdscategorie droes, een half jaar later ontwikkelde 17% van dezelfde veulens na hernieuwde blootstelling een tweede keer droes. Ongeveer 75-80% van de paarden, mits niet behandeld met antibiotica, ontwikkelt langdurige immuniteit na een droesinfectie. Dat houdt echter ook in dat ongeveer 20-25% van de herstelde paarden na een aantal maanden al weer meer of minder vatbaar is voor een nieuwe infectie (Boyle, 2018; Galan, 1985; Hamlen, 1994).

Oudere paarden met partiële immuniteit, veulens met maternale antistoffen en gevaccineerde paarden zijn minder gevoelig dan immunologisch naïeve dieren en kunnen een milde atypische vorm van droes laten zien (Boyle et al., 2018). Waarschijnlijk zorgt het achterblijven van dragers na een uitbraak voor het stimuleren van de populatie immuniteit. Door regelmatige uitscheiding worden de andere dieren steeds weer blootgesteld aan de bacterie waardoor er in gesloten populaties soms langdurig geen droes meer gezien wordt (Boyle et al., 2018).

De belangrijkste aspecten van de pathogenese voor management en preventie zijn:

- Uitscheiding komt in het algemeen ongeveer 2-3 dagen na het begin van de koorts op gang (houdt voor de veiligheid 24 uur aan). Daarom kunnen bij 2x daags temperaturen nieuwe gevallen worden geïsoleerd voordat ze infectieus zijn voor andere paarden.
- Uitscheiding van bacteriën via de neus houdt meestal zo'n 2-3 weken aan, maar sommige paarden blijven minstens 6 weken nadat de klinische symptomen zijn gestopt infectieus.
- Soms kan de infectie in de luchtzakken persisteren en tot jarenlange, vaak intermitterende, uitscheiding leiden.
- De ernst van de verschijnselen wordt naar alle waarschijnlijkheid mede veroorzaakt door de intensiteit (hoeveelheid bacteriën) en de duur van blootstelling (Boyle et al., 2018).

Epidemiologie

Acute en herstellende droespatiënten zijn een belangrijke en meestal gemakkelijk te herkennen bron van infectie voor andere paarden door de purulente neusuitvloeiing, ooguitvloeiing en doorgebroken abscessen. *S. equi* wordt door direct contact of indirect contact met deze besmettelijke excreta via de neus of de mond opgenomen. Direct contact betreft voornamelijk neus-neus contact in het kader van het normale sociale gedrag, indirect contact kan het delen van besmette stallen, besmet drinkwater, voeders, tuig, handen van verzorgers etc. zijn (Boyle et al., 2018). *S. equi* is gevoelig voor bacteriocide stoffen die door bodembacteriën of intestinale flora worden uitgescheiden en overleeft daarom slechts 1-3 dagen in faeces of bodemmateriaal of compost (Weese et al., 2009, Poulin et al., 2018), al zijn er ook grote seizoenverschillen in overleving gerapporteerd tussen zomer en winter en tussen droge (2 – 9 dagen) en vochtige/natte plaatsen (13 – 34 dagen)(Durham, 2018). *S. equi* kan wel 4-6 weken overleven in water, dus gedeelde drinkbakken kunnen een belangrijke bron van infectie zijn (Boyle, 2018).

Tegenwoordig wordt onderkend dat ogenschijnlijk gezonde paarden ('draggers') waarschijnlijk een belangrijkere rol spelen bij het tot stand komen van nieuwe uitbraken of zich herhalende

uitbraken dan paarden in de acute fase van een droesinfectie (Boyle et al., 2018; Newton et al., 2000; Newton et al., 1997). De rol van dragers moet niet worden onderschat en daarom is het detecteren, isoleren en behandelen van dragers van groot belang voor de controle en preventie van droes op bedrijfsniveau en populatieniveau (Boyle et al., 2018; Harris et al., 2015). In de meeste gevallen zal het doorbreken van de retropharyngeale lymfeknopen in de luchtzakken leiden tot een kortdurend empyeem van de luchtzakken waarna spontane drainage en opschoning van de luchtzakken optreedt. Echter, in ongeveer 10% van de gevallen ontstaat er een chronisch empyeem van de luchtzakken met dragerschap tot gevolg. Veel dragers zijn het grootste deel van de tijd asymptomatisch, ongeveer 50% van de dragers hoest zo nu en dan en laat intermitterend en vaak unilateraal neusuitvloeiing zien (Sweeney et al., 2005). Newton et al. (1997) beschreven een droes uitbraak op een groot paardenbedrijf, waarbij zeven dragers werden geïdentificeerd. Vijf van de zeven dragers vertoonden intermitterend unilateraal neusuitvloeiing en alle dragers werden pas gedetecteerd na herhaalde monsternames gedurende een periode van enkele maanden. Paarden kunnen ook drager worden zonder voorafgaande klinische verschijnselen passend bij droes. In een retrospectieve case-control studie bleek bij 12 van de 25 dragers geen eerdere droesverschijnselen te zijn waargenomen (Duffee et al., 2015). Droes is wereldwijd één van de meest voorkomende infectieziekten bij het paard en dus erg belangrijk (Sweeney et al., 2005). De ontwikkeling van moleculaire methoden zoals het sequencen van de genomen van veel wereldwijd verzamelde stammen, ook uit Nederland, heeft tot veel nieuwe inzichten geleid. Alhoewel de ziekte al in de 13^e eeuw beschreven is, blijken alle nu circulerende stammen een gezamenlijke voorouder te hebben uit de 19^e of het begin van de 20^e eeuw (Harris et al., 2015). Waarschijnlijk heeft dit mede te maken met de massale inzet van paarden tijdens de Eerste Wereldoorlog, waarin acht miljoen paarden op het slagveld stierven en er tijdens de piek van die oorlog alleen al 1000 paarden per dag van de Verenigde Staten naar Groot-Brittannië geëxporteerd werden (Waller, 2016). De inzet van moleculaire technieken heeft tevens geleid tot de ontwikkeling van de moleculaire epidemiologie, waarbij diverse typeringsmethoden ingezet worden om de transmissie van in dit geval *S. equi* binnen bedrijven, tussen bedrijven en tussen regio's en landen beter te kunnen begrijpen (Al-Ghamdi et al., 2000; Harris et al., 2015; Ivens et al., 2011; Kelly et al., 2006; Libardoni et al., 2013; Lindahl et al., 2011; Parkinson et al., 2011; Patty and Cursons, 2014). Ook worden moleculaire typeringsmethoden gebruikt om de opkomst of ondergang van bepaalde genotypen te volgen (Parkinson et al., 2011) en te kunnen discrimineren tussen veld en vaccinstammen (Cursons et al., 2015; Kelly et al., 2006). Verder hebben moleculaire technieken bijgedragen aan ons inzicht met betrekking tot de pathogenese van dragerschap. Zo zijn in een deel van de *S. equi*-isolaten afkomstig uit de luchtzakken van dragers diverse mutaties en deleties aangetoond waarbij ook belangrijke virulentiefactoren, zoals het ijzerbindend vermogen, verloren zijn gegaan, wat kan leiden tot verminderde pathogeniteit (Harris et al., 2015; Holden et al., 2009). Er bestaat voor deze pathogeen een balans tussen transmissie tijdens uitbraken en de soms langdurige overleving in de gastheer zonder dat er uitbraken optreden. Na het beschikbaar komen van een specifieke en gevoelige ELISA voor het aantonen van antistoffen tegen *S. equi* (Robinson et al., 2013) zijn er wereldwijd diverse seroprevalentiestudies uitgevoerd in verschillende paardenpopulaties. Hierbij bleek de seroprevalentie in Engeland (10%), Ierland (10-42%), Israël (9,5%), Lesotho (10%), Nederland (2-10%) en Zweden (7,8%) wel wat te verschillen (Ling et al., 2011; Tirosh-Levy et al., 2016). In Ierland bleek er een groot verschil in seroprevalentie tussen de volbloedsector (10%) en de overige paardenpopulatie (42%) te zijn. In Nederland werden ook verschillen aangetoond tussen verschillende subpopulaties (resultaten nog niet gepubliceerd). Hierbij moet worden opgemerkt dat paarden gemiddeld binnen 6-8 maanden na het doormaken van een droesinfectie weer seronegatief worden, mits ze de infectie overwonnen hebben (Robinson et al., 2013; Waller, 2013). Dragere blijven over het algemeen persistent seropositief. De seroprevalentie geeft dus een indruk over het percentage recente infecties + dragers in de populatie. Zonder vervolgonderzoek of uitgebreide anamnese kan dit niet verder worden uitgesplitst.

Klinische symptomen

De ernst van een droesinfectie hangt af van een aantal factoren: de immunestatus van het paard, de virulentie van de droesstam, de hoeveelheid bacteriën waaraan het paard wordt blootgesteld (inoculum) én de duur van die blootstelling (Boyle et al., 2018). Klinische symptomen zijn over het algemeen heftiger bij jonge dieren (< 5 jaar) en oude dieren (> 20 jaar) waarbij de immuniteit niet (meer) optimaal is. Daarnaast herstellen volwassen dieren veelal ook sneller dan jonge of oude dieren (Sweeney et al., 1989; Sweeney et al., 2005). Na een incubatietijd van 3-14 dagen zijn in het algemeen koorts en sloomheid de eerste klinische symptomen die worden waargenomen. Ten gevolge van pharyngitis kan het zijn dat het paard slecht wil eten en drinken, moeite heeft met slikken en in sommige gevallen de hals gestrekt houdt. Palpatie van de keel kan dan een pijn- en/of hoestreactie oproepen (Waller, 2014). Purulente neus- en ooguitvloeiing is een symptoom dat regelmatig in het verloop van droes wordt gezien, maar het meest typische verschijnsel is natuurlijk de lymfeknoopzwellings. Dit betreft meestal de submandibulaire en/of retropharyngeale lymfeknopen, soms de parotis en de craniale cervicale lymfeknopen en incidenteel andere lymfeknopen. Deze lymfeknopen kunnen vervolgens gaan abcederen, het eerste teken daarvan is warmte en pijnlijkheid. Het dikke kapsel dat zich over het algemeen vormt, zorgt ervoor dat het abces vaak pas 1 tot 4 weken na infectie doorbreekt, waarbij dikke gele pus vrijkomt. Dit kan naar buiten toe zichtbaar worden, maar kan ook uit de neus (of bij hoesten zelfs uit de mond) komen als het de retropharyngeale lymfeknoop betreft die naar de luchtzak is doorgebroken en daar empyeem heeft veroorzaakt. Als de retropharyngeale lymfeknoop zodanig zwelt dat ademen lastig wordt door obstructie van de pharynx, kan dit soms een (spoed)tracheotomie noodzakelijk maken.

Dit 'standaardverloop' wordt vaak gezien bij jongere dieren die nog weinig of geen immuniteit tegen *S. equi* hebben. In het geval van volwassen dieren die al wel (partiële) immuniteit hebben, is het heel goed mogelijk dat er geen lymfeknoopzwellings en -abcedering wordt gezien en dat het verloop veel minder typisch is met bijvoorbeeld alleen koorts, hoesten en wat neusuitvloeiing (Boyle et al., 2017a). Echter, immuniteit is niet het enige dat hierbij een rol speelt, zoals blijkt uit de bevindingen van Tscheschlok et al. (2018). Tijdens een droesuitbraak werden 112 net gespeende veulens nauwgezet klinisch gevolgd. Hierbij bleek een flink deel van de veulens geen of nauwelijks klinische symptomen te vertonen terwijl ze serologisch wél een seroconversie tegen de droesbacterie lieten zien. De helft van de veulens bleek, ondanks het ontbreken van duidelijke klinische verschijnselen, de bacterie ook op enig moment uit te scheiden en vormde daarmee een gemakkelijk te missen potentiële besmettingsbron voor andere dieren.

Bij uitbraken waarbij de klinische verschijnselen minder kenmerkend zijn, kan het stellen van de diagnose wat langer duren, waardoor de bacterie langer de kans krijgt om zich van paard naar paard te verspreiden. Dit kan ertoe leiden dat de problemen met de droesinfectie op zo'n bedrijf hardnekkiger worden en het meer moeite kost om van de besmetting af te komen (Sweeney et al., 1989; Sweeney et al., 2005).

Tot 20 % van de gevallen (afhankelijk van de tijdsduur en intensiteit van blootstelling aan de infectie) kent daarentegen een heftiger ziekteverloop dan gemiddeld, waarbij er complicaties kunnen optreden.

Pneumonie is een belangrijke mogelijke complicatie van droes (Ford and Lokai, 1980; Sweeney et al., 1987). Door irritatie en druk op de zenuwen rond de keel kunnen (reversibele) slikproblemen optreden, die kunnen leiden tot aspiratie van voedsel met verslikpneumonie als gevolg. De bacterie kan daarnaast ook zelf een suppuratieve bronchopneumonie veroorzaken.

Verslagen droes (≈ bastard strangles) ontstaat als de bacterie zich haematogeen of lymfogeen verspreidt naar andere locaties dan de voorste luchtwegen met bijbehorende lymfeknopen, zoals de longen, de mesenteriale lymfeknopen, de lever, de milt, de hersenen et cetera. Uiteraard hangen de verschijnselen van deze vorm van droes af van de betreffende anatomische locatie. Koorts, sloomheid, intermitterende koliek, neurologische verschijnselen, anorexie en vermageren kunnen optreden, maar zijn niet altijd zo specifiek

dat de link met droes direct duidelijk is (Boyle et al., 2016). Pusterla et al. (2007) beschreven tien gevallen van intra-abdominale abcessen ten gevolge van verslagen droes met een lange termijn overleving van 40%. Voor het 'laten verdwijnen' van de klinische verschijnselen van deze inwendige abcessen bleek langdurige antibioticumtherapie noodzakelijk. De duur van de behandeling varieerde tussen 30 en 131 dagen (gemiddeld 72 dagen). In Nederland wordt doorgaans volstaan met een zes tot acht weken behandelen met procainebenzylpenicilline 20 mg/kg 1dd i.m. Er wordt wel aangegeven dat de kans op verslagen droes toeneemt als een paard met droes wordt behandeld met antibiotica, maar tot op heden heeft men dit vermoeden in onderzoeken niet kunnen bevestigen en is in ieder geval duidelijk dat verslagen droes (ook) kan optreden in onbehandelde paarden (Duffee, 2015; Ramey, 2007; Spoomakers, 2003).

Droes kan ook resulteren in immuungemedieerde complicaties met als bekendste de purpura hemorrhagica (morbus maculosus). In uitbraken waarin deze complicatie is gedocumenteerd, werd dit in circa 5-6 % van de gevallen waargenomen (Duffee et al., 2015; Sweeney 1987). In Nederland lijkt deze complicatie minder vaak voor te komen. Purpura hemorrhagica kan overigens ook ontstaan na andere (respiratoire) infecties (Morris 1987; Pusterla et al. 2007 Whelchel 2009) en wordt genoemd als incidenteel voorkomende complicatie na een droesvaccinatie met het in de Verenigde Staten gebruikt eiwitextract (SeM) vaccins of geattenueerde intranasaal toegediende vaccins (Boyle, 2018; Pusterla, 2003). In geval van purpura hemorrhagica ontstaat, waarschijnlijk door neerslaan van antigeen-antilichaamcomplexen in bloedvatwanden, een (aseptische) necrotiserende vasculitis waarbij oedeem en (punt) bloedingen in de slijmvliezen de meest opvallende verschijnselen zijn. In incidentele gevallen kan het verloop zo heftig zijn dat er serum door de huid lekt en huid ook daadwerkelijk afsterft en soms raken ook andere organen betrokken (longen, darmen, spieren). Bij dit soort ernstigere gevallen wordt naast oedeem en (punt)bloedingen vaak sloomheid, anorexie, koorts en een hoge pols waargenomen (Pusterla et al., 2003; Whelchel and Chaffin, 2010; Sjöblom 2014).

Differentiële diagnose

Soms kan *S. zooepidemicus* droesachtige beelden veroorzaken (Waller, 2014). Albini et al. (2008) beschreven drie gevallen van een infectie met *Actinomyces denticolens* bij paarden die droesverschijnselen vertoonden. Ook *Corynebacterium pseudotuberculosis* kan bij het paard abcessen in lymfeknopen veroorzaken. Daarnaast kunnen kieswortelabcessen en neoplasieën (lymfomen, schildkliertumoren, subcutane lipomen en melanomen) tot verdikkingen van lymfeknopen leiden.

Richtlijnen voor diagnostiek

Klinische diagnostiek

Een verdenking van droes is vaak gebaseerd op klinische symptomen als koorts, (purulente) neusuitvoering en/of gezwollen (abcederende) lymfeknopen. Ook kan aan droes worden gedacht als een groep paarden hardnekkige, recidiverende luchtwegproblemen vertoont die slecht reageren op therapie.

Aanvullende diagnostiek

Om een verdenking te onderbouwen, kan gebruik worden gemaakt van verschillende soorten aanvullende diagnostiek:

- Haematologie en klinisch chemisch bloedonderzoek
- Endoscopie van de voorste luchtwegen en de luchtzakken
- Röntgenfoto van de keelstreek
- Kweek
- PCR
- Serologie

Bloedonderzoek kan zinvol zijn omdat paarden met droes doorgaans (maar niet altijd!) een ontstekingsbloedbeeld hebben, waarbij een leucocytose met een rechtsverschuiving, hyperfibrinogenemie en een verhoogd totaal eiwit met een verhoogde gamma globuline fractie worden gezien. Ook kan anemie optreden (Duffee 2015).

Endoscopie van de voorste luchtwegen is, met name in geval van gezwollen retropharyngeale lymfeknopen, een waardevolle techniek: een 'doorhangend' pharynxdak of, in de luchtzakken, een opbolling in de luchtzakbodem of aanwezigheid van empyeem en/of concrementen in de luchtzakken, geven een sterke indicatie c.q. bewijs dat er mogelijk droes speelt. Röntgendiagnostiek van de keel is hiervoor ook bruikbaar en weliswaar minder invasief maar ook minder betrouwbaar. Als er bij endoscopie of op een röntgenfoto geen zichtbare afwijkingen zijn waar te nemen, sluit dit overigens droes als diagnose niet uit. Echografie is minder goed bruikbaar als 'vroeg-diagnosticum' maar kan bijvoorbeeld wel dienst bewijzen om te bepalen óf en op welke plek een gezwollen lymfeknoop het beste kan worden aangeprikt.

In het algemeen zijn beeldvormende technieken vooral beschikbaar op (verwijs)klinieken, terwijl monsternamen voor laboratoriumdiagnostiek ook prima kan worden uitgevoerd 'in het veld'. De keus welke anatomische locatie er wordt bemonsterd en welke monsternametechniek er wordt gebruikt, hangt onder andere af van de klinische presentatie en het stadium van het ziekteproces. Zoals eerder aangegeven is *S. equi* in de eerste 24-48 uren na het begin van de klinische symptomen (meestal koorts) nog niet aanwezig op de slijmvliezen. Monsternamen in deze periode kan dus een vals-negatief resultaat opleveren (Boyle et al., 2018). In het (sub)acute stadium ligt monsternamen van de voorste luchtwegen het meest voor de hand, terwijl in een later stadium monsternamen in de luchtzakken de beste resultaten geeft, zeker als er gezocht wordt naar eventuele dragers. Het nemen van een neusswab is relatief eenvoudig. Voor PCR diagnostiek wordt bij voorkeur gebruik gemaakt van een lange dikke neusswab met een kunststof kop omdat die meer materiaal kan opnemen en kunststof de bacteriën in de test ook weer beter los laat dan materiaal van katoen (Lindahl et al., 2013). Bacteriologisch medium kan in een PCR test verstoring geven, dient dit daarom alleen gebruikt te worden als een bacteriekweek wordt gevraagd. Nasopharyngeale spoelingen zijn beter dan neusswabs in staat om kleine hoeveelheden bacteriën op te pikken omdat er een groter oppervlak van de nasopharynx wordt bemonsterd (Lindahl et al., 2013). De techniek hoeft in principe niet ingewikkeld te zijn: een infuusslangetje met daarop gedraaid een nozzle van een IBR enting (Risposal®) voldoet bijvoorbeeld prima om de nasopharynxwand mooi 'af te douchen'. Het slangetje wordt opgeschoven tot ongeveer ooghoogte (± 40 cm bij een volwassen paard) waarna gespoeld wordt met circa 50 ml steriel water of fysiologische zoutoplossing. Bij voorkeur is het paard geseedeerd en gepraamd waardoor het hoofd laag gehouden wordt (sedatie is niet altijd nodig); de vloeistof die dan uit de neus stroomt, kan worden opgevangen in een nierbekken of een opvoelhandschoen en vervolgens verwerkt worden voor transport naar het laboratorium. Een luchtzakspoeling onder begeleiding van een 'gewone' endoscoop via het andere neusgat is gemakkelijker uit te voeren dan een luchtzakscopie omdat er geen speciale apparatuur (dunne endoscoop) en specifieke vaardigheid voor nodig is. Met bijvoorbeeld een runder urinecatheter, of een bijgebogen inseminatiepipet, kan dan vaak vrij gemakkelijk toegang tot de luchtzak worden verkregen waarna met 50 ml fysiologische zoutoplossing per luchtzak kan worden gespoeld. Eventueel is voor dierenartsen met veel ervaring in luchtzakspoelingen deze procedure ook 'blind' uit te voeren, maar 100 % zekerheid dat je daadwerkelijk in de luchtzak zit is er dan niet. Ook hierbij verdient sedatie en pramen de voorkeur, omdat het paard dan het hoofd laag houdt en makkelijker zal meewerken. Vooral als op een bedrijf een groot aantal dieren moet worden bemonsterd, bijvoorbeeld in het kader van screening, zal de tijdwinst t.o.v. een klassieke luchtzakscopie, waarvoor speciale apparatuur en enige handigheid zijn vereist een voordeel zijn. Een nadeel is dat als een paard bij deze spoeling positief blijkt te zijn, alsnog de luchtzak visueel zal moeten worden geïnspecteerd op de aanwezigheid van empyeem en/of chondroiden voordat de behandeling kan worden gestart. Daarbij moet het verkregen monster gezien worden als een verzamelmonster van luchtzak, pharynx en neusgangen.

Bij de laboratoriumdiagnostiek van droes moet enerzijds onderscheid worden gemaakt tussen het aantonen van het agens en/of antistoffen tegen het agens en anderzijds tussen het bevestigen van een klinische verdenking en het opsporen van dragers.

Kweek

De traditionele manier van agensdetectie is de bacteriologische kweek op Columbia CNA agar (bloedplaten met colistine en nalidixinezuur). *S. equi* groeit hierop als beta-haemolytische kolonies, maar dat geldt ook voor *S. zooepidemicus* en andere streptococci. Door middel van het inoculeren van een korte bonte rij met trehalose, lactose en sorbitol kunnen *S. equi*, *S. zooepidemicus* en *S. dysgalactiae* subspecies *equisimilis* worden gedifferentieerd (Boyle et al., 2018; Waller, 2014). Tegenwoordig kunnen kolonies veel sneller en goedkoper geïdentificeerd worden met behulp van Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Kudirkiene et al., 2015), maar daarvoor zal de kolonie eerst individueel op een plaat moeten groeien. Het nadeel van een bacteriekweek is dat het relatief lang duurt en tamelijk ongevoelig is. Volgens Lindahl et al. (2013) is de sensitiviteit voor verschillende monstertypen niet hoger dan 40%. Dit wordt met name veroorzaakt door het feit dat *S. zooepidemicus* veel sneller groeit dan *S. equi* en toxinen produceert die *S. equi* afdoden. Doorgebroken abscessen worden bijvoorbeeld snel gekoloniseerd en gedomineerd door *S. zooepidemicus* (Boyle, 2018). Aangezien beide subspecies bèta-hemolytische kolonies produceren en er slechts een beperkt aantal kolonies nader onderzocht kunnen worden door middel van een korte bonte rij of MALDI-TOF kan *S. equi* gemakkelijk worden gemist. Gezien de superieure diagnostische resultaten van de PCR wordt de kweek inmiddels door bijna iedereen niet meer als gouden standaard gezien (Boyle, 2018; Sweeney, 2005; Waller, 2014). Het voordeel van een kweek is dat bij een positieve uitslag het zeker is dat de bacteriën aanwezig zijn en nog virulent zijn en dat er een antibiogram (ABG) kan worden gedaan, al is dit voor *S. equi* doorgaans niet nodig.

PCR

De polymerase chain reaction (PCR) heeft inmiddels een belangrijke plaats verworven in de diagnostiek. De eerste PCR's voor het aantonen van *S. equi* waren gebaseerd op het aantonen van een deel van het *SeM* gen. Aangezien *S. zooepidemicus* een equivalent gen heeft (*SzM*) waarvan grote delen overeenkomen, kunnen bepaalde primers kruisreageren tussen beide subspecies (Boyle et al., 2018). Inmiddels zijn betere targets gevonden, bijvoorbeeld het voor *S. equi* specifieke *seeI* gen (Baverud et al., 2007). Webb et al. (2013) ontwikkelden en valideerden een zeer gevoelige en specifieke triplex qPCR (twee verschillende *S. equi* targets en een interne controle).

Real-time PCRs kunnen binnen enkele uren uitgevoerd worden en bleken in de Verenigde Staten ongeveer drie keer zo gevoelig te zijn als kweek (Boyle, 2011; Boyle et al., 2016; Boyle et al., 2018). In eerste instantie werd gedacht dat de PCR met name vaker positief scoorde dan de kweek omdat de PCR ook dode bacteriën aantoonde, maar dit blijkt geen terechte verklaring te zijn. Dode bacteriën/dode DNA blijkt niet lang te persisteren op slijmvliezen en daarom moet elke PCR positieve uitslag serieus genomen worden (Waller, 2014). Lindahl et al. (2013) vergeleken de diagnostische performance van kweek en real-time PCR op verschillende monstertypes tijdens een acute droesuitbraak. Hierbij bleek de kweek een significant lagere sensitiviteit te hebben dan de real-time PCR. De sensitiviteit van kweek was 37% voor neusswabs of nasopharyngeale swabs, terwijl de sensitiviteit van PCR voor neusswabs (53%) nasopharyngeale swabs (72%) en neusspoelingen (84%) duidelijk hoger bleek te zijn. Gronbaek et al. (2006) vonden ook in swabs van doorgebroken abscessen een veel hogere sensitiviteit van PCR (80%) dan van kweek (20%). Door het onderzoeken van een combinatie van neusspoeling en neusswab of nasopharyngeale swab met real-time PCR kon in meer dan 90% van de acute droes gevallen *S. equi* aangetoond worden (Boyle et al., 2018; Lindahl et al., 2013; Guidelines on Strangles Horserace Betting Levy Board 2017).

Na droesuitbraken blijkt gemiddeld 10% van de paarden drager geworden te zijn (Boyle et al., 2018; Newton et al., 2000; Newton et al., 1997). Tijdens enkele langdurige droesuitbraken rapporteerden Newton et al. (2000) dat 9 – 44% van de paarden *S. equi* drager was nadat de klinische verschijnselen waren verdwenen. In een recente retrospectieve studie (Duffee et al., 2015) waren 25/62 (40%) van de paarden meer dan 40 dagen na de aanvankelijke diagnose nog positief met kweek en/of PCR in neusspoelingen en/of luchtzakspoelingen. Paarden bleven gemiddeld 60 dagen positief. Een bruikbare definitie van dragerschap is de aanwezigheid van *S. equi* zes weken of langer na het verdwijnen van de klinische verschijnselen (Boyle et al., 2018). De gouden standaard voor het aantonen van dragers is endoscopisch onderzoek van beide luchtzakken in combinatie met onderzoek van luchtzakspoelingen door middel van real-time PCR, al dan niet in combinatie met kweek. Volgens de 'Guidelines on strangles' gepubliceerd door de Horserace Betting Levy Board is de combinatie van een beiderzijdse luchtzakspoeling en een nasopharyngeale swab de meest gevoelige methode om dragers aan te tonen en superieur aan drie nasopharyngeale swabs die met intervallen van een week genomen worden.

Samenvattend kan PCR gebruikt worden voor 1) het bevestigen van een klinische diagnose; 2) het detecteren van dragers; 3) het vaststellen of paarden infectieus zijn, vóór transport of na transport maar voordat ze in contact komen met nieuwe paarden; 4) het monitoren van de effectiviteit van behandeling van dragers (Sweeney et al., 2005).

Caveat: PCR is een zeer gevoelige methode en daarom moet veel aandacht besteed worden aan het voorkomen van kruiscontaminatie. Bij het stellen van een bedrijfsdiagnose speelt dit een minder grote rol, maar bij onderzoek van individuele paarden en met name bij onderzoek op dragerschap moet veel aandacht worden besteed aan het schoonmaken en desinfecteren van endoscopen, het gebruik van pipetten (lieftst disposable) en nieuwe handschoenen voor elk paard. Het is niet voldoende om de bacteriën te inactiveren, het bacteriële DNA moet bijna volledig zijn afgebroken om niet meer detecteerbaar te zijn met PCR. Met name chloorverbindingen (hypochloriet) kunnen het DNA goed afbreken, zie ook Champlot et al. (2010).

Serologie

Het aantonen van antistoffen is met name nuttig voor het aantonen van recente infecties (antistoffen zijn aanwezig vanaf twee weken na infectie) en om bedrijven en populaties te screenen op symptoomloze dragers. Droesinfecties kunnen subklinisch of atypisch verlopen, in deze gevallen geeft het aantonen van antistoffen inzicht of de betreffende paarden al dan niet de infectie doorgemaakt hebben. Bij paarden die geen drager worden, het overgrote deel van de paarden dus, zullen de aantoonbare antistoffen na ongeveer 6 maanden verdwenen zijn. Dragere blijven langdurig seropositief omdat ze intermitterend hun immuunsysteem stimuleren (Boyle et al., 2018; Waller, 2014).

Zoals eerder vermeld zijn *S. equi* en *S. zooepidemicus* zeer nauw verwant. SeM is een immuundominant eiwit van *S. equi* en wordt daarom vaak in serologische testen gebruikt, maar *S. zooepidemicus* heeft een soortgelijk eiwit (SzM) waarvan grote delen hetzelfde zijn. Omdat veel paarden besmet zijn met *S. zooepidemicus* en een deel van de antistoffen kruisreageert, hebben serologische droestesten die gebaseerd zijn op het hele SeM eiwit een betrekkelijk lage specificiteit van bijvoorbeeld 75% (Robinson et al., 2013; Velineni et al., 2015). In de Verenigde Staten en ook in Europa zijn dergelijke testen commercieel beschikbaar of kunnen sera naar commerciële labs gestuurd worden voor het onderzoeken op antistoffen tegen het SeM eiwit van *S. equi*.

In de Verenigde Staten worden met name titerbepalingen aangeboden voor een aantal toepassingen (Boyle et al., 2018):

- Een significante titerstijging in gepaarde sera is een bewijs voor een recente infectie;
- Om een verdenking op morbus maculosus of verslagen droes te bevestigen (titer > 1:12800);

- Om paarden met relatief hoge titers (>1:3200) te identificeren (paarden met een sterke antilichaamrespons tegen *S. equi* lijken gepredisponeerd voor morbus maculosus en daarom is het advies daar om paarden met een relatief hoge titer niet te vaccineren met de in de Verenigde Staten geregistreerde vaccins (Boyle et al., 2018).

Sequencing van het hele genoom van *S. equi* en *S. zooepidemicus* (Holden et al., 2009) heeft onder meer geleid tot het identificeren van genen en delen van genen die echt specifiek zijn voor *S. equi* (Robinson et al., 2013; Velineni et al., 2015; Waller, 2014). Op basis van deze informatie zijn onderzoekers van de Animal Health Trust (Newmarket, UK) erin geslaagd een gevoelige en specifieke ELISA te maken. In deze test wordt gebruik gemaakt van een deel van het SeM eiwit (antigeen A) en van een ander eiwit SEQ2190 (antigeen C). De test is positief als er antistoffen tegen één van beide of beide antigenen worden aangetoond en heeft een gevoeligheid en specificiteit van respectievelijk 93.3% en 99.3% (Robinson et al., 2013).

Management van uitbraken

Bij de verdenking op een uitbraak van droes moet zo snel mogelijk een gedetailleerde anamnese worden afgenomen bij de stalmanager, eigenaren en verzorgers. Met name het inkomend en uitgaand verkeer van paarden, het stalmanagement en de eventuele droesvaccinatie historie zijn daarbij van belang. Vervolgens moet met de betrokkenen een goed gesprek worden gevoerd of en hoe men het probleem wil aanpakken. In dit gesprek moeten de diverse opties en de bijbehorende kosten zorgvuldig worden doorgenomen. De 'juiste' aanpak kan per bedrijf en per eigenaar sterk verschillen en loopt van alleen het 'bedrijf sluiten' tot een uitgebreide aanpak om het bedrijf 'droes-vrij' te maken. Ook is het raadzaam om na te denken hoe de infectie is begonnen/ontstaan. Dit kan zijn doordat een nieuw paard de infectie heeft meegebracht óf doordat een nieuw paard de infectie oppikt en dus de 'verklikker' is voor de aanwezigheid van drager(s). Als de eigenaar er voor kiest om een infectie zo snel mogelijk uit te bannen, is het van belang besmette paarden en eventuele dragers zo snel mogelijk te identificeren en indien mogelijk te isoleren.

De belangrijkste maatregelen bij een droes uitbraak (Boyle et al., 2018; Waller, 2013, 2014 <http://www.aht.org.uk/skins/Default/pdfs/steps.pdf>):

1. Paarden die verdacht zijn van droes moeten onmiddellijk geïsoleerd worden om het risico op overdracht naar andere paarden in te perken. Helaas is dit niet altijd mogelijk. Het is belangrijk om dan goed in te schatten in hoeverre de besmetting al over het hele bedrijf verspreid is. Als de besmetting nog gelokaliseerd lijkt moeten er andere keuzes worden gemaakt dan wanneer vermoedelijk het grootste gedeelte van de paarden op het bedrijf al besmet is.
2. Neem neusswabs/neusspoelingen van 1 of meerdere paarden en laat die testen op *S. equi* met PCR. Neem de monsters niet bij paarden die nog te vroeg in het ziekteverloop zitten (dus pas 1-2 dagen na begin koorts/andere symptomen die bij droes passen) en overweeg indien de kosten een probleem zijn om gepoolde monsters te laten testen met maximaal drie monsters per gepoold monster (drie buisjes samen in leveren, dus niet met 1 swab drie paarden doen!).
3. Stel na bevestiging van de diagnose naburige paardenbedrijven/paardenhouders op de hoogte.
4. Creëer zo mogelijk drie groepen (rood, oranje, groen), ook al is er nauwelijks ruimte om de groepen fysiek te scheiden. Het vermijden van neus-neus contact tussen de groepen is al een belangrijke maatregel! De rode groep zijn de klinisch verdachte en bevestigde dieren, de oranje groep zijn de dieren die direct of indirect contact gehad hebben met paarden uit de rode groep en zich nu in de incubatietijd kunnen bevinden, de groene groep zijn de paarden die geen direct of indirect contact gehad hebben met paarden uit de rode groep.
5. Stop onmiddellijk alle paardenbewegingen van en naar het bedrijf. Paarden kunnen tot zes weken na het stoppen van de neus/oog/abces uitvloeiing infectieus zijn. Het bedrijf

moet minstens vier weken (bij voorkeur zes weken) gesloten blijven nadat de laatste klinische verschijnselen zijn verdwenen. Deze periode kan verkort worden indien alle paarden met klinische symptomen negatief getest zijn of de uitbraak beperkt blijft tot enkele indexdieren die klaarblijkelijk effectief geïsoleerd zijn, gezien het ontbreken van klinische verschijnselen bij de rest van de paarden.

6. Overweeg vaccinatie. Als daar voor wordt gekozen kunnen de paarden in de groene groep meteen worden gevaccineerd. Als deze paarden in de laatste 6 maanden gevaccineerd waren, is één herhalingsvaccinatie voldoende voor snelle bescherming. Als de dieren niet eerder waren gevaccineerd moet een basisvaccinatie worden gegeven (twee vaccinaties met 4 weken ertussen) waarbij er 2 weken na voltooiing daarvan, immuniteit is opgebouwd.
7. Neem tweemaal daags de rectale temperatuur van alle paarden in de oranje en groene groep op, en verplaats paarden met koorts onmiddellijk naar de rode groep; als er gekozen wordt om bepaalde paarden te behandelen met antibiotica moet nóg een aparte groep worden gecreëerd omdat de paarden die worden behandeld niet aan de infectiedruk in de rode groep moeten worden blootgesteld.
8. Gebruik kleurcoderingen (gekleurde tape bijvoorbeeld) voor emmers en andere gebruiksmiddelen zodat het duidelijk is wat bij welke groep hoort. Er mag niets tussen de groepen gedeeld worden en water- en voeremmers moeten dagelijks gereinigd en gedesinfecteerd worden.
9. Laat als het mogelijk is iedere groep door ander personeel verzorgen. Als dat niet mogelijk is werk dan van groen naar oranje naar rood.
10. Besteed voldoende tijd aan communicatie, zorg ervoor dat één dierenarts samen met de staleigenaar of beheerder de leiding neemt, zeker op bedrijven waar meerdere eigenaren en dierenartsen komen.
11. Het eventueel testen op dragerschap moet niet eerder dan 6-8 weken na het oplossen van de klinische verschijnselen beginnen. Hierbij kan overwogen worden alle paarden in de oranje en groene groepen eerst serologisch te screenen. Alleen de seropositieve paarden hoeven vervolgens verder onderzocht te worden op dragerschap.

Behandeling van paarden met klinische droes

De meeste paarden herstellen van droes met ondersteuning in de vorm van managementmaatregelen (zacht krachtvoer en ruwvoer, voldoende vers drinkwater uit eigen drinkbak, een schone goed geventileerde stal of verplaatsen naar de wei als de weersomstandigheden dit toelaten). Paarden met hoge koorts kunnen, mits niet gedehydriseerd, baat hebben bij gebruik van NSAID's zoals meloxicam, vedaprofen of flunixin meglumine. Als een abces rijp is maar nog niet doorbreekt, maar het paard er wel echt last van heeft c.q. benauwd wordt, kan chirurgische drainage (evt. onder echobegeleiding) en vervolgens spoelen met een verdunde chloorhexidine oplossing uitkomst bieden. Smeren van de gezwollen lymfeknopen met trekzalf is een obsoleete therapie, met of zonder deze bijzonder huidirriterende en pijnlijke behandeling zal doorbreken doorgaans ongeveer 2-3 weken duren.

Bij droes is een antibioticumtherapie geen eerste keus. Slechts als er sprake is van complicaties zoals metastatische abcessen, of na tracheotomie of eventueel bij acuut ernstig zieke dieren die nog geen lymfeknooppzwelling hebben, is gebruik van antibiotica geïndiceerd. Paarden die in contact zijn geweest en een eerste koortspiek ontwikkelen kunnen eventueel met penicilline behandeld worden, maar door het gebruik van antibiotica wordt er een minder goede immuniteit opgebouwd waardoor paarden alsnog gevoelig zijn voor herinfectie. Daarnaast kunnen reeds aanwezige abcessen niet verder rijpen en na het stoppen van de antibiotica kunnen deze alsnog, vertraagd, weer opkomen (Sweeney et al., 2005). Er is overigens geen bewijs dat gebruik van antibioticum in het acute stadium van een droesinfectie meer kans op verslagen droes zou geven (Duffee et al., 2015; Ramey, 2007).

S. equi is goed gevoelig voor alle soorten antibiotica met uitzondering van aminoglycosides zoals gentamicine. Daarnaast heeft enrofloxacin een verminderde werkzaamheid

(Formularium Paard 2011). Eerste keus in geval van droes is procaïne-benzylpenicilline, andere keuzes kunnen eventueel naar voren komen uit een gevoeligheidstest, of doordat toediening van procaïne-benzylpenicilline op onoverkomelijke problemen stuit (formularium 2016). Hoewel een antibiogram over het algemeen een goede gevoeligheid ten opzichte van TMPS aangeeft, blijkt deze medicatie in vitro in geval van streptococce infecties niet zo'n succes, waarschijnlijk doordat de werking geremd wordt in een purulent proces (Ensink et al., 2005; Ensink et al., 2003; Mallicote, 2015).

In geval van purpura hemorrhagica is de therapie corticosteroïden. Meestal is dit dexamethason (0,04-0,2 mg/kg intramusculair of intraveneus, voor 9 uur 's ochtends) gedurende een langere periode (2-4 weken) in een op effect afbouwend regime. Indien nodig wordt dit gedaan in combinatie met penicilline i.m. Afspuiten en in milde gevallen vroegtijdig bandageren van de benen om oedeem te verminderen is een goede ondersteunende maatregel. Als de benen al te zeer gezwollen zijn, wordt bandageren afgeraden omdat er in dit geval drukplekken door zouden kunnen ontstaan. Als er nog sprake is van een actieve bacteriële infectie of eventueel andere complicerende factoren, kan toediening van antibiotica en eventueel infuustherapie overwogen worden.

Behandeling van dragers

Identificatie en (succesvolle) behandeling van *S. equi* dragers is effectief bij het uitbannen van een hardnekkige droesinfectie op een bedrijf (Boyle et al., 2018). De meeste paarden ruimen een infectie met *S. equi* op binnen 2-3 weken na herstel van de klinische symptomen zelf op. Een deel van de paarden doet hier weliswaar langer over, maar is toch in staat de bacterie binnen 4-6 weken zelf te elimineren (Mallicote, 2015). Circa 10 % van de paarden lukt dat niet binnen deze termijn, zij worden beschouwd als dragers (Mallicote, 2015). Het heeft daarom geen zin eerder dan 6 weken na een uitbraak op zoek te gaan naar eventuele dragers.

Als dragerschap is aangetoond is het belangrijk voor de keuze van de behandeling dat de luchtzakken visueel geïnspecteerd zijn. Is er sprake van empyeem of chondroïden dan moeten de luchtzakken, voordat er medicamenteus behandeld wordt, eerst schoon worden. Dit kan conservatief via de luchtzakopeningen in de pharynx door middel van spoelen met fysiologisch zout, eventueel gecombineerd met 20 % acetylcysteïne (vermindert de viscositeit van pus). In geval van grotere chondroïden kan gebruik van een 'retrieval basket' via het werkkanaal van de endoscoop soms uitkomst bieden. Soms lukt het op deze manier niet de chondroïden te verwijderen en moet chirurgisch worden ingegrepen.

Als de luchtzak optisch schoon is kan gepoogd worden de luchtzakken vrij te maken van *S. equi* door overvloedig te spoelen met een fysiologisch zout oplossing (controle luchtzakspoeling met PCR na 14 dagen) of kan direct lokaal een penicillinegel (géén procaïne penicilline) achter worden gelaten:

- Verwarm 2 gram gelatine ($\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ blaadje gelatine) met 40 ml steriel water tot de gelatine oplost en koel dit af tot ± 40 °C.
- Los 10.000.000 IE Na-penicilline op met 10 ml steriel water.
- Meng de beide oplossingen, zuig op in een spuit en laat het (meerdere uren) afkoelen bij circa 4 °C.
- Breng de gel onder endoscopiebegeleiding aan in de luchtzak (onder sedatie).
- Laat het paard circa 20 minuten met hoofd boven boeghoogte staan tot de sedatie is uitgewerkt om teruglopen te voorkomen.

Caveat: het is belangrijk dat het paard de gel niet inslikt, want dat kan leiden tot een flinke dysbacteriose met bijbehorende complicaties.

In hardnekkige gevallen kan herhalen van deze procedure nodig zijn. Sommige auteurs combineren deze lokale therapie in dat geval ook nog met parenteraal (procaïne)penicilline (20.000-40.0000 IE/kg IM 1 dd 7-14 dagen). N.B.: De luchtzak niet met jodium spoelen, dit kan zelfs in lage concentraties neurologische schade geven! Controle kan na circa 2 weken

plaatsvinden door middel van PCR en/of kweek op een luchtzakspoelsel (Boyle et al., 2018; Kendall et al., 2016; Waller, 2014).

Als een conservatieve aanpak geen succes sorteert, bijvoorbeeld in geval van uitgebreide chondroïdvorming en/of ingedroogde pus, is een chirurgische aanpak (drainage via de Viborgse driehoek) ook nog een mogelijkheid (Smyth et al., 1999). Dit brengt uiteraard wel risico's met zich mee t.a.v. beschadiging van zenuwen en bloedvaten in het chirurgisch gebied (Waller, 2014).

Reiniging en desinfectie

Bij een uitbraak van droes is hygiëne van groot belang. De verspreiding gaat behalve via direct contact tussen paarden ook via handen, emmers en gereedschappen. Dit betekent indien mogelijk: besmette paarden isoleren in een aparte stal-unit en bij reinigen geen hogedrukspuit gebruiken (aërosolen kunnen juist voor verspreiding zorgen) als er nog andere paarden in de nabijheid zijn. Let er ook op geen gebruiksvorwerpen van de ene naar de andere unit mee te nemen. Bij de persoonlijke hygiëne is met name goed de handen wassen essentieel. Daarnaast is ook wisselen van kleding aan te bevelen.

De volgende tips gelden voor een correcte stalreiniging en desinfectie:

- Alle bodembedekking (stro, zaagsel of vlas) verwijderen en zo snel mogelijk van het bedrijf afvoeren.
- Bodem en muren goed huishoudelijk reinigen door schrobben met water en zeep (geen hogedrukspuit gebruiken voor het schoonmaken omdat de bacterie zich dan via kleine waterdruppeltjes in de lucht kan verspreiden).
- Bodem en muren goed laten opdrogen (bacteriën kunnen slecht tegen uitdrogen).
- Vervolgens desinfecteren met Halamid®, Safe4®, Virkon S® of een ander geschikt desinfectans in de voor bacteriën voorgeschreven concentratie en dit 20 minuten lang laten inwerken.
- Daarna goed afspoelen met water.
- Tot besluit heel goed laten drogen.

Consultatie/verwijzing

In de meeste gevallen van klinische droes is het niet nodig en ook niet gewenst een patiënt naar een kliniek te verwijzen. De meeste paardenklinieken hebben slechts beperkt isolatiemogelijkheden en willen dus alleen gevallen opnemen waar specialistisch ingrijpen nodig is. Slechts bij ernstige gevallen, waarbij bijvoorbeeld door het ontstaan van benauwdheid (mogelijk) ingrijpen middels een tracheotomie noodzakelijk wordt of bij complicaties als verslagen droes of morbus maculosus kan verwijzing naar een (specialistische) kliniek raadzaam zijn. Het behandelen van dragers is afhankelijk van de ernst van de pathologie in de luchtzakken (weinig zichtbare afwijkingen, empyeem, chondroïden). Afhankelijk van de bevindingen kan overleg met dan wel verwijzing naar een specialist raadzaam zijn.

Prognose

De meeste paarden herstellen volledig van een droesinfectie en zijn 4-6 weken na verdwijnen van de klinische symptomen niet meer infectieus. In gevoelige populaties (bijvoorbeeld jonge dieren met nog weinig weerstand) wordt een mortaliteitspercentage van 8-10 % gemeld, terwijl dit onder volwassen dieren < 1 % is ([https://www.vetstream.com/treat/equis/diseases/strangles-\(streptococcus-equi-infection\)](https://www.vetstream.com/treat/equis/diseases/strangles-(streptococcus-equi-infection))). Gemiddeld 10 % van de geïnfecteerde paarden wordt drager waarbij de bacteriën in de luchtzakken aanwezig blijven en intermitterend worden uitgescheiden. Deze dragers vormen daarmee een risicofactor voor nieuwe uitbraken in de groep, bijvoorbeeld na de introductie van nieuwe paarden die nog geen immuniteit hebben opgebouwd. Verslagen droes is een serieuze complicatie, meldingen van sterftepercentage in deze patiëntgroep lopen uiteen van circa 10 % (Ford and Lokai, 1980; Sweeney et al., 1987) tot 70 % (Spoormakers, 2010), maar het gaat hierbij om geïsoleerde uitbraken in kleinere groepen dieren die door de

onderzoekers gevolgd zijn. Berlin et al. (2013) beschrijven 4 succesvol verlopen gevallen van verslagen droes in de buikholte die behandeld zijn met penicilline, NSAID's en infuus. De gemiddelde duur van de behandeling was hier 35 dagen (variërend van 32 tot 50 dagen). Voor morbus maculosus geldt dat de prognose afhangt van de mate waarin interne organen betrokken zijn geraakt, hoe uitgebreid er eventuele necrose van de huid is opgetreden en hoe snel en adequaat er een therapie is ingesteld (Pusterla et al., 2003).

Preventie en isolatie

Per bedrijf zal een kosten-baten analyse gemaakt moet worden wat een haalbare en wenselijke benadering is. Dit zal mede afhangen van eerdere ervaringen met droesuitbraken, de bedrijfsstructuur en bedrijfsgrootte, de frequentie waarmee nieuwe paarden op het bedrijf aankomen, de seroprevalentie in de populatie en de quarantainemogelijkheden.

Voor bedrijven waar niet al te veel wisselingen in het paardenbestand plaatsvinden, vallen een isolatiefaciliteit voor nieuwe paarden en quarantainefaciliteit voor zieke paarden te overwegen. Isolatie van nieuwe paarden kan bijdragen aan de preventie van allerlei infectieziekten, niet alleen droes. Nieuwe paarden moeten bij voorkeur tenminste drie weken in isolatie staan, dagelijks worden geobserveerd en getemperatuurd en aan het begin en aan het eind van de quarantaine periode worden onderzocht op antistoffen tegen droes. Paarden die seronegatief zijn bij binnenkomst kunnen immers in de incubatietijd zitten en in de loop van drie weken alsnog antistoffen ontwikkelen (en de bacterie uitscheiden). Seropositieve paarden moeten verder onderzocht worden op dragerschap en mogen pas bij negatief resultaat toegevoegd worden aan de koppel (Boyle et al., 2018; Waller, 2013, 2014). Voor matig- en hoog risico bedrijven is het zinvol om vaccinatie als extra controlestrategie te overwegen.

Vaccinatie

Paarden behoren tot de diersoorten waarmee wereldwijd het meest wordt gereisd en vaccinatie zou een belangrijke rol kunnen spelen bij het beschermen van paarden tegen *S. equi* infecties tijdens het deelnemen aan allerlei evenementen. Het ideale droes vaccin moet beschermen tegen de op dit moment circulerende *S. equi* stammen, een langdurige immuniteit opwekken, zonder lokale of systemische bijwerkingen en DIVA eigenschappen bezitten zodat er onderscheid kan worden gemaakt tussen DNA/antistoffen na een droesinfectie en na vaccinatie. Als dit onderscheid mogelijk is, zouden gevaccineerde paarden zich enerzijds zonder restricties kunnen bewegen en kan anderzijds tijdens droesuitbraken de effectiviteit van vaccinatie veel beter worden gemeten (blootstelling versus klinische bescherming).

Er zijn geen publicaties waaruit blijkt dat vaccinatie tijdens een uitbraak schadelijke effecten heeft. Paarden met verschijnselen van droes moeten uiteraard niet gevaccineerd worden. Gedurende een uitbraak kunnen eventueel alleen paarden die geen direct of indirect contact gehad hebben met besmette of blootgestelde paarden gevaccineerd worden mits ze in de afgelopen zes maanden voor het laatst tegen droes gevaccineerd zijn. Er moet namelijk rekening mee worden gehouden dat het opwekken van immuniteit na een basisvaccinatie twee weken duurt (in geval van een booster gebeurt dit veel sneller). Strikte hygiëne dient in acht genomen te worden om het risico te beperken dat het wild type *S. equi* naar andere paarden verspreid wordt tijdens het vaccineren (Sweeney et al., 2005).

Levende geattenueerde vaccins

Op dit moment is er in Nederland één droesvaccin geregistreerd én beschikbaar: Equilis StrepE (MSD Animal Health). De basisimmunisatie bestaat uit twee vaccinaties met een interval van vier weken. Het vaccin moet worden toegediend aan de binnenzijde van de bovenlip. Op hoog-risico bedrijven is het verstandig om elke drie maanden te booster om de immuniteit op peil te houden. Op bedrijven met een matig risico kan een herhalingsvaccinatie elke 6 maanden volstaan, omdat de memory respons zes maanden behouden blijft. In het laatste geval volstaat een boostervaccinatie in geval van een

droesuitbraak om opnieuw snel immuniteit op te wekken. Het vaccin lijkt veilig voor gebruik bij drachtige merries, maar is hiervoor niet geregistreerd.

Equilis StrepE is een levend geattenuëerd *aroA* deletie mutant, gebaseerd op een Nederlands droesisolaat uit 1990 (Jacobs et al., 2000; Kelly et al., 2006). Na intramusculaire toediening bleek dit vaccin op twee weken na twee vaccinaties met een interval van vier weken volledig te beschermen tegen challenge, maar er traden onacceptabele lokale reacties op met abscessen op de injectieplaatsen. Submucosale toediening aan de binnenzijde van de bovenlip bleek significant te beschermen tegen challenge twee weken na twee vaccinaties met een interval van vier weken en deze toedieningsvorm had geen noemenswaardige bijwerkingen (kleine pustulae op de injectieplaats die binnen twee weken verdwenen). Sinds de introductie van het vaccin zijn er enkele publicaties verschenen. In een grote studie van Reinhold en Venner (2010), waarbij 224 drachtige merries elke drie maanden gevaccineerd werden, werden noch verschijnselen van droes noch lokale of systemische bijwerkingen gevonden. Kelly et al. (2006) ontwikkelden methoden om te differentiëren tussen de Equilis StrepE vaccinstam en *S. equi* veldstammen en vonden in 15 gevallen van droes kort na vaccinatie in alle monsters van geabcedeerde lymfeknopen uitsluitend veldstammen terug. De vaccinstam werd alleen teruggevonden in pustulae op de injectieplaats. Kemp-Symonds et al. (2007) rapporteerden twee gevallen waarin uit abscessen wel de vaccinstam werd aangetoond, maar in het eerste geval was er, terwijl dit door de fabrikant ontraden wordt, sprake van gelijktijdige intramusculaire vaccinatie tegen influenza en in het andere geval was het betreffende paard ziek (persisterende diarree) ten tijde van de vaccinatie.

Deze incidenten illustreren dat dierenartsen zich ervan bewust moeten zijn dat wanneer bij paarden met een matig tot hoog droesrisico worden besloten om te gaan vaccineren, daarmee ook een verhoogde kans bestaat op gelijktijdige infectie met wild type *S. equi* op het moment van vaccineren (Newton et al., 2005). Aangezien dit vaccin een levend klassiek geattenuëerde *S. equi* stam bevat, is het geen DIVA vaccin. Dat wil zeggen dat de diagnostische qPCRs en ELISAs die eerder beschreven zijn geen onderscheid maken tussen (antistoffen tegen) vaccinstam en veldstammen. Op bedrijven zonder klinische droes verschijnselen waar een deel van de paarden 4-5 maanden geleden was gevaccineerd, was 49% (27/55) van de paarden positief in de ELISA ontwikkeld door de Animal Health Trust, terwijl 0% (0/21) van de ongevaccineerde paarden positief was (Newton en Picavet, niet gepubliceerde data). Dit kan repercussies hebben bij het opsporen van dragers in die zin dat wanneer er gevaccineerd is veel meer paarden seropositief kunnen zijn en vervolgonderzoek nodig hebben met luchtzakspoelingen of sequentiële swabs om dragerschap uit te sluiten of te bevestigen. Om dit te voorkomen kan overwogen worden om bloedmonsters te nemen alvorens te vaccineren en deze te laten onderzoeken op antistoffen tegen *S. equi*.

Een tweede levend geattenuëerde vaccinstam is Pinnacle IN (Zoetis). Dit vaccin moet intranasaal worden toegediend, maar is niet beschikbaar noch geregistreerd in Europa. Het vaccin is gebaseerd op een stam die geïsoleerd is in New York in 1981 en is chemisch geattenuëerd. Ook dit vaccin heeft geen DIVA eigenschappen. In Nieuw Zeeland zijn droesverschijnselen veroorzaakt door de vaccinstam van Pinnacle IN gerapporteerd (Cursons et al., 2015; Livengood et al., 2016). De intranasale vaccinatie met Pinnacle moet niet gecombineerd worden met andere vaccinaties noch met andere invasieve procedures zoals gewrichtsinjecties, gebitsbehandelingen en castraties. Ook moet dit vaccin niet gebruikt worden tijdens een uitbraak, tenzij de paarden geen direct of indirect contact hebben gehad met besmette paarden (Boyle et al., 2018).

Robinson et al. (2015) onderzochten een levend geattenuëerd vaccin waarin deleties in zes verschillende genen waren aangebracht. Het vaccin gaf zeven weken na twee vaccinaties met acht weken interval een uitstekende bescherming, maar meer dan de helft van de dieren ontwikkelde onacceptabele lokale reacties (abscessen op de injectieplaats).

Afgedode en celwand extract vaccins

Het eerste door hitte afgedode vaccin tegen droes werd ontwikkeld door Bazeley in Australië in de veertiger jaren van de vorige eeuw. Het vaccin werd subcutaan toegediend en beschermd tegen droes, maar er werden vaak vrij ernstige bijwerkingen op de injectieplaats en koorts geconstateerd. Bazeley onderzocht ook met formaline afgedode droesvaccins en eiwitextracten, maar kon hiervan geen bescherming aantonen. In sommige delen van de wereld zijn er nog celvrije versies van dit vaccin, celwandextracten die overwegend SeM bevatten, beschikbaar (Equivac S®– Zoetis, Strepguard® MSD Animal Health, Strepvax II® Boehringer Ingelheim) (Waller, 2014). Er zijn niet veel data over de effectiviteit van deze vaccins beschikbaar in het publieke domein. Volgens Boyle et al. (2018) komen plaatselijke reacties zoals abscessen op de injectieplaats en soms gevallen van morbus maculosus voor. Hoffman et al. (1991) publiceerden een studie in veulens op een opfokbedrijf waarbij significante bescherming optrad twee weken na de derde vaccinatie. Vier weken later was er echter al geen significante bescherming meer terwijl 30-40% van de veulens lokale vaccinatie-reacties lieten zien. Ook Jorm (1990) kon op bedrijfsniveau geen significante effect van het gebruik van een SeM vaccin op het wel of niet optreden van een droesuitbraak aantonen. Jacobs et al. (2000) onderzochten geïnactiveerde vaccins op basis van gezuiverd SeM eiwit of intacte bacterie cellen in een vaccinatie-challenge experiment en konden twee weken na twee intramusculaire vaccinaties (interval 6 weken) geen bescherming aantonen.

Subunit vaccins

Subunit vaccins zijn gebaseerd op recombinante *S. equi* eiwitten die in *E. coli* stammen geproduceerd worden. Momenteel is er nog geen commercieel beschikbaar subunit vaccin tegen droes. Subunit vaccins zijn over het algemeen zeer veilig en kunnen als DIVA vaccin worden ontwikkeld door de antigenen die in de diagnostische testen worden gebruikt (antigeen A en C bijvoorbeeld) niet in het vaccin op te nemen. Ook bevatten deze vaccins geen DNA, dus PCRs zullen na vaccinatie altijd negatief scoren en dus bruikbaar blijven om veldinfectie aan te tonen. De belangrijkste uitdaging is uiteraard om een combinatie van eiwitten te vinden die voldoende bescherming opwekt. Een combinatie van zeven *S. equi* oppervlakte en secretoire eiwitten, Septavac® nu bekend als Strangvac®, beschermd 2 weken na de derde vaccinatie 6/7 pony's tegen experimentele challenge (Guss et al., 2009). Recent werden goede veiligheid en effectiviteit gerapporteerd van een nieuwe versie van Strangvac® op basis van 8 verschillende eiwitten na experimentele challenge twee weken na twee of drie vaccinaties (Robinson et al., 2018). Er zijn echter nog geen gegevens gepubliceerd over de immuniteitsduur. Ook is er geen zicht op of en op welke termijn dit vaccin ook commercieel beschikbaar komt.

Vaccineren als onderdeel van een plan van aanpak

Voor geen van de bestaande vaccins zijn gepubliceerde data beschikbaar waaruit blijkt dat de immuniteitsduur langer is dan enkele maanden. Het bereiken van een immuniteitsduur van 6 maanden of langer is een uitdaging. MSD Animal Health adviseert om Equilis StrepE® na de basisimmunisatie (twee vaccinaties met een interval van vier weken) elke drie maanden toe te dienen om de immuniteit op peil te houden. Een memory respons blijft zes maanden behouden; een boostervaccinatie na 6 maanden wekt dus opnieuw snel immuniteit op. Er zijn nog geen vaccins met DIVA eigenschappen op de markt. De kosten en baten van vaccinatie moeten daarom zorgvuldig worden afgewogen ten opzichte van de kosten en baten van het opsporen en behandelen van dragers. De aard van het bedrijf (opfok, manage, pensionstal, handelsstal etc.), de contactstructuur binnen het bedrijf en de aard en intensiteit van de paardenbewegingen van en naar het bedrijf spelen hierbij ook een belangrijke rol. Voor hoogrisicobedrijven, bijvoorbeeld opfokbedrijven, kan vaccinatie significant bijdragen aan vermindering van de klinische symptomen. Hiertoe zou de basisvaccinatie bij voorkeur minstens twee weken voor aankomst op het opfokbedrijf afgerond moeten zijn. Daarnaast moet vaccinatie gecombineerd worden met goed management, waarbij aspecten zoals groepssamenstelling en groepsgrootte,

bezettingsgraad, ventilatie, andere vaccinaties en ontwormen een belangrijke rol spelen. Per bedrijf moet een plan van aanpak gemaakt worden, inclusief kostenbaten analyse welke benadering en combinatie van maatregelen de voorkeur verdient en haalbaar is: systematisch vaccineren al dan niet in combinatie met detecteren en behandelen van dragers, het in quarantaine houden en onderzoeken van nieuwe paarden. Daarbij moet ook het doel helder zijn: ofwel het vrij worden en blijven van droes ofwel het beheersbaar houden van een eventuele droes problematiek. In alle scenario's moet, wanneer er zich onverhoopt een droes uitbraak voordoet een helder protocol gevolgd worden conform de eerder beschreven STEPS benadering om de uitbraak zo veel en snel mogelijk in te perken.

Biosecurity

Het voorkómen van blootstelling is nog altijd de beste methode om *S. equi* infecties te voorkomen. Goede biosecurity maatregelen, waarover hierna meer, bestaan onder andere uit het gedurende drie weken isoleren, observeren en testen van alle nieuwe paarden, het regelmatig reinigen en desinfecteren van alle potentieel besmette gebruiksartikelen, goede hygiënemaatregelen en het voorlichten/scholen van alle verzorgers met betrekking tot nut en noodzaak van basale biosecurity maatregelen.

De basisprincipes van biosecurity berusten op scheiding (schoon versus vuil), reiniging en desinfectie. Er zijn een aantal simpele stappen die men altijd kan nemen om het risico op blootstelling en besmetting te reduceren wanneer men deelneemt aan evenementen, wedstrijden en andere activiteiten waarbij meerdere paarden samenkomen:

- Gebruik altijd je eigen voer en water emmers en deel die niet met andere paarden.
- Vermijd neus-neus contact met vreemde paarden.
- Als je een ander paard aanraakt, was dan je handen voordat je je eigen paard weer aanraakt.
- Maak er op stal een gewoonte van dat alle paarden hun eigen set gebruiksmaterialen hebben.
- Als je van het ene paardenbedrijf naar het andere gaat, maak er dan een gewoonte van om simpele hygiënemaatregelen zoals het wassen van de handen, het desinfecteren van laarzen/schoeisel en eventueel schone overkleding/stofjas standaard door te voeren (of gebruik te maken van bedrijfskleding).
- Alle nieuwe paarden zouden eerst drie weken in isolatie geplaatst moeten worden, deze periode biedt voldoende tijd om eventuele ziekteverschijnselen tijdig te herkennen en tevens kan er bij het begin en einde van de quarantaineperiode getest worden op antistoffen tegen droes.
- Registreer alle paarden die het bedrijf betreden en verlaten.

Droesvrij/droes onverdacht certificering

In Schotland is er enkele jaren geleden een zogenaamd 'Premium Assured Strangles Scheme' opgezet, wat inmiddels in Nederland navolging gekregen heeft. Een bedrijf kan overwegen om deel te nemen aan een droesvrij/droes onverdacht certificeringsprogramma. Met name voor bedrijven met een stabiele paardenpopulatie (weinig nieuwe paarden) en dierenartsenpraktijken met een stabiele populatie eigen paarden kan het aantrekkelijk zijn. Een dergelijk programma ziet er in het kort als volgt uit:

- Alle paarden op het bedrijf worden eerst serologisch gescreend, waarna de seropositieve paarden op dragerschap worden onderzocht.
- Eventueel aanwezige dragers worden behandeld en gecontroleerd.
- Nieuw binnenkomende paarden worden eerst serologisch getest voordat ze in contact mogen komen met de reeds aanwezige paarden.
- De eigenaar/beheerder committeert zich aan een plan van aanpak, mocht er zich een droesuitbraak voordoen en aan een aantal basale biosecurity maatregelen op het bedrijf en bij het bezoeken van evenementen en wedstrijden.
- Eigenaren kunnen hun gebruikelijke activiteiten dus gewoon blijven doen.

Literatuur

- Al-Ghamdi, G.M., Kapur, V., Ames, T.R., Timoney, J.F., Love, D.N., Mellencamp, M.A., 2000. Use of repetitive sequence-based polymerase chain reaction for molecular epidemiologic analysis of *Streptococcus equi* subspecies *equi*. *Am J Vet Res* 61, 699-705.
- Albini, S., Korczak, B.M., Abril, C., Hussy, D., Limat, S., Gerber, V., Hermann, M., Howald, B., Miserez, R., 2008. Mandibular lymphadenopathy caused by *Actinomyces denticolens* mimicking strangles in three horses. *Vet Rec* 162, 158-159.
- Baverud, V., Johansson, S.K., Aspan, A., 2007. Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Vet Microbiol* 124, 219-229.
- Berlin, D., Kelmer, G., Steinman, A., Sutton, G.A., 2013. Successful medical management of intra-abdominal abscesses in 4 adult horses. *Can Vet J* 54, 157-161.
- Borst, L.B., Patterson, S.K., Lanka, S., Barger, A.M., Fredrickson, R.L., Maddox, C.W., 2011. Evaluation of a commercially available modified-live *Streptococcus equi* subsp *equi* vaccine in ponies. *Am J Vet Res* 72, 1130-1138.
- Boyle, A., 2011. *Streptococcus equi* subspecies *equi* infection (strangles) in horses. *Compend Contin Educ Vet* 33, E1-7; quiz E8.
- Boyle, A.G., Rankin, S.C., Duffee, L., Boston, R.C., Wheeler-Aceto, H., 2016. *Streptococcus equi* Detection Polymerase Chain Reaction Assay for Equine Nasopharyngeal and Guttural Pouch Wash Samples. *J Vet Intern Med* 30, 276-281.
- Boyle, A.G., Smith, M.A., Boston, R.C., Stefanovski, D., 2017a. A case-control study developing a model for predicting risk factors for high SeM-specific antibody titers after natural outbreaks of *Streptococcus equi* subsp *equi* infection in horses. *J Am Vet Med Assoc* 250, 1432-1439.
- Boyle, A.G., Stefanovski, D., Rankin, S.C., 2017b. Comparison of nasopharyngeal and guttural pouch specimens to determine the optimal sampling site to detect *Streptococcus equi* subsp *equi* carriers by DNA amplification. *BMC Vet Res* 13, 75.
- Boyle, A.G., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., Waller, A.S., Buchanan, B.R., 2018. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles-Revised Consensus Statement. *J Vet Intern Med* 32, 633-647.
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E.A., Grange, T., Geigl, E.M., 2010. An efficient multistrategy DNA decontamination procedure of PCR reagents for hypersensitive PCR applications. *PLoS One* 5.
- Chanter, N., Newton, J.R., Wood, J.L., Verheyen, K., Hannant, D., 1998. Detection of strangles carriers. *Vet Rec* 142, 496.
- Cursons, R., Patty, O., Steward, K.F., Waller, A.S., 2015. Strangles in horses can be caused by vaccination with Pinnacle I. *N. Vaccine* 33, 3440-3443.
- Duffee, L.R., Stefanovski, D., Boston, R.C., Boyle, A.G., 2015. Predictor variables for and complications associated with *Streptococcus equi* subsp *equi* infection in horses. *J Am Vet Med Assoc* 247, 1161-1168.
- Ensink, J.M., Bosch, G., van Duijkeren, E., 2005. Clinical efficacy of prophylactic administration of trimethoprim/sulfadiazine in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. *J Vet Pharmacol Ther* 28, 45-49.
- Ensink, J.M., Smit, J.A., van Duijkeren, E., 2003. Clinical efficacy of trimethoprim/sulfadiazine and procaine penicillin G in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. *J Vet Pharmacol Ther* 26, 247-252.
- Ford, J., Lokai, M.D., 1980. Complications of *Streptococcus equi* infection. *Equine Practice* 4, 41-44.
- Gronbaek, L.M., Angen, O., Vigre, H., Olsen, S.N., 2006. Evaluation of a nested PCR test and bacterial culture of swabs from the nasal passages and from abscesses in relation to diagnosis of *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Vet J* 38, 59-63.

- Guss, B., Flock, M., Frykberg, L., Waller, A.S., Robinson, C., Smith, K.C., Flock, J.I., 2009. Getting to grips with strangles: an effective multi-component recombinant vaccine for the protection of horses from *Streptococcus equi* infection. *PLoS Pathog* 5, e1000584.
- Hamlen, H.J., Timoney, J.F., Bell, R.J., 1994. Epidemiologic and immunologic characteristics of *Streptococcus equi* infection in foals. *J Am Vet Med Assoc* 204, 768-775.
- Harris, S.R., Robinson, C., Steward, K.F., Webb, K.S., Paillot, R., Parkhill, J., Holden, M.T., Waller, A.S., 2015. Genome specialization and decay of the strangles pathogen, *Streptococcus equi*, is driven by persistent infection. *Genome Res* 25, 1360-1371.
- Hoffman, A.M., Staempfli, H.R., Prescott, J.F., Viel, L., 1991. Field evaluation of a commercial M-protein vaccine against *Streptococcus equi* infection in foals. *Am J Vet Res* 52, 589-592.
- Holden, M.T., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K.F., Webb, K., Ainslie, F., Jourdan, T., Bason, N.C., Holroyd, N.E., Mungall, K., Quail, M.A., Sanders, M., Simmonds, M., Willey, D., Brooks, K., Aanensen, D.M., Spratt, B.G., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Kehoe, M., Chanter, N., Bentley, S.D., Robinson, C., Maskell, D.J., Parkhill, J., Waller, A.S., 2009. Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathog* 5, e1000346.
- Ivens, P.A., Matthews, D., Webb, K., Newton, J.R., Steward, K., Waller, A.S., Robinson, C., Slater, J.D., 2011. Molecular characterisation of 'strangles' outbreaks in the UK: the use of M-protein typing of *Streptococcus equi* ssp. *equi*. *Equine Vet J* 43, 359-364.
- Jacobs, A.A., Goovaerts, D., Nuijten, P.J., Theelen, R.P., Hartford, O.M., Foster, T.J., 2000. Investigations towards an efficacious and safe strangles vaccine: submucosal vaccination with a live attenuated *Streptococcus equi*. *Vet Rec* 147, 563-567.
- Jorm, L.R., 1990. Strangles in horse studs: incidence, risk factors and effect of vaccination. *Aust Vet J* 67, 436-439.
- Kelly, C., Bugg, M., Robinson, C., Mitchell, Z., Davis-Poynter, N., Newton, J.R., Jolley, K.A., Maiden, M.C., Waller, A.S., 2006. Sequence variation of the seM gene of *Streptococcus equi* allows discrimination of the source of strangles outbreaks. *J Clin Microbiol* 44, 480-486.
- Kemp-Symonds, J., Kemble, T., Waller, A., 2007. Modified live *Streptococcus equi* ('strangles') vaccination followed by clinically adverse reactions associated with bacterial replication. *Equine Vet J* 39, 284-286.
- Kendall, A., Mayhew, I.G., Petrovski, K., 2016. Preliminary study of tissue concentrations of penicillin after local administration into the guttural pouches in four healthy horses. *Aust Vet J* 94, 271-273.
- Kudirkiene, E., Welker, M., Knudsen, N.R., Bojesen, A.M., 2015. Rapid and accurate identification of *Streptococcus equi* subspecies by MALDI-TOF MS. *Syst Appl Microbiol* 38, 315-322.
- Libardoni, F., Vielmo, A., Farias, L., Matter, L.B., Potter, L., Spilki, F.R., de Vargas, A.C., 2013. Diversity of seM in *Streptococcus equi* subsp. *equi* isolated from strangles outbreaks. *Vet Microbiol* 162, 663-669.
- Lindahl, S., Baverud, V., Egenvall, A., Aspan, A., Pringle, J., 2013. Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *equi* in horses from confirmed strangles outbreaks. *J Vet Intern Med* 27, 542-547.
- Lindahl, S., Soderlund, R., Frosth, S., Pringle, J., Baverud, V., Aspan, A., 2011. Tracing outbreaks of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses using sequence variation in the seM gene and pulsed-field gel electrophoresis. *Vet Microbiol* 153, 144-149.
- Ling, A.S., Upjohn, M.M., Webb, K., Waller, A.S., Verheyen, K.L., 2011. Seroprevalence of *Streptococcus equi* in working horses in Lesotho. *Vet Rec* 169, 72.
- Livengood, J.L., Lanka, S., Maddox, C., Tewari, D., 2016. Detection and differentiation of wild-type and a vaccine strain of *Streptococcus equi* ssp. *equi* using pyrosequencing. *Vaccine* 34, 3935-3937.

- Mallicote, M., 2015. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* infections. *Vet Clin North Am Equine Pract* 31, 27-41.
- Muhktar, M.M., Timoney, J.F., 1988. Chemotactic response of equine polymorphonuclear leucocytes to *Streptococcus equi*. *Res Vet Sci* 45, 225-229.
- Newton, J.R., Verheyen, K., Talbot, N.C., Timoney, J.F., Wood, J.L., Lakhani, K.H., Chanter, N., 2000. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J* 32, 515-526.
- Newton, J.R., Wood, J.L., Dunn, K.A., DeBrauwere, M.N., Chanter, N., 1997. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Vet Rec* 140, 84-90.
- Newton, R., Waller, A., King, A., 2005. Investigation of suspected adverse reactions following strangles vaccination in horses. *Vet Rec* 156, 291-292.
- Parkinson, N.J., Robin, C., Newton, J.R., Slater, J., Waller, A.S., 2011. Molecular epidemiology of strangles outbreaks in the UK during 2010. *Vet Rec* 168, 666.
- Patty, O.A., Cursons, R.T., 2014. The molecular identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* strains isolated within New Zealand. *N Z Vet J* 62, 63-67.
- Poulin, A., Hutchinson, M., Dube, M., Stokes, M., Mitchell, S., Edwards, A., Harvey, K., Myer, A., Causey, R., 2018. Abatement of *Streptococcus equi* in soiled equine bedding and compost. *J Equine Vet Sc* 70, 117-122.
- Pusterla, N., Watson, J.L., Affolter, V.K., Magdesian, K.G., Wilson, W.D., Carlson, G.P., 2003. Purpura haemorrhagica in 53 horses. *Vet Rec* 153, 118-121.
- Pusterla, N., Whitcomb, M.B., Wilson, W.D., 2007. Internal abdominal abscesses caused by *Streptococcus equi* subspecies *equi* in 10 horses in California between 1989 and 2004. *Vet Rec* 160, 589-592.
- Ramey, D., 2007. Does early antibiotic use in horses with 'strangles' cause metastatic *Streptococcus equi* bacterial infections? *Equine Veterinary Education* 19, 14-15.
- Robinson, C., Frykberg, L., Flock, M., Guss, B., Waller, A.S., Flock, J.I., 2018. Strangvac: A recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi*. *Vaccine* 36, 1484-1490.
- Robinson, C., Heather, Z., Slater, J., Potts, N., Steward, K.F., Maskell, D.J., Fontaine, M.C., Lee, J.J., Smith, K., Waller, A.S., 2015. Vaccination with a live multi-gene deletion strain protects horses against virulent challenge with *Streptococcus equi*. *Vaccine* 33, 1160-1167.
- Robinson, C., Steward, K.F., Potts, N., Barker, C., Hammond, T.A., Pierce, K., Gunnarsson, E., Svansson, V., Slater, J., Newton, J.R., Waller, A.S., 2013. Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure. *Vet J* 197, 188-191.
- Smyth, D.A., Baptiste, K.E., Cruz, A.M., Naylor, J.M., 1999. Primary distension of the guttural pouch lateral compartment secondary to empyema. *Can Vet J* 40, 802-804.
- Sweeney, C.R., Benson, C.E., Whitlock, R.H., Meirs, D.A., Barningham, S.O., Whitehead, S.C., Cohen, D., 1989. Description of an epizootic and persistence of *Streptococcus equi* infections in horses. *J Am Vet Med Assoc* 194, 1281-1286.
- Sweeney, C.R., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T., 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J Vet Intern Med* 19, 123-134.
- Sweeney, C.R., Whitlock, R.H., Meirs, D.A., Whitehead, S.C., Barningham, S.O., 1987. Complications associated with *Streptococcus equi* infection on a horse farm. *J Am Vet Med Assoc* 191, 1446-1448.
- Thompson, R.N., McNicholl, B.P., 2010. Needlestick and infection with horse vaccine. *BMJ Case Rep* 2010.
- Timoney, J.F., 2004. The pathogenic equine streptococci. *Vet Res* 35, 397-409.
- Timoney, J.F., Kumar, P., 2008. Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Vet J* 40, 637-642.

- Tirosh-Levy, S., Blum, S.E., Steward, K.F., Waller, A.S., Steinman, A., 2016. *Streptococcus equi* subspecies *equi* in horses in Israel: seroprevalence and strain types. *Vet Rec Open* 3, e000187.
- Tscheschlok, L., Venner, M., Steward, K., Bose, R., Riihimaki, M., Pringle, J., 2018. Decreased Clinical Severity of Strangles in Weanlings Associated with Restricted Seroconversion to Optimized *Streptococcus equi* ssp *equi* Assays. *J Vet Intern Med* 32, 459-464.
- Velineni, S., DeNegri, R., Artiushin, S.C., Timoney, J.F., 2015. Comparison of specificities of serum antibody responses of horses to clinical infections caused by *Streptococcus equi* or *zooepidemicus*. *Vet Microbiol* 180, 253-259.
- Verheyen, K., Newton, J.R., Talbot, N.C., de Brauwere, M.N., Chanter, N., 2000. Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*. *Equine Vet J* 32, 527-532.
- Waller, A.S., 2013. Strangles: taking steps towards eradication. *Vet Microbiol* 167, 50-60.
- Waller, A.S., 2014. New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract* 30, 591-607.
- Waller, A.S., 2016. Strangles: a pathogenic legacy of the war horse. *Vet Rec* 178, 91-92.
- Waller, A.S., Paillot, R., Timoney, J.F., 2011. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *J Med Microbiol* 60, 1231-1240.
- Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K.F., Robinson, C., Newton, J.R., Waller, A.S., 2013. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *Vet J* 195, 300-304.
- Webb, K., Jolley, K.A., Mitchell, Z., Robinson, C., Newton, J.R., Maiden, M.C., Waller, A., 2008. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology* 154, 3016-3024.
- Weese, J.S., 2014. Infection control and biosecurity in equine disease control. *Equine Vet J* 46, 654-660.
- Weese, J.S., Jarlot, C., Morley, P.S., 2009. Survival of *Streptococcus equi* on surfaces in an outdoor environment. *Can Vet J* 50, 968-970.
- Whelchel, D.D., Chaffin, M.K., 2010. Sequelae and complications of *Streptococcus equi* subspecies *equi* infections in the horse. *Equine Veterinary Education* 21, 135-141.