

Lokalisering af *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* i equint uterint væv og sammenhæng mellem infektion, histologi, alder og fertilitet

Veterinært specialeprojekt skrevet ved Institut for Veterinær- og Husdyrvidenskab ved Sektion for Bakterier og Virus ved Københavns Universitet

Emilie Kähler Hjenner, rdc467

Kathrine Kjeldsen Ravn, lcf131

Vejleder: Anders Miki Bojesen (Sektion for Bakterier og Virus)
Medvejledere: Henrik Elvang Jensen (Sektion for Parasitologi og Patobiologi)
Mette Christoffersen (Sektion for Medicin, Kirurgi og Reproduktion Store Husdyr)
Afleveringsdato: 22.12.2025

Forord

Vi vil gerne sige en tak til vores hovedvejleder, Anders Miki Bojesen fra Sektion for Bakterier og Virus ved Københavns Universitet, for hjælpen med at udarbejde dette speciale. Både ved at fremskaffe prøvemateriale samt hjælp til udførelse af mikrobiologiske test og FISH og derudover værdifuld teoretisk sparring. Desuden vil vi gerne takke medvejleder Henrik Elvang Jensen og laboranterne fra Sektion for Veterinær Parasitologi og Patobiologi ved Københavns Universitet for hjælp med fremstilling af snit og farvning af disse samt histologisk vurdering. Sidst, men ikke mindst, vil vi gerne takke medvejleder Mette Christoffersen fra Sektion for Medicin, Kirurgi og Reproduktion Store Husdyr ved Københavns Universitet for sparring i forbindelse med opsætning af opgaven og histologisk vurdering af de HE-farvede snit - i forbindelse med dette var din hjælp uundværlig. Mange tak for hjælpen til jer alle og til alle laboranterne fra både Sektion for Bakterier og Virus og Sektion for Parasitologi og Patobiologi.

Indholdsfortegnelse

Forord	2
Resumé	4
Abstract	5
Indledning og hypoteser	6
Litteraturreview	7
<i>Endometritis</i>	7
<i>Streptococcus equi spp. zooepidemicus</i>	8
<i>Diagnostik af endometritis</i>	8
<i>Endometrose</i>	10
<i>Sammenhænge mellem endometrose, endometritis og fertilitet</i>	12
<i>Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)</i>	13
Metoder og materialer	17
<i>Litteratursøgning</i>	17
<i>Hopper</i>	17
Hopper fra Irland.....	17
Hopper fra Danmark.....	18

<i>Prøveudtagning</i>	18
Hopper fra Irland.....	18
Hopper fra Danmark.....	18
<i>Bakteriologi</i>	19
Hopper fra Irland.....	19
Hopper fra Danmark.....	19
<i>Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)</i>	19
Oligonukleotid prober	20
Positive og negative kontroller	20
Epi-fluorescensmikroskopi	21
<i>Histologisk vurdering</i>	21
<i>Statistisk analyse</i>	24
Resultater	24
<i>Bakteriologi og fertilitet</i>	24
<i>Histologi – Kenney-score</i>	25
<i>Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)</i>	26
Eub338 probe og kontroller.....	27
<i>Streptococcus</i> spp. probe	29
<i>Sammenhæng mellem alder, Kenney-score og fertilitet</i>	33
Sammenhæng mellem Kenney-score og alder.....	33
Sammenhæng mellem Kenney-score, alder, barren years, drægtighedsrate og live-foal rate.....	33
Diskussion	34
<i>Sammenhæng mellem Kenney-score, alder, infektion/inflammation og fertilitet</i>	34
<i>Påvisning af subkliniske infektioner med <i>S. zooepidemicus</i> og lokalisering af denne ved brug af FISH</i>	36
<i>Fordele og ulemper ved brug af FISH</i>	38
<i>Pålidelighed af diagnostiske tests og Kenney-score hos hopper med <i>S. zooepidemicus</i> infektion</i>	39
Konklusion	41
Perspektivering	42
Referencer	44
Bilag	49
<i>Bilag 1: Fremgangsmåde for fremstilling af kontroller til FISH</i>	49
<i>Bilag 2: Fremgangsmåde for Fluorescent In Situ Hybridisering (FISH)</i>	50
<i>Bilag 3: KU's AI-deklaration</i>	52

Resumé

Endometritis og endometrose er de hyppigst forekommende sygdomme i endometriet hos hopper, og de påvirker begge fertiliteten negativt. *S. zooepidemicus* er et af de hyppigst forekommende bakterieisolater hos hopper med infektiøs endometritis, og bakterien har flere egenskaber, der gør den i stand til at forårsage kroniske/subkliniske infektioner. Dette kan resultere i langvarig subfertilitet, da infektionen kan være svær for praktiserende dyrlæger at diagnosticere og behandle. Endometrose er en irreversibel tilstand, og dennes indflydelse på fertiliteten er således permanent, mens endometritis oftest kan behandles. Formålet med dette studie var at undersøge, i hvilken grad henholdsvis subklinisk endometritis, forårsaget af *S. zooepidemicus*, og endometrose påvirkede fertiliteten hos en population af hopper, der havde været subfertile mellem 1 - 3 år. Desuden undersøges det, om stigende alder og stigende grad af endometrose hænger sammen hos to populationer af hopper, samt om der er en forbindelse mellem kronisk infektion og endometrose. Dette undersøges ved hjælp af Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH), som kan visualisere bakteriernes lokalisering i endometriet. 31 hopper blev tildelt en Kenney-score, og der observeredes en tendens til, at hopper med en højere Kenney-score havde en højere gennemsnitsalder. Derudover viste vores data, at subklinisk infektion med *S. zooepidemicus* havde en markant negativ påvirkning af fertiliteten, men at denne tilsyneladende kunne reverseres ved aktivering og behandling af infektionen. Endometrose havde derimod en mere permanent negativ påvirkning af fertiliteten, og jo højere Kenney-score hopperne havde, jo lavere var deres live-foal rates. FISH påviste *Streptococcus* spp. hos 100% (16/16) af hopperne, og disse var beliggende såvel i det luminale epitel, i stratum compactum samt dybt i stratum spongiosum og intracellulært i kirtelepitelcellerne. Der var ingen tydelig forskel på lokaliseringen mellem de subklinisk inficerede hopper og hoppen med aktiv infektion, og kun hos 15,4% (2/13) af hopperne observeredes bakterierne i relation til kroniske degenerative forandringer i endometriet. Vores studie understreger, hvorfor det kan være svært at påvise kroniske infektioner med *S. zooepidemicus*, men viser også, at det er af stor vigtighed for hoppens fertilitet, at disse infektioner diagnosticeres og behandles. FISH kan potentielt bruges til at diagnosticere disse infektioner i fremtiden, men det kræver yderligere evaluering af metoden og villighed blandt dyrlægerne til at implementere den i deres diagnostik. Der bør laves yderligere studier, der undersøger forholdet mellem kronisk infektion og endometrose.

Abstract

Endometritis and endometriosis are the most common diseases of the endometrium in mares, and they both affect fertility negatively. *S. zooepidemicus* is one of the most common bacterial isolates from mares with infectious endometritis, and it has multiple traits that enables it to cause chronic/subclinical infections. These infections can result in subfertility in mares over long periods of time, as the infection can be difficult for veterinarians to diagnose and treat. Endometriosis is an irreversible condition, and its influence on fertility is therefore permanent, whereas endometritis often can be treated. The aim of this study was to evaluate to which degree both endometritis, caused by *S. zooepidemicus*, and endometriosis affected the fertility in a group of mares that had been barren for 1 - 3 years. Furthermore, it was evaluated, if increasing age is associated with a higher Kenney-score in two populations of mares, and whether there is a connection between chronic infection and endometriosis. To investigate this, Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) was performed to visualize the bacteria, and their location in the endometrium. 31 mares were given a Kenney-score, and there was a tendency that mares with higher Kenney-scores had an increasing average age. Furthermore, the data showed that subclinical infection with *S. zooepidemicus* had a significant negative impact on fertility, but that this could seemingly be reversed by activating and treating the infection. Endometriosis on the other hand had a more permanent negative impact on fertility, and the higher Kenney-scores the mares had, the lower their live-foal rates were. FISH identified *Streptococcus* spp. in 100% (16/16) of the mares, and the bacteria were located in the luminal epithelium and in stratum compactum, but also deep within stratum spongiosum and intracellularly in the glandular epithelium cells. There were no obvious differences between the location of the bacteria in the chronically infected mares and the mare with an active infection. Furthermore, the bacteria were only located in relation to chronic degenerative changes in the endometrium in 15,4% (2/13) of the mares. Our study underlines, why it might be difficult to diagnose chronic infections with *S. zooepidemicus*, but also shows that it is of great importance for the mare's fertility that the infection is diagnosed and treated. FISH might be able to help diagnose these infections in the future, but it will require further evaluation of the method and compliance amongst veterinarians to implement it in their work. Further studies should be made to investigate the relationship between chronic infection and progression of endometriosis.

Indledning og hypoteser

Fertiliteten hos hopper kan påvirkes negativt af en lang række faktorer. Sygdomme i endometriet kan både være akutte, kroniske eller subkliniske; og de kan være infektiøse, inflammatoriske eller degenerative. Endometritis og endometrose er de hyppigste årsager til nedsat fertilitet hos hopper. Et af de hyppigst isolerede agens ved infektiøs endometritis er *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus*. Denne bakterie kan danne en subpopulation af dormante celler og derved forårsage langvarig, subklinisk infektion. Det er påvist i flere studier, at der er en sammenhæng mellem inflammation og fibrose, og at hopper med en højere Kenney-score er mere modtagelige for infektiøs endometritis. At endometritis skulle kunne give anledning til udvikling/forværring af endometrose er kun beskrevet teoretisk og ikke påvist klinisk. Generelt er sensitiviteten af diagnostiske tests ikke optimal ved endometritis, og den forværres yderligere af, at prøverne oftest udtages med svaber. Dette mindsker sandsynligheden for at identificere subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus*. Det har i tidligere studier vist sig muligt at påvise bakterierne ved Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH), hvormed deres tilstedeværelse og lokalisering i vævet kan visualiseres. FISH kan således bruges til at påvise *Streptococcus* spp., der ikke kan diagnosticeres ved dyrkning. Formålet med dette studie er at undersøge sammenhængen mellem alder og graden af degenerative forandringer i endometriet hos subfertile hopper. Desuden ønskes det at undersøge sammenhængen mellem Kenney-score og fertilitet for hopper, der har haft en subklinisk infektion med *S. zooepidemicus*, men er behandlet for denne. Derudover forsøges det at påvise subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus* ved brug af FISH. Samtidig undersøges bakteriernes lokalisering og antal i endometriet hos hopper med aktiv og subklinisk infektion, dertil deres lokalisering i forhold til degenerative forandringer.

Vores hypoteser er følgende:

1. Der er en sammenhæng mellem stigende alder og sværhedsgraden af degenerative forandringer, i form af en højere Kenney-score.
2. Der er en sammenhæng mellem stigende Kenney-score og lavere drægtighedsrate samt live-foal rate.
3. Infektion med *S. zooepidemicus* har en negativ påvirkning af fertiliteten.
4. Subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus*, der ikke kan påvises ved standard bakteriel dyrkning, kan påvises ved Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH).
5. *S. zooepidemicus* ligger i relation til de områder i vævet, hvor der ses kroniske degenerative forandringer på histologi.

6. *S. zooepidemicus* er beliggende under det lumenale epitel eller dybere i stratum spongiosum ved kronisk infektion.

Litteraturreview

Endometritis

Endometritis er betegnelsen for en inflammatorisk tilstand i endometriet, og det har i mange år været den primære årsag til nedsat fertilitet hos avlshopper (Troedsson 1999; Canisso *et al.* 2020) og en af de hyppigste medicinske lidelser hos heste (Traub-Dargatz *et al.* 1991). Den inflammatoriske tilstand kan opstå som resultat af introduktion af fremmedlegemer (f.eks. sæd), bakterier eller svampe i uterus. Det anses som fysiologisk, at hoppen reagerer med et inflammatorisk respons som følge af bedækning/insemination. Formålet med dette er at rense uterus for kontaminerende elementer forud for implementering af embryoet. En subpopulation på 14 - 30% af avlshopper formår ikke at stoppe inflammationen indenfor 48 timer, hvorved de udvikler "Persistent Breeding Induced Endometritis" (PBIE) (Christoffersen & Troedsson 2017; Katila & Ferreira-Dias 2022). Prædisponering for at udvikle PBIE kan skyldes anatomiske defekter, nedsat myometriekontraktilitet og/eller et dysreguleret immunrespons, hvor der ses en forlænget udskillelse af pro-inflammatoriske cytokiner og en nedsat mængde modulerende cytokiner (Christoffersen & Troedsson 2017; Morris *et al.* 2020). Ved forlænget inflammation overgår immunresponsen fra at være normalt-immunologisk til at være patofysiologisk. Inflammationen har da en skadelig indvirkning på det uterine miljø og drægtighedsraten. Dette skyldes, at uterus ikke renses for væske og debris, og desuden er hopper med PBIE mere modtagelige for infektiøs endometritis (Morris *et al.* 2020). Ved infektiøs endometritis kan bakterier enten introduceres direkte ved bedækning/insemination, de kan ascendere fra mere caudale dele af reproduktionsorganerne eller de kan være til stede i endometriet i form af en latent infektion som re-aktiveres. Flere studier har gennem tiden vist, at *Escherichia coli* (*E. coli*) og *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) er de hyppigste bakterieisolater hos hopper med infektiøs endometritis (Morris *et al.* 2020; Ravaioli *et al.* 2022; Mouncey *et al.* 2024).

Streptococcus equi spp. *zooepidemicus*

S. zooepidemicus er et opportunistisk patogen der anses for at være en del af normalfloraen i de caudale dele af reproduktionsorganerne, men ikke i uterus. Bakterien er udstyret med mekanismer til at undgå hoppers immunforsvar, og ved introduktion i uterus kan den give endometritis, især ved tilstedeværelse af dysreguleret inflammation, vævsskade og ophobning af debris og væske som ved PBIE (Morris *et al.* 2020). Ved kronisk infektion er det i et studie påvist, at *S. zooepidemicus* kan persistere i de uterine kirtler. Derudover er bakterien påvist at befinde sig i foci beliggende såvel under det luminale epitel som dybere i endometriet (Petersen *et al.* 2009; Petersen *et al.* 2015). Det er i et andet studie yderligere påvist, at bakterierne kan invadere epitelceller og opholde sig intracellulært *in vitro* (Skive *et al.* 2017). Derudover kan *S. zooepidemicus* også danne persister-celler *in vitro*. Ved dannelse af persister-celler indgår en subpopulation af bakterierne i en lav-metabolisk/dormant tilstand, hvorved de både er svære at påvise ved traditionelle dyrkningsbaserede metoder og tolererer meget høje koncentrationer af antibiotika på trods af, at de stammer fra en ellers sensitiv population. Dette besværliggør således diagnostik og behandling betydeligt (Petersen *et al.* 2015). *S. zooepidemicus* formodes yderligere at kunne danne biofilm (Morris *et al.* 2020). Både dannelse af biofilm og intracellulære infektioner øger risikoen for dannelse af en persister-celle subpopulation (Kaldalu *et al.* 2020). *S. zooepidemicus* har således flere egenskaber, der gør den i stand til at forårsage subklinisk endometritis, hvor infektionen ligger i dvale og aktiveres ved bedækning/insemination.

Diagnostik af endometritis

De typiske symptomer ved persisterende eller subklinisk endometritis, forårsaget af *S. zooepidemicus*, er detektion af intrauterin væske (IUF) ≥ 2 cm på ultralydsscanning. Derudover kan udtalt endometrie-ødem og subfertilitet være tegn på persisterende eller subklinisk infektion (Katila 2016). Diagnostik af endometritis beror typisk på en klinisk undersøgelse, med henblik på at identificere risikofaktorer, samt ultralydsscanning og udtag af prøver til dyrkning, cytologi og/eller histologi. Prøverne kan udtages med svaber, cytobrush, low volume lavage (LVL) eller biopsi. Uanset hvilken metode der benyttes er anbefalingen, at prøvetagningsinstrumentet og prøven afskærms så vidt muligt for at undgå kontamination fra mere caudale afsnit af reproduktionsorganerne. Dette opnås ved at bruge double-guarded teknikker, ved ind/udførelse via spekulum eller ved at afskærme instrumentet i en rektalhandske ved ind/udførelse i uterus via vagina og cervix (Katila 2016).

Metoden der betegnes som “gold standard” for detektion af endometritis, er påvisning af PMNs ved histologi på en biopsi, og det er denne de andre metoder typisk sammenlignes med. Dog giver histologi ingen information om ætiologien (Nielsen *et al.* 2012). I forhold til valg af prøveudtagningsmetode, påvirker valget af metode sensitiviteten af dyrkning og cytologi. Prøver udtaget med svaber er i flere studier påvist at have en lav sensitivitet ved dyrkning på hhv. 0,34 og 0,33 (Nielsen 2005; Christoffersen *et al.* 2015). Derimod har prøver udtaget ved brug af cytobrush i et studie af Buczkowska *et al.* vist sig at have en sensitivitet på 0,5 ved dyrkning alene; 0,71 ved cytologi alene og 0,86 ved samtidig dyrkning og cytologi. Dette er sammenligneligt med sensitiviteten for en biopsi, som er på hhv. 0,63; 0,73 og 0,91 i samme studie, hvormed cytobrush vurderes som en pålidelig og mindre invasiv prøvetagningsmetode (Buczkowska *et al.* 2014a). I flere studier er desuden dokumenteret en høj sensitivitet ved dyrkning fra LVL på hhv. 0,71 og 0,75 (LeBlanc *et al.* 2007; Christoffersen *et al.* 2015). I studiet af LeBlanc *et al.* er desuden angivet en sensitivitet for cytologi på LVL på 0,80 (LeBlanc *et al.* 2007). LVL tilskrives dens højere sensitivitet på baggrund af, at prøven udtages fra et større område af uterus’ overflade. Denne metode er ligeledes mindre invasiv end biopsi og er således også en god valgmulighed til prøveudtagning i praksis. LVL-væsken kan også bruges til at vurdere uklarhed/grad af debris, hvormed der yderligere kan skelnes mellem kliniske infektioner og kontamination (LeBlanc *et al.* 2007; Christoffersen *et al.* 2015). Det er mest optimalt at vurdere prøverne, der er udtaget på baggrund af både dyrkning og cytologi, da infektion med *S. zooepidemicus* ikke nødvendigvis vil give udslag i vækst på blodagar. Dog er *S. zooepidemicus* infektion ofte associeret med et PMN-respons, grundet høj kemotaksi af bakterien, hvorfor inficerede hopper ofte er cytologi-positive. Ved at kombinere dyrkning og cytologi, kan man desuden nemmere skelne, hvorvidt der reelt er tale om endometritis eller om prøven er blevet kontamineret. Dette øger sensitiviteten og den prædiktive værdi af prøven (Katila 2016).

Dormante infektioner med *S. zooepidemicus* udgør en diagnostisk udfordring, da bakterierne ikke nødvendigvis kan detekteres ved de traditionelle prøvemethoder, hvor prøven udtages fra endometriets overflade. Samtidig er det også beskrevet, at det ikke er sikkert, at bakterierne findes ved udtag af en biopsi, da dormante *S. zooepidemicus* har en fokal fordeling i endometriet (Katila 2016). Der findes et vækstmedie ved navn bActivate, der er påvist at kunne re-aktivere dormante *S. zooepidemicus*, så de genoptager normal metabolisme og således giver anledning til vækst af bakterien på dyrkning. Ved brug af dette vækstmedie, forud for prøvetagning, øges sensitiviteten af de diagnostiske metoder, hvormed bakterien lettere kan påvises og behandles, da aktivering også genetablerer bakteriernes følsomhed overfor antibiotika (Petersen *et al.* 2015).

Endometrose

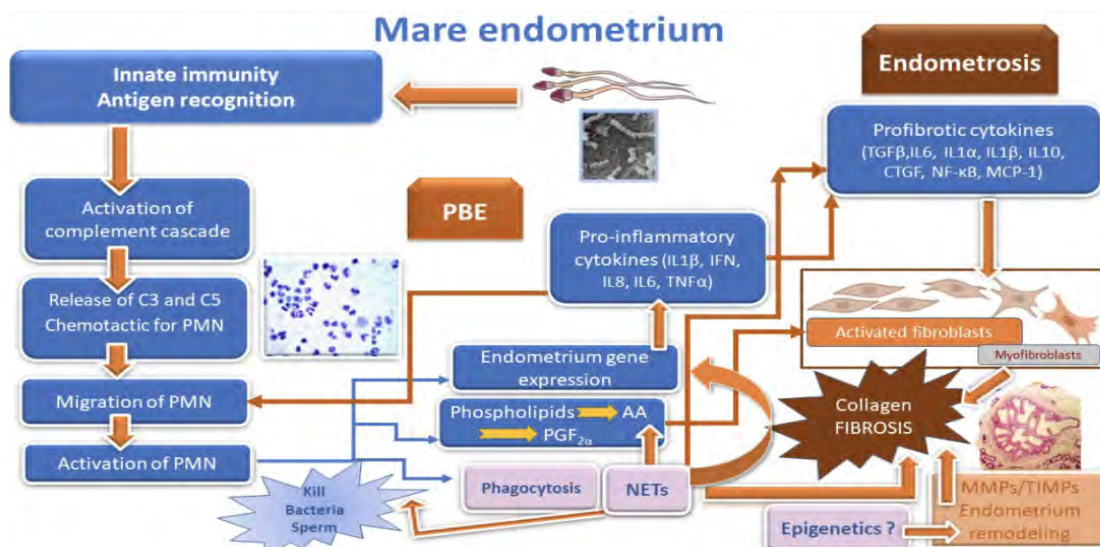
Endometrose er en sygdom der er kendetegnet ved tilstedeværelse af kroniske degenerative forandringer i hoppers endometrie. Kendetegnende for endometrose er, at der ses koncentriske lag af fibroblaster og kollagen-aflejring periglandulært, hvor antallet af lag afspejler sværhedsgraden af fibrosen. Fibroseringen omkring kirtlerne kan give anledning til dysfunktion af kirtlepitelcellerne, hvorved ernæringskapaciteten af de uterine kirtler og placenta reduceres. Dette kan lede til tidlig embryonal-død eller abort senere i drægtigheden. Det er i flere studier påvist, at der er en korrelation mellem stigende alder og stigende sværhedsgrad af læsionerne. I 1986 indførte Kenney & Doig et scoringssystem for hoppers endometrie-kvalitet med dertilhørende forventede live-foal rates. I vurderingen af endometriets kvalitet, indgår typisk en vurdering af tilstedeværelse af PMNs, antal lag fibroblaster omkring de afficerede kirtler, tilstedeværelse af lymfatiske lacunae, mængde af kirtelrededannelser og reproduktionshistorik (Schöniger & Schoon 2020; Katila & Ferreira-Dias 2022). Tilstedeværelsen af PMNs er typisk et udtryk for akut inflammation, hvormed denne parameter adskiller sig fra de øvrige ved at være potentielt reversibel (Buczowska *et al.* 2014b). I dag er Kenney-scoren det internationalt anerkendte scoringssystem til vurdering af endometrose, endometrie-kvalitet og fertilitets-prognose (Snider *et al.* 2011). Dette er på trods af, at klassifikationen af de histologiske fund indeholder en vis grad af subjektivitet, samt at der er påvist betydelig uoverensstemmelse mellem patologer ved brug af scoringssystemet (Westendorf *et al.* 2022b).

*Tabel 1: Modificeret Kenney-score og dertilhørende estimerede live-foal rates (Schöniger & Schoon 2020). Her ses, hvilke parametre der indgår ved tildeling af en Kenney-score. Desuden er tilføjet, hvorvidt hopper i hver kategori forventes at være resistente eller modtagelige for infektion (Troedsson *et al.* 1993; Buczowska *et al.* 2016).*

Kenney-score	Histologiske og kliniske fund	Estimeret live-foal rate	Modtagelighed overfor infektion
I	Ingen signifikante ændringer	> 80 – 90%	Resistent (Troedsson <i>et al.</i> 1993; Buczowska <i>et al.</i> 2016)
IIA	Mild endometritis ELLER Mild endometrose ELLER Milde lymfatiske lacunae ELLER	50 – 80%	Modtagelig (Buczowska <i>et al.</i> 2016)

	Delvis endometrial atrofi i den sidste del af avlssæsonen		Hverken modtagelig eller resistent (Troedsson <i>et al.</i> 1993)
IIB	Moderat endometritis ELLER Moderat endometrose ELLER Moderat lymfatisk lacunae ELLER gold ≥ 2 år ELLER Kombineret tilstedeværelse af to kategori IIA-fund	10 – 50%	
III	Alvorlig endometritis ELLER Alvorlig endometrose ELLER Alvorlig lymfatisk lacunae ELLER Udpræget endometrial atrofi i avlssæsonen ELLER Kombineret tilstedeværelse af ≥ 3 kategori IIA fund eller ≥ 2 kategori IIB eller III fund	< 10%	Modtagelig (Troedsson <i>et al.</i> 1993; Buczkowska <i>et al.</i> 2016)

Hvad angår patogenesen for endometrose, er der stadig uklarhed omkring denne. Det er vist, at der er en sammenhæng mellem tilstedeværelse/sværhedsgrad af angiose og endometrose, og at sværhedsgraden af angiose er korreleret med hoppens alder og paritet. Dette indikerer, at nedsat blodtilførsel kan spille en rolle i udviklingen af endometrose (Schöniger & Schoon 2020). De seneste år er der desuden forsket mere i, hvilken rolle inflammation spiller i patogenesen for endometrose. Det er blevet påvist, at inflammation kan give anledning til udvikling af fibrose via flere forskellige mekanismer. Ved udvikling af PBIE eller infektiøs endometritis, er der en forlænget tilstedeværelse af PMNs i endometriet, hvilke kan danne Neutrophil Extracellular Traps (NETs). Frigivelse af enzymer fra NETs kan give anledning til deponering af kollagen, men også til øget produktion af $\text{PGF}_{2\alpha}$ som kan have en pro-fibrotisk effekt. Desuden kan en forlænget tilstedeværelse af pro-inflammatoriske cytokiner ($\text{TGF-}\beta 1$, IL-6, IL- 1β , PGE_2 og $\text{PGF}_{2\alpha}$) give anledning til pro-fibrotiske modifikationer i ECM (Ekstracellulær Matrix) genudtrykkelse samt fibroblast differentiering og proliferation (Rebordão *et al.* 2014; Ferreira-Dias *et al.* 2024). Således findes der forskning, der viser, at endometritis kan give anledning til udvikling af et pro-fibrotisk miljø i uterus og dermed potentielt spille en rolle i patogenesen for endometrose. Det er påvist i et enkelt studie, at vedvarende inflammation efter insemination ledte til en forøget "fibrose-score" (Reilas *et al.* 2016). Dog er det ikke påvist, at infektion med *S. zooepidemicus* medfører, at der ses en betydelig progrediering i graden af endometrose (Schöniger & Schoon 2020).



Figur 1: Figuren illustrerer samspillet mellem PBE (i figuren refereret til som "PBE") og/eller bakteriel endometritis og endometrose (Katila & Ferreira-Dias 2022).

Sammenhænge mellem endometrose, endometritis og fertilitet

Der er i flere studier påvist sammenhænge mellem inflammation og fertilitet. I et studie af Davies Morel *et al.* er det påvist, at hopper med blot $\geq 1\%$ PMNs påvist på cytologi har en markant lavere live-foal rate (51,4%) end hopper der er PMN-negative på cytologi (66,9%) (Davies Morel *et al.* 2013). I et andet studie er det ligeledes påvist, at hopper der er positive for PMNs på histologi har en signifikant lavere dag 70 drægtighedsrate end histologi-negative hopper på hhv. 50% og 86,7% (Nielsen *et al.* 2012). Riddle *et al.* har vist, at graden af inflammation også påvirker drægtighedsraten, da de viste, at hopper med svær inflammation (≥ 5 PMNs / hpf) havde en drægtighedsrate på 23%, mens hopper med moderat inflammation (2 - 5 PMNs / hpf) havde en drægtighedsrate på 48% (Riddle *et al.* 2007). Infektion kan ligeledes forringe fertiliteten. Davies Morel *et al.* har påvist, at hopper med positiv dyrkning med vækst af ét patogen havde en signifikant lavere live-foal rate (43,8%), end hopper der havde negativ dyrkning (Davies Morel *et al.* 2013). Riddle *et al.* har desuden vist, at samtidig positiv cytologi og dyrkning giver anledning til lavere drægtighedsrater, samt at hopper der er inficerede med *S. zooepidemicus* har en dag 28 drægtighedsrate på bare 30% (Riddle *et al.* 2007).

Endometrose kan ligeledes have en negativ påvirkning på fertiliteten. Flere studier har demonstreret, at der er en sammenhæng mellem stigende alder og graden af kroniske degenerative forandringer i endometriet, samt mellem stigende alder og nedsat fertilitet. Stigende alder er således associeret med højere Kenney-score, og hopper med en højere Kenney-score har en lavere live-foal rate (Snider *et al.* 2011; de Witt *et al.* 2023). Når det kommer til sammenhængen mellem endometrose og infektiøs endometritis, er der mere uklarhed omkring forbindelsen mellem disse. Der er som

tidligere nævnt flere studier, der har påvist mere teoretiske sammenhænge mellem inflammation og fibrose, men det er ikke påvist, at infektion med *S. zooepidemicus* giver anledning til progrediering af endometrose (Schöniger & Schoon 2020). Dog er der lavet studier, der har vist, at hopper med en højere Kenney-score er mere modtagelige for infektiøs endometritis. I 1993 undersøgte Troedsson *et al.* hoppers evne til at bekæmpe infektion med *S. zooepidemicus* baseret på deres Kenney-score. Her fandt de, at hopper med kategori I endometrium generelt var resistente overfor infektion, mens hopper med kategori III endometrium generelt var modtagelige for infektion. Hopper i gruppe IIA og IIB kunne ikke kategoriseres som hverken resistente eller modtagelige for infektion i studiet (Troedsson *et al.* 1993). I et nyere studie fra 2016 er det derimod påvist, at hopper i gruppe IIA og IIB er statistisk signifikant mere modtagelige for infektion end hopper i gruppe I (Buczowska *et al.* 2016). Det tyder altså på, at endometrose kan prædisponere for udvikling af infektiøs endometritis. Dette formodes at skyldes, at myometriekontraktioner og lymfedrænage kompromitteres på grund af de degenerative forandringer (Schöniger & Schoon 2020; Katila & Ferreira-Dias 2022).

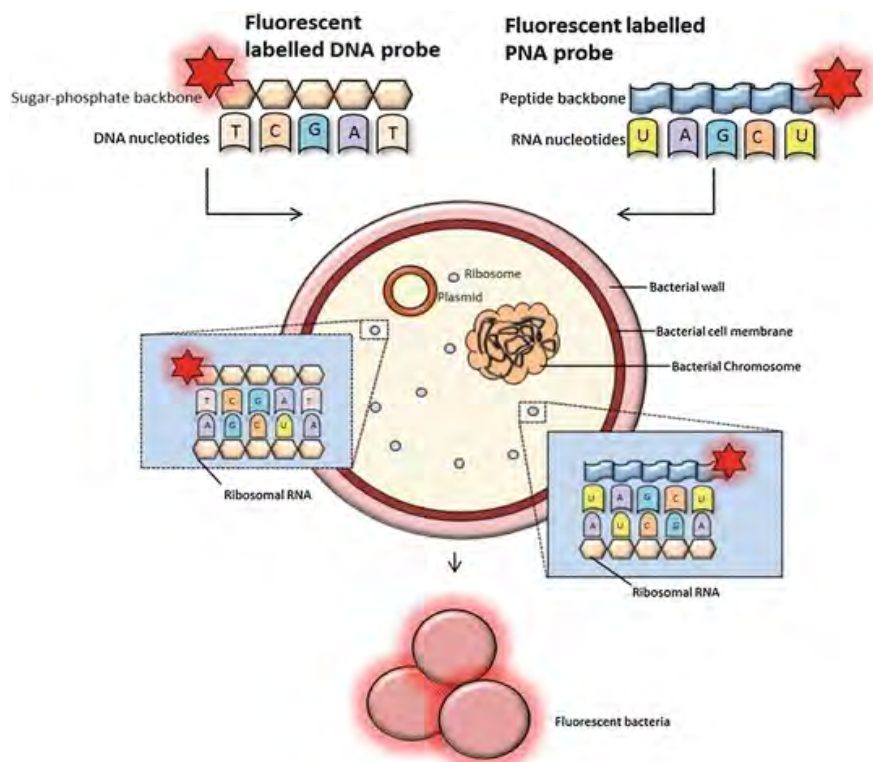
I dette studie undersøges det, hvorvidt der er en sammenhæng mellem stigende alder og øget forekomst af degenerative forandringer i endometriet. Derudover undersøges sammenhængen mellem endometrose og persisterende *S. zooepidemicus* infektion nærmere, da forskning peger i retning af, at der kan være en sammenhæng mellem disse. Derfor undersøges det, ved hjælp af Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH), om *S. zooepidemicus* er lokaliseret i relation til de kroniske degenerative forandringer i endometriet hos hopper med kronisk infektion, ligesom det er påvist hos enkelte hopper i studiet af Petersen *et al.* (Petersen *et al.* 2009).

Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)

Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH) er en teknik der har været brugt i både human- og veterinærmedicin i mange år og er siden begyndelsen blevet udviklet, så den nu til dags kan bruges til at identificere mikrobielle organismer og visualisere deres lokalisering i væv (Frickmann *et al.* 2017; Rolph *et al.* 2024). Hidtil har FISH blandt andet været brugt til detektion af bakterier i mennesker (Prudent & Raoult 2019), familiedyr (Rolph *et al.* 2024), grise (Jensen *et al.* 2015) og heste (Petersen *et al.* 2009). FISH er et godt redskab som supplement til anden diagnostik, da man ved brug af denne teknik kan detektere og identificere patogener som kan være svære at påvise på anden vis. Nogle bakterier kan være langsomt voksende ved dyrkning, eller de kan være lokaliseret intracellulært eller i biofilm, hvormed normale diagnostiske metoder ikke kan detektere dem (Moter & Göbel 2000; Prudent & Raoult 2019). Det er muligt at identificere disse bakterier ved FISH, da

man ved denne metode detekterer specifikke sekvenser af nukleinsyrer i prøven. Til detektion af bakterier benyttes oftest en probe, der binder til en komplementær sekvens i ribosomalt RNA (rRNA) i bakterien. Det er ofte rRNA der bruges som mål for proben, da der er en naturlig forøgelse af rRNA molekyler i bakterier (Jensen *et al.* 2015). Især i metabolisk aktive bakterier er der en høj mængde af rRNA, men der er også rRNA til stede i metabolisk inaktive bakterier, omend i lavere mængde (Prudent & Raoult 2019). Selvom rRNA er til stede i alle bakterier, findes der varierende sekvenser i de områder, der er mål for prober, der bruges til identifikation på artsniveau. Bakteriernes 70S ribosomer består af en 50S underenhed og en 30S underenhed. Yderligere består 50S underenheden af to RNA-molekyler, 5S og 23S, mens 30S underenheden består af et enkelt RNA-molekyle, 16S. Ved FISH benytter man typisk RNA-molekylet 16S som probens målsekvens til identifikation af bakterier, grundet molekylets konserverede og variable regioner (Jensen *et al.* 2015). De konserverede regioner er bevarede i de fleste bakterier, hvorimod de variable regioner varierer mellem de forskellige arter. De variable regioner kan dermed benyttes til at identificere specifikke arter, hvorimod de konserverede regioner kan bruges til at screene for en generel tilstedeværelse af bakterier (Wallner *et al.* 1993; Chakravorty *et al.* 2007). 16S molekylet er genetisk stabilt og findes i højt antal, hvorfor det er oplagt at bruge og giver størst nøjagtighed ved identifikation af bakterier (Moter & Göbel 2000).

Proben, der benyttes til FISH, er oftest en oligonukleotid-probe, der typisk har en størrelse på 18 - 25 basepar og er markeret med en fluorescens-markør (Frickmann *et al.* 2017). Der kan benyttes såvel DNA som PNA (peptide nucleic acid) prober, hvilke differentieres ud fra strukturen af rygraden. DNA har en sukker-fosfat-rygrad, hvorimod PNA har en polyamid-rygrad. PNA prober har en højere affinitet og binder bedre til den komplementære sekvens i forhold til DNA prober. Begge prober binder kun til en specifik sekvens og dermed kun kendte bakterier, hvormed metoden ikke kan bruges til at identificere ukendte bakterier i vævet. Dog kan der benyttes universelle prober til screening for alle bakterier, da disse binder til en sekvens, der er bevaret i alle bakterier (Wallner *et al.* 1993; Moter & Göbel 2000; Jensen *et al.* 2015).



Figur 2: FISH - binding af DNA- og PNA-fluorescensmarkerede prober til ribosomalt RNA (Jensen et al. 2015).

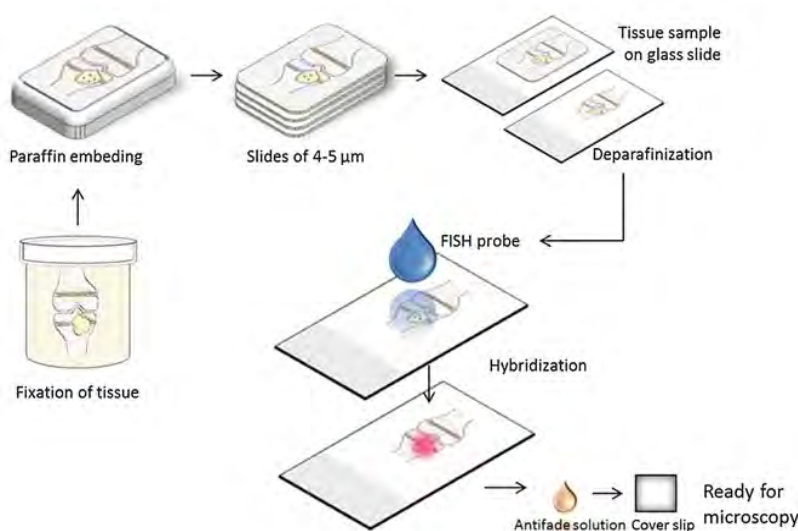
Fluorescensmarkering af proberne gør det muligt at visualisere de bakterier, proberne er bundet til ved fluorescens-mikroskopi. Fluoroforer der er baseret på cyanin farver, såsom Cy3 og Cy5, bliver ofte benyttet (Prudent & Raoult 2019). Disse farver har en høj fluorescensintensitet og er relativt stabile overfor nedbrydning ved udsættelse for kraftigt lys. Fluoroforer med forskellig excitation og emission gør det muligt at detektere flere bakterier i samme væv samtidig. Dette skyldes, at de optager farve (excitation) og udskiller farve (emission) ved forskellige bølgelængder, hvormed der kan differentieres mellem dem (Moter & Göbel 2000). Eksempler på dette kan ses i tabel 2.

Tabel 2: Oversigt over fluoroforerne Cy3 og Cy5 (Moter & Göbel 2000).

Fluorofor	Excitation	Emission	Farve
Cy3	550 nm	570 nm	Orange/rød
Cy5	651 nm	674 nm	Infrarød

FISH-proceduren består overordnet af fire trin: 1) fiksering og permeabilisering af prøven, 2) hybridisering, 3) fjernelse af ubundne prober og 4) detektion af markerede celler. Det er vigtigt at fikseres vævet før hybridiseringen, da dette bevarer den cellulære morfologi og nukleinsyrer,

hvorved der sikres en optimal bevaring af målsekvenser i vævet (Jensen *et al.* 2015; Frickmann *et al.* 2017). Derudover er det vigtigt at gøre bakterien permeabel. I Gram positive bakterier, såsom streptokokker, skal peptidoglykanlaget i bakteriens cellevæg åbnes, så proben lettere kan trænge ind i bakterien og binde til målsekvensen. Permeabilisering af cellevæggen kan opnås ved brug af enzymatisk præ-behandling med enten lysozym eller anden enzymatisk behandling (Frickmann *et al.* 2017).



Figur 3: Fremgangsmåde for FISH (Jensen *et al.* 2015).

Udover blot at påvise bakteriers tilstedeværelse, kan FISH desuden bruges til at visualisere lokaliseringen af bakterier i et væv. Derved muliggøres det at lave en korrelation mellem bakterier, vævsmorfologi og patologiske forandringer i vævet (Jensen *et al.* 2015). I et studie lavet af Petersen *et al.*, fulgtes lokaliseringen af *S. zooepidemicus* i endometrievæv hos fire hopper eksperimentelt inficeret med bakterien. Efterfølgende blev der taget biopsier i fastsatte tidsintervaller efter inokulationen, hvor bakterierne blev lokaliseret ved hjælp af FISH. Det blev påvist, at bakterierne bevægede sig fra lumen i uterus til klynger på overfladen af det luminale epitel indenfor 24 timer. Der blev desuden taget biopsier fra seks hopper med tegn på klinisk endometritis, hvor bakterierne primært blev lokaliseret i adskilte foci beliggende umiddelbart under det luminale epitel. I studiet blev bakterierne derudover fundet dybere i stratum compactum, 300 - 500 µm fra lumen. Studiet viste således, at *S. zooepidemicus* ved persisterende infektioner havde en anderledes placering i vævet end ved akutte infektioner. I nogle tilfælde blev bakterien også lokaliseret i områder med

vævsremodellering i form af fibrotisk væv. Dog kunne det ikke ud fra studiet siges, om bakterien havde haft en indflydelse på remodelleringen af vævet (Petersen *et al.* 2009).

En udfordring ved FISH er autofluorescens ved mikroskopering. Autofluorescens er fluorescens, der stammer fra celler i væv, der fluorescerer uden binding af fluoroforer. Især kollagen, erythrocytter og eosinofile granulocytter afgiver autofluorescens. Disse kan således forstyrre, når man forsøger at undersøge forekomsten af signaler fra fluoroforer. For at undgå falsk positive resultater, er det vigtigt at skelne mellem et positivt FISH resultat og autofluorescens. Autofluorescensen kan forekomme ved bølglængder, hvor tilførte fluoroforer ikke observeres, hvormed der kan skelnes mellem fluorescenserne (Moter & Göbel 2000; Brodie 2020). Det anbefales at inkludere mange positive og negative kontroller for lettere at kunne skelne mellem fluorescens fra fluoroforen og autofluorescens fra vævet (Prudent & Raoult 2019).

Metoder og materialer

Litteratursøgning

Videnskabelig litteratur, der er anvendt i projektet, er fundet ved søgning på PubMed og Google Scholar. Derudover er ChatGPT (*chatgpt.com*) blevet benyttet til at fremsøge og gennemlæse litteratur, men ikke til at generere tekst eller figurer til videre brug i opgaven. Københavns Universitets AI deklARATION er vedlagt som bilag (bilag 3).

Hopper

Hopper fra Irland

Der er inkluderet endometrie-biopsier fra 17 hopper fra et fuldblodsstutteri i Irland. Disse hopper er inkluderet grundet historik om subfertilitet over flere år, men initielt et negativt dyrkningsresultat. *S. zooepidemicus* infektion i endometriet er påvist hos størstedelen af hopperne (13/15), efter de er aktiveret med vækstmediet bActivate i forbindelse med et andet studie. Disse hopper har således haft en subklinisk *S. zooepidemicus* infektion på det tidspunkt, hvor biopsierne er udtaget. Alderen på hopperne ved udtagning af biopsierne er mellem 6 - 21 år. Biopsierne er udtaget mellem 2015 - 2017.

Hopper fra Danmark

Der er inkluderet endometrie-biopsier fra 14 rugehopper fra et stutteri i Danmark. Disse hopper er inkluderet, da de i avlssæsonen 2025 ikke er blevet drægtige ved Embryo Transfer (ET). Ingen af hopperne er behandlet med antibiotika i 2025 avlssæsonen, dog er flere af dem behandlet med oxytocin én eller flere gange som følge af påvisning af IUF ≥ 2 cm på ultralydsscanning. Hopperne mistænkes for at kunne have enten en klinisk eller subklinisk *S. zooepidemicus* infektion, da de ikke er blevet drægtige, og da der er påvist IUF af forskellig varighed og over et varierende antal cyklusser hos 13/14 af hopperne. Alderen på disse hopper er mellem 6 - 16 år. Alle biopsierne er udtaget i september 2025.

Prøveudtagning

Hopper fra Irland

Biopsierne er udtaget ved hjælp af en krokodillenæbs-biopsitang. Selve trinnene i prøveudtagningen er ukendte, men det formodes, at biopsierne er udtaget *lege artis*, da de er udtaget af en rutineret reproduktions-dyrlæge. Prøverne blev efter udtag opbevaret i lukkede beholdere indeholdende formalin. Disse er opbevaret mørkt og ved stuetemperatur. Vævet blev indstøbt i paraffinblokke, hvorfra der blev skåret snit på 2 - 4 μm , hvilke blev monteret på objektglas.

Hopper fra Danmark

Biopsierne er udtaget ved hjælp af en punch-biopsitang. Forud for prøveudtagning er området omkring vulva og perineum afvasket med iod-tilblandet vand. Ved udtag af biopsien indførtes biopsitangen blindt ind i vagina og gennem cervix. Ved indførsel i vagina var biopsitangen afskærmet i en rektalhandske med et hul i spidsen og først ved indførsel i cervix, førtes tangen ud af handsken. Biopsitangen blev ligeledes afskærmet i handsken på vej ud gennem vagina. Efter udtag blev der lavet udstrygning på blodagar af biopsierne, hvorefter de blev overført til en beholder med formalin (BiopSafe biopsi container 20 mL, OneMed A/S, Hinnerup, Danmark) og opbevaret mørkt ved stuetemperatur. Vævet blev indstøbt i paraffinblokke, hvorfra der blev skåret snit på 2 - 4 μm , hvilke blev monteret på objektglas.

Bakteriologi

Hopper fra Irland

For alle hopperne er der lavet dyrkning på en udstrygning af biopsien fra endometriet forud for aktivering med bActivate. Her var alle hopperne negative for *S. zooepidemicus* ved dyrkning på blodagar med aerob inkubation ved 37°C i 24 timer. Hopperne fik efterfølgende en infusion af vækstmediet bActivate (Bojesen and Petersen Biotech ApS, København, Danmark) i uterus, hvorefter der blev foretaget LVL. Fra LVL-væsken blev der ligeledes dyrket på blodagar ved aerob inkubation ved 37°C i 24 timer. Prøverne blev betegnet som positive for *S. zooepidemicus*, såfremt denne forekom i monokultur eller ved blandet vækst med højst 2 dominerende kolonier. Såfremt der ikke var en sådan vækst af *S. zooepidemicus*, blev prøven betegnet som negativ for *S. zooepidemicus* infektion. Ved vækst af en bakterie, der mistænkes for at være *S. zooepidemicus*, blev bakterien sendt til et laboratorium, hvor arten blev endeligt bestemt ved MALDI-TOF.

Hopper fra Danmark

Der blev lavet dyrkning på udstrygning fra biopsierne på blodagar med aerob inkubation ved 37°C i 20 timer. På dyrkningen fandtes 3 hopper der havde vækst uden dominerende kolonier, 1 hoppe der havde vækst med 2 dominerende kolonier, og 10 hopper der havde vækst med 1 dominerende koloni. De dominerende kolonier blev subkultiveret, og renkulturene blev brugt til at bestemme bakteriernes art. Det blev undersøgt, om bakterierne var Gram-positive eller Gram-negative, kokker eller stave, og om de var katalase positive eller negative. Derudover blev kolonimorfologien vurderet. Baseret på disse undersøgelser blev det antaget, at 8 af de subkultiverede kolonier var samme bakterie, hvorfor der kun blev lavet MALDI-TOF på én af disse. De 4 resterende kolonier havde forskelligartet morfologi og hæmolyse, hvorfor der blev lavet MALDI-TOF på alle disse separat.

Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)

FISH-proceduren blev udført som beskrevet i bilag 2. Protokollen der benyttes er standard-protokollen for FISH fra Sektion for Veterinær Parasitologi og Patobiologi ved Københavns Universitet, hvilken er meget lig protokollen der er anvendt i studiet af Petersen *et al.* og Steffensen & Søndergaard til påvisning af *S. zooepidemicus* i uterint væv fra hopper (Petersen *et al.* 2009; Steffensen & Søndergaard 2022). *Streptococcus* spp. proben der benyttes i disse studier har samme sekvens som proben i dette studie. I korte træk udføres FISH således: snittene afparaffineres og

dehydreres. Derefter behandles de med proteinase K for at øge tilgængeligheden af RNA for proberne og for at nedbryde RNaser. Snittene placeres i Shandon rack og skylles med vaskebuffer. Proberne fortyndes til en koncentration på 5 ng/μL. Der tilføres 100 μL hybridiseringsbuffer med probe til hvert snit. Der dækkes af med sølvpapir for at undgå degradering af fluoroforen og inkuberes ved 45°C natten over. Efter hybridiseringen vaskes snittene 3 gange med hybridiseringsbuffer og derefter 3 gange med vaskebuffer. Snittene dehydreres 3 x 2 min i hhv. 70%, 85% og 96% ethanol. Snittene baggrundsfarves med DAPI, hvorefter de tørrer i varmeskab. Når de er tørre monteres dækglas med VectaShield.

Oligonukleotid prober

I dette studie blev der udelukkende fokuseret på at påvise *S. zooepidemicus* i vævet. Da der ikke findes en specifik probe for *S. zooepidemicus*, benyttes i stedet en probe der binder til alle *Streptococcus* spp. Dette kan med rimelighed forsvares, da *S. zooepidemicus* klart er den hyppigst isolerede *Streptococcus* spp. hos hopper med endometritis (Proietti *et al.* 2011; Mouncey *et al.* 2024). Proben, der benyttes i dette studie, er mærket med Cy3, hvilken afgiver en orange/rød farve ved fluorescens-mikroskopi. Proben er produceret af Eurofins Genomics (Ebersberg, Tyskland) og sekvensen er følgende: 5'-Cy3-CAC TCT CCC CTT CTG CAC-3'.

Udover *Streptococcus* spp. proben blev der for hver biopsi også lavet en kontrol prøve med en Eub338 probe, også produceret af Eurofins Genomics. Denne probe er designet, så den binder til en sekvens i 16S rRNA som er velkonserveret for alle bakteriearter, hvorfor den kan bruges til at påvise alle bakterier i vævet (Wallner *et al.* 1993). Eub338 proben er ligeledes mærket med Cy3, og sekvensen er følgende: 5'-Cy3-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'.

Positive og negative kontroller

Der blev lavet både positive og negative kontroller for *Streptococcus* spp. proben. Dette blev gjort ved at dyrke renkulturer af *E. coli* og *S. zooepidemicus*. Kolonierne blev overført til sterilt BHI/B-vækstmedie, og det blev ved hjælp af OD600-målinger undersøgt, hvornår bakterierne var i eksponentiel fase. Her blev de isoleret og fikseret i 10% formalin i 1 time og derefter vasket 2 x 5 min i PBS. De blev opbevaret i PBS, og herfra blev de overført til histogelblokke (HistoGel™, EpreDia, Holland), som der blev lavet snit af. Fremgangsmåden for fremstillingen af kontrollerne findes i bilag 1. Bakterie-kontrollerne gennemgik hybridisering på samme måde som biopsi-snittene. Formålet med renkulturen af *S. zooepidemicus* er at sikre, at den benyttede Eub338 probe og *Streptococcus* spp. probe kan binde til denne bakterie ved den anvendte FISH-protokol. Formålet

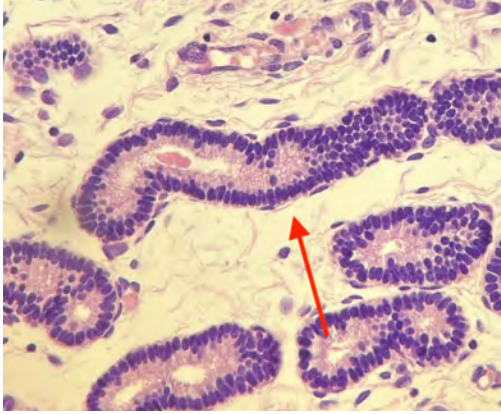
med renkulturen af *E. coli* er at sikre, at Eub338 proben kan binde til denne, men at *Streptococcus* spp. proben ikke kan og er dermed en sikring for, at proben ikke har en for lav specificitet. *E. coli* er udvalgt på baggrund af, at denne udover *S. zooepidemicus* er det hyppigst forekommende bakterieisolat ved infektiøs endometritis (Morris *et al.* 2020; Mouncey *et al.* 2024).

Epi-fluorescensmikroskopi

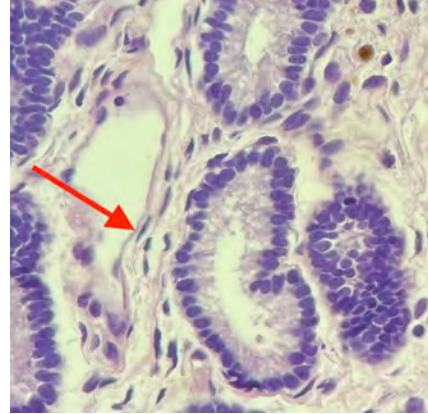
Evaluering af fluorescenssignalet fra biopsierne og kontrollerne efter hybridiseringen blev foretaget med et Axio Imager M1 mikroskop fra Zeiss. Computerprogrammet blev indstillet til at kunne modtage rød, grøn og blå farve. Snittene blev evalueret gennem 43 HE-filtre, 49 DAPI-filtre og 44 GFP-filtre. Hvert snit blev først evalueret ved 200x forstørrelse og efterfølgende ved 400x forstørrelse. Alle snittene blev systematisk evalueret af begge forfattere ved gennemgang af hele det lumbale epitel, stratum compactum og til sidst hele snittet. Autofluorescens blev skelnet fra fluorescens fra proben ved, at det korrekte signal fra Cy3 kun var synligt i 43 HE-filtret og ikke i de andre filtre, mens autofluorescens kunne ses gennem alle filtrene. Der blev i høj grad observeret autofluorescens fra granula i eosinofile granulocytter. Disse havde samme runde form som streptokokker, men kunne adskilles på baggrund af størrelse og organisering samt synlighed gennem filtrene. Granula var større end streptokokkerne og fandtes i runde klynger, nogle steder tydeligt afgrænset af en cellevæg. Kriteriet for, at en bakterie blev anset som værende *Streptococcus* spp. var, at denne bandt *Streptococcus* spp. proben, havde den korrekte morfologi og størrelse, det rette farvesignal, der kun var tydeligt i 43 HE-filtret, og var beliggende i samme plan som vævet.

Histologisk vurdering

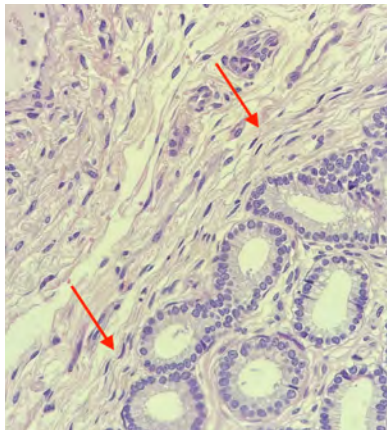
Der blev foretaget histologisk vurdering af alle de HE-farvede biopsier af forfatterne i samarbejde med Mette Christoffersen fra Sektion for Medicin, Kirurgi og Reproduktion Store Husdyr ved Københavns Universitet. Der blev lavet en vurdering af endometrie-kvalitet og inflammation, på baggrund af hvilke hopperne blev tildelt en Kenney-score. I vurderingen indgik graden/udbredelsen af fibrose, tilstedeværelse/antallet af rededannelser og tilstedeværelsen af PMNs. Desuden blev tilstedeværelsen af lymfatiske lacunae og cystiske kirtler noteret. Graden af fibrose blev vurderet ud fra udbredelsen af fibrosen (fokal, multifokal, diffus), samt antallet af lag af fibroblaster der var omkring kirtlerne og/eller rederne. På figur 4, 5, 6 og 7 ses forskellige antal lag af fibroblaster periglandulært som blev observeret ved den histologiske undersøgelse af biopsierne.



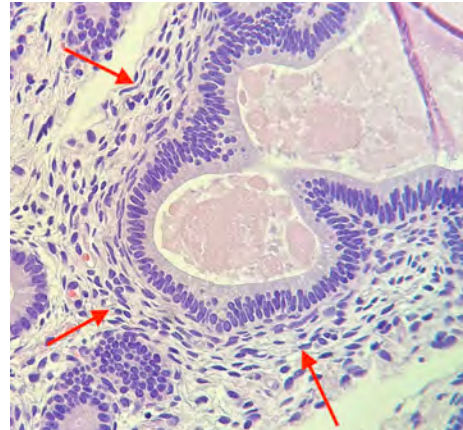
Figur 4: Pilen peger på en kirtel med 1 lag fibroblaster periglandulært. Hoppe #20i.



Figur 5: Pilen peger på en kirtel med 3 lag fibroblaster periglandulært. Hoppe #5i.

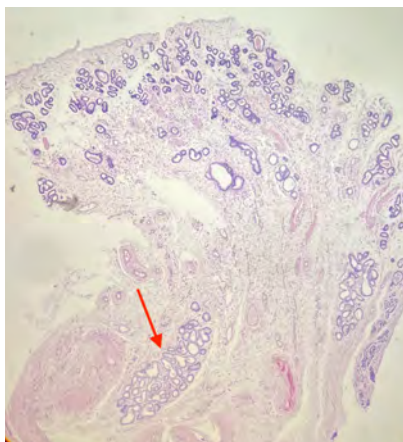


Figur 6: Pilene peger på områder med 5 - 6 lag fibroblaster periglandulært. Hoppe #14i.

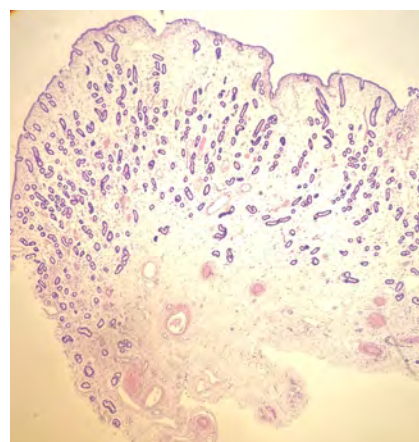


Figur 7: Pilene peger på en kirtel med 6 - 8 lag fibroblaster periglandulært. Hoppe #5d.

Rededannelser blev vurderet som et gennemsnit af antallet af reder i 4 synsfelter med 50x forstørrelse. På figur 8 ses et endometrie med rededannelser og på figur 9 ses et uden. Derudover ses kirtelatrofi på figur 8, samt normal fordeling og antal af kirtler på figur 9.

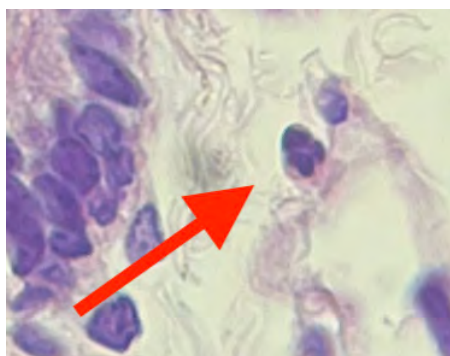


Figur 8: Diffus kirtel atrofi. Pilen peger på en rededannelse. Hoppe #14i.

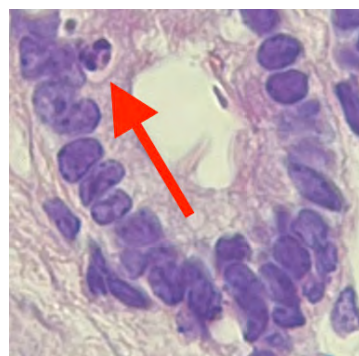


Figur 9: Normal fordeling og antal af kirtler og ingen rededannelser. Hoppe #1i.

PMNs blev vurderet som antal PMNs pr. 5 synsfelter ved 400x forstørrelse. Prøven blev betegnet som positiv for inflammation, såfremt der observeredes ≥ 1 PMN / 5 hpf. På figur 10 og 11 ses eksempler på en PMN beliggende i hhv. stroma og en kirtel.



Figur 10: Pilen peger på en PMN i stroma. Hoppe #11i.



Figur 11: Pilen peger på en PMN beliggende i en kirtel. Hoppe #11i.

På baggrund af ovennævnte observationer blev hopperne inddelt i kategori I, IIAr, IIAi, IIB eller III. Vi har valgt at dele Kenney-gruppe IIA op i to undergrupper, således at det kan skelnes, om hoppen er tildelt denne kategori på baggrund af inflammation (reversibel parameter) eller fibrose (irreversibel parameter). På tabel 3 ses de kriterier, som biopsierne er tildelt en Kenney-score på baggrund af. I dette studie blev en hoppe med kategori I endometrium, i forhold til graden af fibrose, allokeret til kategori IIAr, såfremt der var inflammation til stede, men vil ved eliminering af inflammationen igen kunne tildeles kategori I, hvis fibrosen ikke har udviklet sig yderligere i mellemtiden. I dette studie er det udelukkende mellem kategori I og IIA, at inflammation kan ændre hoppens kategori. I de andre kategorier afgøres hoppens kategori primært af antal lag af fibroblaster og antal rededannelser.

Tabel 3: Kriterierne for tildeling af de forskellige Kenney-kategorier, der er anvendt i dette studie.

Kenney-score	Antal lag fibroblaster	Inflammation (≥ 1 PMN / 5 hpf)	Antal rededannelser / hpf
I	≤ 1 lag fokalt/multifokalt	-	Ingen
Reversibel IIA (IIAr)	≤ 1 lag fokalt/multifokalt	+	Ingen
Irreversibel IIA (IIAi)	1 – 3 lag multifokalt	+/-	< 2 / hpf

IIB	≥ 4 lag multifokalt/diffust	+/-	2 – 4 / hpf
III	> 10 lag multifokalt/diffust	+/-	> 5 / hpf

Statistisk analyse

Dette er et observationelt studie, og grundet det begrænsede antal individer, der indgår i datasættet i dette studie, angives kun gennemsnit, frekvenser og deskriptive data. De beregnede værdier er angivet som gennemsnit \pm spredning eller som procentsatser. Nogle steder er der angivet interval minimum-maksimum. Alle beregninger er foretaget i Maple.

Resultater

Bakteriologi og fertilitet

Tabel 4: Oversigt over hopperne fra Irland med kendte oplysninger om fertilitet.

Hoppe	Alder [år]	Barren years [år]	Aktivering*	Bedækninger [antal]	Drægtighed dag 150**	Levendefødt føl***
#1i	9	1	1	1	1	1
#2i	8	1	1	1	1	1
#3i	17	2	1	0	0	0
#4i	6	3	1	1	1	0
#5i	11	2	1	1	1	1
#6i	9	1	1	2	1	1
#7i	11	2	1	1	1	0
#9i	19	2	0	3	0	0
#10i	21	2	1	2	1	1
#11i	6	1	1	1	1	1
#12i	10	-	1	1	1	1
#13i	14	2	1	1	1	1

#14i	13	2	1	1	1	1
#15i	12	1	1	1	1	1
#17i	9	-	0	3	0	0

* 1 = positiv vækst for *S. zooepidemicus* efter aktivering med bActivate. 0 = ingen vækst af *S. zooepidemicus* efter aktivering med bActivate. Alle hopperne var negative for vækst af *S. zooepidemicus* forud for aktivering med bActivate.

** 1 = Drægtighed ved dag 150. 0 = Ingen drægtighed ved dag 150.

*** 1 = Levendefødt føl. 0 = Ikke et levendefødt føl.

Af hopperne fra Danmark var kun én hoppe (#9d) positiv for vækst af *S. zooepidemicus* på blodagar, bekræftet ved MALDI-TOF. Derfor var dette den eneste af hopperne fra Danmark, hvis biopsi der blev lavet FISH på for at visualisere bakteriens lokalisering ved aktiv infektion.

Histologi – Kenney-score

Tabel 5: Oversigt over histologiske parametre for hopperne fra Irland og Danmark og deraf afledt Kenney-score. #”nr”+i = hopper fra Irland. #”nr”+d = hopper fra Danmark. To af hopperne fra Danmark er ekskluderet grundet for lille størrelse af biopsien og fravær af lumenalt epitel.

Hoppe	Alder [år]	Fibroblaster – antal lag og udbredelse	Rededannelser	Cystiske kirtler	Lymfatiske lacunae	Inflammation (≥ 1 PMNs / 5 hpf)	Kenney-score
#1i	9	1; multifokalt	-	-	-	-	I
#2i	8	1 - 2; multifokalt	-	+	+	-	IIAi
#3i	17	2 – 3; diffust	-	+	+	+	IIAi
#4i	6	1 – 2; multifokalt	2 – 3 / hpf	+	+	+	IIAi
#5i	11	2 – 3; multifokalt	-	-	+	+	IIAi
#6i	9	2 – 3; multifokalt	-	+	-	+	IIAi
#7i	11	3 – 5; multifokalt	2 - 4 / hpf	+	-	+	IIB
#9i	19	3 – 5; multifokalt	2 - 4 / hpf	+	+	+	IIB
#10i	21	3; multifokalt	< 2 / hpf	+	+	+	IIB

#11i	6	1; multifokalt	-	+	-	+	IIAr
#12i	10	1 – 2; fokalt	-	-	+	-	I
#13i	14	1 – 2; multifokalt	< 2 / hpf	+	+	-	IIAi
#14i	13	5 – 6; multifokalt	< 2 / hpf	+	+	-	IIB
#15i	12	1 – 2; multifokalt	-	+	+	-	IIAi
#17i	9	1 – 2; diffust	-	+	+	-	IIAi
#18i	17	1 – 2; diffust	-	+	-	-	IIAi
#20i	8	1; multifokalt	-	+	-	+	IIAr
#1d	15	1 – 2; multifokalt	-	-	-	+	IIAi
#2d	10	1; fokalt	-	-	-	+	IIAr
#3d	11	1 – 2; diffust	-	+	+	+	IIAi
#4d	15	2 – 3; diffust	< 2 / hpf	+	+	+	IIAi
#5d	12	1 – 2; multifokalt 5 – 6; fokalt	< 2 / hpf	+	+	+	IIB
#6d	9	1; fokalt	-	-	+	-	I
#7d	9	1; diffust	-	-	+	+	IIAr
#8d	7	1 – 3; diffust	-	+	+	+	IIAi
#9d	12	1 – 3; diffust	< 2 / hpf	-	+	+	IIAi
#12d	12	1 – 2; multifokalt	-	-	-	-	IIAi
#13d	8	1; fokalt	-	-	+	+	IIAr
#14d	6	1; multifokalt	-	-	+	-	I

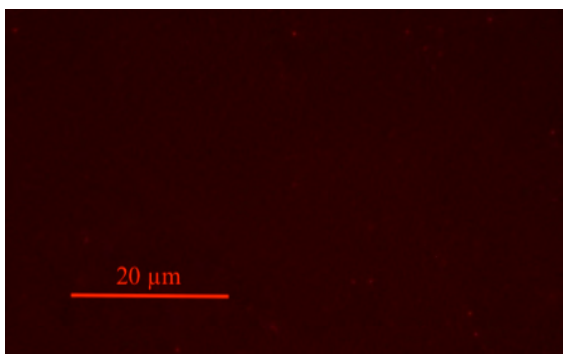
Fluorescens In Situ Hybridisering (FISH)

Der blev i alt lavet FISH på 16 biopsier, hvoraf 15 var fra Irland og 1 var fra Danmark. Derudover blev der lavet negative og positive kontroller for begge prober.

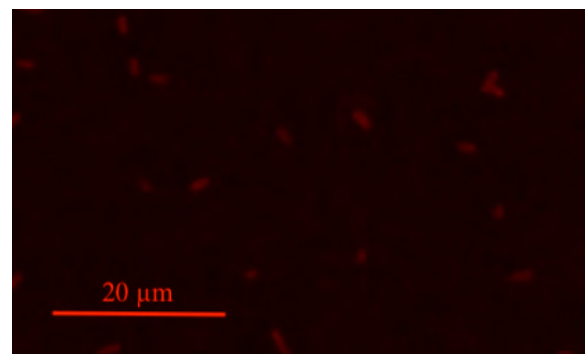
Eub338 probe og kontroller

Ved mikroskopering sås der i alle 16 biopsier fluorescenssignaler fra kokkoide bakterier ved brug af Eub338 proben, hvorfor alle 16 biopsier yderligere undergik FISH med *Streptococcus* spp. proben. Desuden observeredes der signal fra stavbakterier på samtlige biopsier med Eub338 proben. Stavbakterierne fandtes i stort antal og blev observeret såvel i vævet som udenfor vævet, hvorfor der formodes at være en vis grad af kontamination.

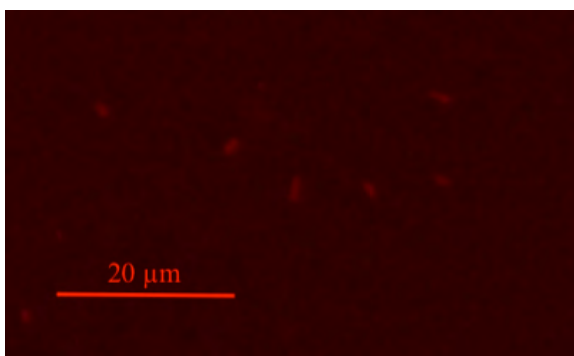
Ved mikroskopering af kontrollerne blev det påvist, at både Eub338 proben og *Streptococcus* spp. proben kunne binde til renkulturen af *S. zooepidemicus*, da der fandtes fluorescenssignal fra *S. zooepidemicus* på de positive kontroller og intet signal på den negative kontrol. På renkulturen af *E. coli* blev det påvist, at Eub338 proben kunne binde til disse, men at *Streptococcus* spp. proben ikke kunne. På biopsierne og renkulturerne af bakterier der gennemgik hybridisering kun med hybridiseringsbuffer og uden probe, sås intet fluorescenssignal fra bakterier. Herunder ses de forskellige kontrolprøver, samt hvorledes der skelnes mellem autofluorescens og signal fra bakterierne. I mikroskopet var det tydeligt at se, at der var fluorescens på de positive kontroller og ikke på de negative. Dette er sværere at erkende på billederne.



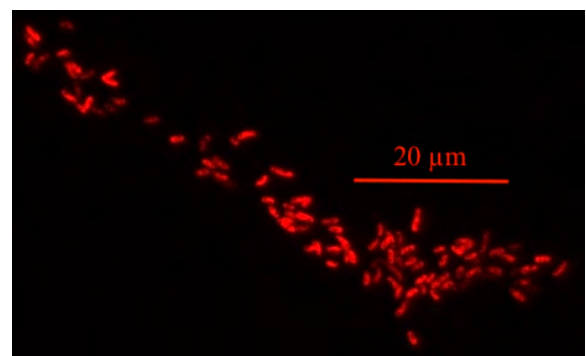
Figur 12: Negativ kontrol - *S. zooepidemicus* uden probe.



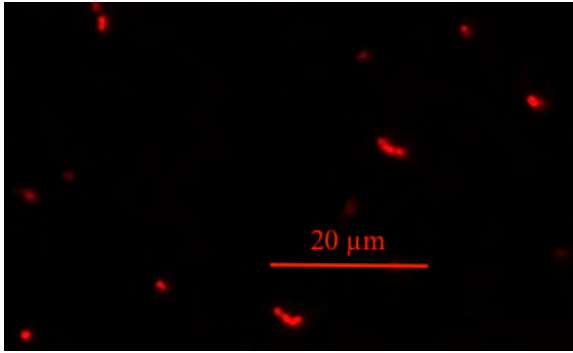
Figur 13: Negativ kontrol - *E. coli* uden probe.



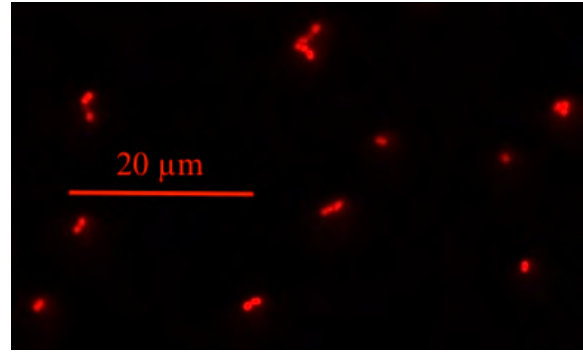
Figur 14: Negativ kontrol - *E. coli* med *Streptococcus* spp. probe.



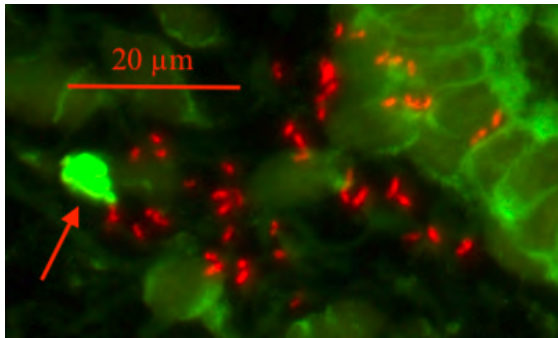
Figur 15: Positiv kontrol - *E. coli* med Eub338 probe.



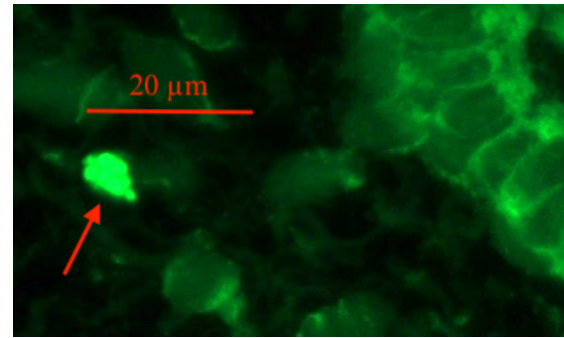
Figur 16: Positiv kontrol - *S. zooepidemicus* med *Streptococcus* spp. probe.



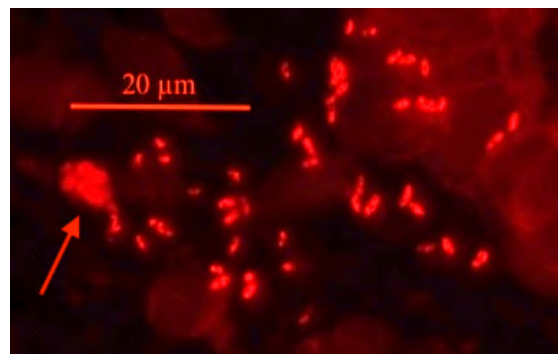
Figur 17: Positiv kontrol - *S. zooepidemicus* med Eub338 probe.



Figur 18: 43 HE-filter og 44 GFP-filter.

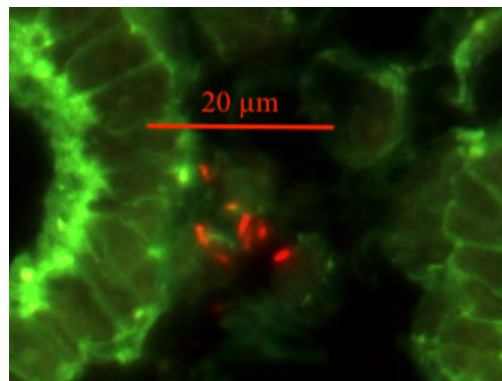


Figur 19: 44 GFP-filter.



Figur 20: 43 HE-filter.

Figur 18, 19 og 20: Eosinofil granulocyt (rød pil) og stavbakterier (røde). Hoppe #12i. Bakterier ses kun gennem 43 HE-filteret (figur 18 og 20), mens granula ses gennem både 43 HE-filteret og 44 GFP-filteret (figur 18, 19 og 20).



Figur 21: Stavbakterier periglandulært. Hoppe #15i.

Streptococcus spp. probe

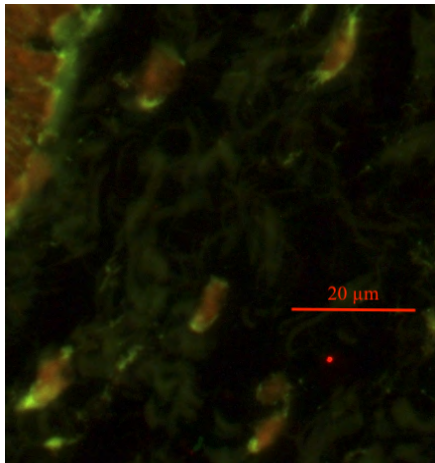
Tabel 6: Lokalisering og antal af *Streptococcus* spp. i vævet fra biopsierne ved FISH. Afstand til lumen er angivet hhv. for bakterierne i lumbinalt epitel/stratum compactum (øverst) og stratum spongiosum (nederst).

Hoppe	Lumbinalt epitel eller stratum compactum	Stratum spongiosum (periglandulært/stromalt)	Intracellulært i kirtlepitel	I relation til degenerative forandringer	Afstand til lumen*
#1i	2	3	-	-	I lumen – 20 µm 200 - > 500 µm
#2i	-	3	-	-	300 - > 500 µm
#3i	Ca. 200 i biofilm/ekssudat 2 i kirtellumen	-	1	-	I lumen > 500 µm
#4i	2	3 21 i klump	2	-	20 – 25 µm 300 µm
#5i	3	11	-	-	I lumen > 500 µm
#6i	-	12	3	-	100 µm
#7i	-	3	-	-	> 500 µm
#9i	-	1	-	-	> 500 µm
#10i	1	12	3	1 intracellulært i en rededannelse	30 – 40 µm 150 - > 500 µm
#11i	-	9	-	-	100 - > 500 µm
#12i	1	2	-	-	50 µm 300 µm
#13i	-	9	-	-	50 - > 500 µm
#14i	-	7	-	1 blandt fibroblaster ved rededannelse	> 500 µm
#15i	-	4	-	-	100 - > 500 µm
#17i	-	4	-	-	> 500 µm
#9d	-	4	-	-	50 - > 500 µm

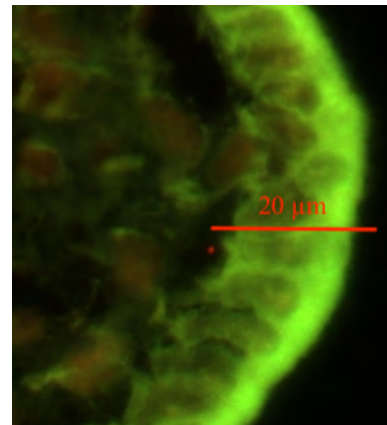
Tabel 7: Herunder ses, hvilket antal af *Streptococcus* spp. bakterier der er visualiseret på de forskellige lokaliteter i vævet fra biopsierne ved FISH.

Luminalt epitel eller stratum compactum	Stratum spongiosum (periglandulært/stromalt)	Intracellulært i kirtelepitel	I relation til degenerative forandringer	Total antal <i>Streptococcus</i> spp. bakterier
211	108	9	2	328

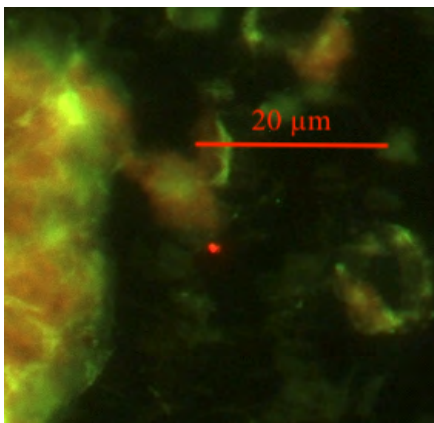
Streptococcus spp. blev påvist i endometriet hos 100% af hopperne ved FISH, herunder også de to hopper der havde negativ dyrkning efter aktivering med bActivate. Der ses streptokokker beliggende i det luminale epitel eller umiddelbart under epitelet i stratum compactum hos 40% (6/15) af de subklinisk inficerede hopper. Derudover ses streptokokker beliggende periglandulært/stromalt eller intracellulært i stratum spongiosum hos 100% (15/15) af de subklinisk inficerede hopper. Disse ligger mellem 50 µm og > 500 µm fra lumen. Hos 20% (3/15) af de subklinisk inficerede hopper, sås streptokokker beliggende intracellulært i kirtelepitelcellerne, hvilket kan ses på figur 25. Generelt var de fleste bakterieceller beliggende enkeltvis, dog lå flere bakterier sammen få steder, f.eks. hos hoppe #4i. Generelt var bakteriernes antal i vævet lavt. Hos en enkelt hoppe (#3i) observeredes, hvad der formodes at være ekssudat eller biofilm indeholdende multiple *Streptococcus* spp. beliggende på overfladen af det luminale epitel. Dette kan ses på figur 28. Hos 15,4% (2/13) af hopperne med degenerative forandringer, og dermed Kenney-score IIAi eller IIB, sås streptokokker beliggende i relation til kronisk degenerative forandringer. Hos den ene af disse hopper, lå en bakterie blandt fibroblasterne omkring en rededannelse, og hos den anden hoppe, lå en bakterie intracellulært i en kirtelepitelcelle, der var inde i en rededannelse. Begge disse hopper tilhørte kategori IIB. Hos resten af hopperne sås ingen bakterier i relation til degenerative forandringer. Hos den danske hoppe, der havde en aktiv infektion, der kunne påvises ved dyrkning, sås kun få bakterier, alle beliggende periglandulært/stromalt i stratum spongiosum. Disse bakterier lå mellem 50 µm og > 500 µm under det luminale epitel. På dette snit sås desuden markant autofluorescens, især fra erythrocytter, hvilket kan ses på figur 27.



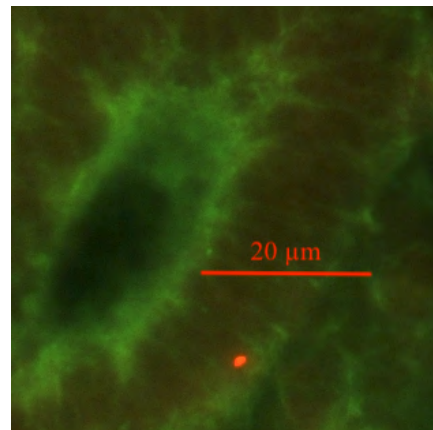
Figur 22: Streptokok blandt fibroblaster rundt om rede. Hoppe #14i.



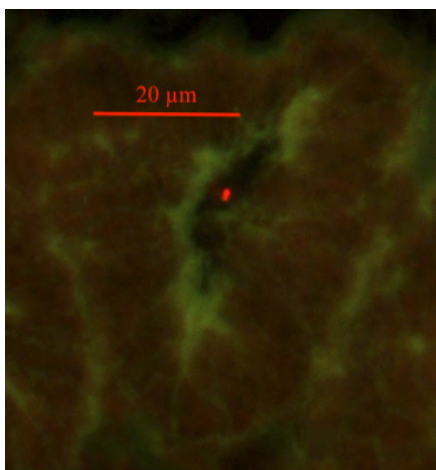
Figur 23: Streptokok i stratum compactum. Lige under det lumenale epitel og ca. 20 μm fra lumen. Hoppe #1i.



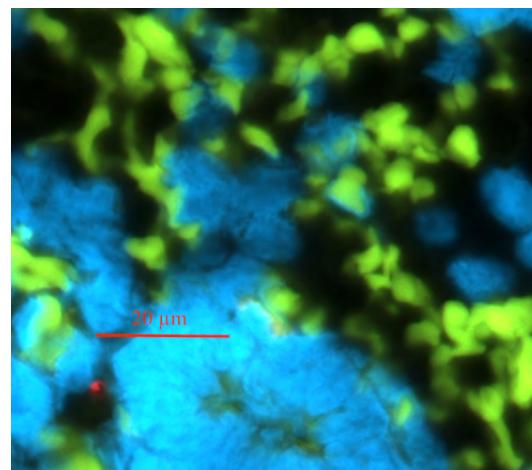
Figur 24: 1 streptokok i stroma. Hoppe #9i.



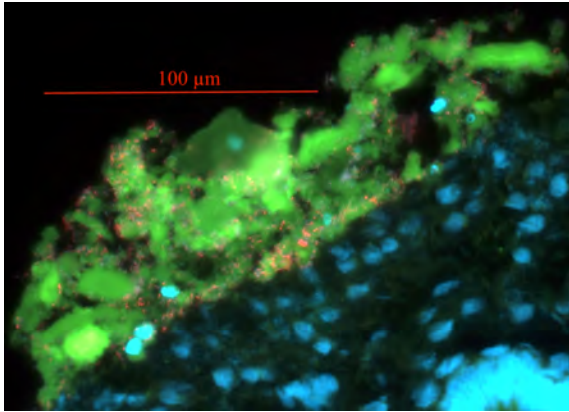
Figur 25: 2 streptokokker intracellulært i en kirtlepitelcelle. Hoppe #4i.



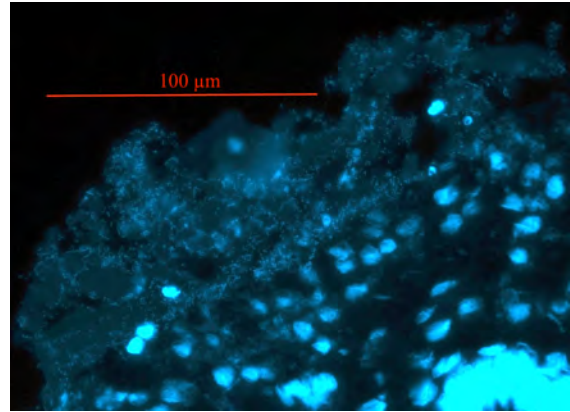
Figur 26: 2 streptokokker i kirtellumen. Hoppe #3i.



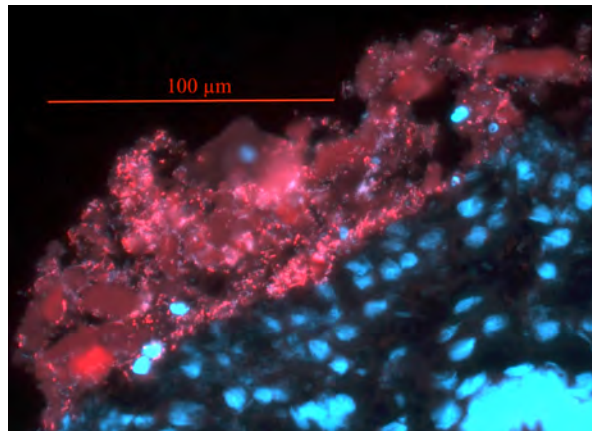
Figur 27: Autofluorescens (grøn) fra erythrocytter og fluorescens fra en streptokok (rød). Hoppe #9d.



Figur 28: 43 HE-, 49 DAPI- og 44 GFP-filter.

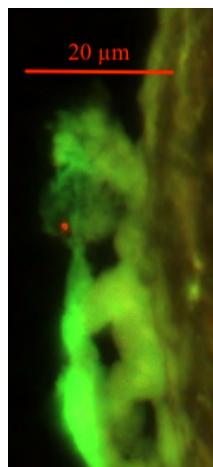


Figur 29: 49 DAPI-filter.

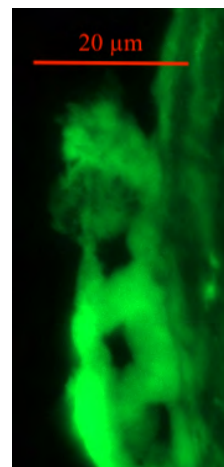


Figur 30: 43 HE- og 49 DAPI-filter.

Figur 28, 29 og 30: Biofilm eller eksudat med streptokokker på overfladen af lumenale epitelceller med hhv. 49 DAPI- og 44 GFP-filter, 49 DAPI-filter, samt 43 HE- og 49 DAPI-filter. Hoppe #3i.



Figur 31: 43 HE- og 44 GFP-filter.



Figur 31: 44 GFP-filter.

Figur 31 og 32: Streptokok i lumenale epitel kommer til syne, når 43 HE-filter benyttes og forsvinder, når 44 GFP-filteret benyttes. Hoppe #5i.

Sammenhæng mellem alder, Kenney-score og fertilitet

I de følgende beregninger indgår kategori I og IIAr sammen, da hopperne i kategori IIAr udelukkende er tildelt denne kategori på grund af tilstedeværelse af inflammation, hvilken anses som en reversibel parameter. Ved eliminering af inflammationen, har de således samme grad af forandringer som hopperne i kategori I.

Sammenhæng mellem Kenney-score og alder

Tabel 8: Oversigt over gennemsnitsalderen for hhv. hopperne fra Danmark og Irland, samt samlet for de to populationer i relation til Kenney-score. IIAr = reversibel IIA - hoppen er tildelt denne score på baggrund af inflammation. IIAi = irreversibel IIA - hoppen er tildelt denne score på baggrund af fibrose og rededannelser.

	Gennemsnitsalder [år] - samlet	Gennemsnitsalder [år] - I + IIAr	Gennemsnitsalder [år] - IIAi	Gennemsnitsalder [år] - IIB
Danske hopper	10,5 ± 2,8 (n = 12) (6 - 15 år)	8,4 ± 1,4 (n = 5) (6 - 10 år)	12 ± 2,7 (n = 6) (7 - 15 år)	12 ± 0 (n = 1) (12 år)
Irske hopper	11,7 ± 4,3 (n = 17) (6 - 21 år)	8,3 ± 1,5 (n = 4) (6 - 10 år)	11,4 ± 3,7 (n = 9) (6 - 17 år)	16,0 ± 4,1 (n = 4) (11 - 21 år)
Samlet	11,2 ± 4,0 (n = 29) (6 - 21 år)	8,3 ± 1,4 (n = 9) (6 - 10 år)	11,7 ± 3,3 (n = 15) (6 - 17 år)	15,2 ± 4,0 (n = 5) (11 - 21 år)

Der ses en højere gennemsnitsalder hos hopper med en højere Kenney-score i begge vores populationer enkeltvis samt i den samlede population. Der tages forbehold for, at der ikke indgår nogen hopper med kategori III-endometrie i studiet.

Sammenhæng mellem Kenney-score, alder, barren years, drægtighedsrate og live-foal rate

Dataene, der er angivet i dette afsnit, er udelukkende beregnet for gruppen af hopper fra Irland med kendt reproduktionshistorik, da vi havde adgang til deskriptive data for disse hoppers fertilitet efter udtag af biopsierne. Forud for, at hopperne fik udtaget biopsier, havde de alle været subfertile i 1 - 3 år. De nedenfor angivne reproduktionsresultater er opnået, efter hopperne er aktiveret med bActivate og behandlet med antibiotika lokalt og systemisk samt LVL. Det er således kun de aktiverings-positive hopper, der indgår i beregningerne for at undersøge, hvilken sammenhæng Kenney-scoren har med fertiliteten, efter hopperne er behandlet for *S. zooepidemicus*. De to hopper, der var aktiverings-negative, blev begge bedækket 3 gange efterfølgende uden at opnå drægtighed. #3i er ikke inkluderet i beregningerne, da denne hoppe ikke blev bedækket efter aktiveringen.

Tabel 9: Kategorierne for Kenney-score med tilhørende gennemsnitsalder, gennemsnitligt antal barren years og reproduktionsresultater efter aktivering med bActivate og behandling af *S. zooepidemicus* infektion.

Kenney-score	Gennemsnitsalder	Gennemsnitligt antal barren years	Gennemsnitligt antal bedækninger	Drægtighedsrate	Live-foal rate
I + IIAr (n = 3)	8,3 år (6 – 10 år)	1,0 år	1,0	100%	100%
IIAi (n = 6)	10,0 år (6 – 14 år)	1,7 år	1,2	100%	83,3%
IIB (n = 3)	15,0 år (11 – 21 år)	2,0 år	1,3	100%	66,7%

Det ses, at en højere gennemsnitsalder hænger sammen med en stigende Kenney-score hos hopperne. Desuden synes der at være en sammenhæng mellem Kenney-score og antal barren years; hopper der har en højere Kenney-score har ligeledes et højere gennemsnitligt antal barren years. Det observeres, at jo højere Kenney-scoren er, jo højere er det gennemsnitlige antal bedækninger der er nødvendige for at opnå drægtighed (antal bedækninger er beregnet fra efter hopperne er aktiveret med bActivate og behandlet for *S. zooepidemicus*). Både i kategori I + IIAr, IIAi og IIB blev 100% af hopperne drægtige, efter de var behandlet for infektionen. Der ses dog et gradvist fald i live-foal rate mellem kategorierne. Den reduceres med 16,7% mellem kategori I + IIAr og kategori IIAi, og den reduceres med 33,3% mellem kategori I + IIAr og kategori IIB. Desuden ses en reduktion på 16,6% mellem kategori IIAi og IIB.

Diskussion

Sammenhæng mellem Kenney-score, alder, infektion/inflammation og fertilitet

Det påvises i dette studie, at hopper med en højere Kenney-score har en højere gennemsnitsalder. Gennemsnitsalderen for de forskellige kategorier af de to uafhængige populationer, der indgik i studiet, var meget ensartede. Den summerede gennemsnitsalder for de to populationer var følgende: I + IIAr = $8,3 \pm 1,4$ år; IIAi = $11,7 \pm 3,3$ år; IIB = $15,2 \pm 4,0$ år. Disse stemmer overens med gennemsnitsaldrene for de forskellige kategorier, der er påvist i studierne af Byron *et al.* og Tugia *et al.* (Tugia *et al.* 2023; Byron *et al.* 2024). Dog rapporterer et andet studie af Alpoim-Moreira *et al.* lavere gennemsnitsaldre fordelt på kategorierne: I = $3,5 \pm 0,2$ år; IIA = $5,9 \pm 2,0$ år; IIB = $11,6 \pm 1,3$

år (Alpoim-Moreira *et al.* 2022). Hopperne, i de andre studier, var ikke selekteret på baggrund af reproduktionshistorik, mens hopperne, der indgår i dette studie, er selekteret på baggrund af at være avlshopper/rugehopper, som over 1 - 3 år ikke er blevet drægtige på trods af bedækning/implentering af embryon. Dette medfører, at der ikke indgår hopper < 6 år i studiet, hvilket kan påvirke gennemsnitsalderen især i gruppe I + IIAr, da det typisk primært er yngre dyr der indgår i denne. Vores resultater bekræfter dog den generelle tendens i litteraturen med, at stigende alder hænger sammen med flere degenerative forandringer og dermed en højere Kenney-score (Schöniger & Schoon 2020; Katila & Ferreira-Dias 2022).

Forud for aktivering med bActivate, havde hopperne fra Irland som beskrevet været subfertile i 1 - 3 år. Der var 86,7% (13/15) af hopperne der viste positiv dyrkning af *S. zooepidemicus* efter aktivering med bActivate. Hos de aktiverings-positive hopper observeredes det, efter behandling af infektionen, at det med stigende Kenney-score var nødvendigt med et højere antal bedækninger, før der blev opnået drægtighed. Dog blev alle de aktiverings-positive hopper drægtige efter behandling af *S. zooepidemicus* infektionen uanset deres Kenney-score, men der observeredes faldende live-foal rates mellem kategorierne: I + IIAr = 100%; IIAi = 83,3%; IIB = 66,7%. De forventede live-foal rates, originalt publiceret af Kenney & Doig, er følgende: I => 80 - 90%; IIA = 50 - 80%; IIB = 10 - 50% (Schöniger & Schoon 2020). Der ses således højere live-foal rates i vores population. De to hopper, der var aktiverings-negative, blev ikke drægtige efter aktivering på trods af, at de hver især blev bedækket 3 gange. Den ene af disse hopper havde Kenney-score IIB, mens den anden havde IIAi. Deres forventede live-foal rate ud fra Kenney-scoren er således hhv. 10 - 50% og 50 - 80%. Faktummet, at 100% (12/12) af de aktiverings-positive hopper, der blev bedækket efter behandling, blev drægtige, og at 83,3% (10/12) af disse bar føl til termin, understøtter vores hypotese om, at kronisk infektion med *S. zooepidemicus* har en markant negativ indvirkning på fertiliteten. Dette understøttes yderligere af, at de to hopper der ikke fik diagnosticeret infektion vha. bActivate, men fik påvist *Streptococcus* spp. ved FISH, fortsat ikke opnåede drægtighed. Desuden er det i overensstemmelse med resultaterne i studiet af Riddle *et al.* der påviste, at hopper med *S. zooepidemicus* infektion havde en lav dag 28 drægtighedsrate på blot 30% (Riddle *et al.* 2007). Vores data indikerer dog, at den negative effekt, som kronisk *S. zooepidemicus* infektion har på fertiliteten, kan reverseres ved korrekt behandling. Graden af degenerative forandringer synes derimod at have en mere permanent negativ indflydelse på fertiliteten, og der findes ikke nogen behandling for endometrose der kan reversere fibrosen (Katila & Ferreira-Dias 2022). Det synes uundgåeligt, at hopper med stigende alder vil udvikle degenerative forandringer i endometriet, hvormed fertiliteten

nedsættes (Katila & Ferreira-Dias 2022). Hvorvidt udviklingen af endometrose fremskyndes ved infektiøse tilstande i endometriet kræver yderligere undersøgelse og kan ikke konkluderes på baggrund af vores studie.

I forhold til om endometrose prædisponerer hopper for at være mere eller mindre modtagelige for infektion, er det beskrevet af Buczkowska *et al.*, at hopper med Kenney-score IIA og IIB er mere modtagelige for infektion end hopper med Kenney-score I (Buczkowska *et al.* 2016). Hvis hopperne med inflammation i vores studie regnes med i gruppe IIA i stedet for I, som det er gjort af Buczkowska *et al.*, viser vores data, at 84,6% (11/13) af de inficerede hopper havde Kenney-score IIA og IIB, mens kun 15,4% (2/13) havde Kenney-score I. Dette understøtter, at en højere Kenney-score er forbundet med større modtagelighed for infektion. Dog er det bemærkelsesværdigt, at der ikke var nogen af de inficerede hopper i dette studie der havde Kenney-score III, da disse ifølge Troedsson *et al.* også er mere modtagelige (Troedsson *et al.* 1993). Der kan ikke påvises statistiske forskelle i dette studie, grundet det begrænsede antal hopper der indgår samt selektionsbias i udvælgelsen af hopperne.

Påvisning af subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus* og lokalisering af denne ved brug af FISH

I vores studie påviste vi *Streptococcus* spp. hos den ene hoppe med aktiv infektion, samt hos 100% (15/15) af hopperne med bekræftet eller formodet subklinisk infektion ved brug af FISH. At vi har påvist bakterien hos 100% af de subklinisk inficerede hopper tyder på, at FISH er en sensitiv metode til at påvise infektiøse agens som ikke kan påvises ved dyrkning, ligesom det er beskrevet af Moter & Göbel og Poppert *et al.* (Moter & Göbel 2000; Poppert *et al.* 2002). Desuden har vi i dette studie vist, at FISH kan påvise bakterielt RNA, selvom det er til stede i en begrænset mængde, som ved dormante infektioner, ligesom det er beskrevet i studiet af Oliver (Oliver 2010). Selv intracellulære bakterier blev identificeret ved FISH og blev påvist hos 20% (3/15) af de subklinisk inficerede hopper. Også dybe infektioner i stratum spongiosum, beliggende mellem 50 og > 500 µm fra lumen, blev identificeret hos 100% (16/16) af hopperne ved FISH. Så vidt vi har kunnet finde frem til, er FISH succesfuldt brugt til at påvise streptokokker i endometriet hos hopper i to andre studier (Petersen *et al.* 2009; Steffensen & Søndergaard 2022). *Streptococcus* spp. er således påvist hos hopper med endometritis flere gange ved ensartede protokoller, hvilket bevidner, at FISH ved denne protokol kan påvise *Streptococcus* spp. hos hopper med både akut og kronisk endometritis. Det kunne have været interessant i dette studie også at lave FISH på biopsierne fra de danske hopper, der var

subfertile i avlssæsonen 2025, for at undersøge, i hvor stort omfang *S. zooepidemicus* forekom hos disse hopper på trods af negativ dyrkning. Dette var desværre ikke muligt grundet mangel på tid.

33% af streptokokkerne, der blev påvist, var beliggende i stratum spongiosum. Størstedelen af bakterierne var lokaliseret i det lumenale epitel eller stratum compactum, hvor 64,3% af bakterierne befandt sig. Hos de subklinisk inficerede hopper var bakterien lokaliseret i stratum spongiosum hos 100% (15/15) af hopperne og i det lumenale epitel eller stratum compactum hos 40% (6/15). Hos hoppen med den aktive infektion fandtes alle bakterierne i stratum spongiosum. Der var ikke et tydeligt mønster for bakteriernes antal og lokalisering i endometriet blandt de subklinisk inficerede hopper, udover at det var en fællesnævner, at bakterierne var beliggende dybt i endometriet hos dem alle. Der var ej heller en tydelig forskel mellem lokaliseringen og antallet hos de subklinisk inficerede hopper og den aktivt inficerede hoppe. Ifølge studiet af Petersen *et al.* er bakterierne lokaliseret superficielt i endometriet ved akut infektion, og lokaliseringen hos hoppe #9d med en aktiv infektion er således overraskende (Petersen *et al.* 2009). Dette kunne dog indikere, at denne hoppe potentielt også har en kronisk infektion der blot er blevet re-aktiveret inden udtagning af biopsien. Det var en fællesnævner for alle hopperne, at bakterierne blev påvist dybt i endometriet, som det også er vist af Petersen *et al.*, der påviste bakterier beliggende 300 - 500 µm fra lumen hos kronisk inficerede hopper (Petersen *et al.* 2009). Vores studie underbygger således, at den dybe beliggenhed af bakterierne i endometriet kan være karakteristisk for kronisk inficerede hopper. Den dybe lokalisering af bakterierne understreger vigtigheden i, at kronisk inficerede hopper ikke kun behandles med antibiotika lokalt men også systemisk, da det ikke er sikkert, at antibiotikummet kan trænge tilstrækkeligt dybt ned i vævet ved lokal administration (Canisso *et al.* 2020).

En af hypoteserne i vores studie var, at *S. zooepidemicus* var lokaliseret i relation til degenerative forandringer. Dette var dog kun tilfældet hos 15,4% (2/13) af hopperne. Begge disse hopper havde Kenney-score IIB og var subklinisk inficerede. Hos den aktivt inficerede hoppe fandtes der ikke bakterier i relation til degenerative forandringer. Vi kan således påvise, at bakterierne forekom i relation til kroniske degenerative forandringer hos 50% (2/4) af hopperne med Kenney-score IIB og hos 0% (0/9) af hopperne med kategori IIAi. Dette kan potentielt være tilfældigt, og vi kan ikke på baggrund af disse fund konkludere, hvorvidt kronisk *S. zooepidemicus* infektion spiller en rolle i patogenesen for endometrose, da bakterien hos størstedelen af hopperne ikke observeredes i relation til kroniske degenerative forandringer.

Fordele og ulemper ved brug af FISH

FISH har vist sig, også i dette studie, at være en hurtig og effektiv metode til at diagnosticere infektioner, som dyrkningsbaserede diagnostiske teknikker ikke kan detektere (Moter & Göbel 2000; Ding & Wang 2011; Atieh *et al.* 2013). Det er dog vigtigt at være opmærksom på, at der ved brug af en universel probe, som for eksempel Eub338 proben, potentielt kan detekteres bakterier, som ikke nødvendigvis er patogener og giver anledning til endometritis. Det er i et studie af Guo *et al.* påvist, at både raske hopper og hopper med kronisk endometritis har et rigt mikrobiom i uterus. Der blev detekteret en bred vifte af bakterier hos begge grupper, hvor blandt andet streptokokker var iblandt (Guo *et al.* 2025). Der er i vores studie, samt i et specialestudie af Steffensen & Søndergaard, påvist bakterier i uterus hos hopper, uden at der har været tilstedeværelse af PMNs på histologi (Steffensen & Søndergaard 2022). Dette bevidner, at detektion af bakterier, især ved brug af universelle prober, ikke nødvendigvis er ensbetydende med, at hoppen har endometritis, hvilket understreger vigtigheden i, at kliniske tegn og diagnostiske resultater skal sammenholdes. Dog lader det til, ifølge vores studie, at subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus* kan være til stede og give anledning til subfertilitet, uden at PMNs kan påvises på histologi. Dermed bør detektion af denne bakterie ved FISH potentielt tolkes som patogen uanset, om der er PMNs på histologi eller ej. I studiet af Steffensen & Søndergaard fandtes en høj sensitivitet men en lav specificitet af FISH ved brug af Eub338 proben (Steffensen & Søndergaard 2022). Der bør laves yderligere studier med species-specifikke prober for at undersøge, om man ved brug af disse kan opnå en højere specificitet af FISH ved diagnostik af endometritis for at undgå overdiagnosticering. Det ville desuden være fordelagtigt, hvis der blev udviklet en probe der udelukkende bandt til *S. zooepidemicus*, da det tyder på, at detektion af denne med større sikkerhed ville påvise infektiøs endometritis end detektion af en generel *Streptococcus* spp. probe.

En praktisk udfordring, der kan være ved brug af FISH, er forekomsten af autofluorescens. Generelt var det ikke et stort problem for forfatterne af dette studie at skelne autofluorescens fra reelt signal fra fluoroforen. Dog forekom der markant autofluorescens fra erythrocytter i vævet fra hoppe #9d, hvor cellerne autofluorescerede i en sådan grad, at det potentielt kunne overskygge fluorescens fra fluoroforer. Dette medfører en risiko for, at bakterier i vævet kan overses. En af forskellene på biopsien fra hoppe #9d, og de andre biopsier, er opbevaringstiden i formalin. Biopsien fra hoppe #9d lå i formalin i blot få måneder, hvorimod de andre biopsier havde ligget i formalin i mellem 8 og 10 år. Disse biopsier viste enten en lille grad af autofluorescens eller slet ingen. Dette stemmer umiddelbart ikke overens med det der er beskrevet i litteraturen, da formalin

ved fiksering kan danne forbindelser med vævet der fluorescerer (Whittington & Wray 2017). Dermed burde en længere fiksering øge graden af autofluorescens og ikke mindske den. En anden forskel på hoppe #9d og de andre var, at der hos denne fandtes en større mængde erythrocytter. Erythrocytter indeholder fluorescerende hæmoglobin som dermed ville kunne øge mængden af autofluorescens (Whittington & Wray 2017). Det kan ikke konkluderes, hvad der var årsagen til den øgede autofluorescens hos hoppe #9d, da der i dette studie kun var inddraget denne ene friske biopsi. Hvis dette ønskes belyst yderligere, kan der opsættes et studie, hvor flere friske biopsier inkluderes. Generelt er det ønskværdigt at undgå autofluorescens så vidt muligt.

Pålidelighed af diagnostiske tests og Kenney-score hos hopper med *S. zooepidemicus* infektion

Vores datasæt understreger vigtigheden i at tolke resultatet af diagnostiske tests i lyset af deres begrænsninger. Det er i flere studier påvist, at både dyrkning og cytologi har en lav sensitivitet i forhold til detektion af bakteriel endometritis, især hvis prøven er udtaget med svaber (Nielsen 2005; Christoffersen *et al.* 2015). Denne viden har været veldokumenteret i litteraturen i mange år, men på trods af dette, viser en nyere spørgeskemaundersøgelse, at svaber fortsat er den foretrukne prøvetagningsmetode i praksis (Köhne *et al.* 2020). Dette medfører en stor risiko for falsk negative resultater. Især ved subkliniske infektioner med *S. zooepidemicus* er risikoen høj, da bakterierne ved disse infektioner er påvist at ligge fokalt i det lumbale epitel og dybt i endometriet, og de typisk ikke vokser på almindelig dyrkning (Petersen *et al.* 2009; Petersen *et al.* 2015; Katila 2016). Vores studie viser, ligesom det tidligere er påvist, at bakterierne er beliggende dybt i endometriet ved kroniske infektioner, og at de desuden kan ligge intracellulært i kirtelepitelcellerne. Kun hos 40% af hopperne i dette studie, lå bakterierne i/under det lumbale epitel. Dette kan være med til at forklare, hvorfor bakterierne ikke altid kan isoleres fra prøver, der er udtaget fra endometriets overflade, ligesom det er beskrevet af både Petersen *et al.* og Katila (Petersen *et al.* 2009; Katila 2016). Desuden forekom bakterierne i lavt antal på de fleste af biopsierne, hvilket også kan være med til at mindske chancen for at få bakterierne med ved prøvetagning. Katila beskriver, at bakteriernes fokale fordeling ved subklinisk infektion, gør det usandsynligt at få disse med på prøven selv ved udtag af biopsier (Katila 2016). Dette modbeviser vores studie, da der blev påvist bakterier på alle biopsierne ved FISH. Det tyder altså på, at det snarere er et spørgsmål om, hvorvidt bakterierne kan påvises ved dyrkning end et spørgsmål om, hvorvidt de er til stede i biopsien. Såfremt bakterierne er i en dormant tilstand, er det ikke sikkert, at de kan påvises ved traditionel dyrkning uden at blive aktiveret først (Petersen *et*

al. 2015). Dette ville kunne forklare, hvorfor hopperne med subklinisk infektion havde negativ dyrkning forud for aktivering, selvom bakterierne var til stede i stratum spongiosum og/eller det lumbinale epitel på biopsien, mens hoppen med aktiv infektion havde positiv dyrkning på trods af, at bakterierne udelukkende var til stede i stratum spongiosum i lavt antal. Udover at *S. zooepidemicus* kan være svær at påvise ved dyrkning, viser vores data, at det heller ikke er sikkert, at der ses inflammation på histologi hos subklinisk inficerede hopper. 46,2% (6/13) af hopperne, der var aktiverings-positive med bActivate, var negative for inflammation (PMNs \geq 1) på histologi inden aktiveringen. Subklinisk *S. zooepidemicus* infektion kan således ikke med stor sikkerhed forventes at kunne påvises ved histologi. Dette formodes at skyldes, at bakterierne ved dormante infektioner ikke nødvendigvis udløser et immunrespons.

Såfremt en hoppe har negativ dyrkning, ikke får påvist PMNs på histologi og ikke har markante degenerative forandringer i endometriet, men over en længere periode forbliver subfertil, bør man, ifølge vores studie, overveje subklinisk *S. zooepidemicus* infektion som mulig årsag, da dette symptom-billede observeredes hos flere af de subklinisk inficerede hopper. Til aktivering af subkliniske infektioner findes, som før omtalt, vækstmediet bActivate. Dette vækstmedie har vist sig effektivt til at aktivere dormante *S. zooepidemicus*, og aktiverede infektionen hos 86,7% (13/15) af de subfertile hopper i vores studie (Petersen *et al.* 2015). Dog påviste vi ved FISH også *S. zooepidemicus* hos de to hopper der var aktiverings-negative. Hos disse fandtes kun hhv. 1 eller 4 bakterier i biopsien, og bakterierne var udelukkende beliggende $>$ 500 μ m under det lumbinale epitel. Dette rejser en mistanke om, at bActivate potentielt ikke har en tilstrækkelig penetration dybt i endometriet til at aktivere alle bakterier der er beliggende her. Dette kan dog ikke siges med sikkerhed, da andre hopper med dybe infektioner beliggende $>$ 500 μ m fra lumen havde positiv dyrkning efter aktivering. For at undersøge effektiviteten af bActivate nærmere, kunne man udtage biopsier fra de samme hopper før og efter aktivering og lave FISH for at undersøge, i hvilket omfang *S. zooepidemicus* reelt aktiveres og elimineres fra endometriet ved aktivering og behandling.

Kenney-scoren er standardmetoden til at vurdere endometriets kvalitet og forudsige hoppers live-foal rate, men den har sine udfordringer. Det er vist flere gange, at der er en vis grad af subjektivitet forbundet med brug af scoringssystemet, hvilket giver anledning til uoverensstemmelse mellem vurderinger og lav reproducerbarhed (Westendorf *et al.* 2022b; Martínez-Bartolomé *et al.* 2024). Desuden varierer det om/i hvilken grad de kliniske informationer indgår i scoren, da disse ikke altid er tilgængelige eller videregives til patologen, og denne variation kan påvirke scoren (Snider *et al.* 2011; Schöniger & Schoon 2020). Der indgår såvel reversible som irreversible parametre i scoren,

hvilket gør dens tolkning kompliceret og øger vigtigheden i, at patologen uddyber baggrunden for scoringen (Schöniger & Schoon 2020; Westendorf *et al.* 2022a; Westendorf *et al.* 2022b). I dette studie har vi ikke inddraget hoppens historik i tildelingen af Kenney-scoren. Desuden har vi korreleret for inflammationens betydning i beregningerne ved at slå kategori I og IIAr sammen. Vi har i stedet lagt vægt på antal lag af fibroblaster og forekomsten af rededannelser ved tildelingen af en kategori, da disse er udtryk for kronisk degeneration. Vores vurdering afviger således på nogle punkter fra retningslinjerne i et forsøg på at korrelere for, at hopperne er behandlet for infektion, og dermed antagelig også inflammation, mellem udtag af biopsierne og indsamling af fertilitetsdata. Hvis en reversibel parameter, som inflammation, vægtes ved tildeling af en Kenney-score, er det vigtigt, at man har for øje, at kategorien potentielt kan ændres ved korrekt behandling af den udløsende årsag, og at Kenney-scoren dermed ikke nødvendigvis giver en fast prognose for fertiliteten (Ricketts & Alonso 1991; Westendorf *et al.* 2022b). Kenney-scoren forsøger at opsummere reversible og irreversible histologiske forandringer i endometriet samt reproduktionshistorik i en samlet prognose for fertiliteten. Vores studie viser, at *S. zooepidemicus* infektion kan have en tungtvejende negativ påvirkning af fertiliteten, mens graden af endometrose i vores population ikke påvirkede hoppers evne til at blive drægtige, og kun i nogen grad påvirkede deres evne til at bære et føl til termin. Vi synes derfor, at det i fremtiden er relevant at overveje, om det er ønskværdigt at vurdere så mange forskelligartede data i ét samlet scoringssystem. Man kan i hvert fald argumentere for, på baggrund af vores data, at Kenney-scoren ikke giver en retvisende prognose for hopper, der er kronisk inficerede med *S. zooepidemicus*. Selv hvis PMNs og reproduktionshistorik havde været inddraget i tildelingen af Kenney-scoren, på den måde som det er beskrevet i tabel 1, havde denne formentligt overestimeret mange af hoppers evne til at blive drægtige og bære føl til termin, såfremt infektionen ikke blev behandlet. Forholdet mellem hvor stor indflydelse hhv. infektion/inflammation og kroniske degenerative forandringer har på fertiliteten, synes således ikke at kunne afvejes retvisende i Kenney-scoren hos hopper med kronisk *S. zooepidemicus* infektion.

Konklusion

Formålet med dette studie var at undersøge, hvorledes hhv. infektiøs endometritis og endometrose påvirkede fertiliteten hos hopper, der har været subklinisk inficeret med *S. zooepidemicus*. Derudover ville vi undersøge, hvorvidt FISH kunne bruges til at påvise bakterierne og undersøge deres lokalisering i endometriet. På baggrund af vores data kunne vi konkludere, at hopper med en højere

Kenney-score også havde en højere gennemsnitsalder. Desuden observerede vi, at hopper med en højere Kenney-score havde ringere fertilitet efter behandling af den subkliniske infektion med *S. zooepidemicus*. Jo højere Kenney-score hoppen havde, jo flere bedækninger krævedes før hoppen blev drægtig, og jo lavere var live-foal rate. Live-foal rates hos hopperne var efter behandling af infektionen højere, end det der er forventet i forhold til Kenney-scoren. Forud for aktivering med bActivate og behandling havde alle hopperne været subfertile mellem 1 - 3 år, men i dette studie vendte de tilbage til en vis grad af fertilitet, der tilsyneladende afhænger af mængden af degenerative forandringer, når de ikke længere var inficerede. De to hopper, der var aktiverings-negative, men som ved FISH blev vist at være inficerede, forblev derimod subfertile. Således konkluderes det, at *S. zooepidemicus* havde en markant negativ indvirkning på fertiliteten hos den population af subklinisk inficerede hopper, der indgik i dette studie.

FISH viste sig effektivt til at påvise *S. zooepidemicus* i endometriet både hos de subklinisk inficerede hopper og hos hoppen med en aktiv infektion. Ved FISH observeredes bakterier i endometriet hos alle hopperne, også de to der var aktiverings-negative med bActivate. *S. zooepidemicus* observeredes både i det lumbale epitel, i stratum compactum samt dybt i stratum spongiosum mellem 50 og > 500 µm under det lumbale epitel. Intracellulære bakterier kunne ligeledes påvises ved FISH. Der kunne ikke påvises et bestemt mønster for, hvor bakterierne var lokaliseret hos de kronisk inficerede hopper, udover at de hos dem alle var beliggende dybt i endometriet. Der var ingen tydelig forskel på lokaliseringen eller antallet af bakterier hos den aktivt inficerede hoppe i forhold til de kronisk inficerede hopper. Kun hos to af hopperne blev bakterierne påvist at ligge i relation til kroniske degenerative forandringer, og vi kan således ikke på baggrund af dette studie udtale os om, hvorvidt der er en sammenhæng mellem kronisk infektion og udviklingen af endometrose. Dog kan det konkluderes, at *S. zooepidemicus* ved kroniske infektioner kan være beliggende dybt i endometriet og intracellulært i kirtelepitelcellerne såvel som mere overfladisk i det lumbale epitel eller stratum compactum. FISH viser sig, ifølge vores studie, at være en effektiv metode til at påvise *S. zooepidemicus* infektion hos subklinisk/kronisk inficerede hopper.

Perspektivering

Det kunne i fremtiden være relevant, at der blev foretaget yderligere undersøgelser af, hvorvidt det giver mening at inddrage FISH rutinemæssigt i diagnostik af infektiøs endometritis. Metoden har i dette studie vist stort potentiale til at påvise *Streptococcus* spp. infektioner hos kronisk inficerede

hopper, hvor de traditionelle diagnostiske metoder ikke formår at detektere infektionen. Subkliniske/dormante infektioner kan være svære for dyrlæger at håndtere i praksis, og bActivate har været det eneste produkt på markedet, der kunne hjælpe med at diagnosticere disse. Vores data viser at FISH kan påvise *S. zooepidemicus*, selv hos hopper der er negative ved aktivering med bActivate. Der er dog den begrænsning ved FISH, at selvom bakterierne kan påvises ved denne metode, så kræver det fortsat, at de aktiveres fra den dormante tilstand, før de bliver følsomme overfor antibiotika og kan behandles. I fremtiden kunne bActivate og FISH derfor potentielt komplimentere hinanden i udredningen af hopper, der ikke kan diagnosticeres ved de traditionelle diagnostiske metoder men som forbliver subfertile over længere tid. FISH kan, udover at undersøge for *S. zooepidemicus* infektion, også anvendes til at påvise andre bakterier. Dog er det nødvendigt med en større indsigt i det almindelige mikrobiom i uterus hos hopper og udvikling af et system til fortolkning af resultaterne, inden FISH bruges rutinemæssigt, så man undgår overdiagnosticering.

Vores studie kunne ikke påvise en klar sammenhæng mellem lokaliseringen af *S. zooepidemicus* og kroniske degenerative forandringer i endometriet. Det kunne derfor være interessant, hvis man i fremtiden kunne opsætte et studie, hvor subklinisk inficerede hopper, ved hjælp af FISH og histologi, kunne undersøges over en længere periode for at se, om disse har en hurtigere progression af endometrose, end hhv. hopper der ikke er inficerede eller hopper der har en akut infektion. Dette ville potentielt kunne belyse sammenhængen mellem infektiøs endometritis og endometrose yderligere, da det endnu ikke er fastlagt, i hvilket omfang sygdommene påvirker hinanden klinisk. Vi tror på, at FISH har potentiale til at kunne gøre det lettere at diagnosticere subklinisk/kronisk endometritis hos hopper i fremtiden og potentielt kan spille en rolle i at opnå en bedre forståelse for forholdet mellem sygdomme i endometriet og fertilitet. At kunne diagnosticere endometritis og endometrose korrekt og kunne tolke deres indflydelse på fertiliteten, såvel samlet som hver for sig, vil kunne hjælpe dyrlæger med at stille en mere pålidelig prognose for fertiliteten hos hopper med eller uden infektion. Derved kan den rette behandling initieres, hvis der påvises infektiøs endometritis, hvormed hoppens potentielt kan genopnå fertilitet. Alternativt kan klienten rådgives til at overveje andre metoder, såfremt hoppens infertilitet skyldes fremskreden endometrose. Hos disse hopper kan nyere metoder, såsom Embryo Transfer (ET) eller Ovum Pick Up (OPU) og Intracytoplasmatic Sperm Injection (ICSI) tilbyde en mulighed for at avle på hoppens på trods af, at hoppens ikke selv kan bære et føt til termin (Cuervo-Arango *et al.* 2019).

Referencer

1. Alpoim-Moreira J., Fernandes C., Rebordão M.R., Costa A.L., Bliebernick M., Nunes T., Szóstek-Mioduchowska A., Skarzynski D.J., Ferreira-Dias G. (2022). Collagen Type III as a Possible Blood Biomarker of Fibrosis in Equine Endometrium. *Animals: an open access journal from MDPI*, Volume 12, Issue 14, Page 1854.
2. Atieh T., Audoly G., Hraiech S., Lepidi H., Roch A., Rolain J.M., Raoult D., Papazian L., Brégeon F. (2013). Evaluation of the diagnostic value of fluorescent in situ hybridization in a rat model of bacterial pneumonia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, Volume 76, Issue 4, Pages 425 - 431.
3. Brodie C. (2020). Overcoming Autofluorescence (AF) and Tissue Variation in Image Analysis of In Situ Hybridization. In: Nielsen, B.S., Jones, J. (eds) *In Situ Hybridization Protocols. Methods in Molecular Biology*, Volume 2148.
4. Buczkowska J., Kozdrowski R., Nowak M., Raś A., Staroniewicz Z., Siemieniuch, M.J. (2014a). Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, Volume 12, Article 27.
5. Buczkowska, J., Kozdrowski, R., Nowak, M., Raś, A., & Mrowiec, J. (2014b). Endometrosis-significance for horse reproduction, pathogenesis, diagnosis, and proposed therapeutic methods. *Polish journal of veterinary sciences*, Volume 17, No 3, Pages 547 – 554.
6. Buczkowska J., Kozdrowski R., Nowak M., Sikora M. (2016). Relationship between uterine biopsy score, endometrial infection and inflammation in the mare. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2016*, Volume 44, Issue 3, Pages 158 - 163.
7. Byron M., Lektion J., Foster R.A., Tracey C., Wagner B., Amorim M.D. (2024). Prostaglandin-related genes are differentially expressed in equine endometrium with different biopsy grade, degrees of inflammation, and fibrosis. *Theriogenology*, Volume 227, Pages 151-156.
8. Canisso I.F., Segabinazzi L.G.T.M., Fedorka C.E. (2020). Persistent Breeding-Induced Endometritis in Mares - a Multifaceted Challenge: From Clinical Aspects to Immunopathogenesis and Pathobiology. *Int J Mol Sci*. Volume 21, Issue 4, Page 1432.
9. Chakravorty S., Helb D., Burday M., Connell N., Alland D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 69, Issue 2, Pages 330 - 339.

10. Christoffersen M., Brandis L., Samuelsson J., Bojesen A.M., Troedsson M.H.T., Petersen M.R. (2015). Diagnostic double-guarded low-volume uterine lavage in mares. *Theriogenology*, Volume 83, Issue 2, Pages 222 - 227.
11. Christoffersen M., Troedsson M.H.T. (2017). Inflammation and infertility of the mare. *Reproduction in Domestic Animals*, Volume 52, Issue S3, Pages 14 - 20.
12. Cuervo-Arango J., Claes A.N., Stout T.A. (2019). A retrospective comparison of the efficiency of different assisted reproductive techniques in the horse, emphasizing the impact of maternal age. *Theriogenology*, Volume 132, Pages 36 - 44.
13. Davies Morel M.C.G., Lawlor O., Nash D.M. (2013). Equine endometrial cytology and bacteriology: effectiveness for predicting live foaling rates. *The Veterinary Journal*, Volume 198, Issue 1, Pages 206 – 211.
14. Ding J.Y. & Wang P. (2011). Methods for the rapid screening of group A streptococci: fluorescent in situ hybridization versus immunochromatography. *Med Princ Pract I*, Volume 20, Issue 6, Pages 504 – 508.
15. Ferreira-Dias G., Alpoim-Moreira J., Szóstek-Mioduchowska A., Rebordão M.R., Skarzynski D.J. (2024). The path to fertility: Current approaches to mare endometritis and endometrosis. *Anim. Reprod.*, Volume 21, Issue 3.
16. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., Kikhney J., Hagen R.M., Stender H., Poppert S. (2017). Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, Volume 43, Issue 3, Pages 263 – 293.
17. Guo L., Holyoak G.R., DeSilva U. (2025). Endometrial microbiome in mares with and without clinical endometritis. *Front Vet Sci.*, Volume 12.
18. Jensen H.E., Jensen L.K., Barington K., Pors S.E., Bjarnsholt T., Boye M. (2015). Fluorescence In Situ Hybridization for the Tissue Detection of Bacterial Pathogens Associated with Porcine Infections. In: Cunha, M., Inácio, J. (eds) *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies. Methods in Molecular Biology*, Volume 1247.
19. Kaldalu N., Hauryliuk V., Turnbull K.J., La Mensa A., Putrinš M., Tenson T. (2020). In Vitro Studies of Persister Cells. *Microbiol Mol Biol Rev.*, Volume 84, No 4.
20. Katila T. (2016). Evaluation of diagnostic methods in equine endometritis. *Reproductive Biology*, Volume 16, Issue 3, Pages 189 - 196.
21. Katila T., Ferreira-Dias G. (2022). Evolution of the Concepts of Endometrosis, Post Breeding Endometritis, and Susceptibility of Mares. *Animals*, Volume 12, No 6, Page 779.

22. Köhne M., Kuhlmann M., Tönißen A., Martinsson G., Sieme H. (2020). Diagnostic and Treatment Practices of Equine Endometritis - A Questionnaire. *Front Vet Sci.*, Volume 7, Page 547.
23. LeBlanc M.M., Magsig J., Stromberg A.J. (2007). Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. *Theriogenology*, Volume 68, Issue 3, Pages 403 - 412.
24. Martínez-Bartolomé I., Masot J., Serres C. (2024). Development of an equine histology scoring system to complement the Kenney-Doig scale. *Reproduction in Domestic Animals*, Volume 59, Issue S3.
25. Morris L.H.A., McCue P.M., Aurich C. (2020). Equine endometritis: A review of challenges and new approaches. *Reproduction*, Volume 160, Issue 5, Pages R95 – R110.
26. Moter A. & Göbel U.B. (2000). Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, Volume 41, Issue 2, Pages 85 - 112.
27. Mouncey R., Arango-Sabogal J.C., Rathbone P., Scott C.J., de Mestre A.M. (2024). Prevalence of Microbial Isolates Cultured from Endometrial Swab Samples Collected from United Kingdom Thoroughbred Mares from 2014 to 2020. *Vet Sci.*, Volume 11, Issue 2, Page 82.
28. Nielsen J.M. (2005). Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*, Volume 64, Issue 3, Pages 510 - 518.
29. Nielsen J.M., Nielsen F.H., Petersen M.R. (2012). Diagnosis of equine endometritis - Microbiology, cytology and histology of endometrial biopsies and the correlation to fertility. *Pferdeheilkunde*, Volume 28, Pages 8 – 13.
30. Oliver J.D. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, Volume 34, Issue 4, Pages 415 – 425.
31. Petersen M., Nielsen J., Lehn-Jensen H., Bojesen A. (2009). *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* resides deep in the chronically infected endometrium of mares. *Clinical Theriogenology*, Volume 1, No 1.
32. Petersen M.R., Skive B., Christoffersen M., Lu K., Nielsen J.M., Troedsson M.H., Bojesen A.M. (2015). Activation of persistent *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in mares with subclinical endometritis. *Veterinary Microbiology*, Volume 179, Issues 1 – 2, Pages 119 - 125.
33. Poppert S., Essig A., Marre R., Wagner M., Horn M. (2002). Detection and differentiation of chlamydiae by fluorescence in situ hybridization. *Applied and environmental microbiology*, Volume 68, No 8, Pages 4081 – 4089.

34. Proietti P.C., Bietta A., Coppola G., Felicetti M., Cook R.F., Coletti M., Marenzoni M.L., Passamonti F. (2011). Isolation and characterization of β -haemolytic-Streptococci from endometritis in mares. *Veterinary Microbiology*, Volume 152, Issues 1 – 2, Pages 126 - 130.
35. Prudent E. & Raoult D. (2019). Fluorescence in situ hybridization, a complementary molecular tool for the clinical diagnosis of infectious diseases by intracellular and fastidious bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 43, Issue 1, Pages 88 – 107.
36. Ravaioli V., Raffini E., Tamburini M., Galletti G., Frasnelli M. (2022). Infectious Endometritis in Mares: Microbiological Findings in Field Samples. *Journal of Equine Veterinary Science*, Volume 112, 103913.
37. Rebordão M.R., Galvão A., Szóstek A., Amaral A., Mateus L., Skarzynski D.J., Ferreira-Dias G. (2014). Physiopathologic mechanisms involved in mare endometrosis. *Reproduction in Domestic Animals*, Volume 49, Issue S4, Pages 82 - 87.
38. Reilas T., del Alamo M.M.R., Liepina E., Yeste M., Katila T. (2016). Effects on the equine endometrium of cervical occlusion after insemination. *Theriogenology*, Volume 85, Issue 4, Pages 617 - 624.
39. Ricketts, S. W., & Alonso, S. (1991). Assessment of the breeding prognosis of mares using paired endometrial biopsy techniques. *Equine veterinary journal*, Volume 23, Issue 3, Pages 185 – 188.
40. Riddle W.T., LeBlanc M.M., Stromberg A.J. (2007). Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. *Theriogenology*, Volume 68, Issue 3, Pages 395 - 402.
41. Rolph M.J., Bolfa P., Cavanaugh S.M., Rolph K.E. (2024). Fluorescent In Situ Hybridization for the Detection of Intracellular Bacteria in Companion Animals. *Vet Sci.*, Volume 11, Issue 1, 52.
42. Schöniger S. & Schoon H.A. (2020). The Healthy and Diseased Equine Endometrium: A Review of Morphological Features and Molecular Analyses. *Animals: an open access journal from MDPI*, Volume 10, Issue 4, 625.
43. Skive B., Rohde M., Molinari G., Braunstein T.H., Bojesen A.M. (2017). Streptococcus equi subsp. zooepidemicus Invades and Survives in Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.*, Volume 7, Article 465.
44. Snider T.A., Sepoy C., Holyoak G.R. (2011). Equine endometrial biopsy reviewed: observation, interpretation, and application of histopathologic data. *Theriogenology*, Volume 75, Issue 9, Pages 1567 - 1581.

45. Steffensen C.B. & Søndergaard J.S. (2022). Comparison of diagnostic sensitivity of endometritis through bacterial culture and cytology, and Fluorescence In Situ Hybridization in endometrial tissue-biopsies from 105 mares. Københavns Universitet.
46. Traub-Dargatz J.L., Salman M.D., Voss J.L. (1991). Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. *JAMVA*, Volume 198, Issue 10, Pages 1745 - 1747.
47. Troedsson M.H.T. (1999). Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. *Theriogenology*, Volume 52, Issue 3, Pages 461 – 471.
48. Troedsson M.H., deMoraes M.J., Liu I.K. (1993). Correlations between histologic endometrial lesions in mares and clinical response to intrauterine exposure with *Streptococcus zooepidemicus*. *JAMVA*, Volume 54, Issue 4, Pages 570 - 572.
49. Tukiä E., Hallman I., Pentillä M., Hänninen S., Kareskoski M. (2023). RNA in situ hybridization of *Escherichia coli* in equine endometrial biopsies. *Frontiers in veterinary science*, 10, 1186051.
50. Wallner G., Amann R., Beisker W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, Volume 14, Issue 2, Pages 136 – 143.
51. Westendorf J., Wobeser B., Epp T. (2022a). IIB or not IIB, part 1: retrospective evaluation of Kenney-Doig categorization of equine endometrial biopsies at a veterinary diagnostic laboratory and comparison with published reports. *J Vet Diagn Invest*, Volume 34, Issue 2, Pages 206 – 214.
52. Westendorf J., Wobeser B., Epp T. (2022b). IIB or not IIB, part 2: assessing inter-rater and intra-rater repeatability of the Kenney-Doig scale in equine endometrial biopsy evaluation. *J Vet Diagn Invest*, Volume 34, Issue 2, Pages 215 – 225.
53. Whittington N.C. & Wray S. (2017). Suppression of Red Blood Cell Autofluorescence for Immunocytochemistry on Fixed Embryonic Mouse Tissue. *Current protocols in neuroscience*, Volume 81, Pages 2.28.1 – 2.28.12.
54. de Witt A.A., Fosgate G.T., Schulman M.L. (2023). The association between the endometrial biopsy grade and selected epidemiological and reproductive variables in a population of subfertile mares. *Equine Veterinary Education*, Volume 35, Issue 5, Pages 421 - 428.

Bilag

Bilag 1: Fremgangsmåde for fremstilling af kontroller til FISH

1. Bakterier subkultiveres fra en renkultur til blodagar for at opnå en ny-opvokset renkultur. Blodagarpladerne inkuberes i 20 timer ved 37°C. 5 mL BHI/B overføres til 8 glasrør, og de inkuberes ligeledes i 20 timer ved 37°C for at sikre, at de er sterile inden videre opformering af bakterierne i vækstmediet.
2. 1 koloni fra hver renkultur af bakterierne overføres til glasrør med sterilt BHI/B medie. Dermed haves 2 rør pr. bakterie samt 2 rør med rent medie. De rene rør uden bakterie tilsat bruges til at kalibrere spektrofotometeret forud for OD600 måling, da BHI/B i sig selv har en vis lysabsorption.
3. 1 mL fortyndet (fortyndet med faktor 10) medie overføres til en kuvette til kalibrering af spektrofotometer. 1 mL fortyndet (faktor 10) bakterie-medie køres igennem spektrofotometer for måling af OD600.
4. Til tiderne $t = 0$ timer, $t = 1$ timer, $t = 2$ timer, $t = 3$ timer, $t = 4$ timer og $t = 5$ timer måles OD600. Mellem målingerne inkuberes bakterierne i vækstmediet i varmeskab ved 37°C. Ud fra disse målinger laves en graf for at visualisere, hvornår bakterierne er i den eksponentielle vækstfase.
5. Når bakterierne er i den eksponentielle vækstfase, stoppes inkuberingen i varmeskab og 100 μL af bakterierne overføres til 800 μL 10% formalin i et eppendorfrør og inkuberes i dette ved stuetemperatur i 60 min for at opnå fiksering af bakteriecellerne.
6. Efter inkubering centrifugeres blandingen i eppendorf-centrifuge i 5 min ved 1100 rpm (rounds per minute). Derved dannes en "pellet" af bakterieceller i bunden af eppendorfrøret. Supernatanten afpipetteres og der tilføjes 800 μL 1X PBS, hvorefter røret centrifugeres som tidligere beskrevet. Dette gøres 2 gange for at "vaske" prøven og fjerne tilbageværende formalin fra bakteriecellerne.
7. Efter de 2 vaske blev der tilføjet 800 μL 1X PBS til bakterierne i eppendorfrøret, og de blev opbevaret på køl (4°C) natten over.
8. Bakteriecellerne blev overført til histogel som blev indstøbt, og der blev lavet snit på 2 - 4 μm som blev monteret på objektglas.

Bilag 2: Fremgangsmåde for Fluorescent In Situ Hybridisering (FISH)

1. Snit opvarmes i 60 min ved 60°C.
2. Snittene de-paraffineres og dehydreres i 96% ethanol.
3. Snittene skylles i MilliQ-vand.
4. Der behandles med 5 mg/mL proteinase K ved stuetemperatur i 10 min. Derefter skylles 2 x med MilliQ-vand.
5. Der fyldes MilliQ-vand i bunden af Shandon-rack, til stregen.
6. Snittene fugtes med vaskebuffer. De placeres i Shandon rack og skylles endnu en gang med vaskebuffer.
7. Proben fortyndes, så der opnås en koncentration på 5 ng/μL og der påføres 100 μL hybridiseringsbuffer med probe på hvert snit.
8. Der lægges låg på Shandon rack og den pakkes ind i sølvpapir. Der inkuberes i varmeskab ved 45°C natten over.
9. Der vaskes 3 x med opvarmet hybridiseringsbuffer ved 45°C.
10. Der vaskes 3 x med vaskebuffer ved 45°C og snittene tages ud af Shandon racks.
11. Snittene dehydreres 3 x 2 min i hhv. 70%, 85% og 96% ethanol.
12. Snittene tørrer i 10 min.
13. Der lægges en dråbe DAPI på snittene og lægges et dækglas over, for at farve cellekernerne. Snittene står i mørke i 15 min.
14. Dækglas fjernes og der skylles med destilleret vand.
15. Snittene tørres i varmeskab ved 45°C i 30 min.
16. Snittene monteres med VectaShield.
17. Snittene er klar til fluorescens-mikroskopi. De opbevares og transporteres i mørke.

Buffere

Hybridiseringsbuffer

- 1 M Tris pH 7,2: 50 mL
- 5 M NaCl: 90 mL
- 10% SDS: 5 mL
- MilliQ-vand: 355 ml

Vaskebuffer

- 1 M Tris pH 7,2: 50 mL
- 1 M NaCl: 90 mL
- MilliQ-vand: 360 mL

Komponenter i buffere

1 M Tris pH 7,2

- Trizma base (*Sigma: T6066*): 12,11 g til 100 mL MilliQ-vand
- pH indstilles til 7,2 med saltsyre

5 M NaCl

- NaCl 58,44 g til 200 mL MilliQ-vand

Proteinase K

Proteinase K fra Tritirachium album

- Købes fra Sigma (*cas.nr. 39450-01-6 647-014-00-9*)
- Modtages frosset, tilsættes TBS inden brug (100 µL proteinase K til 900 µL TBS)

10% SDS

- Natrium dodecyl sulfat 10 g til 100 mL MilliQ-vand

TBS

- Tris HCL (*cas.nr. 1185-53-1*)
- Tris Base (*cas.nr. 77-86-1*)
- Natriumklorid (*cas.nr. 7647-14-5*)
- Vand
- pH 7,6

Bilag 3: KU's AI-deklaration

Deklaration for anvendelse af generative AI-værktøjer
<p><input checked="" type="checkbox"/> Jeg/vi har benyttet generativ AI som hjælpemiddel/værktøj (<i>sæt kryds</i>)</p> <p><input type="checkbox"/> Jeg/vi har <u>IKKE</u> benyttet generativ AI som hjælpemiddel/værktøj (<i>sæt kryds</i>)</p> <p><i>Hvis brug af generativ AI er tilladt til eksamen, men du ikke har benyttet det i din opgave, skal du blot krydse af, at du ikke har brugt GAI, og behøver ikke at udfylde resten.</i></p>
<p>Oplist, hvilke GAI-værktøjer der er benyttet, inkl. link til platformen (hvis muligt):</p> <p>ChatGPT, https://chatgpt.com</p>
<p>Beskriv hvordan generativ AI er anvendt i opgaven:</p> <ol style="list-style-type: none"><i>1) Formålet med benyttelse af generativ AI har været hjælp til at fremsøge og gennemlæse litteratur.</i><i>2) Generativ AI er blevet benyttet undervejs i arbejdsprocessen, når der har været behov for litteratursøgning.</i><i>3) Fremsøgt litteratur blev gennemlæst og det blev vurderet, hvorvidt det kunne bruges. Dette indebærer evidens validering. Såfremt det vurderedes, at artiklen var relevant for dette speciale-projekt, blev den gennemlæst og vurderet af forfatterne personligt.</i> <p><i>NB. GAI-genereret indhold brugt som kilde i opgaven kræver korrekt brug af citationstegn og kildehenvisning. Læs retningslinjer fra Københavns Universitetsbibliotek på KUNet</i></p>