

Tierärztliche Hochschule Hannover
Klinik für Pferde

**Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlen
durch Vakzination mit einem *Rhodococcus equi*-Totimpfstoff
mit einem unterschiedlich dosierten CpG-Adjuvans**

**INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin
- Doctor medicinae veterinariae -
(Dr. med. vet.)**

**Vorgelegt von
Eva Müller-Alander
(Köln)**

Hannover 2008

Wissenschaftliche Betreuung: Univ. – Prof. Dr. E. Klug

1. Gutachter: Univ. – Prof. Dr. E. Klug

2. Gutachter: Univ. – Prof`in Dr. M. Hoedemaker

Tag der mündlichen Prüfung: 10.04.2008

aus Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Literaturübersicht	11
2.1	Das Immunsystem des equinen Neonaten	11
2.1.1	Die fetale Entwicklung des Immunsystems	11
2.1.2	Kolostrum	13
2.1.3	Beginn der eigenen Immunglobulinsynthese	15
2.1.4	Die zelluläre Abwehr in Zusammenhang mit <i>Rhodococcus equi</i>	15
2.2	Neue Impfstoff-Adjuvantien: CpG-Motive	18
2.2.1	Struktur	18
2.2.2	Wirkmechanismen	19
2.2.3	CpG-Motive als Impfstoff-Adjuvantien	21
2.3	<i>Rhodococcus equi</i>	23
2.3.1	Bedeutung von <i>Rhodococcus equi</i> in der Pferdeaufzucht	23
2.3.2	Geschichtlicher Überblick und Taxonomie	23
2.3.3	Morphologie und Kultur	25
2.3.4	Virulenzfaktoren	26
2.3.5	Epidemiologie und Pathogenese	27
2.3.6	Klinische Symptome der <i>Rhodococcus equi</i> -Pneumonie	29
2.3.7	Pathologie	30
2.3.8	Diagnose	31
2.3.9	Therapie	33
2.3.10	Prognose	34
2.3.11	Prophylaxe	35
3	Material und Methode	39
3.1	Probanden	39
3.1.1	Haltung	39
3.1.2	Erstversorgung der Neonaten	39
3.1.3	Impfungen und Entwurmungen	40
3.1.4	Einteilung der Probanden	40
3.2	<i>Rhodococcus equi</i> -Impfstoff	41
3.3	Adjuvans CpG X	42
3.4	Impfprotokoll	42
3.5	Untersuchung der Fohlen	43
3.5.1	Klinische Allgemeinuntersuchung	43
3.5.2	Klinische Untersuchung des Respirationstraktes	43
3.5.3	Labordiagnostische Untersuchung	45
3.5.4	Weiterführende Untersuchung des Respirationstraktes	45
3.6	Statistische Auswertung	48
4	Ergebnisse	50
4.1	Morbidität	50
4.2	Erkrankungsalter	51
4.3	Klinische Symptome bei den Fohlen mit Lungenabszessen (Klinischer Score)	54
4.4	Anzahl der Blutleukozyten	55
4.5	Anzahl der Lungenabszesse	57

4.6	Abszess-Score	59
4.7	Anzahl therapiebedürftiger Fohlen	60
5	Diskussion	63
5.1	Diskussion von Material und Methode	63
5.1.1	Probanden	63
5.1.2	Impfprotokoll	65
5.1.3	Untersuchungen der Probanden	67
5.2	Ergebnisse	69
5.3	Schlussfolgerungen	73
6	Zusammenfassung	75
7	Summary	77
8	Literaturverzeichnis	79
9	Anhang	93

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AGP	Agargel-Präzipitation
BALF	bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit
BCG	Bacillus Calmette Guérin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
CAMP-	
Phänomen	nach den Entdeckern Christie-Aktins-Munch-Petersen
CAZ-NB	Ceftazidim-Novobiocin
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanosin
d	Tage
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dl	Deziliter
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii
FPT	Failure of passive transfer
g	Gramm
h	Stunde
HIV	humane immunodeficiency virus
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
IQA	Interquartilabstand
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
kV	Kilovolt
Lnn.	Lymphonodii

mAS	Milliampère-Sekunde
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
mod.	modifiziert
l	Liter
MHC	major histocompatibility complex
ml	Milliliter
MW	Mittelwert
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
n	Anzahl
NANAT	Nalidixin-Acid-Novobiocin-Acid-Tellurit
NK	natürliche Killerzellen
o.b.B.	ohne besonderen Befund
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PD	Phosphodiester
PT	Phosphorhathiat
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction
<i>R. equi</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SDS-Page	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
ssp.	Subspezies
Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchialsekret
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Vap	Virulenz-assoziiertes Protein
WBC	white blood cells
WdT	Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte

1 Einleitung

Atemwegserkrankungen beim Fohlen im Alter von zwei bis sechs Monaten gehören zu den häufigsten Erkrankungen in der Fohlenaufzucht. Ätiologisch kommen viele verschiedene Erreger in Betracht, wobei als wichtigste Ursache *Rhodococcus equi* gilt. Dieses fakultativ intrazelluläre Bakterium ist weltweit verbreitet und führt zu Bronchopneumonien und pyogranulomatösen Entzündungen der Lunge, welche sowohl sporadisch wie auch endemisch in der Fohlenpopulation auftreten. Dabei beträgt die Morbidität bis 80 % und die Letalität kann zwischen 5-17 % liegen (MARTENS et al., 1989).

Durch den Einsatz adäquater Antibiotika konnte die Überlebensrate der an einer Rhodokokkose erkrankten Fohlen in den letzten beiden Jahrzehnten von 20 % auf nahezu 90 % gesteigert werden (HILLIDGE, 1987). Jedoch ist die antibiotische Therapie kosten- und zeitintensiv und kann mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden sein, so dass der Bedarf an einer Prophylaxe nach wie vor sehr groß ist. Alle Versuche in der Vergangenheit, durch Vakzinierung der Mutterstuten oder aktive wie passive Immunisierung einen reproduzierbaren Schutz der Fohlen zu erreichen, schlugen fehl.

Die Tatsache, dass in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) von nach einer Rhodokokkose genesenden Fohlen ein signifikant höherer Gehalt an Interferon-sezernierenden T-Lymphozyten als bei erkrankten Fohlen nachzuweisen ist, erlaubt den Rückschluss, dass der Schutz gegen *Rhodococcus equi* weniger humoral sondern viel mehr zellulär bedingt ist (HINES et al., 2003). Durch Bestandteile bakterieller DNA lässt sich die zelluläre Komponente des Immunsystems steigern. Dabei handelt es sich insbesondere um Cytosin-Guanosin-Sequenzen, die so genannten CpG-Motive. Die klinische Wirksamkeit eines CpG-Motivs als Adjuvans für Impfstoffe im Rahmen der Fohlen-Rhodokokkose wurde in der vorliegenden Studie untersucht.

EINLEITUNG

In der Untersuchung von HULLMANN (2006) kam erstmals bei Fohlen ein *Rhodococcus equi*-Impfstoff mit einem CpG-Motiv als Adjuvans zur intranasalen Vakzination mit ersten Hinweisen einer schützenden Wirkung zum Einsatz.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob durch das Hinzufügen von Adjuvans CpG X zu einem Impfstoff ein Schutz gegen *Rhodococcus equi* aufgebaut werden kann. Dabei sollten zwei unterschiedliche Konzentrationen des CpG X in einem stallspezifischen Totimpfstoff intranasal verabreicht und anschließend die klinische Wirksamkeit bei einer natürlichen Infektion verglichen werden.

2 Literaturübersicht

2.1 Das Immunsystem des equinen Neonaten

In den letzten Jahrzehnten vertieften sich die Erkenntnisse über das equine Immunsystem, insbesondere über das Immunsystem des neugeborenen bzw. heranwachsenden Fohlens. Dadurch verbesserte sich das Verständnis über die besondere Empfänglichkeit von Fohlen gegenüber bakteriellen Infektionen wie im Fall der Rhodokokkose. Daraus ergeben sich Ansätze zur sinnvollen Unterstützung der immunologischen Vorgänge in Bezug auf Infektionen von Fohlen mit *Rhodococcus equi*.

2.1.1 Die fetale Entwicklung des Immunsystems

Während der physiologischen Trächtigkeit ist der Fetus effizient vor exogenen Pathogenen geschützt (SELLON, 2006). Mit Beginn der extrauterinen Phase muss sich der Neonat schlagartig mit den vielfältigen Keimen seiner Umwelt auseinandersetzen. Aufgrund einiger essentieller Besonderheiten des neonatalen Immunsystems kommt es bei Fohlen häufig zu Erkrankungen durch Keime, die adulte, immunkompetente Pferde erfolgreich abwehren können.

Zwar ist nachgewiesen, dass fetale Lymphozyten ab dem 80. Graviditätstag bereits auf antigene Stimulation reagieren können und ab dem 185. Graviditätstag eine humorale Immunantwort in Form von Antikörperproduktion stattfindet, dennoch ist diese humorale Immunantwort zum Zeitpunkt der Geburt quantitativ noch nicht ausreichend, um eine Infektion effizient abzuwehren (SELLON, 2006).

Zum Zeitpunkt der Geburt besitzt das Fohlen ein Immunsystem, das sich prinzipiell nicht von dem eines adulten Pferdes unterscheidet (SCHUBERTH u. LEIBOLD, 1996) und die gleichen Komponenten der unspezifischen und spezifischen Abwehr beinhaltet. Grundsätzlich ist das Fohlen dadurch zu jedem Zeitpunkt in der Lage, auf einen antigenen Reiz zu reagieren. Damit kann der equine Neonat zwar als immunkompetent, aber immunnativ gelten, da die immunologischen Vorgänge sowohl hinsichtlich Quantität wie Qualität von denen adulter Pferde abweichen. Das

bedeutet, dass post partum eine Reifungsperiode notwendig ist, damit die volle Funktionsfähigkeit aller Komponenten des Immunsystems erreicht wird.

Ante partum trägt das Immunsystem in erster Linie die bedeutende Aufgabe, eine Autoimmunität aufzubauen und aufrechtzuerhalten (SCHUBERTH u. LEIBOLD, 1996). Hierbei handelt es sich um multifaktorielle Vorgänge des fetalen Immunsystems, wobei die Zellen, die im pathologischen Fall im Sinne von Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen, identisch sind mit den Zellen, die in physiologischen immunologischen Reaktionen protektiv wirken (McCLURE, 2000).

Grundsätzlich können Lymphozyten alle Antigene erkennen, körperfremde wie körpereigene. Im normalen Verlauf der Entwicklung der fetalen Immunabwehr entsteht durch negative Selektion von Zellen, die Rezeptoren für körpereigene Antigene tragen, eine funktionelle Selbsttoleranz; das Immunsystem ist somit in der Lage, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden.

T-Lymphozyten stammen aus dem Knochenmark und erlangen im Thymus die Selbsttoleranz, welches einen wesentlichen Prozess in der T-Zell-Reifung darstellt. Die T-Zellen mit Rezeptoren für körpereigene Antigene können differenziert werden in Zellen mit hoher und niedriger Affinität. T-Zellen mit Rezeptoren, die eine starke Bindungsneigung an körpereigene Antigene aufweisen, werden im Thymus zerstört. Damit wird verhindert, dass sie sich vermehren und körpereigene Strukturen angreifen. T-Zellen mit schwächerer Affinität dagegen können der Zerstörung im Thymus entgehen und in die Körperperipherie gelangen (McCLURE, 2000). Selbsttoleranz bei solchen Zellen wird durch das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen wie Zytokinen, die für das Zustandekommen einer immunologischen Reaktion benötigt werden, erreicht. Ebenso werden schwach selbst-reaktive B-Lymphozyten aus dem Knochenmark, die wie bei allen immunologischen Vorgängen auf die Hilfe von T-Zellen angewiesen sind, durch das Fehlen der T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) deaktiviert. B-Zellen mit einer hohen Affinität zu körpereigenen Antigenen werden bereits im Knochenmark eliminiert (McCLURE, 2000). Diese Vorgänge bedürfen einer immunologischen Kompetenz des Fetus nach „innen“ hin (SCHUBERTH u. LEIBOLD, 1996). Fehler in diesen frühen Mechanismen führen zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen (McCLURE, 2000).

Aufgrund des besonderen Aufbaus der equinen Plazenta (Placenta epitheliochorialis diffusa completa) findet so gut wie keine transplazentare Passage von Immunglobulinen statt, so dass das Fohlen nahezu agammaglobulinämisch zur Welt kommt (SELLON, 2006). HAMMER et al. (2001) ermittelten zwar bei zwei von zehn Fohlen vor der Kolostrumaufnahme bereits messbare IgG-Konzentrationen im Serum und bestätigten damit Ergebnisse von McGUIRE und CRAWFORD (1973) sowie EDWARDS et al. (1982), die bereits niedrige IgG-Gehalte bei einer geringen Prozentzahl neugeborener Fohlen und Kälber nachweisen konnten; jedoch werden diese Werte in der Literatur gemeinhin als vernachlässigenswert angesehen. Ohne Kolostrumaufnahme werden angemessene IgG-Konzentrationen erst mit einem Alter von drei bis vier Monaten erreicht. Damit ist der equine Neonat in der präkolostralen Phase besonders anfällig für Infektionen, was die Wichtigkeit einer frühen und ausreichenden Kolostrumaufnahme unterstreicht.

2.1.2 Kolostrum

Das Kolostrum stellt die erste Immunglobulin-Quelle dar, enthält darüber hinaus aber weitere zelluläre und lösliche Komponenten, die bedeutenden Einfluss auf die Ausbildung der neonatalen Immunität und auf die Reifung des Gastrointestinaltraktes haben. Es handelt sich dabei einerseits um Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Epithelzellen, andererseits um Zytokine, Hormone und Enzyme (SELLON, 2006).

In den letzten Wochen der Trächtigkeit findet eine Anreicherung von Immunglobulinen aus dem Blut der Stute in die Milchdrüse und die Kolostrumproduktion statt. Ein bis zwei Stunden post natum beginnt der Neonat, Kolostrum aufzunehmen; ab der sechsten Stunde sind im Fohlenserum erste Immunglobuline nachweisbar. Die Aufnahme der Antikörper geschieht durch aktive Resorption mittels Pinozytose durch neonatale Enterozyten, wobei die gesamte Dünndarmfläche zur Resorption genutzt wird (JEFFCOTT, 1974). Nach unselektiver Aufnahme gelangen die maternalen Antikörper via Lymphgefäßsystem in den neonatalen Blutkreislauf. Damit entspricht bei ausreichender und rechtzeitiger Kolostrumaufnahme durch das Fohlen die Zusammensetzung der Immunglobulin-

Fraktion im Fohlenserum dem Immunglobulin-Gehalt des Kolostrums. Diese kurzfristige Fähigkeit zur Absorption der Makromoleküle ist einerseits auf die Unselektivität der jungen Darmzellen und andererseits auf das Vorliegen von Trypsininhibitoren im Kolostrum zurückzuführen. Unter dem Einfluss von Nebennierenhormonen werden diese Zellen bald gegen mature, spezialisierte Enterozyten ausgetauscht, welche die Fähigkeit zur Absorption von Makromolekülen nicht haben (JEFFCOTT, 1972). Gleichzeitig setzt die physiologische enzymatische Proteinverdauung ein. Somit liegt das IgG-Absorptionsmaximum in den ersten sechs Lebensstunden; danach tritt ein drastischer Abfall ein, wobei die Absorptionsrate 20 Stunden nach der Geburt weniger als ein Prozent beträgt. Bereits zwölf Stunden post partum werden im Kolostrum nur noch geringe IgG-Spiegel erreicht (SELLON, 2006), nach 24 Stunden ist der kolostrale IgG-Gehalt auf nahezu null abgesunken.

Diese Vorgänge verdeutlichen die Wichtigkeit der rechtzeitigen Kolostrumaufnahme durch das neugeborene Fohlen, wobei nicht nur die Quantität eine Rolle spielt, sondern auch der Gehalt an erregerspezifischen Immunglobulinen für die Gesundheit des heranwachsenden Fohlens von erheblicher Bedeutung ist (SCHUBERTH u. LEIBOLD, 1996).

Prädisponierend für Erkrankungen von Fohlen durch pathogene Erreger ist die zeitliche Beziehung zwischen Abbau der maternalen Antikörper und Beginn der eigenen Immunglobulinsynthese. Bei ausreichender Kolostrumaufnahme erreicht der Neonat 18-24 Stunden post natum adulte Immunglobulinwerte, die aufgrund des Proteinabbaus jedoch nicht lange fortbestehen. Diese Tatsache schränkt auch den Einsatz von speziesfremdem Kolostrum beim Fohlen ein. Die Halbwertszeit für bovines IgG im Fohlenserum liegt bei lediglich 7 bis 9 Tagen, verglichen mit 26 Tagen bei equinem IgG (HAMMER et al., 2001). Die meisten maternalen Antikörper sind mit einem Alter von sechs Monaten nur noch in sehr geringen Konzentrationen im Fohlenserum nachweisbar (SELLON, 2006).

WILSON (2005) empfiehlt daher, bei der aktiven Immunisierung von Fohlen zwischen Erkrankungen, die bereits im Fohlenalter auftreten können (Rotavirus-Infektionen, Rhodokokkose) und solchen, die in der Regel in einem späteren Altersabschnitt auftreten (Infektionen durch das equine Herpes-Virus (EHV)-1 und -4,

Influenza, Druse) zu differenzieren und gegen letztere nicht vor dem sechsten Monat zu impfen, um ein Interferieren zwischen maternalen Antikörpern und Impfantigen zu vermeiden.

2.1.3 Beginn der eigenen Immunglobulinsynthese

Erste eigene Immunglobuline sind ab der zweiten bis vierten Lebenswoche nachweisbar, allerdings erfolgt der Anstieg nur langsam, bis adulte IgG-Level von 8-10 g/l mit 5-10 Monaten erreicht werden. HOLZNAGEL et al. (2003) vermuten als Ursache für den langsamen Beginn der endogenen Immunglobulinsynthese die hemmende Wirkung maternaler Antikörper, die in niedrigen Konzentrationen zwar keine protektive Wirkung mehr zeigen, die endogene Synthese des Neonaten aber dennoch unterdrücken. Damit bestätigen sie Ergebnisse von Studien zur de-novo Antikörper-Synthese bei Fohlen, die kein (JEFFCOTT, 1974) bzw. bovines Kolostrum (HOLMES u. LUNN, 1991) erhielten und bereits ab der zweiten Lebenswoche mit einer vergleichsweise höheren Produktion eigener Immunglobuline begannen.

Die Kombination aus niedrigen IgG-Konzentrationen und verminderter Funktionsfähigkeit der neutrophilen Granulozyten wird als ausschlaggebend für die erhöhte Empfänglichkeit von Fohlen gegenüber bakteriellen Infektionen angesehen (DEMMERS et al., 2001).

2.1.4 Die zelluläre Abwehr in Zusammenhang mit *Rhodococcus equi*

Beim neonaten Fohlen liegt aufgrund der fehlenden erregerspezifischen B- und T-Gedächtniszellen eine quantitativ defiziente spezifische Abwehr vor. Deshalb sind Fohlen bis zu einem Alter von 28 Tagen nicht in der Lage, bei wiederholtem Ag-Kontakt schnell und effektiv zu reagieren (HOLZNAGEL et al., 2003).

Die unspezifische Abwehr, insbesondere der zelluläre Anteil spielt in der frühen Phase der Reaktion gegenüber Infektionserregern eine entscheidende Rolle (DEMMERS et al., 2001). Beim Fohlen allerdings weisen sowohl neutrophile Granulozyten wie Makrophagen geringere bakterizide Aktivität in Form von verminderter chemotaktischer Beweglichkeit, Phagozytoseaktivität und Zytotoxizität auf (DEMMERS et al., 2001). Die verminderte Funktionalität dieser Zellen wird

dadurch weiter verringert, dass Serum von neugeborenen Fohlen weniger Komplementfaktoren wie C3 enthält und dadurch die opsonisierende Aktivität beeinträchtigt (GRÖNDAHL et al., 2001). Weiter exprimieren neonatale Zellen deutlich weniger Zelloberflächenmoleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) und verfügen damit nur eingeschränkt über die Fähigkeit, eine Immunantwort einzuleiten (LUNN et al., 1993).

Die erste Immunantwort des equinen Neonaten ist charakterisiert durch die Polarisierung in Richtung einer Th2-Antwort (BREATHNACH et al., 2006). Seitdem bekannt wurde, dass zelluläre wie humorale Abwehrmechanismen auf die Hilfe der T-Zellen angewiesen sind, ist intensiv an dieser Zellpopulation, allerdings überwiegend bei Nagern, geforscht worden. Aufgrund unterschiedlicher Oberflächen-Antigene werden T-Lymphozyten differenziert in T-Helfer-Zellen, die vor allem das CD4 (Cluster of Differentiation)-Antigen tragen und zytotoxische T-Zellen, die hauptsächlich das CD8-Antigen tragen. Die unterstützende Wirkung der T-Helferzellen erfolgt durch die Produktion verschiedener Zytokine, welche in komplexer Weise zelluläre und humorale Immunvorgänge beeinflussen (HOROHOV, 2000).

Eine weitere Einteilung der T-Helferzellen erfolgt anhand der von ihnen produzierten Zytokine. Während Th1-Zellen hauptsächlich Interferon (IFN) - γ und Interleukin (IL) - 2 produzieren und durch Aktivierung von Makrophagen eine wichtige Rolle in der zellulären Abwehr spielen, bilden Th2-Zellen vor allem IL-4, -5 und -10 und aktivieren die Immunglobulinsynthese.

Diese Tatsache führt aufgrund des bereits erwähnten Ungleichgewichts zugunsten der Th2-Population zu einer eingeschränkten zellulären Abwehr beim equinen Neonaten. Die Polarisierung findet bereits in der fetalen Phase statt und persistiert in der neonatalen Periode. Im Mäusemodell konnte nachgewiesen werden, dass der intrazelluläre Erreger *Leishmania major* durch eine Th1-Antwort und einhergehender Makrophagen-Aktivierung erfolgreich eliminiert werden konnte, während eine Th2-Antwort mit folgender Antikörper-Produktion mit dem Ausbruch einer Leishmaniose assoziiert wurde (HOROHOV, 2000). Wie bei anderen Mäusemodellen auch, muss hier die Übertragbarkeit auf andere Spezies sowie von in vitro- auf in vivo-

Bedingungen in Frage gestellt werden. Allerdings liegen bei Fohlen einige Hinweise dafür vor, dass eine ähnliche Situation wie bei den Leishmanien-infizierten Mäusen hinsichtlich der Immunantwort vorliegt (AINSWORTH, 1999). HINES et al. (2003) wiesen in der BALF von experimentell mit *R. equi* infizierten und erkrankten Fohlen vermehrt IL-4, -5 und -10 nach. Dagegen wurde eine Th1-Antwort bei Fohlen, die nach der Infektion mit *R. equi* keine Pneumonie entwickelten, an einer höheren IFN- γ - und IL-2-Konzentration in der BALF erkannt. Daraus schließen die Autoren, dass der Erreger durch die Th1-Antwort erfolgreich eliminiert werden konnte. Die Produktion von IFN- γ wird als fundamental bei der Reifung des neonatalen Immunsystems und die anfängliche Unreife der Abwehr als ursächlich für die erhöhte Empfänglichkeit gegenüber Infektionen durch *R. equi* angesehen (STURGILL et al., 2006). Der Grund für die IFN- γ -Defizienz zum Zeitpunkt der Geburt ist unklar. Mit zunehmendem Alter der Pferde und IFN- γ -Gehalt im Blut und in der BALF steigt die Widerstandsfähigkeit gegenüber intrazellulären Erregern; die genauen immunologischen Mechanismen sind ebenfalls ungeklärt (BREATHNACH et al., 2006).

In einer Studie an 18 Ponyfohlen konnte weder durch ein mehrmalig verabreichtes Immunstimulans (EqStim[®]), das inaktiviertes *Propionibacterium acnes* enthält, noch durch die zweimalige Applikation von *R. equi*-Hyperimmunplasma die IFN- γ -Konzentration im Blut und in der BALF signifikant beeinflusst werden (STURGILL et al., 2006). Grund dafür könnten andere Wirkungsprinzipien der Toll-like-Rezeptoren (TLR) von antigenpräsentierenden Zellen im neonatalen Organismus sein, die möglicherweise andersartige Signalkaskaden nach Erkennen der PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) als im adulten Organismus induzieren.

Weitere Impfstrategien mit dem Einsatz von neuen Adjuvantien wurden bei Fohlen zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie geprüft. In einer Studie wurde ein spezifisches CpG-Motiv als Adjuvans eingesetzt, um die zelluläre Abwehr zu stimulieren. Dies geschah in Form einer kontrollierten Blindstudie, in der die Fohlen zweimal intra nasal einen stallspezifischen Totimpfstoff mit oder ohne Adjuvans verabreicht bekamen. Es zeigte sich eine Tendenz zum Aufbau einer schützenden Immunität gegenüber einer natürlichen Infektion mit *R. equi*, wenngleich auch hier

keine signifikanten Unterschiede der Erkrankungsrate bei den Impfgruppen und zwischen Impfgruppen und Kontrollgruppe erhoben wurden (HULLMANN, 2006).

2.2 Neue Impfstoff-Adjuvantien: CpG-Motive

Der immunstimulierende Effekt von CpG-Motiven wurde erstmalig anhand der tumorunterdrückenden Wirkung der DNA von Bacillus Calmette Guérin (BCG) beobachtet (TOKUNAGA et al, 1988). Seitdem bekannt wurde, dass prokaryotische DNA beim Wirbeltier als Signal für „infektiöse Gefahr“ fungiert (HÄCKER et al., 1998), ist intensiv an den CpG-Motiven und deren prophylaktischen und therapeutischen Einsatzmöglichkeiten in Human- und Veterinärmedizin geforscht worden (SESTER et al., 2000). Vor allem in der Humanmedizin erlangen die CpG-Motive als adäquate Immunmodulatoren bei Autoimmunerkrankungen und Therapeutika in der Tumortherapie und der Therapie von Virusinfektionen zunehmende Bedeutung (KRIEG et al., 1998b; DAVILA u. CELIS, 2000; HARTMANN et al., 2000; SCHERER, 2004).

2.2.1 Struktur

Bei CpG-Motiven handelt es sich um einzelsträngige DNA-Sequenzen von sechs Basen Länge, die in unterschiedlichen Anordnungen vorliegen (HARTMANN et al., 2000). Allen CpG-Motiven gemeinsam ist dabei ein zentrales Cytosin-Phosphat-Guanosin-Dinukleotid (CpG-Dinukleotid) in 5'-3'-Richtung. Die DNA von Prokaryoten ist unmethyliert (HÄCKER et al., 2002), das bedeutet, dass am C5-Atom des Cytosins keine Methylgruppe gebunden ist. Sowohl die Inversion des CpG-Motivs wie die Methylierung der Oligodeoxynukleotide hebt die immunogene Wirkung auf (HÄCKER et al., 2002).

Der zentrale Cytosin-Guanosin-Kern wird in 3'- und in 5'-Richtung von jeweils zwei Nukleinsäuren umgeben. Dabei bestehen speziesspezifische Unterschiede in der Anordnung der flankierenden Nukleinsäuren, die am stärksten immunogen wirken, also die effizienteste Aktivierung des Immunsystems bewirken. Für Pferde, Menschen, Affen, Rinder, Hunde und Katzen wurde GTCGTT als am stärksten

immunogene Sequenz ermittelt; bei Mäusen dagegen lautet sie GACGTT und bei Schweinen wurde ATCGAT als günstigste Sequenz ermittelt (HARTMANN et al., 2000; BAUER et al., 2001; KAMSTRUP et al., 2001; RANKIN et al., 2001).

Die Wiederholung der sechs Nukleotide führt zu einer Verstärkung der Immunogenität. Als optimal werden DNA-Abschnitte von ca. 20 Nukleotiden angesehen (HARTMANN et al., 2000; HÄCKER et al., 2002).

Natürliche DNA aus Viren, Bakterien oder Parasiten besitzt ein Phosphordiester (PD)-Grundgerüst. Bei synthetisch hergestellten CpG-Motiven wird entweder ein PD- oder ein Phosphorthiat (PT)-Grundgerüst eingesetzt (HARTMANN et al., 2000).

Nachteil der natürlichen CpG-Motive ist die kurze Halbwertszeit im Säugerorganismus, wodurch deren Einsatz eingeschränkt wird. Dagegen konnte mithilfe des PT-Grundgerüsts in CpG-Motiven durch die Hemmung des raschen Abbaus durch ubiquitär vorkommende Nukleasen und gleichzeitig effizientere Aufnahme in die Makrophagen eine stärkere Immunantwort induziert werden (SESTER et al., 2000).

Im Gegensatz zur prokaryotischen DNA enthält die DNA von Wirbeltieren nur relativ wenige CpG-Motive (HÄCKER et al., 2002). Zudem liegt die DNA als Doppelstrang und meistens methyliert vor. Dadurch kann das Immunsystem zwischen körpereigener und körperfremder DNA unterscheiden. Weiterhin wurden die den Cytosin-Guanosin-Kern flankierenden Nukleotide vertebraler DNA als immunneutralisierend beschrieben, wodurch der Unterschied in der Immunogenität avertebraler und vertebraler DNA verdeutlicht wird (KRIEG et al., 1998a).

2.2.2 Wirkmechanismen

Die immunstimulierende Wirkung von CpG-Motiven besteht vor allem in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems (SESTER et al., 2000). Hauptsächlich beteiligte Zellen sind Makrophagen und dendritische Zellen, die lange Zeit von vielen Autoren als untergeordnet im immunologischen Geschehen angesehen wurden (HÄCKER et al., 2002). In jüngerer Zeit hat sich jedoch die überragende Rolle dieser Zellen bei der Abwehr bakterieller Infektionen gezeigt. Durch die Produktion von Mediatoren und Zytokinen und durch Antigenpräsentation beeinflussen die Zellen der angeborenen Abwehr entscheidend die Antwort des adaptiven Systems (SCHERER,

2004). Weiterhin führen CpG-Sequenzen zu einer signifikant gesteigerten zytotoxischen T-Zell-Aktivität, die von besonderer Bedeutung in der Abwehr intrazellulärer Erreger ist (SCHWARZ et al., 2003).

Im Mäusemodell reagieren die Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Stimulation durch CpG-Motive mit einer verstärkten Zytokinproduktion, insbesondere von IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-6 und IL-12, B-Zell Proliferation, Aktivierung von natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) und Kostimulation von CD8-T-Zellen. T-Helfer-Zell-Antworten werden in Richtung einer Th2-Antwort beeinflusst (HÄCKER et al., 2002; SCHERER, 2004). Auch humane Zellen produzieren nach Stimulation durch CpG-Sequenzen vermehrt IFN- α , IFN- β , TNF- α , IL-6 und IL-12, eine Polarisierung der T-Zell-Antwort in Richtung einer Th2-Antwort konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden (SCHERER, 2004).

Canine und feline Leukozyten reagieren in vitro auf CpG-Sequenzen mit einer gesteigerten antigenspezifischen Aktivität (WERNETTE et al., 2002).

Beim Pferd konnte beobachtet werden, dass CpG-Motive in vitro zu einer gesteigerten Sekretion von IFN- α , INF- β , IL-6 und IL-12 durch Leukozyten führen (WATTRANG et al., 2005). Die Qualität der Immunantwort zeigte sich dabei einerseits abhängig von der Nukleotid-Sequenz und der chemischen Zusammensetzung des Grundgerüsts (siehe 2.2.11.1), andererseits von der Anzahl der eingesetzten CpG-Motive. Da zudem die Leukozyten unterschiedlicher Spezies auf die CpG-Motive in unterschiedlicher Weise reagieren, müssen diese speziesspezifischen Unterschiede bei der Erforschung adäquater CpG-Sequenzen berücksichtigt werden (WATTRANG et al., 2005). In einer übergreifenden in vitro-Studie mit 30 verschiedenen CpG-Motiven wurden unterschiedliche Immunantworten bei Hühnern, Mäusen, Kaninchen, Katzen, Hunden Schweinen, Schafen, Ziegen und Pferden nachgewiesen. Trotz der speziesspezifischen Unterschiede konnte gezeigt werden, dass die CpG-Sequenz GTCGTT bei allen untersuchten Spezies ein starkes stimulatorisches Potential zeigte, während die Sequenz GCCGTT generell einen schwachen Effekt auf die Leukozyten ausübte (RANKIN et al., 2001).

Die Zellaktivierung findet nicht wie ursprünglich angenommen durch die Aufnahme der DNA in die Zellen und anschließender Regulation statt, sondern durch eine

Signalkaskade, die durch die Bindung der CpG-Motive an spezifische Rezeptoren erfolgt (UNDERHILL u. OZINSKY, 2002). Dabei fungieren die CpG-Motive als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), vergleichbar mit dem Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Beide Molekülmuster werden vom Immunsystem als körperfremde und pathogene Antigene erkannt. Dies geschieht über die sogenannten pattern recognition receptors (PRRs), zu denen die Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören (MEDZHITOV u. JANEWAY, 1997; GRIEBEL et al., 2005). Die Bezeichnung „Toll-like“ geht auf den als erstes entdeckten Rezeptor „Toll“ zurück, der bei der Fruchtfliege *Drosophila* die unspezifische Abwehr reguliert (LEMAITRE et al., 1996). Die Erforschung dieser Rezeptoren und ihrer Liganden hat die Möglichkeiten der Manipulation immunologischer Vorgänge erheblich erweitert (GRIEBEL et al., 2005). Bis heute sind elf TLR beim Säuger beschrieben (ZHANG et al., 2004). Der erstbeschriebene TLR beim Säuger ist der TLR4 (MEDZHITOV u. JANEWAY, 1997), der eine besondere Bedeutung in der Erkennung von LPS hat. Lipoproteine werden spezifisch vom TLR2 erkannt, Flagellin dagegen vom TLR5 (HÄCKER et al., 2002). Bei der Erkennung der CpG-Motive spielt der TLR9 die entscheidende Rolle (HÄCKER et al., 2002; GRIEBEL et al., 2005).

2.2.3 CpG-Motive als Impfstoff-Adjuvantien

Der Einsatz von CpG-Motiven als Impfstoff-Adjuvans scheint eine Aktivierung insbesondere der zellulären Immunantwort bewirken zu können; jedoch liegen bislang nur wenig in vivo-Studien bei Haussäugetieren vor.

Eine deutliche Reaktion des Immunsystems scheint sehr schnell, d.h. bereits nach der ersten Immunisierung zu erfolgen.

Im Mäusemodell konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit CpG-Motiven als Adjuvantien einen positiven Effekt auf die Immunantwort bewirkt (KOVARIK et al., 1999; HARTMANN et al., 2000; JIANG et al., 2002; JOSEPH et al., 2002). Bereits nach der ersten Immunisierung konnte eine 66fach stärkere antigen-spezifische Immunantwort im Vergleich zu Aluminiumverbindungen als Adjuvantien ermittelt werden (HARTMANN et al., 2000). Der Einsatz von sowohl CpG- als auch GpC-Motiven bei der einmaligen

intramuskulären Immunisierung von Schweinen führte zu einer signifikant höheren Antikörperproduktion und Leukozytenproliferation verglichen mit der Kontrollgruppe (VAN DER STEDE et al., 2002). Auch bei Hühnern wird über die erfolgreiche Immunisierung durch dem Impfstoff zugeführte CpG-Motive als Adjuvans berichtet (VLEUGELS et al., 2002). Die Autoren wiesen dabei bereits nach nur einer Impfung Immunglobulinkonzentrationen in einer Höhe nach, die sonst erst nach einer Wiederholungsimpfung ermittelt wurden. Durch Zugabe von CpG-Motiven zu einem Impfstoff gegen das bovine Herpesvirus-1 konnte bei Rindern die Th2-polarisierte Immunantwort in eine ausgeglichene Th1:Th2-Antwort gelenkt werden und bewirkte im Vergleich zu einer Aluminiumverbindung eine effizientere Immunantwort (RANKIN et al., 2002).

In der Untersuchung von HULLMANN (2006) kam erstmalig bei der intranasalen Immunisierung von Fohlen ein CpG-Motiv zum Einsatz und zeigte eine erfolgversprechende Tendenz beim Aufbau einer schützenden Immunität gegenüber *R. equi* (siehe 2.2.10).

Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass CpG-Motive als geeignete Adjuvantien anzusehen sind, wenngleich die speziesspezifisch günstigsten DNA-Sequenzen weiterhin im Vordergrund der Forschung stehen.

Trotz der nachgewiesenen eigenen stimulierenden Effekte von CpG-Motiven auf das Immunsystem sind die den Impfstoff verstärkenden Wirkungen ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Steigerung der Immunogenität der Impfstoff-Formulierung. CpG-Sequenzen ermöglichen eine verzögerte Freisetzung des Impfantigens, eine verstärkte Aufnahme durch Makrophagen und die Induktion von Kostimulatoren in den Makrophagen (JANEWAY et al., 2002).

Im Gegensatz zu herkömmlichen Adjuvantien wie Aluminiumverbindungen sind die Nebenwirkungen, die durch CpG-Motive hervorgerufen werden, deutlich reduziert (RANKIN et al., 2002). Erst bei sehr hohen Dosierungen von 50-100 µg bei der Maus kam es zu Nebenwirkungen wie Splenomegalie und Lymphadenopathien (JOSEPH et al., 2002). Bei der intranasalen Immunisierung von Fohlen durch einen *R. equi*-Impfstoff mit einem CpG-Motiv als Adjuvans konnten bei keinem der 108 Fohlen Nebenwirkungen beobachtet werden (HULLMANN, 2006).

Als nachteilig bei der Verwendung von CpG-Motiven als Adjuvans wird die mögliche Zersetzung durch DNAsen im Organismus angesehen (JOSEPH et al., 2002). Die Verpackung von Impfantigen und Adjuvans in Vesikel (JOSEPH et al., 2002) oder in sogenannte virus-like particles (VLPs) (STORNI et al., 2004) könnte dieses verhindern und eine längere Wirkdauer im Organismus ermöglichen.

Ein Vorteil der intranasalen Immunisierung mittels CpG-Motiven als Adjuvans liegt in der Aktivierung des Schleimhaut-assoziierten Immunsystems (mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). Dieser vom Immunsystem des restlichen Organismus unabhängige Teil der erworbenen Immunität kann durch die intranasale Applikation genauso wie bei natürlichen aerogenen Infektionen genutzt werden, um eine Leukozyten-Proliferation und Antikörperproduktion, im besonderen die Produktion von IgA im Bereich der Eintrittspforte der Erreger zu bewirken (JANEWAY et al., 2002).

2.3 *Rhodococcus equi*

2.3.1 Bedeutung von *Rhodococcus equi* in der Pferdeaufzucht

Rhodococcus equi verursacht auf endemisch betroffenen Betrieben Erkrankungsraten von 40-80 % und Todesraten von 5-17 % (MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, 1999). Weltweit gehen bis zu 5 % aller Todesfälle bei Fohlen auf eine *Rhodococcus equi*-Erkrankung zurück.

2.3.2 Geschichtlicher Überblick und Taxonomie

Rhodococcus equi (*R. equi*) wurde erstmals 1923 unter dem Namen *Corynebacterium equi* als Erreger eitriger Pneumonien bei Fohlen von MAGNUSSON in Schweden beschrieben. Hierbei handelte es sich um ein grampositives, pleomorphes, unbewegliches Bakterium mit einer Polysaccharidkapsel (WILSON, 1955).

Über die Taxonomie des Keimes gab es anfänglich unterschiedliche Ansichten. JENSEN (1934) und KRASIL'NIKOV (1966) schlugen aufgrund der Ähnlichkeit mit

LITERATURÜBERSICHT

Mykobakterien die Bezeichnung *Mycobacterium equi* vor. HOLTH und AMUNDSEN (1936) wiesen den Erreger aus tuberkulös veränderten Lymphknoten des Schweines als spezifisches, säurefestes kokkobazilläres Bakterium nach, so dass 1940 von PLUM die Bezeichnung *Corynebacterium Magnusson-Holth* vorgeschlagen wurde.

GORDON (1966) befürwortete aufgrund der morphologischen Wachstumseigenschaften den Namen *Mycobacterium rhodococcus*.

Da Untersuchungen des Zellwandaufbaus von GOODFELLOW und MINNIKIN (1977) sowie Ergebnisse aus DNA- und RNA-Analysen (SUZUKI et al., 1981) den Unterschied des Erregers zu Corynebakterien und Mykobakterien verdeutlichten, wurde schließlich die Bezeichnung des neuen Genus *Rhodococcus* etabliert.

Der Name *Rhodococcus* leitet sich von morphologischen Veränderungen der Wachstumsphase ab, in der den filamentartigen verzweigten Formen der frühen Wachstumsphase die kokkoiden Formen folgen ("rod to coccus").

Dieses Genus gehört phylogenetisch zusammen mit den Genera *Nocardia*, *Corynebacterium* spp. und *Mycobacterium* spp. zur Gruppe der nokardioformen Actinomyzeten (PRESCOTT, 1991).

2.3.3 Morphologie und Kultur

Mikroskopisch stellt sich *R. equi* als grampositives, pleomorphes unbewegliches Bakterium dar. Dabei überwiegen in jungen, ca. sechs Stunden alten Kulturen die bazillären Formen, während sie mit zunehmendem Alter der Kulturen immer kokkoider werden, bis nach 24 Stunden ausschließlich kokkoide Formen auftreten. Auf festem, nicht selektiven Nährboden wie Blutagar zeigt sich *R. equi* nach 24-bis 48-stündiger, aerober Bebrütung bei 37 °C typischerweise als unregelmäßig runde Kolonie mit glattem Rand. Die Kolonien sind ein bis vier mm groß, feucht, glatt, glänzend, schleimig mit konfluierender Tendenz, lachsfarbener Pigmentierung und weisen einen erdigen Geruch auf (MAGNUSSON, 1923; PRESCOTT, 1991). Charakteristischerweise zeigt *R. equi* zusammen mit *Staphylococcus aureus* auf Schafsblutagar das CAMP-Phänomen (benannt nach den Entdeckern Christie-Aktins-Munch-Petersen). Hierbei entsteht eine halbmondförmige Zone vollständiger Hämolyse, bedingt durch den Synergismus des sogenannten Equi-Faktors von *R. equi* und dem Hämolysin von *Staphylococcus aureus* (SELBITZ, 2002). Den Equi-Faktor stellen verschiedene Enzyme mit membranolytischen Eigenschaften wie die Cholesteroxidase und die Phospholipase C dar.

Durch die Einführung von Selektivmedien konnte die Isolierungsrate von *R. equi* erhöht werden. WOOLCOCK et al. (1979) benutzten das NANAT-Medium (Nalidixin-Acid-Novobiocin-Acid-Tellurit), VON GRAEVENITZ und PÜNTER-STREIT (1995) den CAZ-NB-Agar (Ceftazidim-Novobiocin-Medium). Für die kulturelle Anzucht von *R. equi* aus Boden- und Kotproben hat sich das TANP (tryptisch verdautes Sojaprotein als flüssiges Medium (TSB) mit den Zusätzen Cycloheximid, Nalidixinsäure, Penicillin und Kaliumtellurit) bewährt.

2.3.4 Virulenzfaktoren

Zwischen den verschiedenen *R. equi*-Stämmen bestehen deutliche Unterschiede in der Virulenz, welche vom Vorliegen so genannter Virulenzfaktoren abhängig ist. Nur die pathogenen Stämme tragen derartige Virulenzfaktoren (TAKAI, 1997). Hierbei handelt es sich einerseits um Kapselpolysaccharide, die die Phagozytose der Leukozyten hemmen, andererseits um die Exoenzyme Cholesteroxidase und Phospholipase C, die Einfluss auf die Lysosomenmembran ausüben, sowie um Zellwandbestandteile, die im Zusammenhang mit der Granulombildung gesehen werden (HONDALUS, 1997). Weiterhin existieren Virulenzfaktoren, deren Genom extrachromosomal auf Plasmiden codiert wird (HONDALUS, 1997). *R. equi*-Stämme, die nicht aus erkrankten Tieren, sondern aus Bodenproben isoliert werden, enthalten diese Plasmide selten (SELLON et al., 2001; VENNER et al., 2007a).

Das Virulenz-assoziierte Protein A (Vap A) ist ein 15-17 kD großes Protein, welches durch ein 85-90 kD großes Plasmid codiert wird. Es wird ausschließlich von virulenten Stämmen gebildet (TKACHUK-SAAD u. PRESCOTT, 1991) und gehört zu einer Familie von sieben Virulenz-assoziierten Proteinen (Vap A, C, D, E, F, G, H) (TAKAI et al., 2000). Das Gen für Vap B wurde bei an *R. equi* erkrankten AIDS-Patienten isoliert. Beim Fohlen dagegen wurde es bisher nur selten nachgewiesen (VENNER et al., 2007a) und zeigt im Mäusemodell eine deutlich geringere Virulenz als Vap A (LÜHRMANN et al., 2004).

Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus der Vap-Proteine in den meisten Fällen noch unbekannt ist, konnte durch die Deletion des Gens, das für Vap A kodiert, dessen pathogene Wirkung verdeutlicht werden: Durch das Entfernen dieses Gens verlieren die Bakterien die Fähigkeit, innerhalb von Makrophagen zu überleben oder Pneumonien in Fohlen auszulösen (HONDALUS u. MOSSER, 1994; WADA et al., 1997). Weiter wurde im Mäusemodell nachgewiesen, dass Vap A exprimierende *R. equi*-Stämme in vitro eine bis zu 70 % stärkere zytotoxische Wirkung an Makrophagen zeigen als Stämme ohne dieses Protein (LÜHRMANN et al., 2004).

PRESCOTT et al. (1996) und TAKAI et al. (1996) gelang der Nachweis spezifischer Antikörper gegen die Virulenzproteine und konnten damit die antigene Wirkung dieser Proteine bei Fohlen belegen.

Die Expression dieser Proteine zeigt sich *in vitro* abhängig von Nährmedium und Inkubationsbedingungen. Nur bei Temperaturen zwischen 34-41°C und nur in nährstoffarmen Medien können die Proteine mittels SDS-Page (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) nachgewiesen werden. Vor allem bei 38°C und saurem pH-Wert ist die Expression des Vap A nachweisbar (TAKAI et al., 1996), weswegen die Autoren vermuten, dass Vap A *in vivo* vor allem in den Phagolysosomen, in denen diese Bedingungen vorherrschen, expremiert wird.

2.3.5 Epidemiologie und Pathogenese

R. equi tritt im Boden weltweit auf, vor allem in nordeuropäischen Ländern und Nordamerika. Insbesondere für Fohlen in den ersten vier Lebensmonaten stellt er einen der wichtigsten Infektionserreger dar. Als ubiquitärer Boden- und Darmbewohner von Pferden und anderen Haussäugetieren tritt dieser Keim meistens nur sporadisch auf, jedoch neigt die Infektion zu endemischem Verlauf. Besonders Gestüte mit hohen Tierzahlen und entsprechender Keimdichte sind betroffen. Obwohl *R. equi* keine Sporen bildet, besitzt er eine hohe Tenazität in der Umwelt. Im Boden überlebt er auch bei direkter Sonneneinstrahlung über 12 Monate. Rhodokokken zählen zu den obligat aeroben Saprophyten, die sich besonders gut in trockenen, sandigen Böden vermehren (BARTON u. HUGHES, 1984). Aus Kotproben von Pferden endemisch betroffener Betriebe kann der Erreger stets isoliert werden. Allerdings liegen Keimzahl und Isolierungsrate deutlich unter denen in am gleichen Ort genommenen Bodenproben (TAKAI u. TSUBAKI, 1985).

R. equi kann vermehrt bei warmem, windigem Wetter, selten dagegen bei Feuchtigkeit, aus der Luft isoliert werden. Eine deutliche Zunahme der Erkrankungsrate tritt in den Monaten Mai bis August auf (CHAFFIN et al., 2003), was zu der Bezeichnung „Sommerpneumonie“ geführt hat (TAKAI u. TSUBAKI, 1985). Im Gegensatz zu der aerogenen Infektion ist die intrauterine, omphalogene oder

orale Infektion bzw. die Infektion über Hautwunden oder wandernde Parasitenlarven selten (ZINK et al., 1986).

Besonders anfällig gegenüber einer experimentellen Infektion zeigen sich Fohlen in den ersten beiden Lebenswochen (MARTENS et al., 1989). Sowohl eine experimentelle wie auch die natürliche Infektion führt vor allem zu Lungenläsionen im cranioventralen Lungenbereich, was auf einen aerogenen Infektionsweg hindeutet (MARTENS et al., 1982; ALTHAUS, 2004). Es entsteht zunächst eine subklinisch verlaufende eitrige Pneumonie (MARTENS et al., 1982), die im weiteren Verlauf klinisch in Form einer lebensbedrohlichen eitrig abszedierenden Lungenentzündung manifest wird. Früher wurde der in dieser Zeit abnehmende maternale Antikörpertiter bei noch unzureichender Immunantwort des Fohlens als begünstigende Faktoren angesehen (ELLENBERGER et al., 1984; MARTENS et al., 1989; MADIGAN et al., 1991). Jedoch wurde in jüngeren Untersuchungen festgestellt, dass zwar eine deutliche Korrelation zwischen dem *R. equi*-Antikörpergehalt des Stutenserums, des Kolostrums und des Fohlenserums besteht, aber kein Zusammenhang zwischen dem *R. equi*-Antikörpergehalt im Fohlenserum und dem Auftreten von *R. equi*-Pneumonien erkennbar ist (TRISKATIS, 2004). Zusätzlich wurde beobachtet, dass Fohlen bereits im Alter von 14 Tagen Lungenabszesse aufweisen, allerdings ohne dabei klinische Symptome aufzuweisen (ALTHAUS, 2004). Daraus lässt sich schließen, dass Fohlen auch bei hohem Antikörper-Gehalt erkranken und ferner dass der niedrige Antikörper-Gehalt bei den Fohlen nur zufällig zeitlich mit der klinischen Symptomatik einer bereits länger verlaufenden subklinischen Pneumonie übereinstimmt.

Im Gegensatz zu der hohen Prävalenz bei Fohlen werden Erkrankungen durch *R. equi* bei adulten Pferden nur in Einzelfällen beschrieben (PRESCOTT, 1991; VENGUST et al., 2002). Auch nur selten wurde der Erreger aus dem Uterus infertiler Stuten sowie aus abortierten Fohlen nachgewiesen (ZINK et al., 1986; SZEREDI et al., 2006).

Bei zahlreichen anderen Tierarten wurde *R. equi* zwar im Kot nachgewiesen (CARMAN u. HODGES, 1987), allerdings führt der Keim hier nur selten zu Erkrankungen. Lediglich beim Schwein kann *R. equi* häufiger sowohl aus

granulomatös entzündeten, wie auch aus unveränderten Lymphknoten nachgewiesen werden (PRESCOTT, 1991).

2.3.6 Klinische Symptome der *Rhodococcus equi*-Pneumonie

Eine Rhodokokkose manifestiert sich am häufigsten als chronisch eitrig, abszedierende Bronchopneumonie in Verbindung mit einer eitrigem Lymphadenitis (MARTENS et al., 1982; ELLENBERGER u. GENETZKY, 1986; ZINK et al., 1986; AINSWORTH, 1999).

Da Fohlen in der Lage sind, den Verlust an funktionellem Lungengewebe sehr lange zu kompensieren (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997), treten zu Beginn der Erkrankung nur unspezifische Symptome, die leicht übersehen werden können auf, wie Niedergeschlagenheit sowie geringgradige Erhöhung der Körperinnentemperatur und der Atemfrequenz (MARTENS et al., 1982; FALCON et al., 1985; ALTHAUS, 2004). Durch hohe Umgebungstemperaturen, Bewegung oder Zwangsmaßnahmen werden diese Symptome erheblich verstärkt (PRESCOTT u. HOFFMAN, 1993).

Im fortschreitenden Krankheitsverlauf zeigen sich deutlichere Symptome wie Apathie, Inappetenz, Fieber bis 41,5°C, Tachykardie, sowie spezifischere respiratorische Symptome wie hochgradige Tachypnoe mit verstärkt abdominaler Atmung, Nüsternblähen, produktiver Husten oder bilateralem mukopurulentem Nasenausfluss (FALCON et al., 1985). Progradient kommt es zu Hyperventilation und zyanotischen Maulschleimhäuten (MARTENS et al., 1982), bis schließlich aufgrund kardialer Schwäche und Asphyxie der Tod eintritt (HARAKAWA u. MORITA, 1949).

Neben der typischen chronischen *R. equi*-Pneumonie treten seltener akute bis subakute Verlaufsformen auf. Diese sind charakterisiert durch plötzliche Todesfälle, denen akute Atemnot und plötzliches hohes Fieber ohne Symptome einer respiratorischen Erkrankung vorausgehen (MARTENS et al., 1982).

Die Auskultation der Lunge sollte nicht alleine, sondern stets in Zusammenhang mit weiteren klinischen Befunden und weiterführenden Untersuchungen als diagnostisches Verfahren dienen, da es insbesondere über stark verdichteten oder

abszessreichen Lungenarealen zu einer vollständigen Dämpfung der physiologischen Lungengeräusche kommen kann (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997). Dagegen ist bei gering- bis mittelgradigen Veränderungen der Lunge häufig ein inspiratorisches und/oder expiratorisches Rasseln, Giemen oder Knistern wahrzunehmen. Die Befunde der Lungenauskultation können sowohl bei der chronischen, wie auch bei der akuten Verlaufsform sehr unterschiedlich ausfallen; eine Korrelation zwischen Auskultationsbefund und Schweregrad der Erkrankung besteht nicht (FALCON et al., 1985).

Neben der *R. equi*-Pneumonie existieren auch extrapulmonale Erkrankungsformen. Ca. 50 % der an einer Pneumonie erkrankten Fohlen weisen auch gastrointestinale Symptome, insbesondere Diarrhoe, Kolik und Anorexie als Folge von ulzerativen Darmveränderungen auf. Als ursächlich wird das Hochhusten und anschließende Abschlucken der Bakterien angesehen (PRESCOTT u. HOFFMAN; 1993). Allerdings kann die intestinale Form auch ohne das Vorliegen von Lungenveränderungen auftreten (ZINK et al., 1986).

Daneben kommen septische (WILSON, 1955) und aseptische (SWEENEY et al., 1987) Arthritiden sowie Osteomyelitiden vor. Immunkomplexablagerungen können in Einzelfällen zu Uveitis, Hypopyon und Anämie führen (KENNEY et al., 1994; AINSWORTH, 1999). Seltener treten vertebrale oder paravertebrale Abszesse (GIGUÈRE u. LAVOIE, 1994) sowie subkutane Abszesse (AINSWORTH, 1999) oder Serositiden (ZINK et al., 1986) auf.

2.3.7 Pathologie

Das typische Sektionsbild einer *R. equi*-Erkrankung des Fohlens zeigt eine feuchte, schwere, dunkle nicht kollabierte Lunge. Die Spitzenlappen weisen eine bilaterale, eitrig-konfluierende und abszedierende Bronchopneumonie auf. Die Abszesse variieren von miliärer Größe bis hin zu großen solitären Abszessen, die von einer unterschiedlich dicken Kapsel umgeben sind (MAGNUSSON, 1923; MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, 1999). Im caudalen Lungenlappen treten die Abszesse nur vereinzelt auf (ZINK et al., 1986; ALTHAUS, 2004). Ebenfalls selten kommen miliäre,

über die ganze Lunge verteilte Abszesse vor; meistens ist hier die akute Verlaufsform vorausgegangen.

Das die Abszesse umgebende Lungenparenchym ist verdichtet oder eingeschmolzen, in den Bronchien findet sich mukopurulenten Sekret. Die Pleura ist nur in seltenen Fällen in das Entzündungsgeschehen miteinbezogen (ZINK et al., 1986).

Der zähflüssige bis bröckelig-käsige Inhalt der Abszesse ist von grauroter bis gelblicher Farbe und von unangenehm fauligem Geruch (AINSWORTH, 1999). Häufig findet sich eine Adenitis der Lymphknoten im Hals- und Thoraxbereich, die sich in einer bis zu achtfachen Größenzunahme und ödematös bis nekrotischer Schnittfläche zeigt (ZINK et al., 1986). Als Anzeichen einer akuten purulenten Bronchitis und Peribronchitis treten in den Alveolen Makrophagen und neutrophile Granulozyten und in den Bronchien Fibrin- und Eiterablagerungen auf (ELLENBERGER u. GENETZKY, 1986).

Histologisch weisen die Veränderungen einen pyogranulomatösen Charakter auf (ELLENBERGER u. GENETZKY, 1986). Im Zytoplasma der Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie in den Alveolen und im Abszessinhalte sind unterschiedlich viele, intakte Bakterien sichtbar (HILLIDGE, 1986; PRESCOTT, 1991). Die Abszesse enthalten Zelldetritus und zugrundegehende neutrophile Granulozyten, während in der Peripherie massenhaft Makrophagen zu finden sind (HILLIDGE, 1986).

2.3.8 Diagnose

Die frühe und gesicherte Diagnose einer Rhodokokkose verbessert die Prognose, verkürzt die Behandlungsdauer und verhindert zudem Kosten, die durch Behandlung falsch-positiver Fohlen entstehen (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997; COHEN et al., 2000, 2002).

In der Anamnese sind die Dauer der Erkrankung, weitere erkrankte Tiere, vorausgegangene Rhodokokken-Infektionen sowie die Haltungsbedingungen zu berücksichtigen (AINSWORTH, 1999).

Bei der klinischen Untersuchung muss berücksichtigt werden, dass die Lungenauskultation keine zuverlässigen Hinweise auf die Schwere der Erkrankung gibt und immer im Zusammenhang mit den anderen klinischen Parametern und weiterführenden Untersuchungen zu sehen ist (FALCON et al., 1985).

Als labordiagnostische Parameter sind die Bestimmung von Leukozytenzahl und Fibrinogengehalt im Blut in einigen Fällen hilfreich, da zu Beginn einer Rhodokokkose eine neutrophile Leukozytose und Hyperfibrinogenämie festzustellen sind (GIGUÈRE et al., 2003b; CHAFFIN et al., 2004). Die Blutleukozytenzahl ist allerdings signifikant sensitiver und spezifischer als der Fibrinogengehalt (GIGUÈRE et al., 2003b).

Im Rahmen eines Screeningprogrammes auf Gestüten mit endemischer Rhodokokkose ist die Bestimmung der Blutleukozytenzahl mit anschließenden weiterführenden Untersuchungen wie Radiologie oder Sonographie im Fall einer Leukozytose (>13.000 / μ l Blut) sinnvoll (GIGUÈRE et al., 2003b). Allerdings lag in einer Studie von ALTHAUS (2004) bei 75 % von 66 Fohlen mit Rhodokokkose die Blutleukozytenzahl unterhalb 13.000 / μ l.

Als weiterführende Untersuchungen bieten sich bildgebende Verfahren wie Radiologie und Sonographie an. Die ultrasonographische Untersuchung der Lunge stellt eine geeignete Alternative zur Radiologie dar, da sie Abszesse und andere pneumonische Veränderungen in peripheren Lungenbereichen, welche hauptsächlich betroffen sind, gut darstellen kann (RAMIREZ et al., 2004; WALTHER, 2006). Für die transkutane sonographische Untersuchung der Lunge beim Fohlen sind sowohl Sektorfeld- wie Linearscanner mit einer Frequenz von 5 bis 7,5 MHz geeignet (O'BRIEN u. BILLER, 1997). In den peripheren Lungenbereichen weist die Sonographie eine höhere Sensitivität als die Radiologie auf (COHEN et al., 2000; WALTHER, 2006). Jedoch ermöglicht die Ultraschall-Diagnostik weder eine Darstellung von Befunden, die medial vom belüfteten Lungenparenchym liegen, noch lässt sie eine exakte Aussage über die Ausdehnung der Veränderungen in die Tiefe zu (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997). Zur Verlaufsuntersuchung von Fohlen unter Behandlung sehen die Autoren aber beide Verfahren als gleichermaßen geeignet an.

Um die Verdachtsdiagnose zu sichern, wird die Kombination von Anzucht des Erregers aus Tracheobronchialsekret (HILLIDGE, 1986; GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997; MEYER-HAMME, 2004) und zytologischer Untersuchung mittels Gramfärbung (SWEENEY et al., 1987) oder Immunfluoreszenstechnik empfohlen (ANZAI et al., 1997). In einer Studie konnte bei 217 Fohlen eines Gestüts mit endemischer Rhodokokkose, die ultrasonographisch Pneumonien oder Abszesse aufwiesen, in nur 52 Fällen (24 %) der Erreger aus dem Nasentupfer und bei 120 Fällen aus dem Tracheobronchialsekret (54 %) isoliert werden (MEYER-HAMME, 2004). Da *R. equi* ein fakultativ intrazelluläres Bakterium ist, gilt der Keim als schwer anzuzüchten. Dies erklärt, dass bis zu 40 % falsch-negative Ergebnisse zu erwarten sind (HILLIDGE et al., 1986). Andererseits kann der Keim inhaliert und im Tracheobronchialsekret nachgewiesen werden, ohne dass eine Lungenerkrankung sich entwickelt (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997). Daher müssen die mikrobiologischen und zytologischen Ergebnisse stets in Zusammenhang mit der klinischen Untersuchung bewertet werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist im Vergleich zu der Kultur schneller und sollte auch abgetötete Bakterien bzw. ihre Bestandteile nachweisen. Allerdings zeigt die Methode eine geringere Sensitivität. Als mögliche Ursachen dafür werden Inhibitoren im Tracheobronchialsekret sowie dessen hohe Viskosität diskutiert (HEYERS, 2005; VENNER et al., 2006), wodurch der Nachweis bakterieller DNA erschwert werden kann.

Als indirekte Nachweismethoden werden der enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), die Agargel-Präzipitation (AGP) sowie Verfahren zur Hämolysehemmung angewandt.

2.3.9. Therapie

Obwohl sich viele Antibiotika in vitro wirksam zeigen, können in vivo nur wenige den Erreger aufgrund seiner besonderen Eigenschaften eliminieren. Bis vor wenigen Jahren galt die Kombination aus dem zur Ansamycingruppe gehörenden Rifampicin mit dem Makrolid Erythromycin als Mittel der Wahl. Als ebenso wirksam wie die

Rifampicin-Erythromycin-Kombination hat sich die Monotherapie mit dem synthetischen Makrolid Azithromycin erwiesen (PILTZ, 2004). Der Einsatz des Makrolidantibiotikums Tulathromycin (Draxxin®) zur Therapie der *R. equi*-Pneumonie beim Fohlen befindet sich in der Erprobungsphase und deutet sich als sinnvolle Kombination mit Rifampicin an (HÖHENSTEIGER, 2005; VENNER et al., 2007b).

Die antimikrobielle Therapie muss in der Regel vier bis neun Wochen durchgeführt werden (HILLIDGE, 1987), wobei in Einzelfällen über Therapiedauern von bis zu fünf Monaten berichtet wird (PRESCOTT u. SWEENEY, 1985). Daneben werden nichtsteroidale Antiphlogistika und Bronchodilatoren eingesetzt (AINSWORTH, 1999).

2.3.10 Prognose

Durch den Einsatz geeigneter Antibiotika bzw. -Kombinationen konnte in den letzten zwanzig Jahren die Prognose bei *R. equi*-Pneumonien deutlich verbessert werden (HILLIDGE, 1987). Der Behandlungserfolg ist umso besser, je früher eine adäquate Therapie eingeleitet wird. Deshalb wird auf endemisch betroffenen Gestüten ein Screeningsystem zur Früherkennung der *R. equi*-Pneumonie empfohlen (COHEN et al., 2000, 2002). Bei rechtzeitiger und adäquater Therapie ist die vollständige Regeneration des Lungenparenchyms auch bei hochgradigen Veränderungen möglich (SWEENEY et al., 1987; AINSWORTH, 1993).

Bei der Frage nach der späteren sportlichen Nutzung eines nach einer *R. equi*-Pneumonie genesenden Fohlens fanden AINSWORTH et al. (1998) heraus, dass nur 54 % der betroffenen Fohlen im Vergleich zu 65 % der nicht erkrankten Fohlen in ihrem späteren Leben im Sport eingesetzt wurden. Diese jedoch zeigten die gleichen Leistungen wie die nicht erkrankten gleichaltrigen Tiere.

Die Antibiotikagabe wurde auch zur Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie bei Fohlen eines endemisch betroffenen Gestütes überprüft, allerdings ohne nachhaltigen Erfolg (VENNER et al., 2007c).

2.3.11 Prophylaxe

Die Entwicklung einer medikamentellen Prophylaxe gegen *R. equi* ist nach wie vor von großem Interesse, um Verluste in der Fohlenaufzucht zu minimieren und nebenwirkungsreiche, kosten- und zeitaufwändige Behandlungen zu reduzieren. Bis dato konnten weder Maßnahmen zur aktiven noch zur passiven Immunisierung der Fohlen einen ausreichenden, reproduzierbaren Schutz erreichen. In der Literatur finden sich dazu uneinheitliche Studienergebnisse.

Über eine passive Immunisierung mittels Hyperimmunplasma von Tieren, die mit einem *R. equi*-Lebend- oder Totimpfstoff geimpft wurden, berichtet bereits SCHMIEDHOFFER (1922). Eine Schutzwirkung gegenüber einer experimentellen (MARTENS et al., 1989; PERKINS et al., 2001) oder natürlichen Infektion (MADIGAN et al., 1991) konnte beobachtet werden. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass Serum von Pferden, die immunkompetent sind aber nicht geimpft wurden, ebenso wirksam ist wie ein spezielles Hyperimmunplasma mit gesteigertem Antikörpergehalt gegen *R. equi* (PERKINS et al., 2001). Bei einem Vergleich eines kommerziellen Hyperimmunplasmas mit einem Plasma, das nur aufgereinigte Immunglobuline gegen die Virulenzfaktoren Vap A und Vap C enthielt, ergab sich, dass sich beide Präparate wirksam zeigen (HOOPER-McGREVY et al., 2001). Dies deutet zum einen auf eine Schutzwirkung der Immunglobuline gegen Vap A und Vap C hin, weist aber auch auf die Möglichkeit hin, dass trotz Aufreinigung der Immunglobuline bisher noch nicht identifizierte Proteine in dem Hyperimmunplasma schützend wirkten. Allerdings müssen diese Ergebnisse aufgrund des inhomogenen Probandengutes und der mit 28 Fohlen geringen Probandenzahl differenziert betrachtet werden.

Ebenso ungeklärt wie Identität und Wirkungsweise der schützenden Plasmakomponenten (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997; AINSWORTH, 1999; COHEN et al., 2000, 2002) sind genaue Daten zu adäquaten Mengen und Zeitpunkt der Plasmainfusion. COHEN et al. (2000, 2002) schlagen die Infusion von je einem Liter während der ersten Lebenstage und eine zweite in der dritten Lebenswoche vor. MADIGAN et al. (1991) halten eine einmalige Plasmainfusion für ausreichend, solange sie vor der ersten Exposition mit dem Erreger stattfindet. Als nachteilig

werden die Transfusionsrisiken sowie der hohe Arbeits- und Kostenaufwand angesehen.

Anhand zweier Untersuchungen an 149 bzw. 146 Fohlen ließ sich jedoch zeigen, dass durch den Einsatz von Hyperimmunserum oder normalem equinem Serum zum einen weder die Erkrankungsrate noch der Schweregrad der Pneumonien gesenkt werden konnte (SCHULTE, 2005). Zum anderen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Antikörperkonzentration im Serum gesunder und erkrankter Fohlen festgestellt werden (PAUL, 2005).

Die Mutterstutenimpfung führt zwar zu erhöhtem spezifischem Antikörpergehalt in Stutenserum, Kolostrum und Fohlenserum, kann jedoch keinen adäquaten Schutz gegenüber experimenteller Infektion bieten (MARTENS et al., 1992; TRISKATIS, 2004). Dies wird auf die im Kolostrum nur geringen Konzentrationen von Faktoren der humoralen Abwehr wie Komplement, Interferone, Zytokine und Fibronectin zurückgeführt (MARTENS et al., 1989; MADIGAN et al., 1991). Dagegen berichten BECÚ et al. (1997) und CAUCHARD et al. (2004) von einer durch die Mutterstutenvakzinierung ausgehenden Schutzwirkung gegenüber der Rhodokokkose. VARGA et al. (1997) beobachteten an 15 Fohlen eine Schutzwirkung durch die Kombination aus Mutterstutenimpfung und aktiver Immunisierung der Fohlen in der 3.-7. Lebenswoche, während in ihrer Kontrollgruppe 4 von 21 Fohlen erkrankten.

Auch die aktive Immunisierung hat einerseits zu differierenden Studienergebnissen geführt, andererseits stellten LOPEZ et al. (2002) fest, dass zahlreiche Impfstudien zur Wirksamkeit von Impfstoffen aus Praktikabilitätsgründen am Mäusemodell durchgeführt werden. Somit sind viele Ergebnisse und die Wirkungsweise der eingesetzten Impfstoffe nicht zwangsläufig auf das Fohlen übertragbar.

Es wird über den erfolgreichen Einsatz eines inaktivierten *R. equi*-Impfstoffes bzw. eines Kombinationsimpfstoffes gegen *R. equi* und das *equine Herpesvirus* Typ 2 berichtet (VARGA et al., 1997). Auch die orale Immunisierung von Fohlen mit einem attenuierten Lebendimpfstoff konnte in zwei Untersuchungen eine schützende Immunität in Bezug auf Feldinfektionen mit *R. equi* aufbauen (CHIRINO-TREJO et al., 1987; HOOPER-McGREVY et al., 2005). CHIRINO-TREJO et al. (1987)

immunisierten sechs Fohlen oral mit einem *R. equi*-Lebendimpfstoff. Dazu wurden den Fohlen über einen Zeitraum von fünf Wochen viermal eine Suspension mit 10^9 bis 10^{10} Rhodokokken per Nasenschlundsonde eingegeben, anschließend wurden die Fohlen per Aerosol infiziert. Alle drei Fohlen der Kontrollgruppe und zwei der geimpften Fohlen erkrankten schwer und wurden zehn Tage nach der Infektion euthanasiert, die restlichen vier Fohlen wurden 14 Tage nach der Infektion euthanasiert. In der anschließenden Sektion wurden signifikant geringere Veränderungen in den Lungen der geimpften Fohlen nachgewiesen. Dieses Ergebnis konnte durch HOOPER-McGREVY et al. (2005) bestätigt werden. Gleichzeitig wird jedoch vor der Verwendung eines Lebendimpfstoffes aufgrund der möglichen Vermehrung des Erregers im Fohlendarm gewarnt (CHIRINO-TREJO et al., 1987).

Im Gegensatz dazu kamen PRESCOTT et al. (1997b) zu dem Ergebnis, dass die Vakzination von Fohlen durch das Vap A paradoxerweise zu einer erhöhten Morbidität führte. Auch die aktive Immunisierung von Fohlen durch BECÚ et al. (1997) verlief erfolglos. Allerdings berichten die Autoren über gute Ergebnisse durch Mutterstutenimpfungen und Verabreichung von Hyperimmunplasma.

Bei der Entwicklung von Impfstoffen gegen *R. equi* hat in den letzten Jahren eine DNA-Vakzine auf der Grundlage des Plasmids, das für das Vap A codiert, bzw. das Vap A selbst eine wichtige Rolle gespielt. Im Mäusemodell führt die intraperitoneale Immunisierung mit dem Vap A zu einer verstärkten Th1-Immunantwort (PRESCOTT et al., 1997a). Außerdem induziert es in Pferden die Bildung von Vap A-Immunglobulinen, welche im Mäusemodell zu einer dosisabhängigen Erregereliminierung führen (FERNANDEZ et al., 1997).

Die gleichzeitige intranasale und intradermale Applikation einer DNA-Vakzine auf der Grundlage des Vap A-Plasmids induzierte bei adulten Ponies im Serum und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit erhöhte Antikörperspiegel (LOPEZ et al., 2003). In vitro zeigten die Zellen der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit eine signifikant höhere Proliferationsrate bei erneuter Antigenkonfrontation. Auch zwei der fünf untersuchten Fohlen wiesen ebenfalls einen erhöhten Antikörperspiegel im Serum und in der BALF auf. Keines der Fohlen zeigte bei den täglich durchgeführten klinischen Allgemeinuntersuchungen Anzeichen einer Erkrankung. Die Bestimmung

einer gleichbleibenden Konzentration an IFN- γ - und IL-4-sezernierender Leukozyten im Serum und in der BALF der Fohlen führte allerdings zu dem Ergebnis, dass durch die Anwendung der DNA-Vakzine bei den untersuchten Fohlen keine Steigerung der zellulären Immunantwort bewirkt werden konnte.

In einer Studie an 108 Fohlen auf einem Gestüt mit endemischer Rhodokokkose wurde die intranasale Immunisierung von Fohlen mit einem *R. equi*-Totimpfstoff alleine bzw. in Kombination mit dem Adjuvans CpG X durchgeführt. Die nur knapp nicht signifikant niedrigere Morbität in der Impfgruppe mit Adjuvans weist auf eine erfolgsversprechende Möglichkeit hin, mithilfe des CpG-Motives X durch Aktivierung der zellulären Immunantwort einen reproduzierbaren Schutz gegen *R. equi* zu errichten (HULLMANN, 2006).

3 Material und Methode

In der vorliegenden kontrollierten und randomisierten Blindstudie wurde einerseits eine stallspezifische *R. equi*-Vakzine allein, andererseits in Kombination mit dem in zwei unterschiedlichen Konzentrationen vorliegenden Adjuvans CpG X auf ihre klinische Wirksamkeit untersucht.

3.1 Probanden

Auf einem privaten Gestüt mit endemischer Rhodokokkose wurden im Jahr 2006 in der Zeit von Juli bis November 139 Fohlen geimpft und dann bis zur 17. Lebenswoche regelmäßig untersucht. Dabei handelte es sich um 63 Stutfohlen und 76 Hengstfohlen verschiedener Warmblutrassen. Da es sich aufgrund der intranasalen Applikationen um einen Tierversuch handelte, wurde die Studie am 14.06.2006 bei der Bezirksregierung Hannover, Dezernat 509 angezeigt.

3.1.1 Haltung

Die Pferde wurden in Gruppenhaltung während der Wintermonate in mit Stroh eingestreuten Laufställen mit betonierten Paddocks und im Sommer auf Weiden gehalten. Die Gruppengröße betrug in den Ställen 8-12 und auf den Weiden 25-30 Stuten mit Fohlen. Erkrankte Fohlen wurden mit ihren Mutterstuten von den Weiden in die Laufställe gebracht.

3.1.2 Erstversorgung der Neonaten

Unmittelbar post natum wurde den Fohlen ein Klistier (Practoclyss® Friedeberg-Fresenius Kabi, Bad Homburg) sowie eine Rota-Corona-Schluckimpfung verabreicht und der Nabel mit einer 2 %igen Chlorhexidin-Lösung desinfiziert. Das Kolostrum wurde mit Hilfe eines Zuckerrefraktometers (Digital Handheld 'Pocket' Refractometer PAL-1 Fa. ATAGO, CO, LTD, Tokio, Japan) auf seine IgG-Konzentration untersucht.

Ein Brechungsindex von über 25 % kennzeichnet ein qualitativ hochwertiges Kolostrum mit einem IgG-Gehalt von über 50 g/l. Bei niedrigerem IgG-Gehalt des Kolostrums wurde um so mehr auf das Saugverhalten des Fohlens geachtet und gegebenenfalls anderwärtiges Kolostrum per Flasche eingegeben. Waren die Fohlen zwei Stunden nach der Geburt nicht in der Lage aufzustehen oder am Euter zu saugen, wurde ihnen von der Mutterstute abgemolkenes oder aus der betriebseigenen Kolostrumbank aufgetautes Kolostrum per Flasche eingegeben.

Acht bis zehn Stunden post natum wurde die IgG-Konzentration im EDTA-Blut der Fohlen mittels Snap Foal IgG Test (IDEXX, Blue Ridge Pharmaceuticals, Westbrook, Marine, USA) bestimmt. Lag der IgG-Gehalt unter 800 mg/dl, wurde den Fohlen mittels Flasche oder Nasenschlundsonde qualitativ hochwertiges Kolostrum eingegeben. War die IgG-Konzentration nach weiteren vier Stunden nicht auf mindestens 800 mg/dl angestiegen, bekamen die Fohlen einen Liter betriebseigenes Plasma infundiert.

Bis zum siebten Lebenstag erfolgte eine tägliche Untersuchung und Desinfektion des Nabels.

3.1.3 Impfungen und Entwurmungen

Fohlen ab dem fünften Monat und Stuten wurden regelmäßig gegen Influenza, EHV-1 und -4 und Tetanus geimpft.

Die Stuten wurden vierteljährlich, die Fohlen am zehnten Lebenstag und danach monatlich mit wechselnden Präparaten entwurmt.

3.1.4 Einteilung der Probanden

Bedingung für die Aufnahme in die Studie war eine physiologische Trächtigkeitsdauer von 315-355 Tagen, eine komplikationslose Geburt sowie ein ungestörtes Allgemeinbefinden in den ersten zehn Lebensstunden. Weitere Voraussetzung war ein IgG-Gehalt im Fohlenblut von mindestens 800 mg/dl. Fohlen,

die diesen Wert erst nach Substitution von Kolostrum oder Plasma erreichten, wurden von der Studie ausgeschlossen.

Alle Fohlen unterlagen während des gesamten Untersuchungszeitraumes entsprechend ihres Alters gleichen Hygiene-, Haltungs- und Fütterungsbedingungen.

Die Zuordnung der Fohlen in vier Gruppen erfolgte randomisiert durch Würfeln. Die Identität der verschiedenen Impfstoffformulierungen wurde erst nach Beendigung der Versuchsreihe und der Auswertung der Ergebnisse vom Hersteller, der Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG (WdT, Garbsen) bekannt gegeben.

Gruppe A (n = 35) = *R. equi*-Impfstoff

Gruppe B (n = 36) = *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml

Gruppe C (n = 36) = *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml

Gruppe D (n = 32) = Placebo (0,9 %ige Natriumchloridlösung)

3.2 *Rhodococcus equi*-Impfstoff

Der Impfstoff wurde aus drei *R. equi*-Stämmen zusammengesetzt, die im August 2003 aus Tracheobronchialsekretproben erkrankter Fohlen des gleichen Gestüts gewonnen und im Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover isoliert worden waren. Der Impfstoffhersteller (WdT) lyophilisierte die Isolate, kultivierte die Stämme und überprüfte deren Identität und die Reinheit der Kultur. Die Bakterien wurden durch Formalin inaktiviert. Die Konzentration wurde auf 10^9 Bakterien pro ml Lösung eingestellt und dem Impfstoff zusätzlich 0,5 % Phenol als Konservierungsmittel zugesetzt. Vor der abschließenden Prüfung auf Sterilität gemäß Europäischer Pharmakopoe wurde einem Drittel der Lösung 500 µg des Adjuvans CpG X pro ml hinzugefügt, dem zweiten Drittel wurden 50 µg pro ml zugesetzt. Ein nennenswerter Abbau des CpG-Motivs durch DNAsen im Impfstoff konnte durch Bestimmung der Enzymkonzentration durch das Institut für

physiologische Chemie der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover ausgeschlossen werden.

3.3 Adjuvans CpG X

Bei dem eingesetzten Adjuvans handelt es sich um eine Cytosin-Phosphat-Guanosin-Sequenz, welche Bestandteil bakterieller DNA ist. Auf Wunsch der WdT wird die Sequenz des eingesetzten CpG-Motivs nicht veröffentlicht.

Der Impfstoff mit Adjuvans lag als Lösung in 100 ml-Flaschen vor.

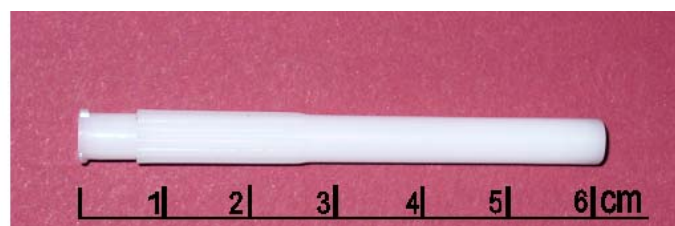
3.4 Impfprotokoll

Das Impfprotokoll bestand aus zwei Impfungen; die erste erfolgte am ersten Lebenstag acht bis zehn Stunden post natum und die zweite am 21. Lebenstag.

Die Impfungen erfolgten beidseitig intranasal als Aerosol. Dazu wurden in zwei 2 ml Spritzen (Braun, Melsungen) jeweils 1 ml Impfstoff-Lösung und 1 ml Luft aufgezogen und auf Lueraufsätze Intranasal-Applikatoren aus Kunststoff (Pfizer, Karlsruhe) mit einer Länge von 60 mm und einem Durchmesser von 0,4 cm gesteckt. Dem fixierten Fohlen wurde der Intranasal-Applikator in die jeweilige Nüster eingeführt, ohne dass die Nasenschleimhaut berührt wurde. Durch die feinporige Öffnung der Kanülenspitze und die Luft in der Spritze wurde mit Abdrücken der Spritze ein feines Aerosol erzeugt.

Nach der Impfung wurden die Fohlen ca. 15 Minuten lang beobachtet, um ein Reagieren auf etwaige unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu ermöglichen.

Abb. 1 : Intranasal-Applikator



3.5 Untersuchung der Fohlen

Vom Tag der Geburt bis zu einem Alter von vier Monaten wurden die Fohlen mindestens ein Mal pro Woche untersucht.

Die Untersuchung umfasste eine klinische Allgemeinuntersuchung, eine klinische Untersuchung des Respirationstraktes, die Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut sowie ggf. eine weiterführende Untersuchung des Respirationstraktes.

3.5.1 Klinische Allgemeinuntersuchung

Zunächst wurden Haltung, Verhalten sowie Ernährungszustand beurteilt. Die Körpertemperatur wurde ermittelt und der Nabel palpirt, weiterhin wurden Gelenke, Kotkonsistenz und Afterumgebung beurteilt.

3.5.2 Klinische Untersuchung des Respirationstraktes

Bei der klinischen Untersuchung des Respirationstraktes wurde die Größe der Lnn. mandibulares sowie eventueller Nasenausfluss beurteilt. Der Atmungstyp wurde bestimmt und Anzeichen einer Dyspnoe in Form von verstärkt abdominaler Atmung, Einsinken der Interkostalräume, Nüsternblähen oder spontanem Husten beurteilt.

Die Auskultation der Lunge erfolgte beiderseits an drei Lokalisationen, cranio-ventral, in der Mitte und caudo-dorsal. Bei der Auskultation von Lunge und Trachea wurde auf hochgradige Atemgeräusche wie Rasseln, Giemen oder Knistern geachtet.

Die Befunde der klinischen Untersuchung des Respirationstraktes wurden anhand des modifizierten Schemas nach OHNESORGE et al. (1998) entsprechend ihren Schweregrades mit Punkten versehen und anschließend zu einem so genannten klinischen Score addiert (siehe Tab. 1). Dieser Score gibt die Ausprägung der klinischen Symptome wieder. Dabei werden die Fohlen mit Hilfe dieses Scores als gesund (klinischer Score = 0-1), geringgradig erkrankt (2-3), mittelgradig erkrankt (4-5) oder hochgradig erkrankt (> 5) eingestuft.

Tab. 1 : Klinischer Score zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen Befunde des Atmungsapparates (mod. nach OHNESORGE et al., 1998)

Merkmal	Befund	Punkte
1. Atemfrequenz	< 80	0
	> 80	1
2. Nasenausfluss	nicht vorhanden / geringgradig serös	0
	seromukös	1
	mukopurulent / purulent	2
3. Husten	nicht beobachtet	0
	spontan	2
4. Lnn. mandibulares	o.b.B. / geringgradig vergrößert	0
	mittel- / hochgradig vergrößert	1
5. Ruhedyspnoe	nicht vorhanden	0
	Einsinken der Interkostalräume	3
	Nüsternblähen	3
6. Lungenauskultation	vesikulär, vesikulär verschärft	0
	Rasseln / Giemen / Knistern	2
7. Tracheauskultation	o.b.B.	0
	Rasseln	2
Gesamtscore		0 - 13

3.5.3 Labordiagnostische Untersuchung

Zur Ermittlung der Leukozytenkonzentration im Blut wurde eine V. jugularis externa punktiert, ca. ein ml Blut in ein mit Kalium-EDTA beschichtetes Röhrchen gefüllt und mit Hilfe eines Hämatologie-Analysators (Sysmex KX-21N, Sysmex, Kobe, Japan) nach dem elektrischen Widerstandsprinzip ermittelt.

3.5.4 Weiterführende Untersuchung des Respirationstraktes

Die weiterführende Untersuchung des Respirationstraktes in Form der sonographischen Untersuchung der Lunge wurde bei Vorliegen folgender Befunde durchgeführt:

- Körpertemperatur über 39,0 °C
- Dyspnoe
- Spontaner Husten
- Hochgradige Auskultationsbefunde von Lunge oder Trachea (Rasseln, Giemen, Knistern)
- Leukozytose (Leukozytenzahl über 13.000 Zellen/ μ l Blut)
- Kümern.

Die sonographische Lungenuntersuchung erfolgte am stehenden, fixierten Fohlen mit den tragbaren, akkubetriebenen Ultraschallgeräten „Sonovet 2000“ oder „My Sono“ (Fa. Kretztechnik AG, Tiefenbach, Österreich).

Eingesetzt wurde ein 7,5 MHz Linearscanner mit einer Schallkopf-Länge von 6,5 cm und einer Breite von 1,7 cm. Das Untersuchungsfeld am Thorax der Fohlen war dorsal begrenzt durch den M. longissimus dorsi, ventral durch das Zwerchfell und cranial durch die Skapula. Das Fell wurde geschoren, mittels Alkohol (Isopropylalkohol 2-Propanol, Pharma-Depot GmbH, Versmold) entfettet und mit Ultraschallgel (BLR Sonics Ultraschallgel, Waldeck, Münster) eingerieben. Die Lunge wurde in ihrer gesamten Ausdehnung untersucht; bewertet wurden Veränderungen der Pleura sowie akute und chronische Veränderungen des Lungengewebes. Die

Durchmesser der einzelnen Lungenabszesse wurden während der Untersuchung bestimmt und anschließend wurde der so genannte „Abszess-Score“ aus der Summe der einzelnen Abszessdurchmesser errechnet. Der Abszess-Score ermöglicht es Fohlen mit einzelnen, aber ausgedehnten Abszessen mit Fohlen mit multiplen kleinen Abszessen zu vergleichen. Die sonographischen Lungenbefunde wurden während der Untersuchung auf einem speziellen Befundbogen dokumentiert (siehe Abb. 2). Anhand dieses Befundbogens wurde jede Lungenhälfte vom dritten bis zum 15. Interkostalraum mit jeweils einem dorsalen, mittleren und ventralen Bereich in 39 Lungenbezirke aufgeteilt, wodurch eine genaue Lokalisationsangabe der Veränderungen ermöglicht wurde.

MATERIAL UND METHODE

Ultraschalluntersuchung der Lunge												
Stutennummer				Datum				Stall / Weide				

	15.	14.	13.	12.	11.	10.	9.	8.	7.	6.	5.	4.	3.
A													
B													
C													

rechts

	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.
A													
B													
C													

links

Behandelt ab: mit:

Nachkontrolle am: Untersucher:

Sonstiges: T: C° Symptome:

Abb. 2: Befundbogen zur sonographischen Untersuchung der Lunge (mod. nach ALTHAUS, 2004)

In dieser Studie wurden Fohlen, die einen Abszess-Score von unter fünf cm aufwiesen und klinisch gesund waren (i.e. WBC < 18.000 / μ l Blut, kein Fieber, keine Ruhedyspnoe, kein Rasseln, Giemen, Knistern, Husten oder purulenter Nasenausfluss in Verbindung mit Husten) nicht unmittelbar behandelt. Diese Tiere wurden ab dem Tag der Diagnose „Lungenabszess“ zweimal wöchentlich klinisch und sonographisch untersucht bis drei Wochen nach der letzten Darstellung eines Lungenabszesses. Wurde einer der genannten Parameter überschritten, so wurde das Fohlen mit Antibiotika behandelt. Als unmittelbar therapiebedürftig dagegen galten Fohlen, die zum Zeitpunkt der Diagnose „Lungenabszess“ einen Abszess-Score von fünf cm oder mehr und/oder schwerwiegende klinische Atemwegsbefunde aufwiesen.

3.6 Statistische Auswertung

Unter den vier Probandengruppen wurden folgende Parameter statistisch ausgewertet:

- Morbidität
- Anzahl therapiebedürftiger Fohlen
- Alter, klinischer Score, Leukozytenzahl, Abszess-Anzahl und Abszess-Score zum Zeitpunkt der Diagnose „Lungenabszess“

Die deskriptive Darstellung der Ergebnisse erfolgte tabellarisch mit der Darstellung des Mittelwertes und der Standardabweichung bei normal verteilten Daten. Hingegen wurde bei nicht normal verteilten Daten als Lage- und Streuungsmaße der Median (50 %-Quartil) und der Interquartilabstand IQA (Intervall des 25 %- und 75 %-Quartils) angegeben (siehe Tab. 16ff. im Anhang).

Die Daten wurden mit dem Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Überprüfung einen Widerspruch zur Normalverteilungsannahme ergab, wurden die vier Impfgruppen zunächst mit Hilfe des nichtparametrischen Kruskal-Wallis-Tests

analysiert. Anschließend wurde der Dunn-Test als multipler Anschlussstest für paarweise Vergleiche der Gruppen durchgeführt.

Da die Parameter „klinischer Score“, „Abszess-Anzahl“ und „Abszess-Score“ sehr hohe Standardabweichungen aufwiesen und nicht normal verteilt waren, wurde in diesen Fällen als Alternative zum arithmetischen Mittelwert der Median sowie der Range aufgeführt.

Die untersuchten Parameter wurden mit dem Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest auf Zusammenhänge untersucht. Waren die Voraussetzungen für diesen Test nicht gegeben, wurde der exakte Test nach Fisher verwendet.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Programm BIAS für Windows Version 8.3. durch Herrn M. Mogk (Fa. MoRe.data, Giessen).

Das Signifikanzniveau dieser Studie liegt bei $p = 0,05$ (siehe Tab. 1).

Tab. 2: Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) zur Darstellung der Signifikanzen von Unterschieden

Irrtumswahrscheinlichkeit	Unterschied	Symbol
$p > 0,05$	nicht signifikant	
$p < 0,05$	schwach signifikant	*
$p < 0,01$	signifikant	**
$p < 0,001$	hoch signifikant	***

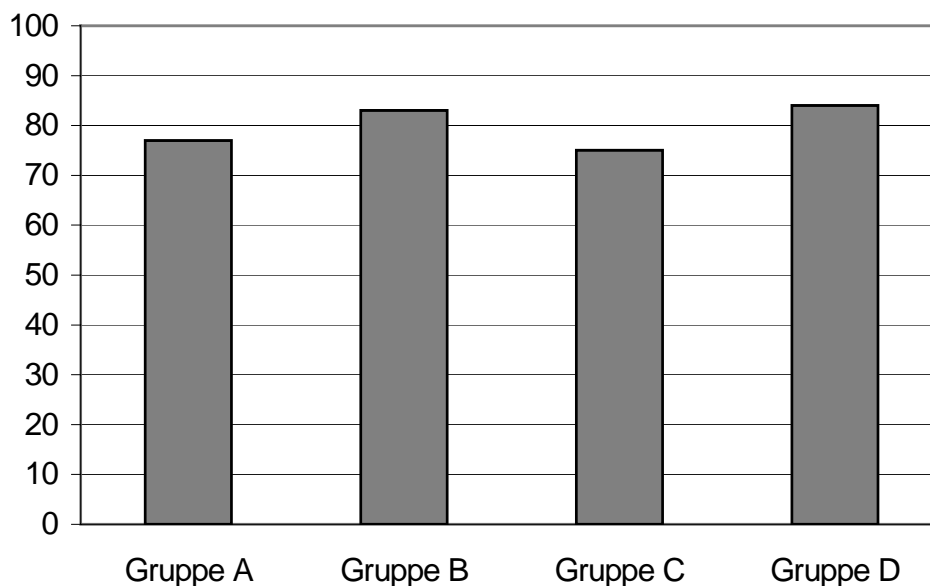
4. Ergebnisse

4.1 Morbidität

Die Diagnose *R. equi*-Pneumonie wurde gestellt, wenn die an die klinische Untersuchung anschließende Ultraschalluntersuchung der Lunge einen oder mehrere Lungenabszesse ergab.

In Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) erkrankten 27 von 35 der Fohlen (77,1 %), in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) erkrankten 30 von 36 (83,3 %) der Fohlen, in Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) erkrankten 27 von 36 (75 %) der Fohlen und in Gruppe D (Placebo) erkrankten 27 von 32 (84,4 %) der Fohlen (siehe Abb. 3). Es waren anhand des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Impfgruppen nachzuweisen ($p = 0.714$).

Morbidität [%]



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

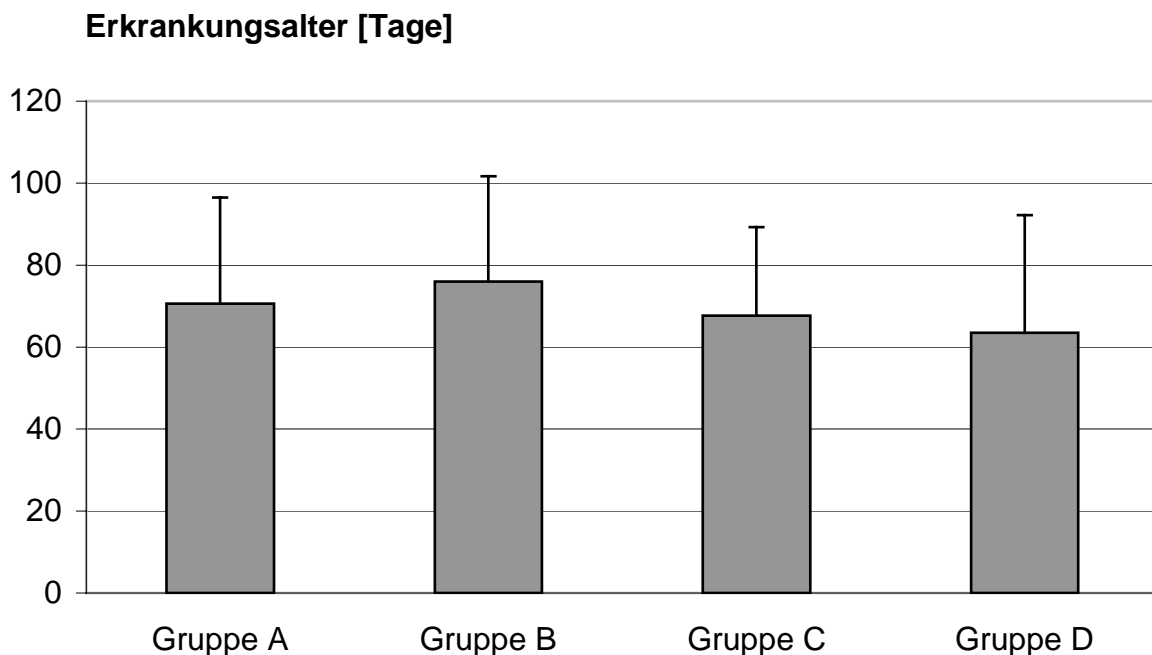
Abb. 3: Anteil der an Lungenabszessen erkrankten Fohlen in den Impfgruppen

4.2 Erkrankungsalter

Als Erkrankungsalter wurde das Alter der Fohlen festgesetzt, in dem erstmalig ein oder mehrere Lungenabszesse sonographisch dargestellt wurden.

In Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) erkrankten die Fohlen mit einem Alter von $70,6 \pm 25,9$ Tagen, in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 $\mu\text{g/ml}$) mit $76 \pm 25,7$ Tagen, in Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 $\mu\text{g/ml}$) mit $67,7 \pm 21,6$ Tagen und in Gruppe D (Placebo) erkrankten die Fohlen mit $63,5 \pm 28,7$ Tagen (siehe Abb. 4).

Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich zwischen den vier Gruppen keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 14 im Anhang).



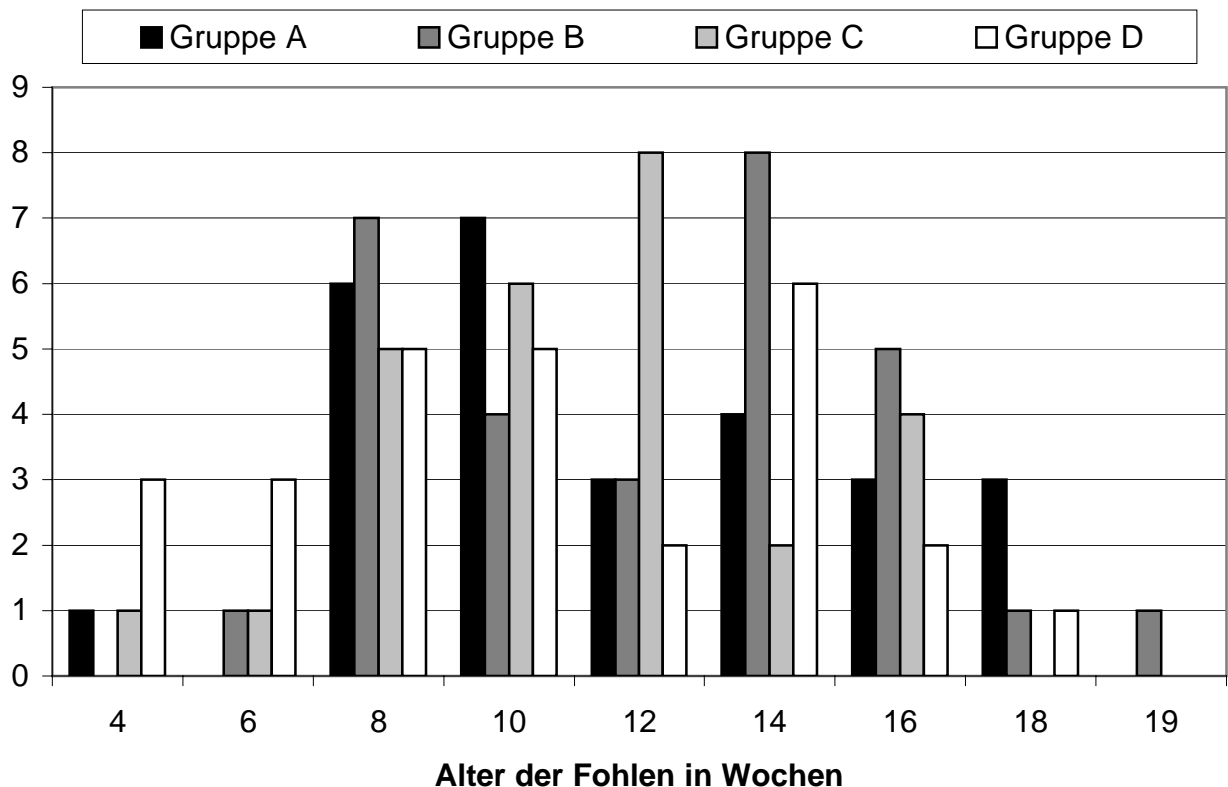
Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 $\mu\text{g/ml}$; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 $\mu\text{g/ml}$; Gruppe D (n = 32): Placebo

Abb. 4: Erkrankungsalter der Fohlen in den einzelnen Impfgruppen (in Tagen). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

ERGEBNISSE

Neben dem durchschnittlichen Erkrankungsalter der vier Fohlengruppen wurde die Verteilung der Neuerkrankungen über den Untersuchungszeitraum von 17 Wochen dargestellt, um die Morbidität in den einzelnen Altersabschnitten zu verdeutlichen (siehe Abb. 5). Erkennbar ist eine Häufung an neuerkrankten Fohlen in der Zeitspanne zwischen 8. und 16. Lebenswoche.

Anzahl neuerkrankter Fohlen

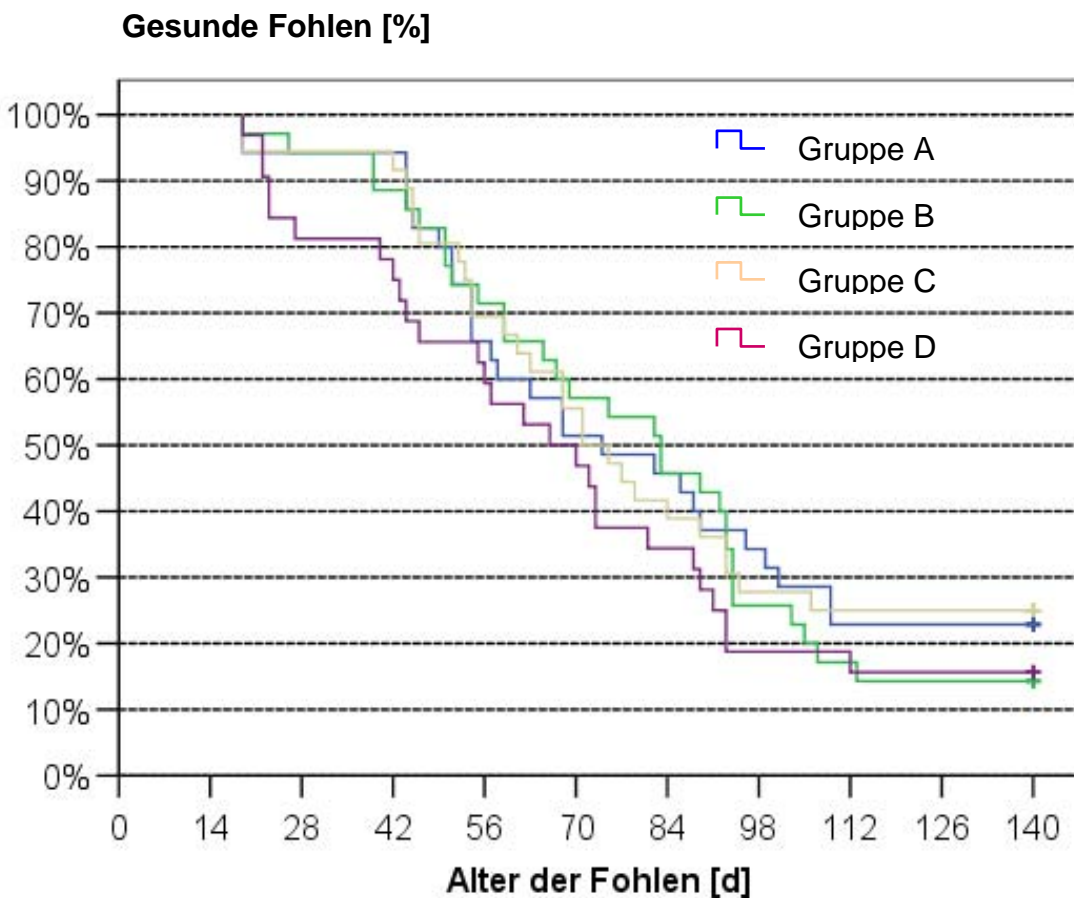


Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

Abb. 5: Neuerkrankungen im Verlauf der ersten 20 Lebenswochen

ERGEBNISSE

Um das Verhältnis des Anteils der erkrankten Fohlen im Vergleich zur Gesamtpopulation darzustellen, wurde im Folgenden die Darstellung nach Kaplan-Meier verwandt (siehe Abb. 6). Ersichtlich wird die sinkende Anzahl nicht an einer Rhodokokkose erkrankender Fohlen im Verlauf des Untersuchungszeitraumes von 140 Tagen.



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo; d: Tage

Abb. 6: Anzahl der in den ersten 140 Lebenstagen erkrankenden Fohlen im Vergleich zur Gesamtpopulation

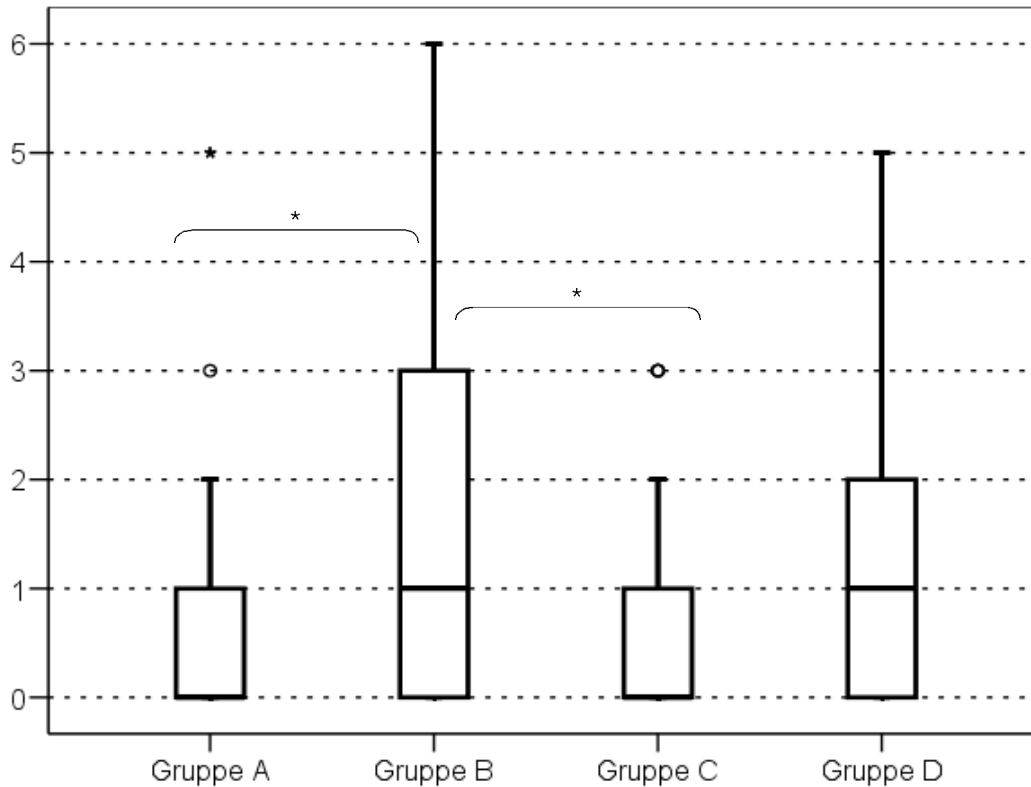
4.3 Klinische Symptome bei den Fohlen mit Lungenabszessen (Klinischer Score)

Zum Diagnosezeitpunkt wiesen die Fohlen aus Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) einen mittleren klinischen Score von 0 (Interquartilabstand IQA: 0 ; 1), die Fohlen aus Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) einen mittleren klinischen Score von 1 (IQA: 0 ; 3), die Fohlen aus Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) einen mittleren klinischen Score von 0 (IQA: 0 ; 1) und die Fohlen aus Gruppe D (Placebo) einen mittleren klinischen Score von 1 (IQA: 0 ; 2) auf (siehe Abb. 7).

Damit wiesen die Fohlen im Mittel einen klinischen Score auf, nach dem sie als klinisch gesund eingestuft wurden.

Der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen durch den Dunn-Test ergab einen signifikant höheren klinischen Score zum Diagnosezeitpunkt in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) als in Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) ($p = 0,025$) und einen signifikant höheren klinischen Score in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) als in Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) ($p = 0,025$) (siehe Tab. 3).

Klinischer Score



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

— : Median, | : Interquartilabstand, T : größter Wert, der kein Ausreißer ist, ○ : Ausreißer und ★ : Extremwerte.

Abb. 7: Klinischer Score zum Diagnosezeitpunkt

4.4 Anzahl der Blutleukozyten

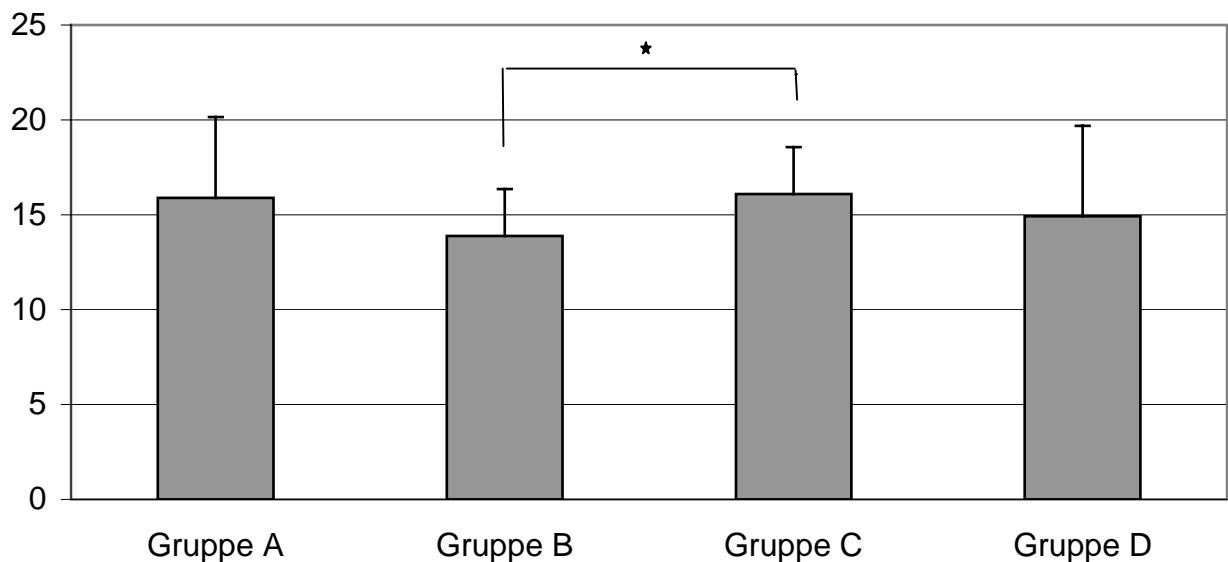
Zum Diagnosezeitpunkt betrug die Leukozytenkonzentration im Blut der Fohlen in Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) durchschnittlich $15,8 \times 10^9/l$ mit einer Standardabweichung von 4,3; in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X,

ERGEBNISSE

500 µg/ml) durchschnittlich $13,9 \pm 2,5 \times 10^9/l$; in Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) durchschnittlich $16,1 \pm 2,5 \times 10^9/l$ und in Gruppe D (Placebo) durchschnittlich $14,9 \pm 4,8 \times 10^9/l$ (siehe Abb. 8).

Der paarweise Vergleich zwischen den Gruppen durch den Dunn-Test ergab eine signifikant höhere Blutleukozytenzahl in Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) als in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) ($p = 0,0275$) (siehe Tab. 3).

Blutleukozyten [$\times 10^9/l$]



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

Abb. 8: Blutleukozytenzahl zum Diagnosezeitpunkt.

Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Tab. 3: Klinischer Score und Blutleukozytenzahl

Gruppe	n	Klinischer Score (Median [IQA])	Blutleukozyten [/ μ l] (MW \pm SD)
A	35	0 ^a [0 ; 1]	15889 \pm 4261 ^{ab}
B	36	1 ^b [0 ; 3]	13890 \pm 2469 ^a
C	36	0 ^a [0 ; 1]	16085 \pm 2478 ^b
D	32	1 ^{ab} [0 ; 2]	14926 \pm 4763 ^{ab}

Unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede an.

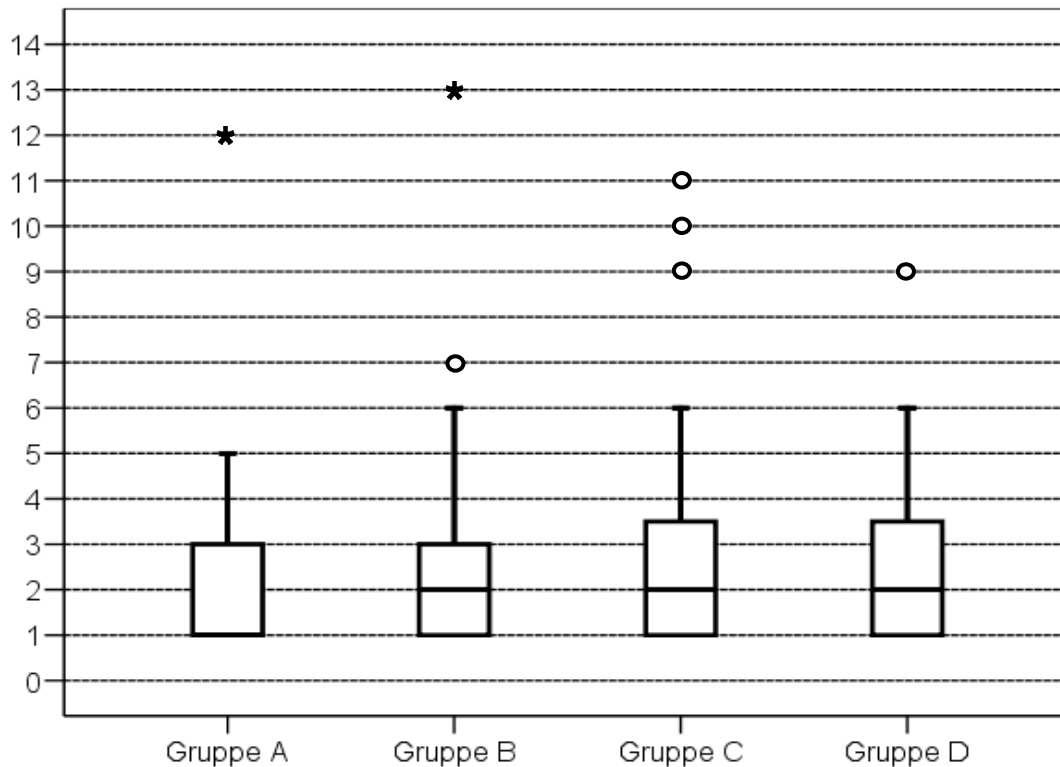
Gruppe A: *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 μ g/ml; Gruppe C: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 μ g/ml; Gruppe D: Placebo

4.5 Anzahl der Lungenabszesse

Zum Diagnosezeitpunkt wiesen die Fohlen in Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) im Mittel nur einen Abszess auf (IQA: 1 ; 3), die Fohlen aus Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 μ g/ml), Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 μ g/ml) und Gruppe D (Placebo) wiesen im Mittel zwei Abszesse mit unterschiedlichen Interquartilabständen auf (siehe Abb. 9 und Tab. 4).

Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Anzahl der sonographisch diagnostizierten Lungenabszesse unter den vier Impfgruppen (siehe Tab. 14 im Anhang).

Anzahl der Abszesse



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

— : Median, | : Interquartilabstand, T : größter Wert, der kein Ausreißer ist, ○ : Ausreißer und ★ : Extremwerte.

Abb. 9: Anzahl der Lungenabszesse bei den Fohlen der vier Impfgruppen zum Diagnosezeitpunkt

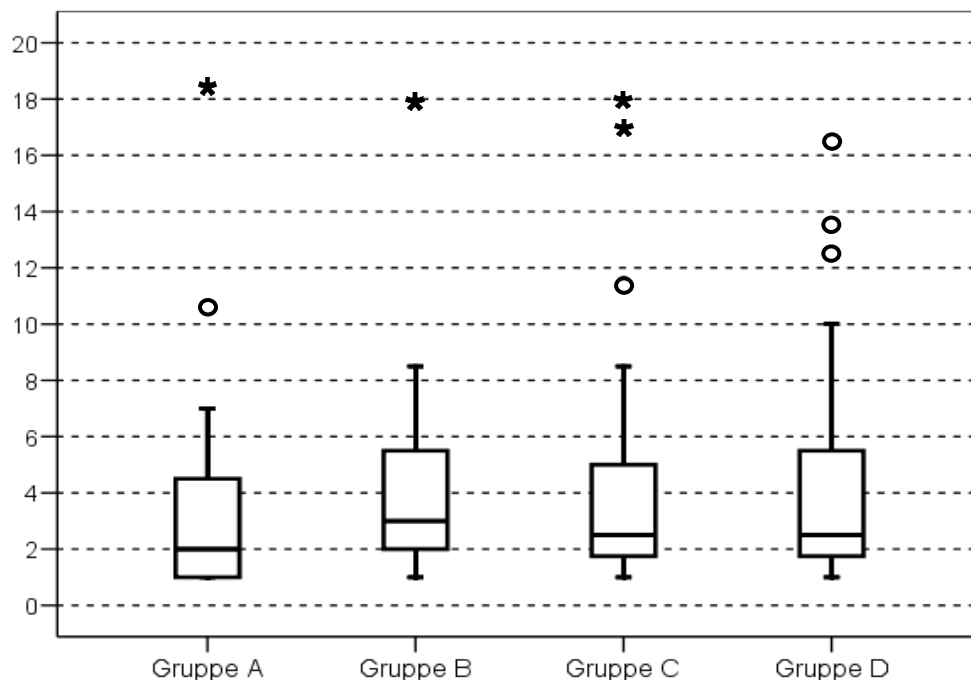
4.6 Abszess-Score

ERGEBNISSE

Neben der Anzahl der Lungenabszesse wurde der Abszess-Score, d.h. die Summe der Durchmesser aller sonographisch nachgewiesenen Abszesse in cm ermittelt. Der Abszess-Score ist ein Maß zur Quantifizierung der Lungenveränderungen.

Der Abszess-Score betrug bei den Fohlen aus Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) im Mittel 2,0 cm (IQA:1 ; 4,5), bei den Fohlen aus Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) im Mittel 3,0 cm (IQA:1,9 ; 5,5), bei den Fohlen aus Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) im Mittel 2,5 cm (IQA:1,5 ; 5) und bei den Fohlen aus Gruppe D (Placebo) im Mittel 2,5 cm (IQA:1,5 ; 6) (siehe Abb. 10 und Tab. 4).

Abszess-Score [cm]



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

— : Median, | : Interquartilabstand, T : größter Wert, der kein Ausreißer ist, ○ : Ausreißer und ★ : Extremwerte.

Abb. 10: Abszess-Score (Summe der Abszessdurchmesser) bei den Fohlen der vier Impfgruppen zum Diagnosezeitpunkt (in cm)

Der Kruskal-Wallis-Test ergab keinen signifikanten Unterschied des Abszess-Scores zwischen den vier Impfgruppen (siehe Tab. 14 im Anhang).

Tab. 4: Abszess-Anzahl und Abszess-Score

Gruppe	n	Abszess-Anzahl (Median [IQA])	Abszess-Score (cm) (Median [IQA])
A	35	1 [1 ; 3]	2 [1 ; 4,5]
B	36	2 [1 ; 3]	3 [1,9 ; 5,5]
C	36	2 [1 ; 4]	2,5 [1,5 ; 5]
D	32	2 [1 ; 4]	2,5 [1,5 ; 6]

Gruppe A: *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D = Placebo

4.7 Anzahl therapiebedürftiger Fohlen

In dieser Studie wurden nicht alle Fohlen, die Lungenabszesse aufwiesen, mit Antibiotika behandelt. Galten nämlich die Fohlen trotz Lungenabszesse als klinisch gesund, wurden sie zweimal wöchentlich untersucht und erst bei Verschlechterung der klinischen oder sonographischen Befunde behandelt. Alle anderen Fohlen wurden ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Antibiotika behandelt (siehe 3.4.4).

So blieben in Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) 11,1 % der Fohlen (3 von 27) obwohl bei ihnen eine abszedierende Pneumonie diagnostiziert wurde ohne Behandlung; 18,5 % der Fohlen (5 von 27) wurden zunächst beobachtet und ab einem späteren Zeitpunkt nämlich bei Verschlechterung der Krankheitsbefunde behandelt und 70,4 % der Fohlen (19 von 27) wurden ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Antibiotika behandelt.

ERGEBNISSE

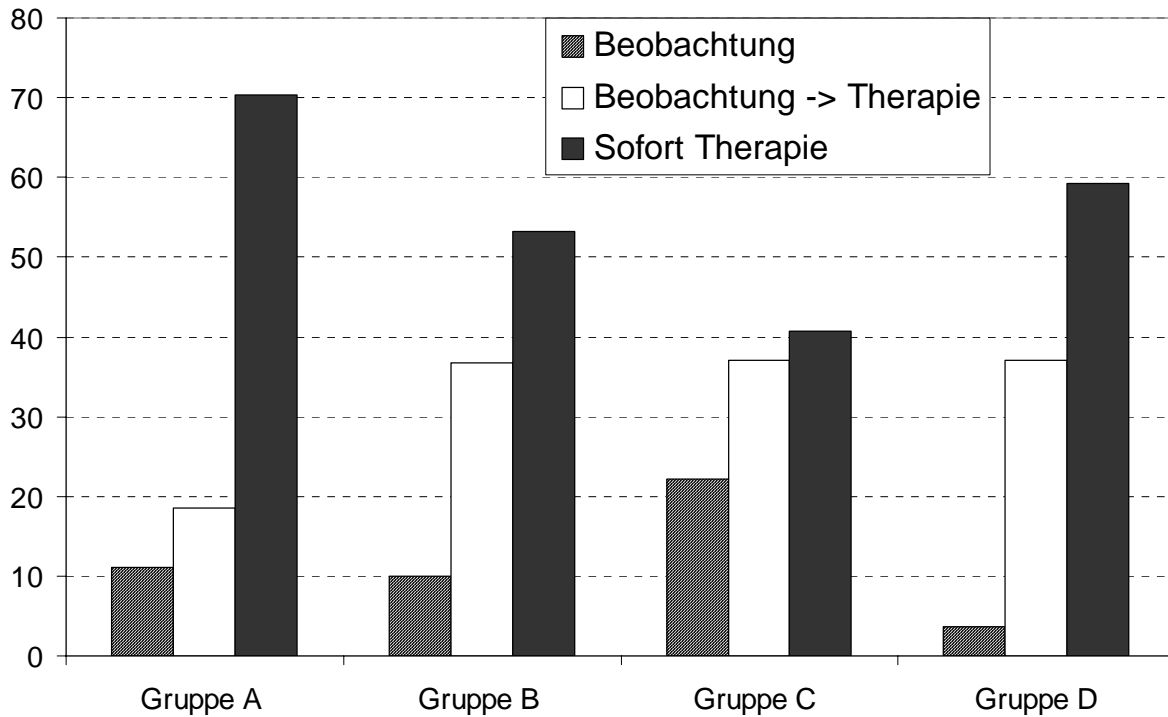
In Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) blieben 10 % der Fohlen (3 von 30) ohne Therapie; 36,7 % der Fohlen (11 von 30) blieben zunächst unter Beobachtung und wurden erst ab einem späteren Zeitpunkt behandelt und weitere 53,3 % der Fohlen (16 von 30) wurden ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Antibiotika behandelt.

In Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) blieben 22,2 % der Fohlen (6 von 27) ohne Therapie; 37 % der Fohlen (10 von 27) wurden zunächst beobachtet und ab einem späteren Zeitpunkt behandelt und 40,8 % der Fohlen (11 von 27) wurden ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Antibiotika behandelt.

In Gruppe D (Placebo) blieben 3,7 % der Fohlen (1 von 27) ohne Therapie; 37 % der Fohlen (10 von 27) blieben zunächst unter Beobachtung und wurden ab einem späteren Zeitpunkt behandelt und 59,3 % der Fohlen (16 von 27) wurden ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung mit Antibiotika behandelt. (siehe Abb. 11).

Anhand des Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstests war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Impfgruppen nachzuweisen (siehe Tab. 15 im Anhang).

Anteil der Fohlen mit unterschiedlichem Management unter den erkrankten Fohlen jeder Gruppe (in %)



Gruppe A (n = 35): *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml; Gruppe C (n = 36): *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml; Gruppe D (n = 32): Placebo

Abb. 11: Management bei den an abszedierender Pneumonie erkrankten Fohlen der einzelnen Impfgruppen (in %).

5 Diskussion

Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob durch die intranasale Applikation eines formalininaktivierten *R. equi*-Impfstoffes allein beziehungsweise in Kombination mit dem in zwei unterschiedlichen Konzentrationen vorliegenden Adjuvans CpG X bei neugeborenen Fohlen ein Schutz gegen den Erreger *Rhodococcus equi* aufgebaut werden kann.

Dazu wurden auf einem Gestüt mit endemischer Rhodokokkose 139 Fohlen randomisiert in vier Gruppen eingeteilt. Den Probanden wurde intranasal zweimalig der *R. equi*-Impfstoff allein, mit Adjuvans in einer Dosierung von 500 bzw. 50 µg/ml oder eine Placebolösung verabreicht.

Die Fohlen wurden von der Geburt bis zum Alter von 17 Wochen wöchentlich untersucht.

5.1 Diskussion von Material und Methode

5.1.1 Probanden

Die Probanden dieser Studie stammten alle von einem Gestüt, auf dem sie im Zeitraum von Juli bis November 2006 geboren wurden. Sie wurden zusammen mit ihren Mutterstuten unter gleichen Bedingungen gehalten und gefüttert. Durch die randomisierte Einteilung in die vier Gruppen können jahreszeitliche Einflüsse ausgeschlossen werden. Der Untersuchungszeitraum von 17 Wochen deckte die Zeit ab, in der üblicherweise Fohlen von einer *R. equi*-Erkrankung betroffen sind (AINSWORTH, 1999). Die Geschlechterverteilung von 63 Stutfohlen und 76 Hengstfohlen kann als repräsentativ für die Gesamtpopulation angesehen werden.

Mit Tierzahlen von 32 bis 36 Fohlen pro Gruppe wurden bei einer Erkrankungsrate von ca. 60 bis 80 % aussagekräftige Gruppengrößen gewählt. Alle Fohlen der Studie befanden sich im gleichen Entwicklungsstadium und es lagen homogene Bedingungen vor, wie sie bisher in anderen Impfstudien mit entsprechender Probandenzahl und Beobachtungszeit nur von HULLMANN (2006) beschrieben

wurden, der im Vorjahr auf dem gleichen Gestüt 108 Fohlen impfte und bis zur 17. Lebenswoche untersuchte.

Nachteil der bisher beschriebenen Impfstudien in Bezug auf *R. equi* waren sowohl geringe Probandenzahlen wie auch kurze Untersuchungszeiträume. Diese beiden Größen wurden von den verschiedenen Autoren zum Teil sehr unterschiedlich gewählt, was eine Erklärung für die inhomogenen Studienergebnisse darstellt. So testeten LOPEZ et al. (2003) an lediglich fünf Fohlen und drei adulten Ponies mit jeweils der gleichen Anzahl an Kontrolltieren eine DNA-Vakzine. Als Untersuchungszeitraum wählten die Autoren 45 Tage. Dem entgegen steht die Tatsache, dass Fohlen üblicherweise im Alter von bis zur vier, zum Teil sogar bis zu sechs Monaten durch *R. equi* erkranken (ZINK et al., 1986), so dass sich in einem längeren Untersuchungszeitraum möglicherweise andere Ergebnisse ergeben hätten. VARGA et al. (1997) setzten bei 74 Fohlen sowohl einen inaktivierten *R. equi*-Impfstoff wie auch einen Kombinationsimpfstoff gegen *R. equi* und das equine Herpesvirus Typ 2 (EHV-2) ein. Die Autoren führten die Impfung der Fohlen in Kombination mit einer Mutterstutenimpfung auf drei verschiedenen Gestüten durch, wodurch die Untersuchungsbedingungen nicht als homogen angesehen werden können. Des Weiteren existierten nur auf zwei der Betriebe Kontrollgruppen. Auch in dieser Studie wurde mit neun Wochen ein relativ kurzer Untersuchungszeitraum gewählt. BECÚ et al. (1997) verglichen die Wirkung durch aktive Immunisierung von Fohlen mit der durch Kombination aus Mutterstutenimpfung und Verabreichung von Hyperimmunplasma. Dabei wurden auf einem endemisch betroffenen Betrieb die 53 Probanden in drei Gruppen aufgeteilt: 30 Fohlen von geimpften Stuten erhielten Hyperimmunplasma, zehn Fohlen galten als Kontrollgruppe und weitere zehn wurden aktiv immunisiert und die serologische Immunantwort über 90 Tage evaluiert.

PRESCOTT et al. (1997b) wählten zwar mit 16 Wochen einen ausreichend langen Untersuchungszeitraum, jedoch standen den Autoren nur sechs Kontrollpaare sowie acht Stuten-Fohlen-Paare zur Verfügung, bei denen sie die Kombination von Mutterstutenimpfung und Impfung der Fohlen durchführten. Somit beruht möglicherweise das negative Ergebnis der Impfung von Stuten und Fohlen in dieser Untersuchung auf einer sehr kleinen Pferdezahl. CHIRINO-TREJO et al. (1987)

impften sechs Fohlen, die sie drei Wochen nach der letzten Impfung zusammen mit drei gleichaltrigen Kontrolltieren einer experimentellen Infektion mit *R. equi* durch Inhalation aussetzten und anschließend nach sechs Wochen euthanasierten, um die histopathologischen Auswirkungen der Infektion auf Lunge und Darm zu untersuchen. Hier waren die Lungen- und intestinalen Veränderungen der geimpften Fohlen signifikant schwächer ausgeprägt als bei den Kontrolltieren. Allerdings schwächt auch hier die geringe Probandenzahl die Aussage der Studie. HOOPER-McGREVY et al. (2005) untersuchten über einen Zeitraum von fünf Wochen sieben Fohlen, von denen vier Fohlen am 2., 7. und 21. Lebenstag mit einer *R. equi*-Lebendvaccine oral immunisiert wurden und drei als Kontrolltiere dienten. Auch in dieser Studie wurden die Fohlen experimentell infiziert und im Alter von fünf Wochen euthanasiert und sezert. Die schützende Wirkung des Impfstoffes zeigte sich in unveränderten Lungen der geimpften Fohlen und mit 10^2 Rhodokokken/g Lungengewebe deutlich geringeren Keimzahlen im Vergleich zu den Kontrolltieren, bei denen pathologische Lungenveränderungen und Keimzahlen bis zu 10^{11} Rhodokokken/g nachgewiesen wurden.

5.1.2 Impfprotokoll

In der vorliegenden Untersuchung wurde für die erste Impfung der erste Lebenstag (8-10 h post natum) gewählt, weil davon auszugehen ist, dass sich der Neonat unmittelbar mit Beginn der extrauterinen Phase mit dem Erreger auseinandersetzen muss (ALTHAUS, 2004; SELLON, 2006). Auch wurde gezeigt, dass Fohlen insbesondere unter zwei Wochen Lebensalter anfällig für die experimentelle Infektion mit *R. equi* sind (MARTENS et al., 1989). Jedoch wurden in anderen Impfstudien zum Teil weitaus spätere Zeitpunkte der aktiven Immunisierung gewählt: LOPEZ et al. (2003) führten die Erstimpfung der Fohlen erst zwischen dem 8.-15. Lebenstag und die Wiederholungsimpfungen 14 und 30 Tage danach durch und konnten damit zwar die Fohlen vor einer Feldinfektion durch *R. equi* schützen, jedoch keine Steigerung der IFN- γ - oder IL-4-sezernierender Leukozyten im Serum und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit bewirken. VARGA et al. (1997) erzielten einen Schutz der Fohlen durch Impfungen gegen *R. equi* in einem Alter von fünf und

sieben Wochen. Weitere erfolgreiche Impfungen gegen *R. equi* und EHV-2 erfolgten gruppenunterschiedlich im Alter von drei und fünf beziehungsweise drei, fünf und sieben Wochen. Bei einem derart späten Impfzeitpunkt muss davon ausgegangen werden, dass die Auseinandersetzung mit dem Erreger deutlich vor der Immunisierung stattgefunden hat, so dass die Wirksamkeit des eingesetzten Impfstoffes differenziert betrachtet werden muss. In der Studie von BECÚ et al. (1997) wurden die Probanden am 20., 30. und 40. Lebenstag ohne Erfolg geimpft. PRESCOTT et al. (1997b) führten die Impfungen erst in der dritten und fünften Lebenswoche mit negativem Ergebnis durch.

CHIRINO-TREJO et al. (1987) begannen mit der oralen Immunisierung der Fohlen im Alter von ein bis drei Wochen und führten anschließend über fünf Wochen vier Wiederholungsimpfungen durch, die zu einer schützenden Immunität in Bezug auf Feldinfektionen mit *R. equi* führten.

Lediglich HOOPER-McGREVY et al. (2005) führten unter den Bedingungen einer experimentellen Infektion die Erstimpfung am zweiten Lebenstag und die Wiederholungsimpfungen am siebten und vierzehnten Tag durch und verwendeten damit ein ähnliches Impfprotokoll wie in der vorliegenden Studie.

In Bezug auf den Applikationsweg des Impfstoffes finden sich in der Literatur ebenfalls unterschiedliche Angaben. In der vorliegenden Studie wurde die intranasale Applikation des Impfstoffes gewählt, um einerseits ein Interferieren mit maternalen Antikörpern zu vermeiden, andererseits um eine optimale Stimulierung der lokalen dendritischen Zellen der Nasenschleimhaut zu erreichen und zusätzlich um eine lokale Immunität am Haupteintrittsort von *R. equi* zu errichten. LOPEZ et al. (2003) wählten simultan zur intradermalen die intranasale Applikation des Impfstoffes, um neben einer systemischen Impfung mit der intranasalen Impfung die unter Feldbedingungen praktikabelste und für die Fohlen stressärmste Impfung über eine Schleimhaut durchführen zu können. VARGA et al. (1997), PRESCOTT et al. (1997b) impften ihre Probanden intramuskulär, wogegen CHIRINO-TREJO et al. (1987) und HOOPER-McGREVY et al. (2005) den oralen Applikationsweg wählten.

In der vorliegenden Studie wurde ein formalininaktivierter *R. equi*-Impfstoff mit dem Adjuvans CpG X eingesetzt. VARGA et al. (1997) wählten als Adjuvans eine Aluminiumverbindung. CHIRINO-TREJO et al. (1987) und HOOPER-McGREVY et al. (2005) setzten für die orale Immunisierung attenuierte *R. equi*-Lebendimpfstoffe ein, obwohl auf endemisch betroffenen Betrieben aufgrund der möglichen Vermehrung im Fohlendarm ein gewisses Risiko damit verbunden ist (CHIRINO-TREJO et al., 1987). PRESCOTT et al. (1997b) verwendeten das Vap A als Antigen, während LOPEZ et al. (2003) eine DNA-Vakzine auf der Basis des Genoms, das für Vap A codiert ohne Erfolg in Hinblick auf die Aktivierung der zellulären Immunität einsetzten. Das in der vorliegenden Studie eingesetzte Adjuvans wurde beim Pferd in vivo bisher nur von HULLMANN (2006) erprobt. Da die in seiner Studie eingesetzte Konzentration von 500 µg/ml Impfstoff zwar keine signifikante Senkung der Erkrankungsrate im Vergleich zur Placebo-Gruppe brachte, jedoch eine positive Tendenz erkennen ließ und bisher in der Literatur keine weiteren Angaben zur Dosierung des Adjuvans CpG X beim Pferd vorliegen, wurde in der vorliegenden Studie dieselbe Konzentration und in einer weiteren Impfgruppe ein Zehntel dieser Dosierung getestet.

Die intramuskuläre Injektion von 10 mg eines CpG-Motivs beim Kalb (RANKIN et al., 2002) und die intranasale Applikation von 500 µg pro Nüster beim Fohlen (HULLMANN, 2006) wurden ohne das Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen beschrieben, so dass in dieser Studie unerwünschte Reaktionen nicht zu erwarten waren.

5.1.3 Untersuchungen der Probanden

Um die Wirksamkeit der eingesetzten Impfstoffformulierungen zu beurteilen, wurden in der vorliegenden Studie die Fohlen wöchentlich klinisch und labordiagnostisch untersucht und die klinischen Symptome, die Konzentration der Blutleukozyten sowie Anzahl und Durchmesser der ultrasonographisch darstellbaren Lungenabszesse unter den Impfgruppen verglichen. Mehrfach wurde gezeigt, dass der Gehalt an Anti-*R. equi*-IgG zwischen gesunden und erkrankten Fohlen zum Diagnosezeitpunkt sich

nicht signifikant unterscheidet und somit die Serologie bei der Rhodokokkose diagnostisch nicht einzusetzen ist (GIGUÈRE et al., 2003b; TRISKATIS, 2004; PAUL, 2005; HULLMANN, 2006). Daher wurden in der vorliegenden Studie keine serologischen Methoden zur Überprüfung der Immunantwort angewandt. Auch der direkte Erregernachweis wurde aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität von Kultur und PCR nicht durchgeführt (MEYER-HAMME, 2004; HEYERS, 2005).

Die klinische Untersuchung der Fohlen geschah mittels eines Screeningprogrammes, das auf den Vorschlägen von COHEN et al. (2000) zur Überwachung endemisch mit *R. equi* betroffener Betriebe basierte. Die sonographische Untersuchung der Lunge wurde als Diagnostikum angewandt, da sie ebenso geeignet ist wie die Radiologie (GIGUÈRE u. PRESCOTT, 1997; WALTHER, 2006) und keine Strahlenbelastung verursacht. Die Ultraschall-Untersuchung des Thorax hat sich auf dem gleichen Gestüt als geeignetes Mittel zur Früherkennung einer *R. equi*-Pneumonie erwiesen (ALTHAUS, 2004). Die Diagnose anhand der sonographischen Lungenuntersuchung wurde ohne weitere Identifizierung des Erregers gestellt, wenngleich auch andere Erreger wie *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* zu Lungenabszessen führen können (LAVOIE et al., 1994). Allerdings wurden im gleichen Jahr in dem gleichen Gestüt 40 verstorbene Fohlen post mortem untersucht. Dabei wurde bei 80 % der untersuchten Fohlen *R. equi* und lediglich bei 20 % der Fohlen *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* aus Lungenabszessen isoliert (WEIMAR, 2006), so dass von einem hohen Vorkommen von *R. equi* bei den Fohlen ausgegangen werden kann.

LOPEZ et al. (2003) führten zur Überprüfung der Wirksamkeit des eingesetzten Impfstoffes klinische und serologische Untersuchungen durch und ermittelten bei zwei der fünf geimpften Fohlen einen Anstieg der Vap A-spezifischen Antikörper, jedoch bei keinem der geimpften Fohlen einen Anstieg von IFN- γ - und IL-4-sezernierender Leukozyten im Serum und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit. Bei den täglich durchgeführten Bestimmungen von Atem- und Herzfrequenz und Körperinnentemperatur wurden weder bei den geimpften, noch bei den ungeimpften Fohlen Anzeichen einer Rhodokokkose ermittelt. VARGA et al. (1997) führten ebenfalls die klinische Untersuchung der Probanden ohne Hinweise auf durch *R. equi* erkrankte Fohlen durch. Dabei ermittelten die Autoren durch

indirekte Hämagglutination und EHV2-Virus-Neutralisationstest insgesamt niedrige Antikörpergehalte im Kolostrum der Stuten und Serum der Fohlen. PRESCOTT et al. (1997b) führten die klinische und serologische Untersuchung sowie die kulturelle Anzucht von *R. equi* aus der BALF durch, wobei der *R. equi*-Nachweis bei vier von acht erkrankten Fohlen der Impfgruppe auch gelang. BECÚ et al. (1997) nutzten dagegen ausschließlich die serologische Untersuchung in Form von Komplementbindungsreaktion und Agargel-Immunodiffusions-Test, um die Immunantwort der Probanden zu überprüfen, die keinen Unterschied unter den Impfgruppen ergab. CHIRINO-TREJO et al. (1987) und HOOPER-McGREVY et al. (2005) führten nach den klinischen Untersuchungen eine erfolgreiche post mortale Untersuchung inklusive deutlich reduziertem Erregernachweis durch.

5.2 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte durch den Einsatz des CpG-Motives X als Impfstoff-Adjuvans die Anzahl der einer natürlichen Infektion folgenden *R. equi*-Pneumonie erkrankenden Fohlen nicht reduziert werden. Obwohl die durchschnittliche Erkrankungsrate in der Kontrollgruppe mit 84,4 % am höchsten lag, unterschied sich die Morbidität nicht signifikant von den drei Impfgruppen. Insgesamt lag hier unter den vier Fohlengruppen eine äußerst hohe durchschnittliche Erkrankungsrate von 80,6 % vor. Diese Tatsache kann mit den überdurchschnittlich warmen und trockenen klimatischen Bedingungen im Untersuchungszeitraum zusammenhängen, wodurch der Infektionsdruck auf dem endemisch mit *R. equi* betroffenen Betrieb derart gesteigert wurde, dass die durchgeführten Immunisierungsmaßnahmen nicht ausreichten, um eine schützende Immunität gegen *R. equi* aufzubauen.

Unerwartet zeigte sich in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) mit 83,3 % erkrankter Fohlen die zweithöchste Morbiditätsrate, was in Widerspruch zu den Ergebnissen von HULLMANN (2006) steht. Obwohl die Fohlen aus Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) mit $76 \pm 25,7$

Tagen durchschnittlich zwölf Tage später erkrankten als die Fohlen der Kontrollgruppe, ist auch hier kein signifikanter Unterschied im Erkrankungsalter unter den Gruppen festzustellen. Die Altersverteilung der neu erkrankten Tiere macht deutlich, dass trotz der aktiven Immunisierung die meisten Fohlen entsprechend nicht geimpften Tieren zwischen der 8. und 16. Lebenswoche erkrankten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei den im Sommer geborenen Fohlen der Zeitpunkt des Aufstallens im Oktober und der daraus resultierende „Crowding-Effekt“ einen Einfluss darauf haben kann. Die ab September geborenen Fohlen wurden ausschließlich in den Ställen gehalten, in denen ein höherer Keimdruck als auf den Weiden vermutet wird. Trotzdem verdeutlicht die Altersverteilung der neu erkrankten Fohlen die bereits erwähnte Notwendigkeit von ausreichend langen Untersuchungszeiträumen in *R. equi*-Impfstudien.

Die Fohlen in Gruppe B (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml) wiesen zum Zeitpunkt der Diagnose einen signifikant höheren klinischen Score als die Fohlen in Gruppe A (*R. equi*-Impfstoff) und die der Gruppe C (*R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 50 µg/ml) auf. Damit wird verdeutlicht, dass die klinische Wirksamkeit des in der vorliegenden Studie gewählten Impfstoffes unzureichend war. Möglicherweise war das Immunsystem der Fohlen aufgrund des hohen Keimdruckes, der auf dem endemisch mit *R. equi* betroffenen Gestütes vorherrschte, überfordert. So ließe sich erklären, dass auf die Stimulation das Immunsystem nicht adäquat reagierte und die Impfung mittels *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG X, 500 µg/ml die Krankheitssymptome sogar verstärkte. Beachtenswert war, dass von den insgesamt 111 erkrankten Fohlen eine hohe Anzahl nämlich 78 keine klinischen Symptome aufwiesen, allerdings bei der Ultraschalluntersuchung der Lunge Abszesse darstellbar waren. Diese Tatsache unterstreicht die Aussage von FALCON et al. (1985), dass die auskultatorische Untersuchung der Lunge allein keine ausreichenden Hinweise auf eine *R. equi*-Pneumonie liefert und hebt die Wichtigkeit der Blutleukozytenmessung zur Früherkennung hervor (GIGUÈRE et al., 2003b; CHAFFIN et al., 2004). In der vorliegenden Studie wiesen lediglich vier der 78 an Lungenabszessen erkrankten Fohlen eine Blutleukozytenzahl von unter $13 \times 10^9/l$

auf, bei denen aufgrund eines nicht physiologischen klinischen Scores (siehe 3.11) eine Ultraschalluntersuchung der Lunge durchgeführt wurde.

Bei der in dieser Studie erstmals eingeführten Unterscheidung von therapiebedürftigen und nicht-therapiebedürftigen Fohlen, die sich aus der klinischen Untersuchung und Ultraschalluntersuchung der Lunge ergab und zur Einteilung der Fohlen in unterschiedliche Managementregimes führte, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede unter den Fohlengruppen.

Da die Morbidität unter den Impfgruppen keine signifikanten Unterschiede zeigt, geben die Ergebnisse dieser Studie eine andere Tendenz als die Untersuchungen von HULLMANN (2006) an, in denen durch die Immunisierung von Fohlen mittels *R. equi*-Impfstoff und Adjuvans CpG ansatzweise eine schützende Immunität von Fohlen gegenüber Feldinfektionen durch *R. equi* ermittelt wurden. Eine mögliche Ursache der divergierenden Ergebnisse zu den Untersuchungen von HULLMANN (2006) könnte die Tatsache sein, dass die dem Impfstoff zugrunde liegenden *R. equi*-Stämme, die 2003 von erkrankten Fohlen des gleichen Betriebes isoliert wurden, nicht mehr mit den zum Zeitpunkt der vorliegenden Studie vorherrschenden Stämmen übereinstimmten. Darüber hinaus bleibt zu untersuchen, ob eine andere CpG X-Konzentration und/oder häufigere Wiederholungsimpfungen einen Schutz gegen *R. equi* aufbauen können.

Die mangelnde Wirksamkeit der hier eingesetzten Impfstoffformulierungen kann durch eine nicht ausreichende Menge des Adjuvans bedingt sein, sowohl im Hinblick auf ungenügende Aufnahme durch die antigenpräsentierenden Zellen wie auch durch mechanische Verluste während der intranasalen Applikation. Weiterhin kann ein Abbau des CpG-Motivs durch DNAsen im Organismus vor der Aufnahme durch Leukozyten nicht ausgeschlossen werden. Somit bleibt zu klären, ob durch Umhüllung von Impfstoff und Adjuvans in Liposomen oder sogenannter Virus-like Particles (JOSEPH et al., 2002, STORNI et al., 2004) ein eventueller Abbau verhindert und die Aufnahme verbessert werden kann.

Bisherige Impfstudien über die Vorbeugung der *R. equi*-Pneumonie bei Fohlen wiesen ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse auf. In der Studie von LOPEZ et al. (2003) erkrankten weder geimpfte Fohlen noch Kontrolltiere. Im Vergleich zu den fünf

Fohlen der Kontrollgruppe wiesen zwei der fünf geimpften Fohlen am 45. Lebenstag signifikant höhere IgGa- und IgGb-Werte in Serum und BALF auf. Die unveränderte Konzentration an IFN- γ - und IL-4-sezernierender Leukozyten im Serum und in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit zeigte jedoch, dass das zelluläre Immunsystem durch die Impfung nicht aktiviert werden konnte. Die Ergebnisse von SHEORAN et al. (2000) zeigen, dass IgGb beim Fohlen das Immunglobulin mit der zuletzt einsetzenden Eigensynthese ist. Somit kann die Steigerung der impfinduzierten Antikörperproduktion durch die Fohlen als Erfolg gewertet werden. Da jedoch weniger die humorale als die zelluläre Immunität bei der Auseinandersetzung mit *R. equi* die herausragende Rolle spielt, ist es weiterhin Ziel der Forschung, durch den Einsatz von Zytokin-Gensequenzen die zelluläre Immunität in Form von vermehrter IFN- γ -Produktion zu steigern (LOPEZ et al., 2003). Zu berücksichtigen bleibt hier die mit zehn Fohlen äußerst geringe Probandenzahl, die die Aussagekraft der Ergebnisse einschränkt. VARGA et al. (1997) berichteten über elf erkrankte Fohlen der insgesamt 21 Kontrolltiere, wohingegen keines der 74 gegen *R. equi* bzw. gegen *R. equi* und EHV-2 geimpften Fohlen erkrankte. Bei den drei verstorbenen Fohlen konnte *R. equi* aus Lungenmaterial isoliert werden. Aufgrund der insgesamt niedrigen Antikörpergehalte im Kolostrum der Stuten und Serum der Fohlen sahen die Autoren den Impferfolg weniger in der Mutterstutenimpfung als in der aktiven Immunisierung der Fohlen. PRESCOTT et al. (1997b) kamen zu dem Ergebnis, dass die Vakzination mittels Vap A, welches aus Vap A-positiven *R. equi*-Stämmen isoliert worden war, paradoxerweise zu einer erhöhten Morbidität führte. In dieser Studie erkrankten vier der acht geimpften Fohlen im Vergleich zu nur einem von sechs Kontrolltieren.

Auch die Immunisierung von Fohlen nicht geimpfter Stuten auf einem endemisch mit *R. equi* betroffenen Betrieb durch BECÚ et al. (1997) brachte keine positiven Ergebnisse hinsichtlich Mortalität und serologischen Befunden. Dagegen berichteten die Autoren von guten Ergebnissen durch Mutterstutenimpfung und durch Verabreichung von Hyperimmunplasma an die Fohlen auf unterschiedlichen Betrieben Anfang der neunziger Jahre in Argentinien.

Die Untersuchungen mit einem attenuierten Lebendimpfstoff von CHIRINO-TREJO et al. (1987) und HOOPER-McGREVY et al. (2005) ergaben eine schützende Immunität in Bezug auf Feldinfektionen mit *R. equi*. Dies zeigte sich in signifikant geringeren Erkrankungsausprägungen der geimpften Fohlen im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Studie von CHIRINO-TREJO et al. (1987) wiesen die Lungen der geimpften Fohlen nach experimenteller Infektion in der Sektion signifikant schwächere Veränderungen auf, während sie in der Studie von HOOPER-McGREVY et al. (2005) sogar frei von pathologischen Veränderungen waren. Weiter wiesen die Autoren nur 10^2 Rhodokokken/g Lungengewebe der geimpften Fohlen nach, wogegen bei den Kontrolltieren bis zu 10^{11} /g ermittelt wurden. Damit wurde bei den geimpften Tieren eine deutlich effektivere Eliminierung des Erregers aus der Lunge nachgewiesen. Allerdings bleibt auch hier mit neun bzw. sieben Fohlen die äußerst geringe Probandenzahl beider Studien bei der Interpretation zu berücksichtigen.

5.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie konnte beim Einsatz des CpG-Motives X kein Schutz gegen eine *R. equi*-Pneumonie festgestellt werden. Die Erfolg versprechenden Tendenzen einer Studie, die im Vorjahr auf dem gleichen Gestüt durchgeführt wurde (HULLMANN, 2006), konnten hier nicht reproduziert bzw. verbessert werden. Auf der Grundlage der vorliegenden Studie kann damit der intranasale Einsatz eines formalininaktivierten Impfstoffes mit Adjuvans CpG X in einer Dosierung von 500 µg/ml bzw. 50 µg/ml beim Fohlen nicht als ausreichender Schutz gegen die Rhodokokkose angesehen werden. Nach wie vor bleibt es Ziel der wissenschaftlichen Forschung, das zelluläre Immunsystem des equinen Neonaten derart zu aktivieren, dass die Morbidität durch *R. equi* gesenkt werden kann. Zum CpG-Motiv besteht weiterer Forschungsbedarf beim Pferd. Es bleibt zu klären, ob durch eine andere Dosierung und/oder eine häufigere Impfstoffapplikation ein vollständiger Schutz gegen *R. equi* aufgebaut werden kann oder ob ein weiteres CpG-Motiv geeignet ist, um das zelluläre Immunsystem von Fohlen zu aktivieren. In

nachfolgenden Studien bleibt weiter zu klären, ob sich die intranasale Applikation eines *R. equi*-Impfstoffes mit dem Adjuvans CpG eignet oder ob möglicherweise eine Kombination von verschiedenen simultanen Applikationsweisen wie von LOPEZ et al. (2003) beschrieben zu besseren Ergebnissen führt. Auch die Zusammensetzung der Impfantigene ist in weiteren Studien klinisch zu überprüfen. Dabei ist trotz der erwähnten hohen Wahrscheinlichkeit der Infektion mit *R. equi* das Vorliegen anderer Erreger nicht völlig auszuschließen.

In Anbetracht der uneinheitlichen Angaben in der Literatur sind *R. equi*-Impfstudien mit ausreichenden Probandengrößen und einheitlichen Umgebungsbedingungen notwendig, um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu liefern.

6 Zusammenfassung

Müller-Alander, Eva: Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlen durch Vakzination mit einem *Rhodococcus equi*-Totimpfstoff mit einem unterschiedlich dosierten CpG-Adjuvans

Rhodococcus equi (*R. equi*) gilt als wichtigster Erreger schwerer abszedierender Pneumonien beim Fohlen. Bisher haben sich weder aktive noch passive Immunisierungen zum Schutz von Fohlen gegen die *R. equi*-Pneumonie als erfolgreich erwiesen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Wirkung eines intranasal applizierten formalininaktivierten *R. equi*-Impfstoffes mit dem Adjuvans CpG X in der Dosierung nach HULLMANN (2006) und einem Zehntel der Dosis gegen eine Feldinfektion mit *R. equi* zu überprüfen.

Dazu wurden 139 Fohlen einer Fohlensaison auf einem endemisch mit *R. equi* betroffenen Gestüt in die randomisierte Blindstudie mit Kontroll-Gruppe aufgenommen. Den Fohlen wurde der aus drei virulenten *R. equi*-Stämmen bestehende Impfstoff allein, mit Adjuvans CpG X in einer Dosierung von 500 µg/ml bzw. 50 µg/ml oder eine Placebolösung verabreicht. Das Impfprotokoll bestand aus zwei intranasalen Impfungen, die am ersten und 21. Lebenstag durchgeführt wurden. Zur Überprüfung des Impferfolges wurden die Fohlen wöchentlich bis zur 17. Lebenswoche untersucht. Dazu zählten eine klinische Untersuchung des Respirationstraktes, eine Bestimmung der Blutleukozytenzahl und eine ultrasonographische Lungenuntersuchung.

In der Kontrollgruppe erkrankten 84,4 % (27 von 32) der Fohlen, in der Impfgruppe ohne Adjuvans 77,1 % (27 von 35), in der Impfgruppe mit Adjuvans CpG X in einer Dosierung von 50 µg/ml 75 % (27 von 36) und in der Impfgruppe mit Adjuvans CpG X in einer Dosierung von 500 µg/ml erkrankten 83,3 % (30 von 36) der Fohlen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch den Einsatz eines *R. equi*-Impfstoffes mit Adjuvans in einer Dosierung von 500 µg/ml bzw. 50 µg/ml keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fohlengruppen hinsichtlich der Morbidität ermittelt

ZUSAMMENFASSUNG

wurden. Auch Erkrankungsalter, Ausprägung der Lungenabszesse und Unterscheidung zwischen therapiebedürftigen und nicht-therapiebedürftigen Fohlen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

So ergibt sich bei dem hier ausgewählten Impf-Protokoll keine schützende Wirkung für Fohlen eines Gestütes mit endemischer Rhodokkose.

7 Summary

Müller-Alander, Eva: Prophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals
by vaccination with an inactivated *Rhodococcus equi* vaccine
with an adjuvant in two different dosages

Rhodococcus equi (*R. equi*) is the most important bacteria causing severe pyogranulomatous pneumonia in foals. Neither active nor passive immunization has been proved to establish reproducible protection of foals against *R. equi* pneumonia so far.

The purpose of the present study was to determine whether intranasal immunization with a *R. equi* vaccine containing the adjuvant CpG X in the dose applied by HULLMANN (2006) and a tenth of this dose, respectively, could reduce morbidity in field infections caused by *R. equi*.

The study was carried out as a blind study with a control group on 139 foals from one foaling season on a breeding farm with endemic rhodococcosis. The foals were randomly administered intranasally either the vaccine composed of three virulent *R. equi*-strains, the vaccine associated with the adjuvant CpG X in a dosage of 500 µg/ml or in a dosage of 50 µg/ml, respectively, or a placebo. The first vaccination was given on the first day of life and the second on the 21st day of life. Evaluating the efficiency of the formulations given to the foals was done by clinical examinations of the respiratory tract, counting blood leucocytes and ultrasonographical examination of the lungs and was carried out weekly until the 17th week of life.

In the placebo group, the morbidity was 84,4% (27 of 32 foals), in the group administered the *R. equi*-vaccine without adjuvant 77,1% (27 of 35 foals), in the group administered the vaccine associated with the adjuvant in a dosage of 50 µg/ml 75% (27 of 36 foals) and in the group administered the vaccine associated with the adjuvant in a dosage of 500 µg/ml 83,3% (30 of 36 foals).

No difference concerning the morbidity, age at diagnosis, size of pulmonary abscesses and different therapy forms first applied on foals with *R. equi*-pneumonia was noted between the four foal groups.

SUMMARY

In conclusion, no protective immunity could be observed after repeated intra nasal vaccination of foals with an inactivated *R. equi* vaccine with a CpG adjuvant in different concentrations on a farm endemically affected by *R. equi*.

8 Literaturverzeichnis

AINSWORTH, D.M. (1993):

Lack of residual lung damage in horses in which *Rhodococcus equi*-induced pneumonia had been diagnosed.

Am. J. Vet. Res. 54, 2115-2120

AINSWORTH, D.M., S.W. EICKER, A.E. YAEGAR, C.R. SWEENEY, L. VIEL, D. TESAROWSKI, J.-P. LAVOIE, A. HOFFMAN, M.R. PARADIS, S.M. REED, H.N. ERB, E. DAVIDOW u. M. NALEVANKO (1998):

Associations between physical examination, laboratory, and radiographic findings and outcome and subsequent racing performance of foals with *Rhodococcus equi* infection: 115 cases (1984-1992).

J. Am. Vet. Med. Assoc. 213, 510-51

AINSWORTH, D.M. (1999):

Rhodococcal infections in foals.

Equine Vet. Educ. 11, 191-198

ALTHAUS, O.P. (2004):

Sonographie der Lunge: Eine Hilfe zur Früherkennung der *Rhodococcus equi* Pneumonie beim Fohlen.

Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

ANZAI, T., R. WADA, A. NAKANISHI, M. KAMADA, S. TAKAI, Y. SHINDO u. S. TSUBAKI (1997):

Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals.

Vet. Microbiol. 56, 335-345

BARTON, M.D. u. K.L. HUGHES (1984):

Ecology of *Rhodococcus equi*.

Vet. Microbiol. 9, 65-76

BAUER, S., G. J. KIRSCHNUNG, H. HAECKER, V. REDECKE, S. HAUSMANN, S. AKIRA, H. WAGNER u. G. B. LIPFORD (2001):

Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition.

Immunol. 98, 9237-9242

BECÚ, T., G. POLLEDO u. J.M. GASKIN (1997):

Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals.

Vet. Microbiol. 56, 193-204

BREATHNACH, C.C., T.L. STURGILL-WRIGHT u. J.A. STILTNER (2006):

Foals are interferongamma-deficient at birth.

Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 199-209

CARMAN, M.G. u. R.T. HODGES (1987):

Distribution of *Rhodococcus equi* in animals, birds and from the environment.

New Z. Vet. J. 35, 114-115

CAUCHARD, J., C. SEVIN, J.-J. BALLETT u. S. TAOUJI (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., N.D. COHEN u. R.J. MARTENS (2003):
Evaluation of equine breeding farm management and preventative health practices as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 222, 476-485

CHAFFIN, M.K., N.D. COHEN, R.J. MARTENS, R.F. EDWARDS, M. NEVILL u. R. SMITH (2004):
Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection.
Vet. Immunol. Immunopathol. 100, 33-48

CHIRINO-TREJO, J.M., J.F. PRESCOTT u. J.A. YAGER (1987):
Protection of Foals Against Experimental *Rhodococcus equi* Pneumonia by Oral Immunization.
Can. J. Vet. Res. 51, 444-447

COHEN, N.D., M.K. CHAFFIN u. R.J. MARTENS (2000):
Control and Prevention of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals.
Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 22, 1062-1070

COHEN, N.D., M.K. CHAFFIN u. R.J. MARTENS (2002):
How to Prevent and Control Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* at Affected Farms.
Proc. Am. Assoc. Equine Pract. 48, 295-299

DAVILA, E. u. E. CELIS (2000):
Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL response with anti-tumor activity.
J. Immunol. 165, 539-547

DEMMERS, S., A. JOHANNISSON, G. GRÖHNDAHL u. M. JENSEN-WAERN (2001):
Neutrophil functions and serum IgG in growing foals.
Equine Vet. J. 33, 676-680

EDWARDS, S.A., D.M. BROOM u. S.C. COLLIS (1982):
Factors affecting levels of passive immunity in dairy calves.
Br. Vet. J. 138, 233-340

ELLENBERGER, M.A., M.L. KAEBERLE u. J.A. ROTH (1984):
Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*.
Am. J. Vet. Res. 45, 2428-2430

ELLENBERGER, M.A. u. R.M. GENETZKY (1986):
Rhodococcus equi Infections: Literature Review.
Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 8, 414-423

FALCON, J., B.P. SMITH, T.R. O'BRIEN., G.P. CARLSON u. E. BIBERSTEIN (1985):
Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 186, 593-599

FERNANDEZ, A.S., J.F. PRESOTT u. V.M. NICHOLSON (1997):
Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens.
Vet. Microbiol. 56, 187-192

GIGUÈRE, S. u. J.P. LAVOIE (1994):
Rhodococcus equi vertebral osteomyelitis in 3 Quarter Horse colts.
Equine Vet. J. 26, 74-77

GIGUÈRE, S. u. J.F. PRESCOTT (1997):
Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals.
Vet. Microbiol. 56, 313-343

GIGUÈRE, S., J. HERNANDEZ, J. GASKIN, C. MILLER u. J.L. BOWMANN (2003b):
Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia.
J. Am. Vet. Med. Assoc. 222, 775-781

GOODFELLOW, M. u. D.E. MINNIKIN (1977):
Norcadiform bacteria.
Ann. Rev. Microbiol. 31, 159-180

GORDON, R.E. (1966):
Some strains in search of a genus: *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* or what?
J. Gen. Microbiol. 43, 329-343

GRAEVENITZ, VON, A. u. V. PÜNTER-STREIT (1995):
Development of a new selective plating medium for *Rhodococcus equi*.
Microbiol. Immunol. 39, 283-284

GRIEBEL, P.J., R. BROWNLIE, A. MANUJA, A. NICHANI, N. MOOKHERJEE, Y. POPOWYCH, G. MUTWIRI, R. HECKER u. L.A. BABIUK (2005):
Bovine toll-like receptor 9: A comparative analysis of molecular structure, function and expression.
Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 11-16

GRÖHNDAHL, G., S. STERNBERG, M. JENSEN-WAERN u. A. JOHANNISSON (2001):

Opsonic capacity of foal serum for the two neonatal pathogens *Escherichia coli* and *Actinobacillus equuli*.

Equine Vet. J. 33, 670-675

HÄCKER, H., H. MISCHAK, T. MIETHKE, S. LIPTAY, R. SCHMID, T. SPARWASSER, K. HEEG, G. B. LIPFORD u. H. WAGNER (1998):

CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.

The EMBO J. 17, 6230-6240

HÄCKER, G., V. REDECKE u. H. HAECKER (2002):

Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA.

Immunol. 105, 245-251

HAMMER, C.J., J.A. BOOTH, L. ETZEL u. H.D. TYLER (2001):

Adequacy of a concentrated equine serum product in preventing failure of immune passive transfer in neonatal foals: preliminary study.

Equine Vet. J. 33, 734-736

HARAKAWA, T. u. S. MORITA (1949):

Observations on *Corynebacterium equi* isolated from abscesses occurring in the lung of foals.

Jpn. J. Vet. Sci. 11, 63-74

HARTMANN, G, R. D. WEERATNA, Z.K. BALLAS, P. PAYETTE, S. BLACKWELL, I. SUPARTO, W.L. RASMUSSEN, M. WALDSCHMIDT, D. SAJUTHI, R. H. PURCELL, H. L. DAVIS u. A.M. KRIEG (2000):

Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo.

J. Immunol. 164, 1617-1624

HEYERS, P. (2005):

Vergleich des Nachweises von *Rhodococcus equi* durch mikrobiologische Kultur mit dem Nachweis durch die Polymerase-Ketten-Reaktion in endoskopisch entnommenem Tracheobronchialsekret bei Fohlen.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

HILLIDGE, C.J. (1986):

Review of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* lung abscesses in foals:

Pathogenesis, diagnosis and treatment.

Vet. Rec. 119, 261-264

HILLIDGE, C.J. (1987):

Use of Erythromycin-Rifampicin Combination in Treatment of *Rhodococcus equi* Pneumonia.

Vet. Microbiol. 14, 337-342

HINES, S.A., D.M. STONE, M.T. HINES, D.C. ALPERIN, D.P. KNOWLES, L.C. NORTON, M.J. HAMILTON, W.C. DAVIS u. T.C. McGUIRE (2003):

Clearance of Virulent but Not Avirulent *Rhodococcus equi* from the Lungs of Adult Horses Is Associated with Intracytoplasmic Gamma Interferon Production by CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 208-215

HÖHENSTEIGER, N. (2005):

Nachweis der Konzentration von Tulathromycin im Plasma und in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit beim Fohlen mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie mit zweifacher Massenspektroskopie nach i.m. Applikation, mit und ohne Kombination von Rifampicin.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

HOLMES, M.A. u. D.P. LUNN (1991):

A study of bovine and equine immunoglobulin levels in pony foals fed bovine colostrum.

Equine Vet. J. 23, 116-118

HOLTH, H. u. H. AMUNDSEN (1936):

Forsatte undersøkelserover baciltyperne ved tuberkulose hos svinet på Ostlandet.

Nor. Veterinaertidkr. 48, 2-17

HOLZNAGEL, D.L., S. HUSSEY, J.E. MIHALY, W.D. WILSON u. D.P. LUNN (2003):

Onset of immunoglobulin production in foals.

Equine Vet. J. 35, 620-622

HONDALUS, M.K. u. D.M. MOSSER (1994):

Survival and Replication of *Rhodococcus equi* in Macrophages.

Infect. Immun. 62, 4167-4175

HONDALUS, M.K. (1997):

Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*.

Vet. Microbiol. 56, 257-268

HOOPER-McGREVY, K.E., S. GIGUÈRE, B.N. WILKIE u. J.F. PRESCOTT (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.

A. J. V. R. 62, 1307-1313

HOOPER-McGREVY, K.E., B.N. WILKIE u. J.F. PRESCOTT (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

HOROHOV, D.W. (2000):

Equine T-cell cytokines: protection and pathology.

Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. 16, 1-14

HULLMANN, A. (2006):

Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie bei Fohlen durch Vakzination mit *Rhodococcus equi*-Impfstoff und Adjuvans CpG XXXX
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

JANEWAY, C.A., P. TRAVERS, M. WALPORT u. M.J.SHLOMCHIK (2002):
Immunologie.
Verlag Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 5. Auflage

JEFFCOTT, L. B. (1972):
Passive immunity and its transfer with special reference to the horse.
Biol. Rev. 47, 439-462

JEFFCOTT, L.B. (1974):
Studies on passive immunity in the foal.
J. Comp. Path. 84, 93-101

JENSEN, H.L. (1934):
Studies on saprophytic *mycobacteria* and *corynebacteria*.
Proc. Linn. Soc. N.S.W. 59, 19-61

JIANG, W., H.J. BAKER u. B.F. SMITH (2002):
Mucosal immunisation with *Helicobacter*, CpG DNA, and cholera toxin is protective.
Infect. Immun. 71, 40-46

JOSEPH, A., I. LOURIA-HAYON, A. PLIS-FINAROV, E. ZEIRA, Z. ZAKAY-RONES,
E. RAZ, T. HAYASHI, K. TAKABAYASHI, Y. BARENHOLZ u. E. KEDAR (2002):
Liposomal immunostimulatory DNA sequences (ISS-ODN): An efficient parenteral
and mucosal adjuvant for influenza and hepatitis B vaccines.
Vaccine 20, 3342-3354

KAMSTRUP, S., D. VERTHELYI u. D. M. KLINMAN (2001):
Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing
oligodeoxynucleotides.
Vet. Microbiol. 78, 353-362

KENNEY, D.G., S.C. ROBBINS, J.F. PRESCOTT, A. KAUSHIK u. J.D. BAIRD
(1994):
Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampin in a foal
during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia.
Equine Vet. J. 26, 246-248

KOVARIK, J., P. BOZOTTI, L. LOVE-HOMAN, M. PIHLGREN, J.L. DAVIS, P.-H.
LAMBERT, A.M. KRIEG u. C.-A. SIEGRIST (1999):
CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal
responses to vaccines but may fail to fully redirect Th2 responses established by
neonatal priming.
J Immunol. 162, 1611-1617

KRASIL'NIKOV, N.A. (1966):
Keys to the Actinomycetales.
Isr. Programme Sci. Trans., Jerusalem

KRIEG, A.M., T. WU, R. WEERATNA, S.M. EFLER, L. LOVE-HOMAN, L. YANG, A.K. YI, D. SHORT u. H.L. DAVIS (1998a):

Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12631-12636

KRIEG, A.M., T. WU, R. WEERATNA, S.M. EFLER, L. LOVE-HOMAN, L. YANG, A.K. YI, D. SHORT u. H.L. DAVIS (1998b):

CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge.

J. Immunol. 161, 2428-2434

LAVOIE, J.-P., L. Fiset u. S. LAVERTY (1994):

Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses.

Equine Vet. J. 26, 348-352

LEMAITRE, B., E. NICOLAS, L. MICHAUT, J.M. REICHHART u. J.A. HOFFMANN (1996):

The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults.

Cell. 86, 973-983

LOPEZ, A.M., M.T. HINES, G.H. PALMER, D.C. ALPERIN u. S.A. HINES (2002):

Identification of Pulmonary T-Lymphocyte and Serum Antibody Isotype Responses Associated with Protection against *Rhodococcus equi*.

Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 1270-1276

LOPEZ, A.M., M.T. HINES, G.H. PALMER, D.P. KNOWLES, D.C. ALPERIN u. S.A. HINES (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

LÜHRMANN, A., N. MAUDER, T. SYDOR, E. FERNANDEZ-MORA, J. SCHULZE-LUEHRMANN, S. TAKAI u. A. HAAS (2004):

Necrotic Death of *Rhodococcus equi*-Infected Macrophages Is Regulated by Virulence-Associated Plasmids.

Infect. Immun. 72, 853-862

LUNN, D.P., M.A. HOLMES u. W.P.H. DUFFURS (1993):

Equine T-lymphocyte MHC II expression:

Variation with age and subset.

Vet. Immunol. Immunopathol. 35, 225-238

MADIGAN, J.E., S. HIETALA u. N.S. MULLER (1991):

Protection against naturally required *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma.

J. Reprod. Fert. 44, Suppl., 571-578

MAGNUSSON, H. (1923):

Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferde.

Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd. 50, 22-38

MARTENS, R.J., R.A. FISKE u. H.W. RENSHAW (1982):
Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of
Corynebacterium equi.
Equine Vet. J. 14, 111-116

MARTENS, R.J., J.G. MARTENS u. R.A. FISKE (1989):
Rhodococcus equi foal pneumonia: Protective effects of immune plasma in
experimentally infected foals.
Equine Vet. J. 21, 249-255

MARTENS, R.J., J.G. MARTENS u. R.A. FISKE (1992):
Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals
against *Rhodococcus equi* pneumonia.
Equine Vet. J. 12, Suppl., 19-22

McCLURE, J.J. (2000):
Equine Autoimmunity.
Vet. Clin. North Am. Large Anim. Pract. 16, 153-164

McGUIRE, T.C. u. T.B. CRAWFORD (1973):
Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific
antibody.
Am. J. Vet. Res. 34, 1299-1303

MEDZHITOV, R. u. C.A. JANEWAY (1997):
Innate immunity: the virtues of nonclonal system of recognition.
Cell. 91, 295-298

MEYER-HAMME, M.B. (2004):
Rhodococcus equi und *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* aus Nasentupfern
und Tracheobronchialsekret bei lungenkranken Fohlen.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

O'BRIEN, R.T. u. D.S. BILLER (1997):
Field imaging of the respiratory tract.
Vet. Clin. N. Am. Equine Pract. 13, 487-499

OHNESORGE, B., C. TRÖTSCHHEL u. E. DEEGEN (1998):
Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumenverhältnis zur
Diagnostik chronischer Lungenerkrankung.
Pferdeheilkd. 14, 450-455

PAUL, M. (2005):
Verlauf des *Rhodococcus equi*-Antikörpertiters beim Fohlen: Vergleich von Fohlen
mit und ohne Anti-*Rhodococcus equi*-Hyperimmunserumgabe.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

PERKINS, G.A., A. YEAGER, H.N. ERB, D.V. NYDAM, T.J. DIVERS u. J.L.
BOWMAN (2001):

Survival of Foals with Experimentally Induced *Rhodococcus equi* Infection Given Either Hyperimmune Plasma Containing *Rhodococcus equi* Antibody or Normal Equine Plasma.

Vet. Ther. 2, 334-346

PILTZ, K. (2004):

Vergleichende Behandlung von *Rhodococcus equi*-Pneumonien bei Fohlen mit Azithromycin und Rifampicin in Kombination mit Erythromycin bzw. Trimethoprim/Sulfadiazin.

Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

PLUM, N. (1940):

On corynebacterial infections in swine.

Preliminary report, Cornell Vet. 30, 14-20

PRESCOTT, J.F. (1991):

Rhodococcus equi: an Animal and Human Pathogen.

Clin. Microbiol. Rev. 4, 20-34

PRESCOTT, J.F. u. C.R. SWEENEY (1985):

Treatment of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals: A review.

J. Am. Vet. Med. Assoc. 187, 725-728

PRESCOTT, J.F. u. A.M. HOFFMANN (1993):

Rhodococcus equi.

Vet. Clin. N. Am.: Equine Pract. 9, 375-383

PRESCOTT, J.F., A.S. FERNANDEZ, V.M. NICHOLSON, M.C. PATTERSON, J.A. YAGER, L. VIEL u. G. PERKINS (1996):

Use of virulence-associated protein based enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* serology in horses.

Equine Vet. J. 28, 344-349

PRESCOTT, J.F., M.C. PATTERSON, V.M. NICHOLSON, B. MOREIN u. J.A. YAGER (1997a):

Assessment of the immunogenic potential of *Rhodococcus equi* virulence associated protein (VapA) in mice.

Vet. Microbiol. 56, 213-225

PRESCOTT, J.F., V.M. NICHOLSON, M.C. PATTERSON, M.C. ZANDONA MELEIRO, A. CATERINO DE ARAUJO, J.A. YAGER u. M.A. HOLMES (1997b):

Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunisation of foals against *R. equi* pneumonia.

Am. J. Vet. Res. 58, 356-359

RAMIREZ, S., G.D. LESTER u. G.R. ROBERTS (2004):

Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia.

Vet. Radiol. Ultrasound 45, 172-176

- RANKIN, R., R. PONTAROLLO, X. IOANNOU, A.M. KRIEG, R. HECKER, L.A. BABIUUK u. S. VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURCK (2001):
CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 11, 333-340
- RANKIN, R., R. PONTAROLLO, S. GOMIS, B. KARVONEN, P. WILLSON, B.I. LOEHR, D.L. GODSON, L.A. BABIUUK, R. HECKER u. S. VAN DRUNEN LITTLE-VAN DEN HURCK (2002):
CpG-containing oligodeoxynucleotides augment and switch the immune responses of cattle to bovine herpesvirus-1 glycoprotein D.
Vaccine 20, 3014-3022
- SCHERER, B. (2004):
Effekt von CpG-Oligonukleotiden auf die Funktion humaner T-Zellen und NK-Zellen.
Techn. Univ. München, Diss.
- SCHMIEDHOFFER, S. (1922):
Über eine infektiöse eitrige Lungenentzündung beim Saugfohlen.
Deutsche Tierärztl. Wochenschrift, 613
- SCHUBERTH, H.J. u. W. LEIBOLD (1996):
Die postnatale Entwicklung immunologischer Kompetenz und Reaktionen von Pferden.
Pferdeheilkd. 12, 205-208
- SCHULTE, S. (2005)
Wirksamkeit von Hyperimmunserum zur Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie beim Fohlen.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- SCHWARZ, K., T. STORNI, V. MANOLOVA, A. DIDIERLAURENT, J.C. SIRARD, P. RÖTHLISBERGER u. M.F. BACHMANN (2003):
Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses.
Eur. J. Immunol. 33, 1465-1470
- SELBITZ, H.J. (2002):
Infektionen mit *Rhodococcus equi*.
In: ROLLE, M., MAYR, A. (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre*.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 7. Auflage, 553-554
- SELLON, D.C., T.E. BESSER, S.L. VIVRETTE u. R.S. McCONNICO (2001):
Comparison of Nucleic Acid Amplification, Serology, and Microbiologic Culture for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals.
J. Clin. Microbiol. 39, 1289-1293
- SELLON, D.C. (2006):
Vulnerable- Foal with Failure of Passive Transfer.
In: PARADIS, M.R. (Hrsg.): *Equine Neonatal Medicine*.
Elsevier Saunders, Philadelphia, 1. Auflage, 31-39

- SESTER, D.P., S. NAIK, S.J. BEASLEY, D.A. HUME u. K.J. STACEY (2000):
Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG DNA.
J. Immunol. 165, 4165-4173
- SHEORAN, A.S., J.F. TIMONEY, M.A. HOLMES, S.S. KARZENSKI u. M.V. CRISMAN (2000):
Immunglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses.
Am. J. Vet. Res. 61, 1099-1105
- STEDE, VAN DER, Y., F. VERDONCK, S. VANCAENEGHEM, E. COX u. B.M. GODDEERIS (2002):
CpG-oligodinucleotides as an effective adjuvant in pigs for intramuscular immunizations.
Vet. Immunol. Immunopathol. 86, 31-41
- STORNI, T., C. RUEDL, K. SCHWARZ, R.A. SCHWENDENER, W.A. RENNER u. M.F. BACHMANN (2004):
Nonmethylated CpG Motifs Packaged into Virus-Like Particles Induce Protective Cytotoxic T cell Responses in the Absence of Systemic Side Effects.
J. Immunol. 172, 1777-1785
- STURGILL, T.L. u. D.W. HOROHOV (2006):
Interferon-gamma expression in young foals when treated with an immunostimulant or Plasma.
AAEP Proc. 52, 237-241
- SUZUKI, K., K. KANEKO u. K. KOMAGATA (1981):
Desoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria.
Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 131-138
- SWEENEY, C.R., R.W. SWEENEY u. T.J. DIVERS (1987):
Rhodococcus equi Pneumonia in 48 Foals: Response to Antimicrobial Therapy.
Vet. Microbiol. 14, 329-336
- SZEREDI, L., T. MOLNÁR, R. GLÁVITS, S. TAKAI, L. MAKRAI, B. DÉNES u. F. DEL PIERO (2006):
Two Cases of Equine Abortion Caused by *Rhodococcus equi*.
Vet. Pathol. 43, 208-211
- TAKAI, S. u. S. TSUBAKI (1985):
The incidence of *Rhodococcus equi* in domestic animal and soil.
Jpn. J. Vet. Sci. 47, 493-496
- TAKAI, S., D. HIDAKA, M. FUJII, Y. SHINDOH, T. MURATA, S. NAKANISHI, Y. SASAKI, S. TSUBAKI u. M. KAMADA (1996):
Serum antibody responses of foals to virulence-associated 15- to 17- kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*.
Vet. Microbiol. 52, 63-71

TAKAI, S. (1997):

Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review.
Vet. Microbiol. 56, 167-176

TAKAI, S., S.A. HINES, T. SEKIZAKI, V.M. NICHOLSON, D.A. ALPERIN, M. OSAKI, D. TAKAMATSU, M. NAKAMURA, K. SUZUKI, N. OGINO, T. KAKUDA, H. DAN u. J.F. PRESCOTT (2000):

DNA Sequence and Comparison of Virulence Plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103.
Infect. Immun. 68, 6840-6847

TKACHUK-SAAD, O. u. J.F. PRESCOTT (1991):

Rhodococcus equi Plasmids: Isolation and Partial Characterization.
J. Clin. Microbiol. 29, 2696-2700

TOKUNAGA, T, S. YAMAMOTO u. K. NAMBA (1988):

A synthetic single-stranded DNA, poly(dG, dC), induces interferon- α/β and $-\gamma$, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth.
Jpn. J. Cancer Res. 79, 682-686

TRISKATIS, A.-L. (2004):

Semiquantitative Bestimmung von Antikörpern gegen *Rhodococcus equi* in Serum und Kolostrum bei Stuten und Fohlen mittels ELISA und der Vergleich mit Befunden der Lungenuntersuchung.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

UNDERHILL, D.M. u. A. OZINSKY (2002):

Toll-like receptors: key mediators of microbe detection.
Curr. Opin. Immunol. 14, 103-110

VARGA, J., L. FODOR, M. RUSVAI, I. SOÓS u. L. MAKRAI (1997):

Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines.
Vet. Microbiol. 56, 205-212

VENGUST, M., H. STAEMPFLI u. J.F. PRESCOTT (2002):

Rhodococcus equi pleuropneumonia in an adult horse.
Can. Vet. J. 43, 706-708

VENNER, M., P. HEYERS, K. STRUTZBERG-MINDER, N. LORENZ, J. VERSPOHL u. E. KLUG (2006):

Detection of *Rhodococcus equi* by microbiological culture and by polymerase chain reaction in samples of tracheobronchial secretions of foals.
Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 120, 126-133

VENNER, M., B. MEYER-HAMME, J. VERSPOHL, F. HATORI, N. SHIMIZU, Y.SASAKI, T. KAKUDA, S. TSUBAKI u. S. TAKAI (2007a):

Genotypic characterization of VapA positive *Rhodococcus equi* in foals with pulmonary affection and their soil environment on a warmblood horse breeding farm in Germany.
Res. Vet. Sci. 83, 311-317

- VENNER, M., R. KERTH u. E. KLUG (2007b):
Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals.
Vet. J. 174, 418-421
- VENNER, M., B. REINHOLD, M. BEYERBACH u. K. FEIGE (2007c):
Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscess in foals.
Vet. J., in Druck
- VLEUGELS, B., C. VERVERKEN u. B.M. GODDEERIS (2002):
Stimulatory effect of CpG sequences on humoral response in chicken.
Poult. Sci. 81, 1317-1321
- WADA, R., M. KAMADA, T. ANZAI, A. NAKANISHI, T. KANEMARU, S. TAKAI u. S. TSUBAKI (1997):
Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge.
Vet. Microbiol. 56, 301-312
- WALTHER, S.M. (2006):
Diagnostik von Lungenabszessen beim Fohlen:
Vergleich von sonographischen und röntgenologischen Befunden.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- WATTRANG, E., M. BERG u. M. MAGNUSSON (2005):
Immunostimulatory DNA activates production of type I interferons and interleukin-6 in equine peripheral blood mononuclear cells in vitro.
Vet. Immunol. Immunopathol. 107, 265-279
- WEIMAR, B. (2006):
Lungenabszesse bei Fohlen: Klinische, sonographische, endoskopische, pathomorphologische und mikrobiologische Befunde.
Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.
- WERNETTE, C.M., B.F. SMITH, Z.L. BARKSDALE, R. HECKER u. H.J. BAKER (2002):
CpG oligodeoxynucleotides stimulate canine and feline immune cell proliferation.
Vet. Immunol. Immunopathol. 84, 223-236
- WILSON, M.M. (1955):
A study of *Corynebacterium equi* infection in a stud of Thoroughbred horses in Victoria.
Austr. Vet. J. 31, 175-181
- WILSON, W.D. (2005):
Strategies for Vaccinating Mares, Foals, and Weanlings.
AAEP Proc. 51, 421-438
- WOOLCOCK, J.B., A.-M.T. FARMER u. M.D. MUTIMER (1979):
Selective Medium for *Corynebacterium equi* Isolation.
J. Clin. Microbiol. 21, 640-642

ZHANG, D., G. ZHANG, M.S. HAYDEN, M.B. GREENBLATT, C. BUSSEY, R.A. FLAVELL u. S. GHOSH (2004):
A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria.
Sci. 303, 1522-1526

ZINK, M.C., J.A. YAGER u. N.L. SMART (1986):
Corynebacterium equi Infections in Horses, 1958-1984: A Review of 131 Cases.
Can. Vet. J. 27, 213-217

ANHANG

9 Anhang

Tab. 5: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe A: *R. equi*-Impfstoff (n = 35)

Laufende Nummer	Stuten- Nummer	Geschlecht	Geburts- Datum	Erkrankungs- Datum	Erkrankungs- Alter (Tage)	Abszess- Anzahl	Abszess- Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/ μ l Blut)
1	82130	w	09.07.	29.08.	51	4	10,5	0	19.900
2	84182	m	23.07.	17.10.	86	3	4	0	13.800
3	87303	w	06.09.	30.10.	54	1	1,5	2	13.300
4	88307	w	10.08.	27.11.	109	1	1	2	11.000
5	91633	w	05.08.						
6	91646	m	11.08.	25.09.	45	1	1	0	16.400
7	92808	w	02.08.	06.11.	96	3	5	0	13.300
8	93160	m	19.07.	14.09.	57	1	1	1	19.300
9	94017	m	29.07.	27.11.	47	4	4,5	0	13.200
10	94159	w	11.07.						
11	94209	w	17.07.	04.09.	49	2	4,5	0	14.800
12	95224	w	04.08.						
13	96154	m	15.07.	29.08.	45	1	1	0	23.900
14	96194	m	31.08.	13.11.	74	3	3,5	0	24.200
15	96209	w	16.10.						
16	97101	m	16.07.	29.08.	44	2	3	0	13.700
17	98025	m	14.07.	10.10.	88	1	2	0	11.400
18	98046	m	30.07.	26.09.	58	1	1,5	0	20.800

ANHANG

Tab. 6: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 35 aus Gruppe A: *R. equi*-Impfstoff (n = 35)

Laufende Nummer	Stuten-Nummer	Geschlecht	Geburts-Datum	Erkrankungs-Datum	Erkrankungs-Alter (Tage)	Abszess-Anzahl	Abszess-Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/µl Blut)
19	98142	w	26.07.	18.09.	54	1	1,5	3	10.100
20	99021	w	10.07.	08.11.	121	4	6	1	15.200
21	99096	m	23.08.	13.11.	82	1	1	5	16.700
22	99155	m	25.07.	01.11.	102	2	2	5	12.900
23	00029	w	06.09.	25.09.	19	4	5,5	0	16.900
24	00061	m	12.07.	09.10.	89	1	1	1	15.200
25	00073	w	03.09.	30.10.	57	1	2,5	0	24.200
26	00086	m	18.08.	27.11.	101	12	18,5	2	7.900
27	01004	m	21.07.	04.09.	45	1	1	1	20.800
28	01030	w	16.08.	23.10.	68	1	1,5	0	13.400
29	01051	m	12.07.						
30	01204	w	03.08.						
31	02116	w	20.08.	16.10.	57	1	1,5	0	14.800
32	02154	m	13.07.	14.09.	63	5	7	0	17.000
33	02278	m	27.07.	09.10.	74	1	1	0	14.900
34	03000	m	24.07.						
35	03290	m	07.07.						

ANHANG

Tab. 7: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe B: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 36)

Laufende Nummer	Stuten- Nummer	Geschlecht	Geburts- Datum	Erkrankungs- Datum	Erkrankungs- Alter (Tage)	Abszess- Anzahl	Abszess- Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/µl Blut)
1	87274	m	02.09.						
2	87281	w	28.07.	30.10.	94	1	2	1	16.000
3	87282	w	12.07.	09.10.	89	1	1	6	12.000
4	88449	w	22.08.	13.11.	83	2	5	3	20.700
5	90445	m	11.07.	01.11.	113	5	6,5	4	10.800
6	90503	w	06.09.	18.12.	100	3	4	0	13.300
7	90518	m	10.07.	30.08.	51	2	2,5	0	13.700
8	91533	w	07.08.	05.10.	56	2	2	2	20.900
9	92803	m	22.08.	03.12.	73	13	18	3	10.900
10	93170	w	26.07.	23.10.	89	7	8	2	5.000
11	94006	w	12.07.	07.08.	26	1	1,5	3	11.100
12	96048	m	09.07.	29.08.	50	1	2	0	16.600
13	96170	m	02.08.	23.10.	82	1	1	1	14.100
14	96197	w	07.09.	13.11.	67	6	8,5	0	18.000
15	97220	m	16.08.						
16	98037	w	20.08.	09.10.	50	1	3	5	18.000
17	98253	w	18.07.	18.10.	92	3	5,5	1	16.800
18	99014	m	11.07.	13.11.	125	3	5,5	1	14.900

ANHANG

Tab. 8: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 36 aus Gruppe B: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 36)

Laufende Nummer	Stuten-Nummer	Geschlecht	Geburts-Datum	Erkrankungs-Datum	Erkrankungs-Alter (Tage)	Abszess-Anzahl	Abszess-Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/µl Blut)
19	99051	m	26.07.	09.10.	75	1	1,5	1	12.900
20	99060	m	15.08.	23.10.	69	1	1	3	16.100
21	99119	w	13.07.	26.10.	105	5	6,5	4	10.400
22	99123	w	16.10.						
23	99179	m	26.08.	11.12.	107	2	2	3	11.300
24	00006	m	05.08.	18.09.	41	2	4	0	13.000
25	00162	m	15.07.	16.10.	93	1	1,5	0	13.400
26	00176	w	16.07.						
27	01062	w	03.08.						
28	01244	m	12.08.	25.09.	44	2	3	0	7.600
29	01246	m	31.07.	04.10.	65	1	3	0	13.000
30	02023	m	28.07.	01.10.	65	1	2,5	0	13.600
31	02118	m	09.08.						
32	03154	w	07.07.	22.08.	46	2	4	0	16.600
33	03215	m	19.07.	30.10.	103	1	1,5	0	14.900
34	03241	w	21.07.	14.09.	55	2	4,5	5	14.000
35	03283	w	15.07.	23.08.	39	1	2,5	1	13.200
36	03287	w	24.07.	26.10.	94	3	5,5	2	13.900

ANHANG

Tab. 9: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe C: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml (n = 36)

Laufende Nummer	Stuten- Nummer	Geschlecht	Geburts- Datum	Erkrankungs- Datum	Erkrankungs- Alter (Tage)	Abszess- Anzahl	Abszess- Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/µl Blut)
1	87301	m	15.07.						
2	89381	m	11.08.						
3	90477	w	30.07.	13.11.	106	2	2	0	15.000
4	91577	m	23.08.	06.11.	75	10	17	1	16.500
5	93157	m	19.10.						
6	93179	w	10.07.	13.10.	95	1	1	3	18.100
7	94201	w	26.07.	14.08.	19	2	2	0	18.100
8	94208	w	05.09.						
9	94221	m	19.08.	11.10.	53	3	3	0	14.800
10	95123	w	13.07.	14.09.	63	2	3,5	0	13.000
11	95160	w	12.08.	27.11.	107	3	3	1	20.800
12	95213	m	12.07.	04.09.	54	1	1	0	19.600
13	95225	w	03.08.	18.09.	46	1	1	1	14.400
14	96106	m	14.07.						
15	96196	m	28.08.	13.11.	77	6	8,5	1	14.100
16	96202	m	28.07.	18.09.	52	3	5	0	14.300
17	97203	m	21.07.	18.09.	59	1	1,5	0	13.500
18	97235	m	05.08.	23.10.	79	1	1,5	0	16.900

ANHANG

Tab. 10: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 36 aus Gruppe C: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml (n = 36)

Laufende Nummer	Stuten-Nummer	Geschlecht	Geburts-Datum	Erkrankungs-Datum	Erkrankungs-Alter (Tage)	Abszess-Anzahl	Abszess-Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/µl Blut)
19	98125	w	20.08.	30.10.	71	11	18	3	15.300
20	99013	w	21.07.	18.09.	59	1	1,5	0	14.200
21	99089	m	16.08.	16.10.	61	2	2,5	0	13.200
22	99113	m	24.07.	16.10.	84	3	3	1	16.800
23	99123	w	16.10.						
24	99168	w	07.07.	22.08.	46	2	2	0	16.100
25	00002	m	31.08.	10.11.	71	4	8,5	3	20.100
26	00080	m	07.08.						
27	00082	m	26.07.	02.10.	68	2	2	0	18.600
28	01037	w	28.07.						
29	01110	m	31.07.	01.11.	93	9	11,5	2	17.300
30	01127	m	18.07.	29.08.	42	1	2	0	14.800
31	01132	m	16.07.	29.08.	44	3	4,5	0	21.300
32	01143	m	12.07.	25.09.	75	1	1,5	0	13.000
33	01250	w	20.07.	23.10.	95	6	8,5	2	13.200
34	01255	w	08.07.	22.08.	45	1	2,5	0	16.900
35	02216	m	11.07.						
36	02240	w	09.08.	06.11.	89	5	5	0	14.400

ANHANG

Tab. 11: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe D: Placebo (n = 32)

Laufende Nummer	Stuten- Nummer	Geschlecht	Geburts- Datum	Erkrankungs- Datum	Erkrankungs- Alter (Tage)	Abszess- Anzahl	Abszess- Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/ μ l Blut)
1	85235	m	06.08.	11.10.	66	1	2,5	0	17.800
2	87304	w	12.07.	08.11.	119	1	2,5	3	18.100
3	89358	m	20.08.						
4	89405	m	25.08.	06.11.	73	5	8,5	1	7.800
5	91570	w	17.08.	13.11.	76	9	10	3	10.300
6	91618	w	24.07.	23.10.	91	1	2,5	0	14.200
7	93169	m	12.07.	24.08.	43	1	1	0	13.100
8	94186	w	17.07.						
9	94203	m	24.07.	04.09.	42	1	1,5	0	14.200
10	95145	w	19.07.	08.11.	112	3	4,5	0	15.300
11	95219	w	12.07.	01.11.	112	1	1	2	10.900
12	96125	w	25.07.	20.09.	57	3	4	2	15.500
13	96192	w	29.07.	30.10.	37	4	5	3	8.500
14	97223	m	06.08.	28.08.	22	5	6	0	15.800
15	97228	w	26.07.	26.09.	62	2	2,5	1	18.300
16	98049	m	19.08.	30.10.	72	9	16,5	5	19.900
17	98250	m	09.07.	22.08.	44	1	3	3	11.000
18	99022	w	31.08.	20.11.	81	1	2	0	13.100

ANHANG

Tab. 12: Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 32 aus Gruppe D: Placebo (n = 32)

Laufende Nummer	Stuten- Nummer	Geschlecht	Geburts- Datum	Erkrankungs- Datum	Erkrankungs- Alter (Tage)	Abszess- Anzahl	Abszess- Score (cm)	Klinischer Score	Leukozyten (/ μ l Blut)
19	99142	m	20.07.	04.09.	46	1	1,5	1	28.600
20	99167	m	11.08.						
21	00020	m	23.08.	15.09.	23	1	1	0	20.500
22	01071	m	05.09.	02.10.	27	2	4,5	0	9.100
23	01156	m	12.08.	04.09.	23	6	12,5	0	15.200
24	01227	m	11.07.	04.09.	55	3	4,5	1	15.600
25	02097	m	15.07.	04.10.	81	2	2	1	15.000
26	02149	w	29.07.	26.10.	89	9	13,5	4	9.400
27	02165	m	10.08.						
28	02254	m	02.10.	11.12.	71	1	1	1	14.000
29	03082	w	03.08.	30.08.	27	2	2	1	14.000
30	03185	w	10.07.	04.09.	52	2	10	2	24.600
31	03211	w	17.07.						
32	03246	w	27.07.	05.09.	40	1	1	0	13.200

Tab. 14: Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) der Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Blutleukozytenzahl“ unter den Impfgruppen; ermittelt durch den Kruskal-Wallis-Test

Parameter	Irrtums-Wahrscheinlichkeit (p-Wert)
Erkrankungsalter (in Tagen)	p = 0,343
Abszess-Anzahl	p = 0,505
Abszess-Score (in cm)	p = 0,441
Klinischer Score	p = 0,047
Blutleukozyten (/ μ l)	p = 0,064

Tab.15: Anteil der erkrankten Fohlen der einzelnen Impfgruppen an den unterschiedlichen Managementregimes „Beobachtung“; „Beobachtung → Therapie“ oder „sofort Therapie“

Gruppe	Beobachtung	Beobachtung → Therapie	sofort Therapie
Gruppe A (n=27)	3 (11,1 %)	5 (18,5 %)	19 (70,4 %)
Gruppe B (n=30)	3 (10 %)	11 (36,7)	16 (53,3 %)
Gruppe C (n=27)	6 (22,2 %)	10 (37 %)	11 (40,8 %)
Gruppe D (n=27)	1 (3,7 %)	10 (37 %)	16 (59,3 %)

Gruppe A = *R. equi*-Impfstoff; Gruppe B = *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 μ g/ml; Gruppe C = *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 μ g/ml; Gruppe D = Placebo

Tab. 16 Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe A: *R. equi*-Impfstoff (n = 27)

Parameter	MW \pm SD	CI	$X_{0,5}$	IQA
Erkrankungsalter (Tage)	70,6 \pm 25,9	[60,3 ; 80,8]	63	[51 ; 89]
Abszess-Anzahl	2,3 \pm 2,3	[1,4 ; 3,3]	1	[1 ; 3]
Abszess-Score (cm)	3,5 \pm 3,8	[2 ; 5]	2	[1 ; 4,5]
Klinischer Score	0,9 \pm 1,5	[0,3 ; 1,4]	0	[0 ; 1]
Leukozyten (/ μ l Blut)	15888,9 \pm 4261	[14203,3 ; 17574,5]	14900	[13000 ; 19300]

Tab. 17: Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe B: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 30)

Parameter	MW ± SD	CI	$X_{0,5}$	IQA
Erkrankungsalter (Tage)	76 ± 25,7	[66,4 ; 85,6]	78,5	[51 ; 96,3]
Abszess-Anzahl	2,6 ± 2,5	[1,6 ; 3,5]	2	[1 ; 3]
Abszess-Score (cm)	4 ± 3,4	[2,7 ; 5,2]	3	[1,9 ; 5,5]
Klinischer Score	1,7 ± 1,8	[1 ; 2,4]	1	[0 ; 3]
Leukozyten (/µl Blut)	13890 ± 3398	[12620 ; 15159]	13650	[11825 ; 16225]

Tab. 18 Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe C: *R. equi*-Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/m (n = 27)

Parameter	MW ± SD	CI	$X_{0,5}$	IQA
Erkrankungsalter (Tage)	67,7 ± 21,6	[59,2 ; 76,2]	68	[52 ; 84]
Abszess-Anzahl	3,2 ± 2,9	[2,1 ; 4,4]	2	[1 ; 4]
Abszess-Score (cm)	4,6 ± 4,6	[2,7 ; 6,4]	2,5	[1,5 ; 5]
Klinischer Score	0,7 ± 1	[0,3 ; 1,1]	0	[0 ; 1]
Leukozyten (/µl Blut)	16085,2 ± 2478	[15104,9 ; 17065,5]	15300	[14200 ; 18100]

Tab. 19 Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe D: Placebo (n = 27)

Parameter	MW ± SD	CI	$X_{0,5}$	IQA
Erkrankungsalter (Tage)	63,5 ± 28,7	[52,1 ; 74,8]	62	[42 ; 88]
Abszess-Anzahl	2,9 ± 2,6	[1,9 ; 3,9]	2	[1 ; 4]
Abszess-Score (cm)	4,7 ± 4,3	[3 ; 6,4]	2,5	[1,5 ; 6]
Klinischer Score	1,3 ± 1,4	[0,7; 1,8]	1	[0 ; 2]
Leukozyten (/µl Blut)	14925,9 ± 4763	[13041,7 ; 16810,1]	14200	[11000 ; 17800]

Verzeichnis der Tabellen

Nr.	Titel	Seite
Tab. 1	Klinischer Score zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen Befunde des Atmungsapparates (mod. nach Ohnesorge et al., 1998)	44
Tab. 2	Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) zur Darstellung der Signifikanzen von Unterschieden	49
Tab. 3	Klinischer Score und Blutleukozytenzahl	57
Tab. 4	Abszess-Anzahl [cm] und Abszess-Score	60
Tab. 5	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe A: <i>R. equi</i> -Impfstoff (n = 35)	93
Tab. 6	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 35 aus Gruppe A: <i>R. equi</i> -Impfstoff (n = 35)	94
Tab. 7	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe B: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 36)	95
Tab. 8	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 36 aus Gruppe B: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 36)	96
Tab. 9	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe C: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml (n = 36)	97
Tab. 10	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 36 aus Gruppe C: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml (n = 36)	98
Tab. 11	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 1 bis 18 aus Gruppe D: Placebo (n = 32)	99
Tab. 12	Geschlechterverteilung, Erkrankungsalter und Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchung zum Diagnosezeitpunkt der Fohlen 19 bis 32 aus Gruppe D: Placebo (n = 32)	100
Tab. 13	Morbidität in den einzelnen Impfgruppen	101
Tab. 14	Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) der Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Blutleukozytenzahl“ unter den Impfgruppen; ermittelt durch den Kruskal-Wallis-Test	101
Tab. 15	Anteil der erkrankten Fohlen der einzelnen Impfgruppen an den unterschiedlichen Managementregimes „Beobachtung“; „Beobachtung → Therapie“ oder „sofort Therapie“	102

Tab. 16	Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe A: <i>R. equi</i> -Impfstoff (n = 27)	103
Tab. 17	Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe B: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 500 µg/ml (n = 30)	104
Tab. 18	Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe C: <i>R. equi</i> -Impfstoff mit Adjuvans CpG, 50 µg/ml (n = 27)	105
Tab. 19	Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Konfidenzintervalle (CI), Mediane ($X_{0,5}$) und Interquartilabstände (IQA) für die Parameter „Erkrankungsalter“, „Abszess-Anzahl“, „Abszess-Score“, „Klinischer Score“ und „Leukozyten“ in Gruppe D: Placebo (n = 27)	106

Verzeichnis der Abbildungen

Nr.	Titel	Seite
Abb. 1	Intranasal-Applikator	42
Abb. 2	Befundbogen zur sonographischen Untersuchung der Lunge	47
Abb. 3	Anteil der an Lungenabszessen erkrankten Fohlen in den Impfgruppen	50
Abb. 4	Erkrankungsalter der Fohlen in den einzelnen Impfgruppen (in Tagen)	51
Abb. 5	Neuerkrankungen im Verlauf der ersten 20 Lebenswochen	52
Abb. 6	Anzahl der in den ersten 140 Lebenstagen erkrankenden Fohlen im Vergleich zur Gesamtpopulation	53
Abb. 7	Klinischer Score zum Diagnosezeitpunkt	55
Abb. 8	Blutleukozytenkonzentrationen der Fohlen der einzelnen Impfgruppen zum Diagnosezeitpunkt	56
Abb. 9	Anzahl der Lungenabszesse bei den Fohlen der vier Impfgruppen zum Diagnosezeitpunkt	58
Abb. 10	Abszess-Score (Summe der Abszessdurchmesser) bei den Fohlen der vier Impfgruppen zum Diagnosezeitpunkt (in cm)	59
Abb. 11	Management bei den an abszedierender Pneumonie erkrankten Fohlen der einzelnen Impfgruppen	62

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. E. Klug für die Überlassung des sehr interessanten Dissertationsthemas.

Frau Dr. M. Venner möchte ich herzlich für die intensive fachliche (und moralische) Unterstützung und die produktive Zusammenarbeit danken.

Herrn P. Schockemöhle danke ich für die Bereitstellung der Pferde, die finanzielle Unterstützung und kooperative Zusammenarbeit.

Ich danke Nicole Dittrich, Anke Krumbiegel, Nicole Neudert, Britta Richter, Birthe Schock und Steffi Retteg für ihre Hilfe bei der Probennahme.

Den Mitarbeitern des Gestüts Lewitz, insbesondere Herrn P. Baumgart und Herrn F. Piper gilt mein Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Studie.

Ein großer Dank an Bernd Schliffkowitz für seine ständige Hilfsbereitschaft.

Meinem Lieblings-Opa danke ich für all die lieben Zeilen, die mich in der Lewitz erreicht haben.

Einen besonderen Dank an meine Brüder Jens und Simon für offene Ohren und sämtliche Motivations- und PC-Hilfen!

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern Klaus und Waltraud Müller-Alander danken, die mir das Studium und diese Dissertation überhaupt erst möglich gemacht und an mich geglaubt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Freund Clemens Heider.
Ohne Dich wäre vieles ganz anders gelaufen, auch diese Dissertation.
Dir für alles Dankeschön zu sagen, würde wohl den Rahmen sprengen.
Ich bin einfach dankbar für den Tag, an dem wir uns begegnet sind.