

# Vorbeugung der *Rhodococcus equi* Pneumonie bei Fohlen: eine Literaturübersicht

Karina Schmitz<sup>1</sup>, Wiebke Block<sup>2</sup>, Marc Lämmer<sup>2</sup> und Monica Venner<sup>3</sup>

Pferdekl. Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover<sup>1</sup>, Tierärztliche Klinik Kaufungen<sup>2</sup> und Tierärztliche Klinik für Pferde, Dested<sup>3</sup>

## Zusammenfassung

*Rhodococcus equi* (*R. equi*) ist ein Bakterium, welches weltweit häufig chronisch verlaufende, abszedierende Bronchopneumonien bei Fohlen im Alter bis sechs Monaten verursacht. Im Gegensatz zu Fohlen entwickeln erwachsene Pferde nur äußerst selten eine Erkrankung durch eine Infektion durch *R. equi*. Dies liegt daran, dass die Th1-Immunantwort bei Adulten ausgeprägter ist als in der Neugeborenenphase und somit der intrazelluläre Keim auch in den Makrophagen abgetötet wird. Versuche, die Mutterstuten zu impfen haben zwar dazu geführt, dass hohe Konzentrationen an spezifischen Antikörper über das Kolostrum erfolgreich dem Fohlen übertragen wurden, aber die Erkrankungsrate wurde bei den Fohlen auf endemisch betroffenen Betrieben keinesfalls reduziert. Auch die Verabreichung von spezifischem Hyperimmunplasma bewirkt keinen Schutz der Fohlen vor der *R. equi*-Pneumonie. Diese enttäuschenden Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass bei einer Infektion der Fohlen mit *R. equi* die humorale Immunantwort mit spezifischen Antikörpern selbst in hohen Konzentrationen die Tiere nicht vor einer Erkrankung schützt. Es gibt Hinweise dafür, dass die Infektion durch *R. equi* vielmehr durch Mechanismen der zellulären Immunantwort abgewehrt wird. Weitere Ansätze zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie wie die prophylaktische Verabreichung von Antibiotika bei jungen Fohlen wurden in Erwägung gezogen und geprüft. Insgesamt erwies sich die Behandlung der Fohlen mit Antibiotika in den ersten Lebenswochen nicht als geeignet, um der *R. equi*-Erkrankung vorzubeugen. Bedauerlicherweise sind die bisherigen Anstrengungen, einen Impfstoff für Fohlen zu entwickeln, erfolglos geblieben. Erste Untersuchungen zeigen, dass Lebendimpfstoffe die Th1-Immunantwort bei Fohlen stimulieren und die Fohlen bei experimenteller Infektion mit *R. equi*-Bakterien vor der Erkrankung schützen. Allerdings liegen bisher keine Ergebnisse von Feldstudien über die Wirksamkeit von Lebendimpfstoffen zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie bei Fohlen vor.

**Schlüsselwörter:** *Rhodococcus equi* / Fohlen / Vorbeugung / Literaturübersicht / Infektiologie / Mikrobiologie

## Prophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals – a review of literature

*Rhodococcus equi* (*R. equi*) is a bacterium that causes sporadically and endemically chronic abscess-forming bronchopneumonia in foals under the age of six months. Adult horses in contrast to foals, usually successfully overcome the infection by *R. equi*. This is due to the effective Th1 immune response, which is more pronounced in adults than in the neonatal period and leads to the destruction of the intracellular pathogens. Attempts to vaccinate mares have actually led to high concentrations of specific antibodies transferred successfully via the colostrum to the foals, but the rate of *R. equi* pneumonia in foals on endemic farms was not reduced. The administration of specific hyperimmune plasma is not effective for the prevention of *R. equi* pneumonia either. These disappointing results can be explained by the fact that antibodies alone do not provide any effective protection. Only a cellular immune response reduces *R. equi* effectively. A further measure to prevent rhodococcosis was the treatment of foals with adequate antibiotics in the first weeks of life. This as well did not reduce the disease occurrence. Unfortunately, efforts to develop a vaccine for foals have been unsuccessful in the past. Only live vaccines seem to stimulate Th1 immune response in a range that protection of the foal has been achieved in experimental infection. However, no field studies on the efficacy of safe live vaccines for the prevention of *R. equi* pneumonia in foals have been performed yet.

**Keywords:** *Rhodococcus equi* / foal / prevention / review / immunology / microbiology / neonatology

## Einleitung

*Rhodococcus equi* (*R. equi*), ein grampositives, unbewegliches, fakultativ intrazelluläres Bakterium, wurde erstmals 1923 von Magnusson aus Lungenläsionen bei einem Fohlen isoliert. Als ubiquitärer Bodensaprophyt mit hoher Tenazität kommt es, außer in der Antarktis, weltweit vor (*Knottenbelt* 1993). *R. equi* gilt als häufigste Ursache für das Auftreten von chronischen, eitrigen, abszedierenden Bronchopneumonien bei Fohlen im Alter von vier Wochen bis sechs Monaten (*Martens et al.* 1982). Dagegen ist die Erkrankung bei erwachsenen Pferden nur äußerst selten. *R. equi* wurde aber auch als zoonotischer Infektionserreger bei immunsupprimierten Menschen, insbesondere bei HIV-Patienten beschrieben (*Prescott* 1991), sowie, wenn auch nur anekdotisch, bei anderen Säugetieren, wie z. B. Schweinen, Rindern, Schafen, Ziegen, Lamas, Katzen und Hunden (*Addo und Dennis* 1977, *Hong*

und *Donahue* 1995, *Takai et al.* 2003a, *Pate et al.* 2004). Fohlen, die an einer *R. equi* Pneumonie erkranken, entwickeln pyogranulomatöse Läsionen in der Lunge und in den mediastinalen Lymphknoten. Die klinischen Anzeichen sind Fieber, Husten, Lethargie, Nasenausfluss, progressive Dyspnoe und Tachypnoe (*Prescott* 1991, *Cohen et al.* 2000). Neben den pulmonalen Veränderungen gibt es aber auch seltener vorkommende, extrapulmonale Manifestationen, wie z. B. intestinale Veränderungen, einhergehend mit Durchfall und Kolik, Osteomyelitiden, septischen Arthritiden, und immunvermittelte Erkrankungen, wie Uveitis und Polysynovitis (*Chaffin und Martens* 1997, *Reuss et al.* 2009).

Die *R. equi*-Pneumonie kann endemisch oder sporadisch auf Gestüten auftreten (*Prescott* 1991, *Giguère und Prescott* 1997). Auf endemisch betroffenen Betrieben kann diese

Erkrankung aufgrund der hohen Fohlenverluste eine besondere Bedeutung bekommen. Dort kann die Morbidität 40 bis 80% und die Letalität 5 bis 17% betragen. Das Vorkommen der *R. equi*-Pneumonie ist saisonal mit hohen Erkrankungsraten in den späten Frühlings- und den Sommermonaten (Muscatello et al. 2006). Zu diesem Zeitpunkt kommt es, wetterbedingt, zu einer erhöhten Erregerkonzentration in der Umgebung der Fohlen und somit zu einem erhöhten Infektionsdruck. Ob dabei ein Fohlen, welches *R. equi* ausgesetzt wurde, eine Erkrankung entwickelt oder effektiv die Infektion bekämpfen kann, ist abhängig vom Alter des Fohlens und von der Infektionsdosis (Cohen et al. 2012), der Virulenz des Stammes und der Entwicklung einer Th1 basierten Immunantwort (Sun et al. 2012).

Die Virulenz eines *R. equi*-Stammes ist direkt abhängig von dem Vorliegen eines 80 bis 90 kb großen Plasmids. Dieses enthält eine sogenannte Pathogenitätsinsel, welche für eins der neun Virulenz-Assoziierten-Proteine (Vap) kodiert. Unter den neun bisher beschriebenen Virulenz-Assoziierten-Proteinen ist beim Fohlen VapA am häufigsten vertreten (Takai et al. 1996, 2000, Hooper-McGrevy et al. 2001, Takai et al. 2003b). Stämme, die dieses Plasmid nicht besitzen, können sich nicht in Makrophagen vermehren, die Phagosom-Lysosom Fusion nicht inhibieren, somit die intrazelluläre Abtötung nicht umgehen und sind demzufolge auch nicht virulent (Hondalus und Mosser 1994, Giguère et al. 1999a).

### Das Immunsystem des Pferdes und die *R. equi*-Infektion

Der immunologische Schutz eines Wirtes basiert einerseits auf unspezifischen, angeborenen, humoralen und zellulären Mechanismen, andererseits auf einer spezifischen, erworbenen, zellulären und humoralen Immunantwort. Zum unspezifischen humoralen Schutz zählt unter anderem die Wirkung von Komplement und Lysozym. Zu der unspezifischen, zellulären Abwehr trägt überwiegend die Phagozytose durch Makrophagen bei. Die erworbene, humorale Immunantwort involviert B-Lymphozyten als Vorläufer der Plasmazellen, welche für die Antikörper (AK)-Produktion zuständig sind. Die erworbene, zelluläre Immunantwort wird durch die T-Lymphozyten gesteuert. Von diesen gibt es zwei Subpopulationen. Die zytotoxischen T-Lymphozyten exprimieren an ihrer Oberfläche das CD8<sup>+</sup>-Molekül wohingegen andere T-Lymphozyten CD4<sup>+</sup>-Moleküle synthetisieren und als T-Helferzellen bezeichnet werden. Unter dem Einfluss einer bestimmten Cytokinumgebung differenzieren sich diese T-Helferzellen entweder zu T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) oder zu T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen). Diese zwei Zelltypen sind wiederum für unterschiedliche immunologische Vorgänge zuständig. Die Th1-Zellen bewirken in Verbindung mit aktivierten Makrophagen die Abwehr gegen intrazelluläre Erreger. Die sogenannte Th1-Antwort induziert die Bildung spezifischer Cytokine, wie Interferon-Gamma (IFN- $\gamma$ ), Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin-2 (IL-2). Die Th2-Zellen hingegen aktivieren B-Lymphozyten, insbesondere im Rahmen von Infektionen mit extrazellulären Erregern. Die Th2-Antwort ist charakterisiert durch die Produktion anderer Cytokine, nämlich IL-4, IL-5 und IL-10 (Janeway et al. 2002). Wenn sich individuelle T-Zellen erst einmal in eine Richtung entwickelt haben (Th1 oder Th2), neigt die Immunantwort dazu in dieser Richtung zu persistieren, da die von ihnen produzierten

Cytokine die Entwicklung in die andere Richtung inhibieren (de Almeida et al. 2008, Zhou 2008). Beide Immunantworten (Th1/Th2) sind in der Bekämpfung der *R. equi* Infektion in unterschiedlichem Maße involviert.

Die Beseitigung einer *R. equi* Infektion beim adulten Pferd ist mit einem signifikanten Anstieg der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in der bronchoalveolären Spülflüssigkeit (BALF), einer Proliferation der Lymphozyten als Antwort auf die *R. equi* Antigen-Präsentation, der Entwicklung von *R. equi* spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten, und der Induktion von IFN- $\gamma$  assoziiert (Hines et al. 2001, Hines et al. 2003). Während die CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten im Laufe einer akuten Infektion keine wesentliche Rolle spielen, beteiligen sich die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten an der Aktivierung der Alveolarmakrophagen und der IFN- $\gamma$ -Synthese, die zu einer Abtötung des Erregers führen (Kanaly et al. 1993, 1996). Hieraus wird ersichtlich, dass der Schutz eines Wirtes gegenüber *R. equi* insbesondere mit einer zellvermittelten Immunantwort einhergeht, wobei auch der Antikörper (AK)-vermittelten Immunantwort eine Rolle zukommt (Hines et al. 1997, Hines et al. 2003, Hooper-McGrevy et al. 2003, Lopez et al. 2003).

Die Entwicklung einer reinen Th2-Immunantwort während einer *R. equi*-Infektion führt zum Ausbruch der Erkrankung. Dies wurde an Mäusen gezeigt, die mit neutralisierenden, monoklonalen Antikörpern gegen IFN- $\gamma$  behandelt wurden. Die Mäuse waren nicht dazu in der Lage, eine pulmonale *R. equi* Infektion zu beseitigen und entwickelten pulmonale Granulome (Kanaly et al. 1995). Außerdem exprimierten die Tiere hohe Mengen an IL-4 mRNA. Dies lässt auch auf eine Th2 vermittelte Immunantwort schließen.

Eine Immunantwort vom Th1-Typ hingegen bewirkt einen Infektionsschutz. Die Aktivität von Th1-Cytokinen (IFN- $\gamma$ , IL-2) ist entscheidend für die Elimination von intrazellulären Erregern wie *R. equi* oder auch Mykobakterien (Kanaly et al. 1995, Hines et al. 1997, Hines et al. 2003, Breathnach et al. 2006). Darüber hinaus ist die IFN- $\gamma$ -Produktion, welche essentiell für die Aktivierung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten ist, abhängig von der Exposition des Fohlens zu einer bestimmten Dosis des *R. equi*-Antigens (Jacks et al. 2007a). Die Antigen dosis lenkt die Immunantwort entweder in Richtung eines Th1- oder Th2-Typs. Es wurde an Mäusen festgestellt, dass mit einer geringen Dosis einer *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*)-Vakzine immunisierte Tiere eine Th1-Antwort entwickeln, die durch die ausbleibende Produktion von Antikörpern und eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion charakterisiert ist. Höhere Dosen des *M. bovis*-Antigens induzieren hingegen eine Th2-Antwort, die mit einer AK-Produktion und einem starken Anstieg der IL-4-Produktion einhergeht. Bei der in diesen Versuchen verwendeten Vakzine handelt es sich um eine Bacillus-Calmette-Guérin-(BCG)-Vakzine, die beim Menschen zur Immunisierung gegen Tuberkulose eingesetzt wird (Power et al. 1998). Der Zusammenhang von Antigen-Dosis und Entwicklung der unterschiedlichen Typen der T-Zell-Antwort wurde auch von Jacks et al. (2007a) anhand einer *R. equi*-Infektionsstudie an Fohlen beschrieben. Die intratracheale Instillation einer geringen Dosis an virulentem *R. equi* ( $1 \times 10^6$  CFU/Fohlen), bei Fohlen im Alter von 7 bis 10 Tagen, resultierte in einer signifikant erhöhten IFN- $\gamma$  mRNA-Expression und einer signifikant niedrigeren IL-4 mRNA-Expression, im Vergleich zu adulten Pferden, während

die IFN- $\gamma$ -Induktion bei nicht infizierten Fohlen deutlich geringer war als bei Adulten (*Breathnach et al. 2006, Jacks et al. 2007a*). Dies widerlegt die bisherige Annahme, dass neonate Fohlen bis zu einem Alter von drei Monaten kaum IFN- $\gamma$  produzieren, zeigt aber, dass Fohlen, ähnlich wie neonate Menschen und Mäuse, die Fähigkeit besitzen, eine, mit adulten Pferden vergleichbare Th1-Antwort zu entwickeln, vorausgesetzt der geeignete Stimulus ist zuvor vorhanden (*Jacks et al. 2007a*). Allerdings entwickelten bei *Jacks et al. (2007a)* alle infizierten Fohlen eine Pneumonie, so dass die Autoren davon ableiteten, dass die durch IFN- $\gamma$  induzierte Th1-Antwort nicht ausreichend ausgeprägt war, um die Infektion erfolgreich zu bekämpfen, oder dass ein weiterer, noch unbekannter Mechanismus der Immunantwort gefehlt hat. Andererseits entwickeln neonate Fohlen eine nur geringe Th2-Immunantwort, die selbst im Alter von drei Monaten noch nicht das Niveau der Th2-Antwort von adulten Pferden erreicht (*Wagner et al. 2010*). Dies widerlegt die bisher vorherrschende Meinung, daß die Immunantwort von Fohlen Th2 dominiert ist (*Boyd et al. 2003, Mealey et al. 2007, Morein et al. 2007*).

Nach wie vor sind die Antigene, die eine protektive Immunantwort gegenüber *R. equi* hervorrufen, unbekannt. Das Virulenzplasmid von *R. equi*, welches für die Pathogenität verantwortlich ist, scheint auch immunmodulierende Effekte, sowohl bei Fohlen als auch bei Adulten, zu haben (*Giguère et al. 1999a*). Einerseits reduziert das Virulenzplasmid die IFN- $\gamma$  Produktion, bzw. moduliert die Cytokin-Antwort während einer *R. equi* Infektion (*Giguère et al. 1999b*), andererseits rufen oberflächenexprimiertes VapA und sekretorisches VapC starke lymphoproliferative Immunantworten bei Fohlen und bei Adulten hervor (*Jacks et al. 2007b*).

Wenngleich die Erkenntnisse zu den Mechanismen der Immunantwort auf eine *R. equi*-Infektion mangelhaft sind, wurden zahlreiche Untersuchungen zur aktiven Immunisierung von Stuten und Fohlen und zur passiven Immunisierung von Fohlen gegen *R. equi* vorgenommen.

### Impfung der Mutterstuten gegen *Rhodococcus equi*

Versuche, Stuten vor der Geburt mit Lebend- oder Totimpfstoff gegen *R. equi* zu immunisieren, haben dazu geführt, dass die *R. equi*-AK im Kolostrum signifikant anstiegen (*Madigan et al. 1991, Martens et al. 1992*). Zusätzlich wurden in postkolostalen Serumproben von Fohlen geimpfter Stuten hohe AK-Konzentrationen ermittelt. Daraus ergab sich die Hoffnung, Fohlen via passivem Immuntransfer über das Kolostrum vor einer *R. equi* Pneumonie zu schützen.

In einer Studie wurden tragende Stuten mit einem *R. equi* Impfstoff, der verschiedene Antigene incl. VapA, Equi-Faktor-Exoenzyme und Aluminiumhydroxid als Adjuvans enthält, geimpft. Es wurde zwar eine signifikante Senkung der Morbidität von 3% auf 1,2% festgestellt (*Becú et al. 1997*) aber die Studie wurde ohne Kontrollgruppe durchgeführt, so dass die Ergebnisse entsprechend kritisch zu bewerten sind. Ein weiterer Ansatz der aktiven Immunisierung basiert einerseits auf der Anwendung einer VapA-haltigen Rhodokokkenproteinlösung in Verbindung mit einer Nanopartikel-Adjuvans, und andererseits auf einem formalinaktivierten Ganzzellimpfstoff virulen-

ter *R. equi*-Stämme (*Cauchard et al. 2004*). Auch hier war die Morbidität durch die *R. equi*-Pneumonie signifikant verringert, es fehlen aber genaue Angaben über die Erkrankungsrate und über die Zusammenstellung der Kontrollgruppe. Wie in der ersten Impfstudie wurden auch in dieser keinerlei Angaben darüber gemacht, ob parallel zur Impfung der Stuten auch Änderungen in Haltung und Management durchgeführt worden sind. Die positiven Ergebnisse der Stutenimpfung dieser Studien lassen sich nicht in Einklang mit anderen Untersuchungen bringen, nach denen es keine Korrelation zwischen den AK im Kolostrum und dem Schutz vor der *R. equi*-Pneumonie gibt (*Martens et al. 1992, Triskatis 2005*).

### Impfung von Fohlen gegen *Rhodococcus equi*

Die alleinige Immunisierung von Fohlen, sowie die kombinierte Impfung von Stuten und Fohlen, lieferten in der Vergangenheit unterschiedliche Ergebnisse. Bisher wurden Tot-, Lebend-, und genmanipulierte Impfstoffe bei Fohlen verschiedener Altersgruppen getestet. Totimpfstoffe, mit oder ohne Adjuvans, schützen Fohlen unterschiedlichen Alters nicht vor der *R. equi*-Erkrankung (*Magnusson 1938, Becú et al. 1997*). Selbst der Einsatz von cpg-Motiven (Cytosin-Phosphat-Guanosin-DNA Sequenzen) als Adjuvans in Form eines Inhalationsimpfstoffs bewirkt keinen Schutz der geimpften Fohlen (*Hullmann 2006, Dittrich 2008, Mueller-Alander 2008*).

Ein Lebendimpfstoff auf der Basis von virulenten *R. equi*-Bakterien wurde oral verabreicht, induzierte zwar einen Schutz vor einer experimentellen Infektion mit virulentem *R. equi* (*Chirino-Trejo et al. 1987, Hooper-McGrevy et al. 2005*) und bewirkte eine schnelle Beseitigung des Erregers aus der Lunge, verhinderte aber nicht die Vermehrung, die Ausscheidung, und die Kontamination der Umgebung der Tiere. Diese Beobachtungen schränken seinen Einsatz auf Zuchtbetrieben ein (*Chirino-Trejo et al. 1987*). Um die Risiken eines Lebendimpfstoffs zu minimieren wäre es notwendig, avirulente/schwach virulente Mutanten zu testen.

Eine Kombination aus Mutterschutz- und Fohlenimpfung, um sowohl einen aktiven als auch einen passiven Schutz hervorzurufen, mit einem inaktivierten *R. equi*-Impfstoff, schützte Fohlen gegen eine Rhodokokkose (*Varga et al. 1997*). Anders als in der Kontrollgruppe, entwickelte kein Fohlen aus den beiden Impfgruppen klinische Symptome einer *R. equi*-Pneumonie, so dass eine niedrigere Morbidität und Letalität bei den geimpften Fohlen beobachtet wurde. Da im Kolostrum sehr niedrige *R. equi*-Antikörperkonzentrationen ermittelt wurden, die nicht höher waren, als die der nicht vakzinierten Kontrollgruppe, wird vermutet, dass der Schutz wahrscheinlich durch die wiederholte Vakzinierung der Fohlen (mit 3, 5 und 7 Wochen) und nicht durch die Stutenimpfung zustande kam (*Varga et al. 1997*). In dieser Studie, die auf 3 verschiedenen Betrieben mit bedeutenden Fohlenverlusten in vorhergehenden Abfohlsaisons durchgeführt wurde, gibt es keine Angaben über sonstige Änderungen, z. B. in Hinblick auf Haltung oder Management. Deshalb sollten auch diese Ergebnisse, kritisch betrachtet werden.

Die Verwendung einer APTX (acetone-precipitated, Triton X-extracted)-Antigen Vakzine, bot nach experimenteller Infektion keinen Schutz vor der Entwicklung einer *R. equi*-Pneumonie,

sondern schien die Infektion zu verschlimmern. Da aber die Anzahl an Stuten und Fohlen, die an der Studie teilnahm, nur gering war, handelt es sich um eine vorläufige Beobachtung. Auch ist nicht klar, ob die eventuelle Verschlimmerung allein auf die Stuten- oder die Fohlenvakzinierung zurückzuführen ist (Prescott et al. 1997).

## DNA-Vakzinen

DNA-Immunisierung ist in der Lage sowohl eine zellvermittelte, als auch eine AK-vermittelte Immunantwort hervorzurufen. Obwohl die zellvermittelte Immunantwort die Hauptrolle bei der Bekämpfung von *R. equi* spielt, darf die AK-vermittelte Immunantwort nicht vernachlässigt werden (Hines et al. 1997, Hines et al. 2003, Hooper-McGrevy et al. 2003, Lopez et al. 2003). Da maternale AK bei der Verwendung von konventionellen Vakzinen dem Vorbereiten einer Immunantwort entgegenwirken (Stewien et al. 1978), könnte die DNA-Immunisierung einen speziellen Platz bei der Induktion der neonaten Immunantwort einnehmen (Hasset et al. 1997). Viele Arbeitsgruppen haben sich mit unterschiedlichem Erfolg auf die Verwendung von DNA-Technologie konzentriert, um eine *R. equi*-Vakzine für Fohlen zu entwickeln.

Im Mäusemodell wurde mit einer DNA-Vakzine, bestehend aus VapA in Kombination mit IL-12 (Haghighi und Prescott 2005), sowie einem attenuierten Salmonella-Stamm, der das VapA-Antigen enthält (Oliveira et al. 2007), *R. equi* aus der Lunge von vakzinieren Mäusen beseitigt und eine signifikante AK-Antwort erzielt (Haghighi und Prescott 2005, Oliveira et al. 2007). Hier zeigte sich das erste Mal, dass VapA ein schützendes Immunogen, zumindest bei Mäusen, ist (Haghighi und Prescott 2005). Da Mäuse natürlicherweise resistent gegenüber virulentem *R. equi* sind, ist es allerdings nicht möglich, ohne weitere Studien von diesen Ergebnissen auf die Wirksamkeit bei Fohlen zu schließen.

Für *R. equi* stellt das Mycobacterium tuberculosis ein gutes Modell der Immunisierung dar, denn beide Bakterien sind sich taxonomisch und pathogenomisch sehr ähnlich (nocardioforme Actinomyceten, Genom mit hohem Guanin- und Cytosin-Anteil, Zellwände mit Mykolsäure) und weisen außerdem eine ähnlich Biologie auf (Invasion von Alveolar-Makrophagen, intrazelluläres Überleben, replizieren sich in Phagosomen, verhindern die Phagosom-Lysosom-Fusion) (Hietala und Ardans 1987, Zink et al. 1987, Takai et al. 1992). Studien, die eine protektive Immunantwort gegen *M. tuberculosis* identifizieren, konzentrieren sich auf sezernierte Proteine, die im Überstand von Kultur-Filtraten (Culture filtrate supernatants (CFS)) präsent sind. Diese aktiv sezernierten Proteine rufen eine zellvermittelte Immunantwort bei Tieren und Menschen hervor (Andersen 1994, Arend et al. 2000, Smith et al. 2000). In einer Studie an drei adulten Pferde, zeigte sich, dass *R. equi*-CFS ebenso wie *M. tuberculosis*-CFS immunprotektiv wirken (Kohler et al. 2003). Die immunogenen Proteine in *R. equi*-CFS, namentlich VapC, VapD und VapE, werden auch während einer natürlichen Infektion bei adulten Pferden produziert. Sie werden mit dem Virulenzplasmid in Verbindung gebracht und stimulieren die IFN- $\gamma$  Produktion. Cauchard et al. (2006) zeigten beim Fohlen, dass synthetische Vap-Peptide (VapA, VapD, VapF und VapG) in Kombination mit einem Nanopartikel-Adjuvans auf Wasserbasis

immunogenen Charakter haben. Dies zeigt sich, wenn auch teilweise inkonsistent, in einem signifikanten Anstieg der IgG-AK und einer damit einhergehenden, gesteigerten, opsonierenden Serumaktivität (Cauchard et al. 2006).

Das Vakzine-Potential eines komplett attenuierten, auxotrophen Riboflavin (rib-) Stammes wurde in einem Immunisierungs-Infektions-Modell bei Fohlen getestet, nachdem sich im Mäusemodell gezeigt hatte, dass der Impfstamm lange genug persistiert, um eine IFN- $\gamma$ -Antwort zu erzeugen, die äquivalent zu der des Elternstammes ist (Lopez et al. 2008). Alle immunisierten Fohlen zeigten eine *R. equi* spezifische IgG-Antwort. Weiterhin wurde bei fünf von sechs immunisierten Fohlen eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion beobachtet, die sich nur bei einem Fohlen der Kontrollgruppe zeigte (Lopez et al. 2008). Der Vorteil in der Benutzung eines attenuierten Lebend-Stammes liegt darin, dass dieser das Virulenzplasmid enthält und somit potentiell relevante Antigene, die durch das Virulenz-Plasmid kodiert werden, auch in der Vakzine enthalten sind. Es wird hingegen vermutet, dass die Immunisierung mit nicht replizierbaren, schnell bereinigten, plasmidlosen Stämmen von *R. equi* deshalb keinen Schutz vor der *R. equi* Infektion bei Fohlen aufbaut, weil der Stamm schnell beseitigt wird oder die Immunantwort nicht gegen das Plasmid gerichtet ist (Lopez et al. 2008).

Da der Glyoxylat-Zyklus wichtig für die Virulenz von *R. equi* ist, wurde in einer Studie die Rolle der Isocitratlyase, das erste Enzym dieses Zyklus, untersucht. Hierfür entwickelte man eine Isocitratlyase-defiziente Mutante. Der Isocitratlyase-defiziente Stamm induziert bei Fohlen im Alter von 3 Wochen keine Erkrankung, obwohl *R. equi* aus der Lunge von infizierten Fohlen isoliert werden konnten. Die Anzahl der Bakterien war mehr als 6-fach geringer als bei dem Wild-Stamm (Goldstein und McCusker 2001). Die Mutante konnte sich nicht in Makrophagen vermehren, während der Wildstamm sich innerhalb von 8 Stunden verdoppelte. Das AceA-Gen, verantwortlich für die Isocitratlyase, ist das zweite Gen nach VapA, welches entscheidend für die Virulenz von *R. equi* ist, da es sowohl für die Assimilation von Fettsäuren, als auch von Acetat benötigt wird. Acetat ist in signifikanten Mengen im Dickdarm von Pferden präsent (Wall et al. 2005) und stimuliert das Wachstum von *R. equi* im Mist (Hughes und Sulaiman 1987). Dies zeigt, dass die Isocitratlyase, obwohl sie kein echter Virulenzfaktor wie z. B. VapA ist, sowohl im Wirt als auch in der Umgebung eine kritische Rolle im Wachstum und Überleben von *R. equi* spielt (Wall et al. 2005). Aufgrund dieser viel versprechenden Erkenntnisse wurden in einer weiterführenden Studie Fohlen im Alter von einer Woche mit einem Isocitratlyase-defizienten Stamm infiziert (Pei et al. 2007). Zwei von fünf infizierten Fohlen entwickelten eine schwere aber verzögert auftretende Pneumonie. Die drei weiteren Fohlen erkrankten nicht. Trotz der geringen Probandenzahl sind die Ergebnisse von beachtlichem Interesse, da die Deletions-Mutante weniger pathogen ist als der Wildstamm und möglicherweise zu einer Immunisierung der überlebenden Fohlen führt und so als Impfstamm relevant sein könnte (Pei et al. 2007).

## Hyperimmunplasma und andere AK-Produkte

Auch der Einsatz von Hyperimmunplasma (HIP) zur Prophylaxe der *R. equi*-Pneumonie ist gemäß einiger Studien erfolg-

reich (Martens et al. 1989, Madigan et al. 1991, Becú et al. 1997, Higuchi et al. 1999), aber auch laut anderer Autoren und jüngerer Studien nicht effektiv (Chaffin et al. 1991, Hurley und Begg 1995, Giguère et al. 2002, Perkins et al. 2002, Caston et al. 2006). Trotzdem gilt das HIP bis heute als einziges Mittel, das sowohl unter Feld- als auch unter experimentellen Bedingungen in der Lage ist, die Morbidität zu senken, vorausgesetzt die Verabreichung erfolgt vor der Exposition mit *R. equi* (Martens et al. 1989).

Der erste Einsatz von „Hyperimmunplasma“ erfolgte 1922 durch Schmiedhoffer. Dieser benutzte ein stallspezifisches Immenserum zur Prophylaxe von infektiösen, eitrigen Lungenentzündungen, die dieser Autor auf einen „Fohlenstreptokokkus“ zurückführte. Die Effektivität von Hyperimmunplasma ist abhängig von der Dosis, dem Zeitpunkt der Verabreichung, der angeborenen Kompetenz des Immunsystems der Fohlen, Management-Konditionen und der Anzahl an virulenten Bakterien in der Umgebung (Giguère et al. 2002). Der Zeitpunkt zu dem HIP verabreicht werden soll, um den bestmöglichen Schutz zu gewähren, ist unbekannt. Empfohlen wird eine Transfusion vor der ersten *R. equi*-Exposition (Martens et al. 1992) und eine zweite im Alter von etwa einem Monat (Giguère und Prescott 1997, Giguère et al. 2002, Perkins et al. 2002).

Auch normales equines Plasma wurde Fohlen zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie in Studien mit unbehandelter Kontroll-Gruppe infundiert (Perkins et al. 2002, Schulte 2005). Ähnlich wie beim spezifischen Hyperimmunplasma zeigte sich, dass die Anzahl an Fohlen mit Lungenabszessen in der Plasma-Gruppe und in der unbehandelten Kontrollgruppe identisch waren (Perkins et al. 2002), allerdings erkrankten die Fohlen durchschnittlich 3 Wochen später (Schulte 2005). Für diesen positiven Effekt wurden unspezifische Immunfaktoren wie Fibronektin, Komplementfaktoren, Cytokine und die opsonierenden Eigenschaften von Plasma und HIP verantwortlich gemacht (Madigan et al. 1991, Hurley und Begg 1995, Higuchi et al. 1999, Hooper-McGrevy et al. 2001, Giguère et al. 2002, Perkins et al. 2002).

### Paramunitätsinducer

Zur Prophylaxe der *R. equi* Pneumonie wurde auch ein Paramunitätsinducer (Zylexis®, Fa. Pfizer) bei Fohlen getestet. Zylexis® (früher Baypamun P®, Fa. Bayer) basiert auf inaktiviertem Parapoxvirus ovis und soll erregerunspezifisch, lokal und systemisch wirkende Abwehrmechanismen stimulieren und somit für einen immunstimulierenden Effekt sorgen (Büttner et al. 1987).

Dies wurde im Rahmen einer randomisierten Blindstudie auf einem Gestüt mit endemischer Rhodokokkose bei den Fohlen getestet. 45 Fohlen wurden subkutan und 45 Fohlen intranasal mit jeweils 2 ml des Paramunitätsinducers, insgesamt 14 mal, bis zum Alter von fünf Monaten, nach einem festgelegten Zeitplan, vakziniert. Außerdem wurden 45 Fohlen als Kontrollgruppe mitgeführt. Die Zahl der an Pneumonie erkrankten Fohlen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Impfgruppen und der Kontrollgruppe (Bauman 2006). Weder die wiederholte subkutane Verabreichung noch die mehrmalige intra-nasale Bestäubung bewirkten einen Schutz der Fohlen gegen eine Rhodokokkose.

### Chemoprophylaxe

Die prophylaktische Gabe von Makrolid-Antibiotika im Einsatz gegen die *R. equi*-Pneumonie war Gegenstand einiger Studien (Chaffin et al. 2008, Venner et al. 2009). Das verwendete Makrolid war Azithromycin, welches in Kombination mit Rifampicin zur Behandlung der *R. equi*-Pneumonie eingesetzt wird. Während Chaffin et al. (2008) auf zehn verschiedenen Gestüten, bei 338 Fohlen durch die orale Kurzzeitapplikation von Azithromycin während der ersten 14 Lebenstage im Abstand von 48 Stunden mit 10 mg/kg eine Reduzierung der Gesamtinzidenz von 20,8 % (Kontrollfohlen) auf 5,3 % erzielte, erreichten Venner et al. (2009) bei einer Verabreichung von 10 mg/kg täglich über die ersten 3 Lebenswochen keine Reduzierung der Erkrankungsrate bei den 25 behandelten Fohlen.

In aktuellen Studien wurde Gallium-Maltolate (GaM) zur Prävention und Behandlung der *R. equi*-Pneumonie getestet (Martens et al. 2007, Chaffin et al. 2009a, Chaffin et al. 2009b). Gallium ist ein trivalentes Halbmetall, welches in der Kombination mit Maltol eine hohe orale Bioverfügbarkeit aufweist (Bernstein et al. 2000) und beim Menschen nicht mit Nebeneffekten in Verbindung gebracht wird. Gallium konkurriert mit dreiwertigem Eisen, dem es chemisch sehr ähnlich ist, um die Aufnahme durch intrazelluläre Bakterien und wird bevorzugt aufgenommen. Eisen ist essentiell für das Wachstum der meisten Mikroorganismen, inklusive *R. equi*, da es in vielen metabolischen und DNA-Syntheseprozessen benötigt wird (Jordan et al. 2003). Um das Eisen für pathogene Mikroben zu limitieren, wird es an Plasma-Proteine (z. B. Transferrin und Lactoferrin) gebunden und stellt somit einen angeborenen anti-mikrobiellen Abwehrmechanismus dar. Allerdings ist *R. equi* in der Lage proteingebundenes Eisen zu benutzen und umgeht somit diesen Abwehrmechanismus (Jordan et al. 2003). Wird Gallium statt Eisen aufgenommen und in wesentliche, eisenabhängige reproduktive Enzym-Systeme eingebaut, kommt es zum Verlust der Funktionalität der eisenabhängigen Enzyme und damit einhergehend zu bakterieller Stase und/oder zum „Tod“ des Bakteriums (Bernstein 1998). Trivalentes Gallium kann im Gegensatz zu dreiwertigem Eisen nicht reduziert werden. Gallium liegt im Plasma hauptsächlich gebunden an Transferrin vor und wird bevorzugt von phagozytierenden Zellen am Ort von Entzündungen und granulomatösen Läsionen aufgenommen und reichert sich an diesen Stellen an (Tsan und Scheffel 1986).

Bei einer Dosierung von 30 mg/kg, oral, alle 24 Stunden, werden Serumkonzentrationen erreicht, die adäquat sein sollten, das Wachstum von *R. equi* zu inhibieren (Chaffin et al. 2009b). Das Ziel der GaM-Verabreichung in den ersten Lebenswochen ist, einen Schutz gegen die frühe Infektion zu bieten. Damit sollten Fohlen in den ersten Lebenswochen vor der Infektion mit *R. equi* geschützt werden (Chaffin et al. 2009b). Allerdings zeigte eine Studie an 483 Fohlen, dass durch GaM weder die Inzidenz, noch die Mortalität infolge der *R. equi*-Pneumonie in endemisch betroffenen Gestüten reduziert werden (Chaffin et al. 2009a).

### Schlussfolgerung

Bis heute gibt es keine wirksame Prävention der *R. equi*-Pneumonie bei Fohlen. In den letzten Jahren wurden zahlreiche

Studien durchgeführt, um die Immunantwort von Pferden und Fohlen bei einer Infektion mit *Rhodococcus equi* zu erforschen, und um zu verstehen, warum Fohlen derart anfällig gegenüber *R. equi* sind. Dabei wurden Immunprophylaxe und andere Kontrollstrategien untersucht. Die Fähigkeit des Erregers, die Immunantwort des Wirtes zum Zeitpunkt der Infektion zu umgehen, kann ein Grund für die Anfälligkeit der Fohlen sein, obwohl Fohlen durchaus in der Lage sind eine angemessene Th1-Antwort zu entwickeln (Jacks et al. 2007a). Theoretisch besteht eine angemessene Immunantwort aus einer Th1-betonen zellvermittelten Immunantwort, kombiniert mit spezifischen Antikörpern, insbesondere mukosalem IgA sowie systemischem IgG<sub>a</sub> und IgG<sub>b</sub>. Dies bedeutet, dass zur Abwehr von *R. equi* sowohl die angeborene, als auch die erworbene Immunität benötigt werden. Deshalb ist anzunehmen, dass eine attenuierte Lebendvaccine, die den natürlichen Weg der Infektion nachahmt und wenig Potential hat die Umwelt zu kontaminieren, den größten Erfolg im Hinblick auf eine effektive Immunantwort verspricht (Muscatello et al. 2007, Dawson et al. 2010). Allerdings fehlen derzeit dazu positive Ergebnisse aus Feldstudien.

Ein weiterer Ansatz zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie bei Fohlen ist die Anwendung von BCG-Vakzine. Aufgrund der ähnlichen Pathogenität zwischen *R. equi* und *M. tuberculosis* könnte eine BCG-Vakzine in kleinen Dosen die zur Abwehr von *R. equi* gewünschte Th1 zellvermittelte Immunantwort bei Fohlen hervorrufen, wie es bereits bei Mäusen und Babys gezeigt wurde (Power et al. 1998).

Von ganz entscheidender Bedeutung ist das Alter indem Fohlen geschützt werden sollten. Eine Vorbeugungsmaßnahme kann nur dann wirksam sein, wenn sie vor der Infektion durch *R. equi* verabreicht wird, dass heißt, wenn sie in der ersten Lebenswoche bei den Fohlen angewendet wird (Cohen 2012). Weiterhin sollte eine solche Maßnahme sicher und einfach, auch auf Zuchtbetrieben mit größeren Fohlenzahlen, anzuwenden sein.

## Literatur

- Addo P. B. und Dennis S. M. (1977) Corynebacteria associated with diseases of cattle, sheep and goats in Northern Nigeria. *Br. Vet. J.* 133, 334-339
- Andersen P. (1994) The T cell response to secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunobiology* 191, 537-547
- Arend S. M., Andersen P., van Meijgaarden K. E., Skjot R. L., Subronto Y. W., van Dissel J. T. und Ottenhoff T. H. (2000) Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J. Infect. Dis.* 181, 1850-1854
- Ashour J. und Hondalus M. K. (2003) Phenotypic mutants of the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi* created by in vivo Himar1 transposon mutagenesis. *J. Bacteriol.* 185, 2644-2652
- Bauman I. (2006) Untersuchung der Wirksamkeit des Paramunitäts-inducers Zylexis® zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Becú T., Polledo G. und Gaskin J. M. (1997) Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet. Microbiol.* 56, 193-204
- Bernstein L. R. (1998) Mechanisms of therapeutic activity for gallium. *Pharmacol. Rev.* 50, 665-682
- Bernstein L. R., Tanner T., Godfrey C. und Noll B. (2000) Chemistry and pharmacokinetics of gallium maltolate, a compound with high oral gallium bioavailability. *Met. Based Drugs* 7, 33-47
- Boyd N. K., Cohen N. D., Lim W. S., Martens R. J., Chaffin M. K. und Ball J. M. (2003) Temporal changes in cytokine expression of foals during the first month of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 92, 75-85
- Breathnach C. C., Sturgill-Wright T., Stiltner J. L., Adams A. A., Lunn D. P. und Horohov D. W. (2006) Foals are interferon gamma-deficient at birth. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 199-209
- Büttner M., Strube W., Wolf G. und Hoerstke M. (1987) Parapoxvirus als Induktor unspezifischer Abwehrmechanismen. *Tierärztl. Umsch.* 42, 14-21
- Caston S. S., McClure S. R., Martens R. J., Chaffin M. K., Miles K. G., Griffith R. W. und Cohen N. D. (2006) Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals. *Vet. Ther.* 7, 361-375
- Cauchard J., Sevin C., Ballet J. J. und Taouji S. (2004) Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Vet. Microbiol.* 104, 73-81
- Chaffin M. K., Cohen N. D. und Martens R. J. (2008) Chemoprophylactic effects of azithromycin against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia among foals at equine breeding farms with endemic infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 232, 1035-1047
- Chaffin M. K., Cohen N. D., Martens R. J., O'Connor M. und Bernstein L. R. (2009a) Chemoprophylactic effects of Gallium Maltolate against *Rhodococcus equi* Pneumonia among foals at endemic equine breeding farms. *Annual Convention of the AAEP, Las Vegas, NV, USA*, 55, 36-37
- Chaffin M. K., Fajt V., Martens R. J., Arnold C. E., Cohen N. D., O'Connor M., Taylor R. J. und Bernstein L. R. (2009b): Pharmacokinetics of an orally administered methylcellulose formulation of gallium maltolate in neonatal foals. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 33, 376-382
- Chaffin M. K. und Martens R. J. (1997) Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: Retrospective study of 61 cases (1988-1996) *Proc. Am. Assoc. Equine Pract* 79-80
- Chaffin M. K., Martens R. J., Martens J. G. und Fiske R. A. (1991) Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet. J.* 12, Suppl., 23-29
- Chirino-Trejo J. M., Prescott J. F. und Yager J. A. (1987) Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Can. J. Vet. Res.* 51, 444-447
- Cohen N. D., Chaffin M. K. und Martens R. J. (2000) Control and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 22, 1062-1070
- Cohen N. D., Chaffin M. K., Kuslie K. R., Syndergaard M., Takai S. und Blodgett G. P. (2012) Association of perinatal airborne exposure to *Rhodococcus equi* with increased risk of pneumonia caused by *R. equi* in foals. *Havemeyer Workshop*, 10-12.07.2012 Deauville
- Dawson T. R., Horohov D. W., Meijer W. G. und Muscatello G. (2010) Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 135, 1-11
- de Almeida D. E., Colvin C. J. und Coussens P. M. (2008) Antigen-specific regulatory T cells in bovine paratuberculosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 125, 234-245
- Dittrich N. (2008) Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlen durch Vakzination mit *Rhodococcus equi*-Impfstoff und Adjuvans CpG X: Vergleich eines kurzen und langen Impfstoffprotokolls. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Giguère S., Gaskin J. M., Miller C. und Bowman J. L. (2002) Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 220, 59-63
- Giguère S., Hondalus M. K., Yager J. A., Darrach P., Mosser D. M. und Prescott J. F. (1999a) Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 67, 3548-3557
- Giguère S. und Prescott J. F. (1997) Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet. Microbiol.* 56, 313-334

- Giguère S., Wilkie B. N. und Prescott J. F.* (1999b) Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 67, 5041-5047
- Goldstein A. L. und McCusker J. H.* (2001) Development of *Saccharomyces cerevisiae* as a model pathogen. A system for the genetic identification of gene products required for survival in the mammalian host environment. *Genetics* 159, 499-513
- Haghighi H. R. und Prescott J. F.* (2005) Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 215-225
- Hassetz D. E., Zhang J. und Whitton J. L.* (1997) Neonatal DNA immunization with a plasmid encoding an internal viral protein is effective in the presence of maternal antibodies and protects against subsequent viral challenge. *J. Virol.* 71, 7881-7888
- Hietala S. K. und Ardans A. A.* (1987) Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and non-exposed foals. *Vet. Microbiol.* 14, 307-320
- Higuchi T., Arakawa T., Hashikura S., Inui T., Senba H. und Takai S.* (1999) Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. *Zentralbl. Veterinarmed.* B 46, 641-648
- Hines M. T., Paasch K. M., Alperin D. C., Palmer G. H., Westhoff N. C. und Hines S. A.* (2001) Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 79, 101-114
- Hines S. A., Kanaly S. T., Byrne B. A. und Palmer G. H.* (1997) Immunity to *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* 56, 177-185
- Hines S. A., Stone D. M., Hines M. T., Alperin D. C., Knowles D. P., Norton L. K., Hamilton M. J., Davis W. C. und McGuire T. C.* (2003) Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 208-215
- Hondalus M. K. und Mosser D. M.* (1994) Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infect. Immun.* 62, 4167-75
- Hong C. B. und Donahue J. M.* (1995) *Rhodococcus equi*-associated necrotizing lymphadenitis in a llama. *J. Comp. Pathol.* 113, 85-88
- Hooper-McGrevy K. E., Giguere S., Wilkie B. N. und Prescott J. F.* (2001) Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1307-1313
- Hooper-McGrevy K. E., Wilkie B. N. und Prescott J. F.* (2003) Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10, 345-351
- Hooper-McGrevy K. E., Wilkie B. N. und Prescott J. F.* (2005) Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. *Vaccine* 23, 5760-5767
- Hughes K. L. und Sulaiman I.* (1987) The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Vet. Microbiol.* 14, 241-250
- Hullmann A.* (2006) Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlen durch Vakzination mit *Rhodococcus equi*-Impfstoff und Adjuvans CpG XXXX. *Diss. Med. Vet.* Hannover
- Hurley J. R. und Begg A. P.* (1995) Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Aust. Vet. J.* 72, 418-420
- Jacks S., Giguere S., Crawford P. C. und Castleman W. L.* (2007a) Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 669-677
- Jacks S., Giguere S. und Prescott J. F.* (2007b) In vivo expression of and cell-mediated immune responses to the plasmid-encoded virulence-associated proteins of *Rhodococcus equi* in foals. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 369-374
- Janeway C. A., Travers P., Walport M. und Shlomchik M.* (2002) *Immunologie.* Verlag Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 5. Auflage
- Jordan M. C., Harrington J. R., Cohen N. D., Tsois R. M., Dangott L. J., Weinberg E. D. und Martens R. J.* (2003) Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence-associated protein A. *Am. J. Vet. Res.* 64, 1337-1346
- Kanally S. T., Hines S. A. und Palmer G. H.* (1993) Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4<sup>+</sup> T-lymphocyte-deficient transgenic mice. *Infect. Immun.* 61, 4929-4932
- Kanally S. T., Hines S. A. und Palmer G. H.* (1995) Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infect. Immun.* 63, 3037-3041
- Kanally S. T., Hines S. A. und Palmer G. H.* (1996) Transfer of a CD4<sup>+</sup> Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. *Infect. Immun.* 64, 1126-1132
- Knottenbelt D. C.* (1993) *Rhodococcus equi* infection in foals: a report of an outbreak on a thoroughbred stud in Zimbabwe. *Vet. Rec.* 132, 79-85
- Kohler A. K., Stone D. M., Hines M. T., Byrne B. A., Alperin D. C., Norton L. K. und Hines S. A.* (2003) *Rhodococcus equi* secreted antigens are immunogenic and stimulate a type 1 recall response in the lungs of horses immune to *R. equi* infection. *Infect. Immun.* 71, 6329-6337
- Lopez A. M., Hines M. T., Palmer G. H., Knowles D. P., Alperin D. C. und Hines S. A.* (2003) Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA gene of *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 21, 3815-3825
- Lopez A. M., Townsend H. G., Allen A. L. und Hondalus M. K.* (2008) Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Vaccine* 26, 998-1009
- Madigan J. E., Hietala S. und Muller N.* (1991) Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 44, 571-578
- Magnusson H.* (1923) Spezifische Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger. *Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk* 50, 22-38
- Magnusson H.* (1938) Pyaemia in foals caused by *Corynebacterium equi*. *Vet. Rec.* 50, 1359-1468
- Martens R. J., Martens J. G. und Fiske R. A.* (1992) Failure of passive immunization by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet. J.* 12, Suppl., 19-22
- Martens R. J., Martens J. G., Fiske R. A. und Hietala S. K.* (1989) *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Vet. J.* 21, 249-255
- Martens R. J., Mealey K., Cohen N. D., Harrington J. R., Chaffin M. K., Taylor R. J. und Bernstein L. R.* (2007) Pharmacokinetics of gallium maltolate after intragastric administration in neonatal foals. *Am. J. Vet. Res.* 68, 1041-1044
- Martens R. J., Ruoff W. W. und Renshaw H. W.* (1982) Foal pneumonia: a practical approach to diagnosis and therapy. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet* 4, 361-373
- Mealey R. H., Stone D. M., Hines M. T., Alperin D. C., Littke M. H., Leib S. R., Leach S. E. und Hines S. A.* (2007) Experimental *Rhodococcus equi* and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: effect of IL-12, dose, and route. *Vaccine* 25, 7582-7597
- Morein B., Blomqvist G. und Hu K.* (2007) Immune responsiveness in the neonatal period. *J. Comp. Pathol.* 137 Suppl 1, S27-31
- Mueller-Alander E.* (2008) Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlendurch Vakzination mit einem *Rhodococcus equi*-Totimpfstoff mit einem unterschiedlich dosierten CpG-Adjuvans. *Diss. Med. Vet.* Hannover
- Muscattello G., Anderson G. A., Gilkerson J. R. und Browning G. F.* (2006) Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6152-6160
- Muscattello G., Leaden D. P., Klayt M., Ocampo-Sosa A., Lewis D. A., Fogarty U., Buckley T., Gilkerson J. R., Meijer W. G. und Vazquez-Boland J. A.* (2007) *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. *Equine Vet. J.* 39, 470-478

- Oliveira A. F., Ferraz L. C., Brocchi M. und Roque-Barreira M. C. (2007) Oral administration of a live attenuated Salmonella vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by Rhodococcus equi. *Microbes Infect.* 9, 382-390
- Oliveira A. F., Ruas L. P., Cardoso S. A., Soares S. G. und Roque-Barreira M. C. (2010) Vaccination of mice with salmonella expressing VapA: mucosal and systemic Th1 responses provide protection against Rhodococcus equi infection. *PLoS One* 5, e8644
- Pate M., Zdovc I., Pirs T., Krt B. und Ocepek M. (2004) Isolation and characterisation of Mycobacterium avium and Rhodococcus equi from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. *Acta Vet. Hung.* 52, 143-150
- Pei Y., Nicholson V., Woods K. und Prescott J. F. (2007) Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of Rhodococcus equi strain 103<sup>+</sup>. *Vet. Microbiol.* 125, 100-110
- Perkins G. A., Yeager A., Erb H. N., Nydam D. V., Divers T. J. und Bowman J. L. (2002) Survival of foals with experimentally induced Rhodococcus equi infection given either hyperimmune plasma containing R. equi antibody or normal equine plasma. *Vet. Ther.* 3, 334-346
- Power C. A., Wei G. und Bretscher P. A. (1998) Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infect. Immun.* 66, 5743-50
- Prescott J. F. (1991) Rhodococcus equi: an animal and human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 20-34
- Prescott J. F., Nicholson V. M., Patterson M. C., Zandona Meleiro M. C., Caterino de Araujo A., Yager J. A. und Holmes M. A. (1997) Use of Rhodococcus equi virulence-associated protein for immunization of foals against R. equi pneumonia. *Am. J. Vet. Res.* 58, 356-359
- Reuss S. M., Chaffin M. K. und Cohen N. D. (2009) Extrapulmonary disorders associated with Rhodococcus equi infection in foals: 150 cases (1987-2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 235, 855-63
- Schmiedhoffer S. (1922) Über eine infektiöse eitrige Lungenentzündung bei Saugfohlen. *Tierärztl. Wschr.* 613
- Schulte S. (2005) Wirksamkeit von Hyperimmenserum zur Prophylaxe der Rhodococcus-equi-Pneumonie beim Fohlen. Wirksamkeit von Hyperimmenserum zur Prophylaxe der Rhodococcus-equi-Pneumonie beim Fohlen. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Smith S. M., Brookes R., Klein M. R., Malin A. S., Lukey P. T., King A. S., Ogg G. S. Hill, A. V. und Dockrell H. M. (2000) Human CD8<sup>+</sup> CTL specific for the mycobacterial major secreted antigen 85A. *J. Immunol.* 165, 7088-95
- Sun L., Gong Z., Oberst E. J., Betancourt A., Adams A. A. und Horohov D. W. (2012) The hypermethylation of IFN $\gamma$  gene promoter is correlated with IFN $\gamma$  deficiency in the neonatal foals and its demethylation with aging is associated with environment. *Havemeyer Workshop*, 10-12.07.2012 Deauville
- Takai S., Hidaka D., Fujii M., Shindoh Y., Murata T., Nakanishi S., Sasaki Y., Tsubaki S. und Kamada M. (1996) Serum antibody responses of foals to virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens of Rhodococcus equi. *Vet. Microbiol.* 52, 63-71
- Takai S., Hines S. A., Sekizaki T., Nicholson V. M., Alperin D. A., Osa-ki M., Takamatsu D., Nakamura M., Suzuki K., Ogino N., Kakuda T., Dan H. und Prescott J. F. (2000) DNA sequence and comparison of virulence plasmids from Rhodococcus equi ATCC 33701 and 103. *Infect. Immun.* 68, 6840-7
- Takai S., M. Iie, Watanabe Y., Tsubaki S. und Sekizaki T. (1992) Virulence-associated 15- to 17-kilodalton antigens in Rhodococcus equi: temperature-dependent expression and location of the antigens. *Infect. Immun.* 60, 2995-7
- Takai S., Martens R. J., Julian A., Garcia Ribeiro M., Rodrigues de Farias M., Sasaki Y., Inuzuka K., Kakuda T., Tsubaki S. und Prescott J. F. (2003a) Virulence of Rhodococcus equi isolated from cats and dogs. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4468-4470
- Takai S., Son W. G., Lee D. S., Madarame H., Seki I., Yamatoda N., Kimura A., Kakuda T., Sasaki Y., Tsubaki S. und Lim Y. K. (2003b) Rhodococcus equi virulence plasmids recovered from horses and their environment in Jeju, Korea: 90-kb type II and a new variant, 90-kb type V. *J. Vet. Med. Sci.* 65, 1313-1317
- Triskatis A.-L. (2005) Semiquantitative Bestimmung von Antikörpern gegen Rhodococcus equi in Serum und Kolostrum bei Stuten und Fohlen mittels ELISA und der Vergleich mit Befunden der Lungenuntersuchung. *Diss. Med. Vet. Hannover*
- Tsan M. F. und Scheffel U. (1986) Mechanism of gallium-67 accumulation in tumors. *J. Nucl. Med.* 27, 1215-1219
- Varga J., Fodor L., Rusvai M., Soos I. und Makrai L. (1997) Prevention of Rhodococcus equi pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. *Vet. Microbiol.* 56, 205-212
- Venner M., Reinhold B., Beyerbach M. und Feige K. (2009) Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. *Vet. J.* 179, 301-303
- Wagner B., Burton A. und Ainsworth D. (2010) Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Vet. Res.* 41, 47
- Wall D. M., Duffy P. S., Dupont C., Prescott J. F. und Meijer W. G. (2005) Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen Rhodococcus equi. *Infect. Immun.* 73, 6736-6741
- Zhou Y. (2008) Regulatory T cells and viral infections. *Front. Biosci.* 13, 1152-1170
- Zink M. C., Yager J. A., Prescott J. F. und Fernando M. A. (1987) Electron microscopic investigation of intracellular events after ingestion of Rhodococcus equi by foal alveolar macrophages. *Vet. Microbiol.* 14, 295-305

Dr. Dr. habil. PhD Monica Venner  
Pferdeambulanz Destedt  
Trift 4  
38162 Destedt  
monica.venner@tiho-hannover.de