

Aus der Klinik für Pferde  
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

---

**Untersuchung der Wirksamkeit des Paramunitätsinducers Zylexis®  
zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
(Dr. med. vet.)  
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von  
**Ina Dagmar Baumann**  
aus Meppen

Hannover 2006

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. E. Klug

1. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. E. Klug

2. Gutachter:

Univ.-Prof. Dr. J. Rehage

Tag der mündlichen Prüfung: 22.05.2006

**Meinen Eltern**



# Inhaltsverzeichnis

<b><u>1 Einleitung</u></b> .....	<b>1</b>
<b><u>2 Literaturübersicht</u></b> .....	<b>2</b>
<b>2.1 Die Rhodococcus equi-Infektion</b> .....	<b>2</b>
2.1.1 Ätiologie .....	2
2.1.2 Pathogenese.....	3
2.1.2.1 Virulenzfaktoren im Rahmen der Pathogenese.....	4
2.1.3 Klinische Symptome der <i>Rhodococcus equi</i> -Erkrankung.....	6
2.1.3.1 Bronchopneumonie des Fohlens.....	6
2.1.3.2 Extrapulmonale Erkrankungsformen .....	8
2.1.4 <i>R. equi</i> -Infektionen bei anderen Spezies .....	8
2.1.5 Pathologische Befunde bei einer <i>Rhodococcus equi</i> -Erkrankung.....	9
2.1.6 Diagnose der <i>Rhodococcus equi</i> -Erkrankung .....	10
2.1.6.1 Labordiagnostischer und kultureller Nachweis von <i>Rhodococcus equi</i> .....	10
2.1.6.2 Serologische und molekularbiologische Nachweisverfahren .....	12
2.1.7 Bildgebende Verfahren in der Diagnostik abszedierender Pneumonien .....	13
2.1.7.1 Vergleich der Röntgen- und der Ultraschalluntersuchung.....	13
2.1.7.2 Sonographie im Rahmen der <i>Rhodococcus equi</i> -Pneumonie.....	14
2.1.8 Prognose der <i>Rhodococcus equi</i> -Pneumonie .....	15
2.1.9 Prophylaxe der <i>Rhodococcus equi</i> -Pneumonie .....	16
2.1.9.1 Management und Haltungsbedingungen .....	16
2.1.9.2 Hyperimmunplasma .....	17
2.1.9.3 Prophylaxe durch Vakzination.....	19
2.1.10 Therapie der <i>Rhodococcus equi</i> -Infektion.....	20
<b>2.2 Weitere Erreger von Lungenabszessen bei Fohlen: <i>Streptococcus equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i></b> .....	<b>21</b>
<b>2.3 Immunologie</b> .....	<b>23</b>
2.3.2 Immunsystem des Fohlens in der peripartalen Phase .....	24
2.3.3.1 Die zelluläre Immunantwort.....	25
2.3.3.2 Die humorale Immunantwort .....	27
<b>2.4 Paramunitätsinducer</b> .....	<b>28</b>

2.4.1	Allgemeines und Begriffsdefinition .....	28
2.4.2	Substanzen und Präparate zur Immunstimulierung .....	29
2.4.3	Immunstimulantien aus Pockenviren.....	30
2.4.3.1	Studien zur klinischen Wirksamkeit von Parapoxviruspräparaten .....	31
2.4.3.2	Labordiagnostischer Nachweis von immunologischen Reaktionen auf Parapoxviruspräparate.....	33
2.4.4	Der Immunmodulator Zylexis® .....	35
2.4.4.1	Indikation, Herstellung und Inhaltsstoffe .....	35
2.4.4.2	Anwendung: parenteral versus lokal .....	36

### **3 Probanden, Material und Methode..... 39**

<b>3.1</b>	<b>Probanden.....</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Haltung und Fütterung.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Geburtshygiene und –überwachung sowie Erstversorgung der Fohlen... 40</b>	
<b>3.4</b>	<b>Bedingungen für die Aufnahme in die Studie .....</b>	<b>41</b>
<b>3.5</b>	<b>Impfungen und Entwurmungen.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6</b>	<b>Einteilung in Gruppen .....</b>	<b>42</b>
3.6.1	Gruppe A (Zylexis® s.c.).....	42
3.6.2	Gruppe B (Zylexis® i.n.).....	43
3.6.3	Gruppe C (Kontrollgruppe).....	43
<b>3.7</b>	<b>Die Applikationszeitpunkte von Zylexis® für ein Fohlen im Laufe der Studie .....</b>	<b>43</b>
<b>3.8</b>	<b>Der Paramunitätsinducer Zylexis® .....</b>	<b>44</b>
<b>3.9</b>	<b>Klinische Untersuchung der Fohlen .....</b>	<b>45</b>
3.9.1	Spezielle Untersuchung des Respirationstraktes .....	45
<b>3.10</b>	<b>Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut.....</b>	<b>47</b>
<b>3.11</b>	<b>Ultrasonographische Untersuchung der Lunge .....</b>	<b>47</b>
3.11.1	Durchführung der ultrasonographischen Untersuchung.....	47
3.11.2	Befunde der ultrasonographischen Untersuchung .....	48
<b>3.12</b>	<b>Gewinnung von Tracheobronchialsekret zum Erregernachweis .....</b>	<b>49</b>
<b>3.13</b>	<b>Beurteilung des Gesundheitsstatus eines Fohlens .....</b>	<b>49</b>
<b>3.14</b>	<b>Behandlung der erkrankten Fohlen .....</b>	<b>50</b>
<b>3.15</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>51</b>

<b><u>4</u></b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b><u>53</u></b>
4.1	Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Zylexis®	53
4.2	Anzahl erkrankter Fohlen	53
4.3	Fohlen, die vorzeitig aus der Studie ausschieden	55
4.4	Auftreten von Rezidiven	56
4.5	Befunde der klinischen und hämatologischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	57
4.6	Befunde der sonographischen Untersuchung der Lunge zum Zeitpunkt der Diagnosestellung	59
4.7	Ergebnisse des Erregernachweises	61
4.8	Vergleich des Erkrankungsalters	62
4.9	Vergleich der Behandlung der an Lungenabszessen erkrankten Fohlen	65
4.10	Zeitpunkt des Therapiebeginns	66
4.11	Dauer der Behandlung	67
4.12	Zeit bis zur Spontanremission bei den erkrankten Fohlen ohne Behandlung	68
4.13	Einfluss der Haltung auf die Erkrankungsrate	70
4.14	Auftreten von Nabelentzündungen	71
4.15	Einfluss einer Antibiotikagabe in der neonatalen Phase auf die Erkrankungsrate	71
<b><u>5</u></b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>73</u></b>
5.1	Probanden	73
5.2	Haltungsbedingungen	74
5.3	Auswahl des Präparates	75
5.4	Verabreichungsprotokoll für Zylexis®	77
5.5	Auswahl der Untersuchungsparameter	79
5.6	Schweregrad der Erkrankungen und Erkrankungsformen	80
5.7	Effektivität von Zylexis® in der Prävention abszedierender Pneumonien	81
5.8	Schlussfolgerung	82
<b><u>6</u></b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>83</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>Summary</u></b>	<b><u>85</u></b>

<b><u>8</u></b>	<b><u>Literaturverzeichnis .....</u></b>	<b><u>87</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>Anhang .....</u></b>	<b><u>112</u></b>
9.1	Untersuchungsergebnisse .....	112
9.2	Befundbögen .....	123
9.3	Abbildungsverzeichnis .....	125
9.4	Tabellenverzeichnis .....	126



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

<	kleiner als
>	größer als
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AGID	Agar Gel Immunodiffusion
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage
BCG	Bacillus-Calmette-Guerin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cm	Zentimeter
d.h.	das heißt
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
evt.	eventuell
α	alpha (griech.)
β	beta (griech.)
γ	gamma (griech.)
G	Gauge
G/l	Giga pro Liter
g/l	Gramm pro Liter
ggr.	geringgradig
GKID	Gewebekultur infektiöse Dosis
h	Stunden
hgr.	hochgradig
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
i.m.	intramuskulös
i.n.	intranasal
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
Kg	Kilogramm

KGW	Körpergewicht
l	Liter
Lnn.	Lymphonodi
µg	Mikrogramm
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm
mgr.	mittelgradig
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
n	Stichprobenumfang
NANAT	Nalidixin-Acid-Novobiocin-Acid-Tellurit
Nr.	Nummer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
<i>PCR</i>	<i>polymerase chain reaction</i>
PIND-AVI	inaktiviertes aviäres Parapoxvirus (Laborbezeichnung)
PIND-ORF	inaktiviertes Parapoxvirus ovis (Laborbezeichnung)
s.	siehe
StdAbw.	Standardabweichung
s.c.	subkutan
Tab.	Tabelle
TBS	Tracheobronchalsekret
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helferzelle
T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zelle	Subpopulationen von T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
u.U.	unter Umständen
v.a.	vor allem
Vap	Virulenzassoziiertes Protein
x	multipliziert mit
z.B.	zum Beispiel
z. Zt.	zur Zeit

## 1 Einleitung

Atemwegserkrankungen stellen beim Fohlen neben Durchfallerkrankungen die häufigsten und verlustreichsten Faktoren in der Fohlenaufzucht dar. Eine besonders schwere Form der Pneumonie wird durch den Erreger *Rhodococcus equi* verursacht. Dieser weltweit verbreitete intrazellulär in Makrophagen lebende Keim führt hauptsächlich bei zwei bis sechs Monate alten Fohlen zu Bronchopneumonien und pyogranulomatösen Veränderungen der Lunge (MARTENS et al, 1991). Ein weiterer Erreger der Lungenabszesse bei Fohlen verursachen kann, ist *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*.

Durch seine relative Unempfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen, wie z.B. Sonnenlicht und Änderungen des pH-Wertes, kann *Rhodococcus equi* auf Gestüten zu endemischen Erkrankungsformen führen. In den betroffenen Betrieben verursacht die Rhodokokkose zum Teil eine erhebliche Morbidität und auch Mortalität unter den Fohlen. Dadurch hat der Erreger auch eine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung. Da eine Früherkennung der Rhodokokkose zeitaufwendig und ebenso wie die Therapie sehr kostenintensiv ist, spielt die Prophylaxe eine entscheidende Rolle. Hierfür wird schon lange ein geeigneter Weg gesucht, doch eine wirksame Methode existiert zur Zeit nicht.

Da es Hinweise dafür gibt, dass bei Fohlen die humorale Immunantwort keinen Schutz gegen die *R. equi*-Pneumonie darstellt, wird die zelluläre Immunantwort beim Neonaten als ein Ansatz zur Vorbeugung der Rhodokokkose diskutiert. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu ermitteln, ob die Gabe eines immunmodulierenden Präparates der Entwicklung von Lungenabszessen bei Fohlen vorbeugen kann. In dieser Studie wird an Fohlen eines Warmblutgestütes, auf dem *R. equi*-Erkrankungen endemisch sind, die Wirksamkeit des Immunmodulators Zylexis® zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen untersucht. Dabei soll geprüft werden, ob über wiederholte systemische oder aber lokale, mukosale Stimulation der Immunabwehr die Resistenz des Fohlens gegenüber einer *R. equi*-Erkrankung zu erhöhen ist.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die *Rhodococcus equi*-Infektion

#### 2.1.1 Ätiologie

*Rhodococcus equi* (kurz: *R. equi*) wurde zum ersten Mal 1923 von MAGNUSSON in Schweden als Erreger einer purulenten Bronchopneumonie bei Fohlen beschrieben und wurde zunächst *Corynebacterium equi* genannt. Im gleichen Jahr berichteten MIESSNER und WETZEL in Hannover von einem die Existenz eines Gestütes bedrohenden Erreger, den sie *Corynebacterium pyogenes equi* nannten. 1980 wurde der Erreger taxonomisch in das Genus *Rhodococcus* eingeordnet und als *Rhodococcus equi* aufgeführt.

In der Morphologie stellt sich der Keim als pleomorpher, grampositiver, unbeweglicher Keim mit einer Polysaccharidkapsel dar (MAGNUSSON, 1923; WILSON, 1955; SMITH, 1966). Den fakultativ intrazellulären Charakter von *R. equi* entdeckte schon MAGNUSSON (1923). Er wies den Erreger in Zellen der Leukozytenfraktion aus den pyogranulomatösen Lungenveränderungen nach. *R. equi* ist eng verwandt mit den Mykobakterien, besonders mit *Mycobacterium tuberculosis*, so dass sogar ein Großteil ihrer Gensequenzen sehr ähnlich ist (RAHMAN et al., 2003). Beide gehören zu den Mycolata, welche bestimmte Glykolipide in der Zellwand aufweisen, die typische komplexe, verzweigte Fettsäuren enthalten (sog. Mycolic acids). Diese Glykolipide sind wichtig, um in schwierigen Umweltbedingungen, wie z.B. in Makrophagen, überleben zu können (GARTON et al., 2002, MEIJER und PRESCOTT, 2004).

Bereits MAGNUSSON gelang die Anzüchtung von *R. equi* aus Abszessinhalten auf unterschiedlichen Nährmedien wie Agar, Gelatine und Bouillon bei einem pH-Optimum zwischen pH 6-8. Dabei beschrieb er eine hellrote bis lachsfarbene Pigmentierung der verwendeten Medien auf denen der Keim wuchs. Später entwickelten WOOLCOCK et al. (1979) das sogenannte NANAT-Selektivmedium für die gezielte Anzüchtung von *R. equi*.

Wiederum war es MAGNUSSON, der die hohe Widerstandskraft des Erregers gegen Umwelteinflüsse als erstes beschrieb. Ihm fiel die relative Unempfindlichkeit gegenüber UV-Licht auf. Obwohl *R. equi* keine Sporen bildet, ist er sehr resistent gegenüber dem Einsatz von Säuren, Laugen und Desinfektionsmitteln (MAGNUSSON, 1923; ELLENBERGER u. GENETZKY, 1986).

Der Erreger kommt ubiquitär vor. Die Ansprüche an die Wachstumsbedingungen sind gering. *R. equi* bevorzugt höhere Temperaturen; die optimale Temperatur liegt bei 37°C (MAGNUSSON, 1923, FALCON et al., 1985, TAKAI et al., 1986).

Aus dem Verdauungstrakt von gesunden Pferden, aber auch anderen Haustieren und aus Bodenproben konnte der Erreger isoliert werden (WILSON, 1955; TAKAI, 1985; DEBEY, 1987). Im Erdboden und im Verdauungstrakt von Fohlen ist *R. equi* sogar in der Lage, sich zu vermehren; im Verdauungstrakt erwachsener Pferde hingegen kann er lediglich überleben (TAKAI et al., 1986b).

In den oberen Erdschichten wurde *R. equi* bis zu einer Tiefe von 30 cm nachgewiesen (COHEN et al., 2002). Im Boden bleibt die Fähigkeit zu Vermehrung unter idealen Bedingungen für den Erreger über eine lange Zeit, sogar bis zu mehreren Jahren, bestehen (WILSON, 1955; ARDANS et al., 1986). Sandige, trockene Böden und warmes Klima bieten *R. equi* besonders gute Bedingungen (BARTON und HUGHES, 1984).

### **2.1.2 Pathogenese**

Natürliche Infektionen mit *R. equi* treten meistens bei Fohlen auf. Äußerst selten treten Infektionen beim erwachsenen Pferd auf; meist liegt bei einem erwachsenen Tier dann eine Immunschwäche vor (FREESTONE et al., 1987). Vielfach wird eine Anfälligkeit für eine Erkrankung durch *R. equi* durch eine Unreife der humoralen und zellvermittelten Immunantwort des Fohlens angenommen (YAGER, 1987, TAKAI et al., 1995, AINSWORTH, 1999). Andere Untersuchungen belegen allerdings, dass ein Fohlen zum Zeitpunkt der Geburt immunkompetent ist (GIGUÈRE und POLKES, 2005). Es wurden aber immunmodulatorische Eigenschaften von *R. equi* nachgewiesen, die zu einer unwirksamen Immunantwort bei den Fohlen führen (GIGUÈRE, 1999 ; HOOPER-MCGREY, 2003; MEIJER und PRESCOTT, 2004).

Am häufigsten erkranken Fohlen in einem Alter zwischen zwei Wochen und sechs Monaten (BARTON und HUGHES, 1980; PRESCOTT, 1987; GIGUÈRE, 2001; ALTHAUS, 2004). Hauptsächlich Fohlen bis zu einem Alter von vier Monaten entwickeln deutliche klinische Symptome (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1997). Die hohe Erkrankungsrate im Alter zwischen vier und sechs Wochen ist möglicherweise korreliert mit dem Absinken der maternalen Antikörper im Blut des Fohlens (AINSWORTH, 1999). Die Infektion mit *R. equi* findet vermutlich früher als zunächst angenommen, also noch vor dem Absinken der maternalen Antikörper im Alter von

vier bis sechs Wochen, statt. Es wird inzwischen von einer Infektion innerhalb der ersten Lebenswoche des Fohlens ausgegangen (COHEN et al., 2001; ALTHAUS, 2004). Bisher konnte nicht nachgewiesen werden, dass fohlenspezifische Faktoren für eine Erkrankung prädisponierend sind (CHAFFIN et al., 2003). Es bestehen allerdings Hinweise auf gestütsbezogene und jahres- sowie jahreszeitabhängige Erkrankungen (CHAFFIN et al., 2003). So kommen *Rhodococcus equi* bedingte Erkrankungen unter den Fohlen auf einigen Gestüten endemisch vor und in anderen Auszuchtbetrieben nur sporadisch. Aufgrund der Daten von 5230 Fohlen aus 138 Zuchtbetrieben ergab sich, dass größere Betriebe mit mehr als 15 Fohlen häufiger von *R. equi*-Pneumonien betroffen sind (COHEN et al., 2005). Auch ein gutes Management führte nicht zu einer Kontrolle oder einem Schutz vor *R. equi*-Erkrankungen. So sind es daher vermutlich wirtsspezifische Faktoren, die für die Entwicklung der Erkrankung entscheidend sind.

Bereits frühere Studien weisen auf eine jahreszeitabhängige Erkrankungsrate hin. Ein Großteil der Fälle wird während warmer, trockener Sommer diagnostiziert (HONDALUS, 1997). Diese Bedingungen sind nicht nur optimal für das Wachstum von *R. equi* im Boden, sondern sie liefern auch die Grundlage für ein staubiges Klima, in dem Fohlen proportional mehr kontaminierte Staubpartikel einatmen (HILLIDGE, 1986; TAKAI et al., 1987; GIGUÈRE, 2001; MEIJER und PRESCOTT, 2004).

Durch intratracheale Instillierung von *R. equi* gelang es schon MAGNUSSON (1923) bei einem Fohlen eine abszedierende Pneumonie zu erzeugen. Auch über das Sektionsbild der Lunge kommt er zur Vermutung einer Infektion durch Aspiration des Erregers. Eine Infektion mit *R. equi* via Aerosol induziert die gleichen Symptome wie eine natürliche Infektion (MARTENS et al., 1982). Die Ingestion von *R. equi* durch das Fohlen, zum Beispiel über die Aufnahme von Kot, ist eine Variante, über die eine starke Exposition vorkommt. Dieser Weg führte allerdings auf natürlichem Weg nicht zur Entwicklung von Pneumonien (JOHNSON et al., 1983).

### 2.1.2.1 Virulenzfaktoren im Rahmen der Pathogenese

Durch in vitro Studien wurde gezeigt, dass sich *Rhodococcus equi* in Makrophagen sehr schnell vermehren, die Phagosom-Lysosom-Verschmelzung verhindern und somit intrazellulär überleben kann (ZINK et al., 1985; AINSWORTH, 1999). Die

intrazelluläre Persistenz korreliert mit dem Ausbleiben des sogenannten „Respiratory burst“ nach der Phagozytose durch die Makrophagen (HIETALA et al., 1987b; BRUMBAUGH et al., 1990). Hierbei kommt es also nicht - wie üblich nach einer Phagozytose - zu einer Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen wie Superoxidradikalen, Wasserstoffperoxid und Stickstoffoxid durch die Zellen des Immunsystems. Die oben genannten Metaboliten haben eine bakterizide Wirkung und entstehen in einem Prozeß, der als „Respiratory burst“ bezeichnet wird.

In vitro Studien zeigten, dass eine Opsonierung von *R. equi* durch spezifische Antikörper mit einer erhöhten Phagosom-Lysosom-Verschmelzung korreliert (als Opsonierung bezeichnet man das Einhüllen von Krankheitserregern und Fremdpartikeln in Antikörper). Die Opsonierung durch Antikörper trägt somit zu einer erfolgreichen Abtötung des Erregers durch die equinen Makrophagen bei (HIETALA et al., 1987b; FLAMINIO et al., 1999). Eine aktuelle Studie an Zellkulturen mit Mäusemakrophagen zeigte dagegen, dass *R. equi* nicht in der Lage ist, die Phagosom-Lysosom-Verschmelzung zu verhindern. Vielmehr war der Säuregehalt in Phagolysosomen, die *R. equi* enthielten, herabgesetzt. Dies ließe vermuten, dass hierin eine Überlebensstrategie des Erregers besteht (TOYOOKA et al., 2005).

Die Virulenzmechanismen von *R. equi* blieben lange unbekannt, bis TAKAI et al. und TKACHUK-SAAD und PRESCOTT im Jahr 1991 zeitgleich die Virulenzplasmide entdeckten. Anders als in den meisten Umweltisolaten von *R. equi* fanden sie in Isolaten von Fohlen mit Pneumonien typische 80-90 kb große Plasmide, die sieben engverwandte Virulenzplasmide – VapA und VapC bis VapH – enthielten (TAKAI et al., 1991a + b; TKACHUK-SAAD und PRESCOTT, 1991).

Das Virulenzplasmid A wird temperaturabhängig auf der Bakterienoberfläche exprimiert und beeinflusst die anderen Virulenzplasmide (BYRNE et al., 2001). Das VapA ist aber alleine nicht ausreichend, um die Virulenz von *R. equi* vollständig aufrechtzuerhalten und zu erklären (GIGUÈRE et al., 1999b). Die anderen Virulenzplasmide sind mitverantwortlich für die Möglichkeit einer schnellen intrazellulären Replikation (HONDALUS und MOSSER, 1994).

Eine weitere Rolle für die Virulenz spielen in der Zellwand von *R. equi* enthaltene Glykolipide, die typische komplexe und verzweigte Fettsäuren enthalten (sog. Mycolic acids). *R. equi*-Stämme, die über längere dieser spezifischen Kohlenhydratketten verfügen, stellten sich im Mäuseversuch virulenter dar als solche mit kurzen Ketten (GOTOH et al., 1991). Als weitere mögliche Virulenzfaktoren wurden

Polysaccharide der Kapsel, die die Leukozytenfunktion hemmen, untersucht. Auch Enzyme wie die Cholesteroxidase und Cholinphosphohydrolase und Exoenzyme der Phospholipase C, sog. „equi-Faktoren“, die die Membranstabilität beeinflussen, wurden auf ihren Einfluß auf die Virulenz von *R. equi* getestet. Alle diese Faktoren fand man aber sowohl bei virulenten als auch bei avirulenten *R. equi* Stämmen (AINSWORTH, 1999; GIGUÈRE, 2001), so dass ihre genaue Funktion bei einer Infektion unklar blieb. In einer Studie wurde der Einfluss der Isocitratlyase, eines Enzyms, das für den Abbau von membranständigen Fettsäuren mittels  $\beta$ -Oxidation gebraucht wird, auf die Virulenz eines *R. equi*-Isolates untersucht (WALL et al., 2005). Sowohl im Mäuseversuch als auch im Infektionsversuch mit je vier drei Wochen alten Fohlen wurde eine experimentell hergestellte *R. equi*-Mutante, die keine Isocitratlyase synthetisieren kann, besser eliminiert als der ursprüngliche Stamm. Dadurch wurde der Einfluss des sog. *aceA*-Gens, welches die Gensequenz für die Isocitratlyase beinhaltet, auf die Virulenz von *Rhodococcus equi* bewiesen. Ebenso liegen Hinweise dafür vor, dass Membranlipide eine wichtige Rolle für ein intrazelluläres Überleben von *R. equi* nach der Phagozytose spielen (WALL et al., 2005).

### **2.1.3 Klinische Symptome der *Rhodococcus equi*-Erkrankung**

#### 2.1.3.1 Bronchopneumonie des Fohlens

Fohlen im Alter von einem bis sechs Monaten erkranken an einer chronischen, suppurativen Bronchopneumonie mit Bildung von Lungenabszessen und einer suppurativen Lymphadenitis. Die durch *R. equi* verursachte Erkrankung verläuft zunächst subklinisch und wird meist erst spät in einem Stadium erkannt, in dem die Lungenveränderungen weit fortgeschritten sind (MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, D., 1999; GIGUÈRE, 2001).

Eines der ersten klinischen Zeichen einer Rhodococcose kann mildes Fieber sein (GIGUÈRE, 2001). In einer klinischen Studie an 145 Fohlen hatten allerdings nur etwa zehn Prozent der Tiere zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine erhöhte Körpertemperatur von über 39°C (ALTHAUS, 2004). Dennoch fielen hier drei Fohlen allein durch Fieber auf und wiesen in der nachfolgenden ultrasonographischen



Untersuchung der Lunge Abszesse auf. Daher sind stets alle erhobenen Befunde wichtig, da es keinen alleinigen spezifischen Parameter für die Diagnose einer *R. equi*-Pneumonie gibt (LAVOIE et al., 1994; ALTHAUS, 2004). Beim Fortschreiten der Erkrankung können weitere Symptome, wie herabgesetzter Appetit, Lethargie, hohes Fieber und angestrenzte Atmung mit geblähten Nüstern dazu kommen. Husten und mukopurulenter Nasenausfluß treten auf, sind aber nicht immer vorhanden (MAGNUSSON, 1923; FALCON et al., 1985; ELLENBERGER et al., 1986; GIGUÈRE, 2001). Tachypnoe ist zu Beginn der Erkrankung selten zu beobachten. Häufig tritt Tachypnoe erst im späteren Erkrankungsstadium, beim Umgang mit dem Fohlen (u.a. durch Stress beim Einfangen) oder bei großer Hitze auf (PRESCOTT und HOFFMANN, 1993; GIGUÈRE, 2001).

Bei der Auskultation der Lunge von kranken Fohlen ist oftmals ein Rasseln oder Giemen zu hören (MAGNUSSON, 1923; FALCON et al., 1985; ELLENBERGER, 1986). Die Auskultationsbefunde korrelieren aber sehr häufig nicht mit der Schwere der vorliegenden Pneumonie (FALCON et al., 1985; AINSWORTH, 1999). Vielmehr können durch eine stark verdichtete Lunge und umfangreiche periphere Lungenabszesse selbst die physiologischen Lungengeräusche in der Auskultation vermindert sein (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1997). Hier könnten durch eine Perkussion der Lunge möglicherweise Konsolidierungen, Abszesse oder auch Pleuralergüsse akustisch abgegrenzt werden (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1997).

Neben der langsam verlaufenden Form der *R. equi*-Erkrankung gibt es eine subakute Erscheinungsform. Die betroffenen Fohlen fallen mit akuter Atemnot auf. Sie zeigen eine vermehrt abdominale und pumpende Atmung, haben hohes Fieber und verweigern Bewegung sowie Nahrungsaufnahme. Auch legen sie sich meist nicht mehr hin, da dies ihre Atmung noch erschweren würde. Diese Erkrankungsform kann aus einem chronischen Stadium hervorgehen. Sie kann aber auch ohne Vorliegen einer vorhergehenden respiratorischen Erkrankung entstehen (ELLENBERGER u. GENETZKY, 1986; AINSWORTH, 1999; GIGUÈRE, 2001). Auch bei sofortiger Einleitung einer Therapie ist die Prognose für solche Fohlen ungünstig (MARTENS et al., 1982a; GIGUÈRE, 2001).

### 2.1.3.2 Extrapulmonale Erkrankungsformen

Neben den Lungenveränderungen ist auch Durchfall ein weiteres mögliches Symptom einer *R. equi*-Erkrankung, das bei etwa 50 % der Fohlen auftritt (CIMPRICH und ROONEY, 1977; ZINK et al., 1986; PRESCOTT und HOFFMANN, 1993). Weitere Symptome der intestinalen Form, die auch ohne respiratorische Symptome auftreten kann, sind Anorexie, Dehydratation, Kolik und Gewichtsverlust, verursacht durch Atrophie der Mikrovilli, Ulzerationen und Mikroabszessen im Verdauungstrakt (BALDWIN et al., 1992).

Auch hochgradige Lahmheit als Folge von septischer Arthritis und Osteomyelitis wurde in Einzelfällen beschrieben (WILSON, 1955; SWEENEY, 1987; MADISON und SCARRAT, 1988; COLLATOS et. al., 1990; KENNEY, 1994; CHAFFIN und MARTENS, 1997; DESJARDINS und VACHON, 1999). Vereinzelt wird auch von Osteomyelitis an Rückenwirbeln und von Diskospondylitis bei an *Rhodococcus equi* erkrankten Fohlen berichtet (GIGUÈRE und LAVOIE, 1994; CHAFFIN et al., 1995).

Immunkomplexablagerungen können zur Ausprägung einer Uveitis und einem Hypopyon, sowie einer Anämie oder Thrombozytopenie beisteuern (BLOGG et al., 1983; CHAFFIN und MARTENS, 1997; GIGUÈRE, 2001).

Durch hämatogene Streuung können in seltenen Fällen Abszesse auch in der Leber und im Nierenparenchym entstehen (CHAFFIN und MARTENS, 1997). Von einem Araberfohlen mit positiven *R. equi*-Nachweis aus einem Pleuraerguß und einem abdominalen Abszess wurde ebenfalls berichtet (VALDES und JOHNSON, 2005).

### 2.1.4 *R. equi*-Infektionen bei anderen Spezies

Bei anderen Tierarten kommen *R. equi*-Erkrankungen selten vor. Rinder und Schweine weisen dabei knotige Veränderungen der Lymphknoten auf. Meist sind die Mandibularlymphknoten betroffen. Bei jungen Ziegen kann *R. equi* granulomatöse Veränderungen der Leber verursachen (MEIJER und PRESCOTT, 2001).

Infektionen mit *Rhodococcus equi* können auch bei immunsupprimierten Menschen Lungenveränderungen hervorrufen, somit handelt es sich um eine Zoonose (LASKY et al., 1991; ARLOTTI et al., 1996). Auch ist *R. equi* eine wichtige Ursache für die sogenannte Aids-assoziierte Pneumonie bei HIV-infizierten Personen (MEIJER und PRESCOTT, 2001).

### **2.1.5 Pathologische Befunde bei einer *Rhodococcus equi*-Erkrankung**

Im typischen Sektionsbild bei *R. equi*-kranken Fohlen wird eine bilaterale abszedierende Bronchopneumonie mit Atemwegsobstruktionen und Parenchymverdichtungen beobachtet (AINSWORTH, 1999). Auch miliare Abszesse, die über die ganze Lunge verteilt vorliegen, sind möglich, aber eher selten (MARTENS et al., 1982; ELLENBERGER und GENETKY, 1986). Bei der experimentellen Induktion einer subakut verlaufenden *R. equi*-Erkrankung beim Fohlen durch Aerosolinhalation fanden MARTENS et al. (1982a) in der Sektion diffus verteilte miliare pneumonische Veränderungen von pyogranulomatösem Charakter. Typisch sind aber bei einer natürlichen Infektion in den ventralen Lungenbereichen gelegene, multifokale Abszesse bis zu einem Durchmesser von mehreren Zentimetern, wobei das Lungparenchym in den angrenzenden Bereichen oft verdichtet ist (MAGNUSSON, 1923; BARTON und HUGHES, 1980; ELLENBERGER und GENETZKY, 1986; AINSWORTH, 1999). Die Abszesse können auch die Bronchiallymphknoten und die mediastinalen Lymphknoten mit einbeziehen. Eine Beteiligung der Pleura ist aber auch bei ausgedehnten Veränderungen nicht vorhanden (ELLENBERGER und GENETZKY, 1986). Das Abszessmaterial reicht von gelb und zähflüssig bis krümelig, käsig (HILLIDGE, 1986; AINSWORTH, 1999). Das Gebiet um die Abszesse ist weiterhin gekennzeichnet durch Ödematisierung, Infiltration der Alveolen mit Makrophagen und neutrophilen Granulozyten sowie durch eine suppurative Bronchitis und Peribronchitis (ELLENBERGER und GENETKY, 1986; HILLIDGE, 1986). In den Bronchien und Bronchiolen der betroffenen Lungenabschnitte befindet sich häufig mukopurulent bis fibrinopurulent Sekret (BARTON und HUGHES, 1980; ELLENBERGER und GENETZKY, 1986). Histologisch weisen betroffene Lungenbereiche multifokal Ansammlungen von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten auf, die die Alveolen ausfüllen. Im Zentrum der Veränderungen liegt eine Nekrose der Alveolarsepten vor. Das Zytoplasma der meisten Makrophagen enthält zahlreiche gram-positive Bakterien. Nur wenige Rhodokokken werden extrazellulär nachgewiesen (MARTENS et al., 1982a).

### **2.1.6 Diagnose der *Rhodococcus equi*-Erkrankung**

Die Umgebung und die Haltungsbedingungen der Fohlen sollten bei der Diagnosefindung beachtet werden. Ein sandiger Untergrund, Überpopulation und stark frequentierte, mit Kot verunreinigte Paddocks sind ideale Ausgangsbedingungen für eine *R. equi*-Infektion (AINSWORTH, 1999). Auf einem Betrieb ist weiterhin meist nicht nur ein einziges Fohlen, sondern mehrere Fohlen betroffen.

Die klinische Untersuchung kann Hinweise auf eine Erkrankung eines Fohlens durch *R. equi* liefern. Dabei ist aber zu bedenken, dass eine *R. equi*-Pneumonie im frühen Stadium oft klinisch unauffällig ist (MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, D., 1999; GIGUÈRE, 2001) und diese Untersuchung lediglich zu einem Verdacht führt, der mit weiterführenden diagnostischen Verfahren erhärtet werden muss.

Auch wenn das besondere Augenmerk auf der Untersuchung der Lunge liegt, so sollte immer auch eine allgemeine Untersuchung mit Beurteilung von Verhalten, Habitus, Ernährungs- und Pflegezustand, Pulsfrequenz und -qualität, Atemfrequenz und -typ, Messung der Körperinnentemperatur sowie die Beurteilung der Schleimhäute, der Mandibularlymphknoten und des evt. vorhandenen Nasenausflusses erfolgen. Bereits hier können sich Anhaltspunkte für eine Rhodokokkose zeigen (s.2.1.3). Bei der speziellen Untersuchung des Respirationstraktes werden, neben der adspektorischen und palpatorischen Beurteilung, mittels Auskultation tracheale, bronchiale und vesikuläre Atemgeräusche beurteilt. Eine Intensivierung der Atemtiefe kann durch ein kurzzeitiges Verschließen der Nüstern des Fohlens ausgelöst werden und verbessert die Auskultationsqualität bei leisen Lungengeräuschen. Dies sollte aber bei Fohlen mit offensichtlichen Atemproblemen unterlassen werden, um Stress zu vermeiden (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1997).

#### **2.1.6.1 Labordiagnostischer und kultureller Nachweis von *Rhodococcus equi***

Labordiagnostische Parameter ergänzen die oftmals wenig spezifischen klinischen Symptome. Im Blut von Fohlen mit einer *R. equi*-Pneumonie ist eine neutrophile Leukozytose ein typischer Befund (SMITH und ROBINSON, 1981; FALCON et al., 1985; LAVOIE et al., 1994; AINSWORTH, 1999). Allerdings sind die

Blutleukozytenwerte beim Fohlen altersabhängig zu betrachten (HARVEY et al., 1984). Eine Leukozytenanzahl von über 13000 G/l erlaubt jedoch einen Verdacht auf eine *R. equi*-Erkrankung (COHEN et al., 2002; GIGUÈRE et al., 2003). Allerdings zeigten in einer anderen Arbeit 75% der Fohlen, bei denen ultrasonographisch Lungenabszesse nachgewiesen wurden, eine Leukozytenzahl von unter 13000 G/l (ALTHAUS, 2004). Parallel mit der Leukozytenanzahl steigt oft auch der Plasmafibrinogen-Gehalt (über 400 mg/dl) an (FALCON et al., 1985; LAVOIE et al., 1994; COHEN et al., 2002), so dass diese Parameter diagnostische Hinweise auf eine vorliegende *R. equi*-Pneumonie sein können (GIGUÈRE, 2001). Die Amyloid A-Konzentration im Serum von über 200 Fohlen wurde als Parameter im Zusammenhang mit einer Rhodokokkose untersucht. Dabei ergaben sich zu keinem Zeitpunkt der Studie signifikante Unterschiede zwischen erkrankten Fohlen und gleichaltrigen gesunden Fohlen, so dass sich die Amyloid A-Konzentration nicht für die *R. equi*-Diagnostik eignet (COHEN et al., 2005).

Durch einen positiven kulturellen Nachweis von endoskopisch aspiriertem tracheobronchialen Sekret (TBS) kann die Diagnose gesichert werden (MARTENS et al., 1982b; ELLENBERGER und GENETZKY, 1986; MULLER und MADIGAN, 1992). Bei der Entnahme von TBS kann nebenbei beim Einführen des Endoskopes eine visuelle Beurteilung von Nasengängen, Siebbein, Luftsackklappen, Kehlkopf und Gaumensegel erfolgen. Ebenso erlaubt die Endoskopie der Atemwege eine Beurteilung von den Schleimhäuten der Trachea (Farbe, Gefäßzeichnung und Oberflächenbeschaffenheit) und des Sekrets (Menge, Farbe, Viskosität) (OHNESORGE et al., 1998). Ein Nachweis von *R. equi* aus Nasentupfern ist dagegen wenig sensitiv. Bei 217 Fohlen mit sonographisch nachgewiesenen Lungenabszessen gelang in einer Studie der Nachweis aus Nasentupfern nur bei 24% (52 Fohlen). Aber bei 54% der Tiere (118 Fohlen) wurde *R. equi* aus dem TBS isoliert (MEYER-HAMME 2004). Allerdings kann auch bei gesunden, symptomlosen Fohlen gelegentlich der Erreger nachgewiesen werden und bei nachweislich erkrankten Fohlen gelingt die kulturelle Anzüchtung aus TBS nicht immer (TAKAI und TSUBAKI, 1985; ARDANS et al., 1986; MEYER-HAMME, 2004; HEYERS, 2005). Da der Nachweis intrazellulärer Erreger schwierig ist und evt. durch Begleitflora gehemmt wird, schließt das Ausbleiben eines kulturellen Nachweises das Vorliegen einer *R. equi*-bedingten Erkrankung nicht aus (SELLON et al., 2000).

### 2.1.6.2 Serologische und molekularbiologische Nachweisverfahren

Es existieren zahlreiche unterschiedliche Nachweisverfahren, die zur Diagnostik von *R. equi*-Erkrankungen getestet und eingesetzt wurden.

In einer Studie an Fohlen, die klinische Befunde einer Pneumonie zeigten, erlaubte die Agargel-Immunodiffusion (AGID) eine Aussage darüber, welche Fohlen exponiert gegenüber *R. equi* gewesen sind. Allerdings gab es keine Übereinstimmung mit dem kulturellen Nachweis aus Tracheobronchialsekret (HOFFMAN et al., 1993). Es wurden zahlreiche Enzyme-linked-immuno-sorbent-assays (ELISA) in der Literatur beschrieben (ELLENBERGER et al., 1984; HIETALA et al., 1985; TAKAI et al., 1985; HIGUCHI et al., 1997; PRESCOTT et al., 1996; MARTENS et al., 2002). Die Ergebnisse mit dieser Methode weisen darauf hin, dass sie sich nicht eignet, um *R. equi*-kranke Fohlen von gesunden Fohlen sicher zu differenzieren (MARTENS et al., 2002; PAUL, 2005). Bei der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) kann der Nachweis durch Amplifizierung bestimmter Gensequenzen des Erregers aus via Endoskopie gewonnenem Tracheobronchialsekret (TBS) oder Blut sehr schnell geführt werden (TAKAI et al., 1995; SELTON et al., 1997). Dieser Test scheint sehr spezifisch, ist jedoch bei kranken Fohlen wenig sensibel (TAKAI et al., 1998). Eine neue PCR zur *Rhodococcus equi*-Diagnostik, bei der das virulenzassoziierte Protein A (vapA) mit hoher Sensitivität und Spezifität sowohl aus Reinkulturen als auch aus TBS nachgewiesen werden konnte, beschrieben HARRINGTON et al. (2005).

Bedenken werden allerdings gegenüber serologischen Tests, auch im Hinblick auf Spezifität und Sensitivität, geäußert. Ihr Nutzen liegt eher in der Aussage zu einer generellen Exposition eines Bestandes gegenüber *R. equi* als in der Einzeltierdiagnose (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1986; AINSWORTH, 1999). Serologische Tests eignen sich nach COHEN et al. (2002) nicht für ein Screening auf *R. equi*-Erkrankung. Der ELISA als auch die Agargel- Immunodiffusion (AGID) stehen als Tests zwar zur Verfügung, scheinen sich aber nicht für eine definitive Diagnosestellung zu eignen. Ein Grund hierfür ist der mögliche Nachweis maternaler Antikörper, welcher aber nichts über eine tatsächliche Erkrankung aussagt. Weiterhin bedeutet ein serologischer Nachweis nicht zwingend eine Erkrankung, sondern weist lediglich auf eine Reaktion des Immunsystems nach einer vorangegangenen Exposition hin. Nicht zuletzt können sowohl virulente als auch avirulente Isolate zu

positiven serologischen Testergebnissen führen, sofern nicht gezielt der Nachweis eines Virulenzfaktors geführt wird (PRESCOTT et al., 1985; TAKAI et al., 1985; PRESCOTT et al., 1996; GIGUÈRE, 2001).

### **2.1.7 Bildgebende Verfahren in der Diagnostik abszedierender Pneumonien**

#### 2.1.7.1 Vergleich der Röntgen- und der Ultraschalluntersuchung

Durch eine seitliche Röntgenaufnahme des Thorax kann zwischen interstitiellen und alveolären Lungenveränderungen (Konsolidierungen, Kavitätenbildung) unterschieden werden. Umfangreiche radiologische Veränderungen sind prognostisch von Bedeutung und können mit geringeren Überlebensraten verbunden sein (AINSWORTH, 1998). Radiologisch sind sowohl oberflächliche, pleuranahe, als auch tief im Lungengewebe liegende Läsionen darstellbar. Die Befunde können aber im frühen Stadium der Erkrankung wenig charakteristisch sein (COHEN et al., 2002), da die radiologischen Hinweise erst mit der Dauer und dem Fortschreiten der Erkrankung markanter werden (FALCON et al., 1985). Auch wenn hier bereits Korrelationen beobachtet wurden, sollte ein Röntgenbefund nie die alleinige Grundlage einer Aussage über die Prognose für ein *R.equi*-krankes Fohlen sein (GIGUÈRE, 2001). Auch Fohlen mit ausgeprägten radiologischen Lungenbefunden können unter adäquater Behandlung genesen (FALCON et al., 1985; SWEENEY et al., 1987; AINSWORTH, 1998).

Liegt ein Abszess in axialen Lungenbereichen, so ist er möglicherweise röntgenologisch nachweisbar, aber nicht ultrasonographisch darzustellen (REEF, 1991). In einer Arbeit konnte bei drei kranken Fohlen kein röntgenologisch abgrenzbarer Abszess festgestellt werden. Es wurde aber durch eine Röntgenaufnahme dennoch eine erhöhte Dichte im cranioventralen Lungenfeld diagnostiziert (RAMIREZ et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass die Röntgentechnik eine diagnostisch wertvolle Untersuchungsmethode in der Diagnostik von Pneumonien beim Fohlen darstellt und sowohl Hinweise über die Schwere der Lungenveränderungen als auch über den Behandlungserfolg liefern kann (GIGUÈRE, 2001).

Auch bei der ultrasonographischen Untersuchung können Lungenabszesse und Pneumonien dargestellt werden. Ein Vorteil der Ultrasonographie gegenüber der Radiologie ist hier, dass die Lage des Abszesses in der Lunge genau anhand des untersuchten Intercostalraumes feststellbar ist (REEF, 1998). In einer Studie mit 17 nachgewiesenen an *R. equi*-erkrankten Fohlen stimmten die Befunde der ultrasonographischen Untersuchung mit denen der Röntgenaufnahme des Thorax überein (RAMIREZ et al., 2004). Die multifokalen *R. equi*-bedingten Abszesse sind oft axial gelegen und beziehen die Lymphknoten am Hilus mit ein (REEF, 1998). Es besteht die Gefahr, aufgrund der Reverberation der Ultraschallwellen durch eine Luftbarriere tieferliegende Abszesse zu übersehen (AINSWORTH, 1999). Andererseits liegen bei Fohlen mit multiplen Lungenabszessen viele Abszesse auch in peripheren und somit ultrasonographisch diagnostizierbaren Lungenbezirken (REEF, 1998).

Ebenso besteht die Möglichkeit, dass Abszesse nur ultrasonographisch und nicht röntgenologisch sichtbar sind. Dies kann auftreten, wenn die Veränderung in einem Lungenbereich liegt, der über dem Herzschatten oder überlagert zum Zwerchfellschatten liegt (REEF, 1998).

Beide Verfahren liefern jeweils gute Hinweise auf eine *R. equi*-Pneumonie. Über die Vergleichbarkeit der erstellten Befunde mit diesen Techniken liegen noch keine Veröffentlichungen vor.

Lungenabszesse, die durch *Streptococcus equi ssp zooepidemicus* entstanden sind, sehen ähnlich aus (AINSWORTH, 1999; GIGUÈRE, 2001).

### 2.1.7.2 Sonographie im Rahmen der *Rhodococcus equi*-Pneumonie

Die ultrasonographische Untersuchung der Lunge kann sowohl im Rahmen der Früherkennung einer *R. equi*-Pneumonie als auch zur Überprüfung des Therapieerfolges eingesetzt werden (REEF, 1998; ALTHAUS, 2004). Für die Darstellung von pleuranahen Veränderungen beim Fohlen wird die Anwendung eines 7,5 MHz-Schallkopfes empfohlen (REEF, 1998). Gut geeignet sind schmale Schallköpfe, die sich in den Interkostalräumen führen lassen. Die Untersuchung erfolgt vom dritten bis zum zwölften Interkostalraum. Die Pleura visceralis der Lunge erscheint als gerade hyperechogene Linie im Schallbild und bewegt sich atmungssynchron. Diese Linie spiegelt sich in normal ventilierten Lungenbezirken aufgrund der ausgeprägten Reflektierung von Ultraschallwellen durch Luft in gleichmäßigen Abständen



mehrmals wieder (Wiederholungsecho). Caudoventral zeichnet sich der Übergang ins Zwerchfell als Muskelstruktur ab (REEF, 1998).

Die entzündlich bedingten Konsolidierungen der Lunge sind im Anfangsstadium als Unregelmäßigkeiten der Pleurooberfläche bedingt durch die ungleiche Belüftung dieses Lungenbereichs zu sehen. Hiervon können sogenannte Kometenschweifartefakte ausgehen, die von sehr kleinen Ansammlungen wie z.B. Exsudat, Blut oder Eiter hervorgerufen werden (REEF, 1998; VENNER, 2003). Größere Konsolidierungen wie bei alveolären Pneumonien haben einen unregelmäßigen Rand, sind hypoechogen und nicht klar abgegrenzt (REEF, 1998).

Ein Abszess stellt sich ultrasonographisch als ein anechogener, abgegrenzter Bereich dar. Nur selten ist eine Kapsel darstellbar, sie erscheint im sonographischen Bild als echogene Struktur (REEF, 1998).

### **2.1.8 Prognose der *Rhodococcus equi*-Pneumonie**

Die Prognose einer *R. equi*-Pneumonie beim Fohlen ist unter anderem abhängig vom Stadium der Erkrankung. Wird die Erkrankung z.B. auf endemisch betroffenen Gestüten durch die Einrichtung eines Früherkennungssystems (s. auch 2.1.9.1) bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome erkannt, so kann frühzeitig eine Therapie eingeleitet werden. Eine frühe Therapie kann sich wiederum positiv auf die Prognose auswirken.

Früher lagen die Mortalitätsraten bei *R. equi*-Pneumonien bei bis zu 80 % (ELISSALDE et al., 1980). Diese hohen Verluste wurden erheblich reduziert seit der Einführung der Behandlung mit Erythromycin und Rifampicin (GIGUÈRE, 2001). Mit der Kombination der Antibiotika Erythromycin und Rifampicin als Therapie wird von einer Überlebensrate von 88% (50 von 57 Fohlen) bei Fohlen mit nachgewiesener *R. equi*-Pneumonie berichtet (HILLIDGE, 1987).

Einen Überblick über 115 Fohlen, die aufgrund einer *R. equi*-Pneumonie behandelt wurden, veröffentlichten AINSWORTH et al. (1998). Hier lag die Überlebensrate bei 72%. Fohlen mit größeren radiologisch sichtbaren Lungenveränderungen und verstärkter Atmung überlebten seltener. Weiterhin wurde die spätere Leistung im Rennsport ausgewertet. Im Vergleich zu gesunden Fohlen starteten prozentual weniger Fohlen, die im Fohlenalter an *R. equi* erkrankt waren, später als Rennpferde (54% im Vergleich zu 65%). Die Rennleistung vormals *Rhodococcus equi*-erkrankter

Pferde unterschied sich hingegen nicht von Tieren der gleichen Altersgruppe ohne diese Vorerkrankung (CHRISTLEY und HODGSON, 1994; AINSWORTH, 1998).

### **2.1.9 Prophylaxe der *Rhodococcus equi*-Pneumonie**

#### 2.1.9.1 Management und Haltungsbedingungen

Bei einer endemischen Rhodokokkose ist es von Vorteil, ein System zur Früherkennung infizierter Fohlen zu etablieren. Parallel dazu können Maßnahmen zur Infektionsprophylaxe und eine frühe gezielte Behandlung erkrankter Fohlen möglicherweise dazu beitragen, den Infektionsdruck zu senken. (COHEN et al., 2002).

Die im Screening angewandten Verfahren sollten individuell auf das betroffene Gestüt zugeschnitten sein. So geht ein Screening von einer Adspektion der Fohlen aus, welche eventuell bereits Hinweise (z.B. vermehrt gefüllte Gelenke, Lethargie, Nasenausfluss) auf eine *R. equi*-Infektion liefern kann. In diesem Rahmen wird auch ein zweimal tägliches Fiebertimmen empfohlen. Weitere Elemente der Diagnostik bilden dann die Bestimmung der Blutleukozytenzahl und des Plasmafibrinogengehaltes, sowie Röntgen und/ oder eine ultrasonographische Untersuchung der Lunge (COHEN et al., 2002). Durch eine klinische Untersuchung der Fohlen zweimal wöchentlich sowie die frühe Einleitung einer Antibiotikagabe bei ersten Anzeichen einer Erkrankung konnten PRESCOTT et al. (1989) die Mortalitätsrate unter den Fohlen eines Gestütes mit endemischer Rhodokokkose signifikant senken. Die Leukozytenzahl im Blut stellte sich als besonders zuverlässiger Parameter in der frühen Diagnosestellung heraus (GIGUÈRE et al., 2003). Kein kausaler Zusammenhang schien dagegen zwischen den Haltungs- und Managementbedingungen auf verschiedenen Gestüten, die Probleme mit *R. equi*-Pneumonien hatten, zu bestehen (CHAFFIN et al., 2003). Im Fohlenkot kann sich der Erreger gut vermehren (BARTON und HUGHES, 1984; TAKAI et al., 1986b; HUGHES und SULAIMAN, 1987), daher sind Hygienemaßnahmen für eine Einschränkung der Exposition gegenüber *R. equi* auf jeden Fall sinnvoll (CHAFFIN et al., 2003). Es gibt also noch keine einheitliche Meinung über den Zusammenhang zwischen Haltung, Hygiene und der Erkrankungsrate bei *R. equi*-Pneumonien. Allerdings gelten einige

Regeln des Managements auf betroffenen Gestüten, trotz der widersprüchlichen Aussagen, als sinnvoll. Da eine Replikation von *R. equi* im Fohlendarm stattfinden kann, ist es empfehlenswert, erkrankte Fohlen zu isolieren (GIGUÈRE, 2001; COHEN et al., 2002). Ebenso sollte der Stallmist nicht auf Weideflächen ausgebracht, sondern besser einer Kompostierung unterzogen werden (COHEN et al., 2002). Die Weiden sind möglichst nicht mit zu hohen Tierzahlen zu belegen und rechtzeitig zu wechseln, um so die Grasnarbe zu schonen und einer Staubbildung entgegenzuwirken (AINSWORTH, 1999; GIGUÈRE, 2001). Die Inhalation des Erregers stellt einen wahrscheinlichen Infektionsweg dar. Daher kann auch eine gute Ventilation des Stalles sowie das Anbringen von Sprinkleranlagen auf den Ausläufen und Paddocks helfen, die Exposition der Fohlen zu verringern (ELLENBERGER und GENETZKY, 1986; COHEN et al., 2002).

### 2.1.9.2 Hyperimmunplasma

Zum Erfolg von Hyperimmunplasma zur Vorbeugung der Fohlen-Rhodokkose liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während in einigen klinischen Studien mit Hyperimmunplasma die Prävalenz von *R. equi*-Pneumonien gesenkt wurde (MARTENS et al., 1989; MADIGAN et al., 1991), gab es auch Studien, in denen kein positiver Effekt nachgewiesen wurde (HURLEY und BEGG, 1995; HIGUCHI et al., 1999). Dies kann unter anderem darin begründet sein, dass die Komponenten, die einen Schutz auszulösen vermögen, noch nicht bekannt und deshalb im Plasma nicht berücksichtigt sind (AINSWORTH, 1999).

Die Anwendung von Hyperimmunplasma ist relativ kostenintensiv, arbeitsaufwändig, nicht unbedingt praxisgeeignet und nicht immer erfolgreich (MARTENS, 1989; MADIGAN, 1991; HIGUCHI, 1995; COHEN et al., 2002).

Eine Gabe von Hyperimmunplasma bei Betrieben mit einer hohen Prävalenz der *R. equi*-Problematik sowie einer hohen Anzahl von schwerwiegenden Erkrankungen kann eine sinnvolle präventive Maßnahme darstellen (COHEN et al., 2002). Es bestehen Anzeichen dafür, dass spezifische Antikörper – seien sie aus Stutenkolostrum oder aus Hyperimmunplasma stammend - den Fohlen möglichst vor einer Erstexposition mit *R. equi* zur Verfügung stehen sollten (CHAFFIN et al., 1991; FLAMINIO et al., 1999). So kann eine immunologische Aktivierung in Gang gesetzt werden, die für eine erfolgreiche Abwehr des Erregers bedeutsam ist (HIETALA und

ARDANS, 1987b; CHAFFIN et al., 1991; FLAMINIO et al., 1999). In einer in vivo Studie wurden zehn Ponyfohlen am siebten Lebenstag intrabronchial mittels eines *R. equi*-Kulturen enthaltenen Aerosols infiziert. Sieben und neun Tage nach der Infektion erhielten sechs Fohlen 20 ml/kg Körpergewicht eines eigens (unter Verwendung der gleichen Bakteriensuspension wie auch zur Infektion) hergestellten Immunplasmas, eine Gruppe von vier Fohlen erhielt eine Kochsalzlösung als Placebo. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, alle Fohlen erkrankten und zeigten ähnliche klinische, radiologische sowie Sektionsbefunde. Die *R. equi* spezifischen Antikörper der Plasmagruppe waren im ELISA nach der Infusion zwar signifikant höher, hatten aber keine protektive Wirkung (CHAFFIN et al., 1991). Weiterhin wurden in einer anderen in vitro Studie die Eigenschaften von Alveolarmakrophagen sowohl von gesunden als auch *R. equi*-kranken Fohlen und von erwachsenen Pferden untersucht. Makrophagen zuvor nicht *R. equi*-exponierter Fohlen konnten den nicht-opsonierten Erreger zwar phagozytieren, aber einen Prozentanteil von über 65% der Infektionsdosis nicht abtöten.

In einer Blindstudie an 111 Fohlen wurde die Wirksamkeit zweier unterschiedlich zusammengesetzter Hyperimmunseren und eines Serums ohne gesteigerten Antikörpergehalt zur Prophylaxe der *R. equi*-Pneumonie auf einem endemischen Gestüt untersucht. Weitere 35 Fohlen dienten als Kontrollgruppe und blieben ohne prophylaktische Behandlung (SCHULTE, 2004). Nach zweimaliger Transfusion (am ersten Lebenstag und zwischen dem zehnten und zwölften Tag) wurden die Fohlen bis zu einem Alter von fünf Monaten wöchentlich auf Anzeichen einer Erkrankung untersucht. Obwohl die im ELISA ermittelten Antikörpertiter bei den mit Hyperimmunserum transfundierten Fohlen signifikant höher waren, konnte kein Einfluss auf die Erkrankungsrate nachgewiesen werden (PAUL, 2004; SCHULTE, 2004).

In einer weiteren klinischen Studie wurde einer Gruppe von sieben Fohlen kommerzielles Hyperimmunplasma transfundiert und einer zweiten Gruppe (n = 7) spezifische gegen *vapA* und *C* gerichtete Immunglobuline. Eine dritte Gruppe (n = 11) blieb ohne prophylaktische Behandlung und diente als Kontrollgruppe. Weitere drei Fohlen erhielten statt *R. equi*-Kulturmaterial eine sterile Pufferlösung instilliert (HOOPER-MCGREY et al., 2001). Alle Fohlen waren zu Versuchsbeginn zwischen 18 und 23 Tagen alt. Nach intrabronchialer Instillation mit *R. equi*-Kulturen zeigten beide Versuchsgruppen in der Sektion 14 Tage später eine geringere Ausprägung

von Lungenveränderungen und eine geringere Anzahl nachweisbarer Erreger im Lungengewebe. Dies ist ein weiteres Indiz für die Bedeutung der virulenzassoziierten Proteine für die Infektiösität des Erregers. Weiterhin wurde gezeigt, dass es möglich zu sein scheint, mit spezifischen Antikörpern einen passiven Schutz zu erreichen. Für eine endgültige Aussage über die Wirksamkeit fehlen allerdings größere Studien mit unter standardisierten Bedingungen geborenen Fohlen und zur Zusammensetzung des Plasmas. Denn sowohl Plasma als auch Serum enthalten neben den Antikörpern auch unspezifische Faktoren wie Interferon, Lymphokine, Fibronectin und Komplementfaktoren, die zur Ausbildung einer Schutzwirkung gegen *R. equi* beitragen (MARTENS et al., 1989).

### 2.1.9.3 Prophylaxe durch Vakzination

Zur Zeit gibt es keine wirksame Impfung gegen *Rhodococcus equi*.

Die Impfung der Mutterstuten erwies sich in klinischen Studien als nicht wirkungsvoll. Bei drei Impfungen innerhalb der letzten drei Trächtigkeitsmonate mit einem *R. equi*-Totimpfstoff stieg der Level an kolostralen Antikörpern im Vergleich zu ungeimpften Stuten. Die Aufnahme eines Kolostrums mit erhöhtem Antikörpergehalt gegen *R. equi* bot aber keinen wirksamen Schutz für die Fohlen (MADIGAN et al., 1991). In einer klinischen Studie mit insgesamt zwölf während der Trächtigkeit experimentell infizierten Ponystuten, konnte ebenfalls kein Infektionsschutz für die Fohlen durch die Aufnahme eines Kolostrums mit *R. equi*-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Alle Fohlen erkrankten nach intrabronchialer Instillation eines *R. equi* enthaltenden Aerosols. Es gab keinen signifikanten Unterschied zu den sechs Fohlen der Kontrollgruppe, die Kolostrum ohne gesteigerten *R. equi*-Antikörpergehalt erhielten (MARTENS et al., 1991).

Durch die zwei- bis dreimalige Impfung von Stuten in den letzten beiden Monaten der Trächtigkeit mit einer Vakzine aus einem Isolat, das sowohl VapA als auch Exoenzyme, sog. Equi-Faktoren, enthielt, konnte die Prävalenz von *R. equi*-Pneumonien unter den Fohlen signifikant gesenkt werden (BECÚ et al., 1997). Die Studie wurde allerdings als Feldstudie über vier Jahre auf bis zu 22 unterschiedlichen Betrieben, darunter endemisch und sporadisch von *R. equi* betroffene, pro Jahr und mit 700 bis 1200 Stuten jährlich durchgeführt.

Impfstoffe mit gezielten antigenwirkenden Segmenten von *R. equi* sind zur Zeit in Entwicklung. Aus dem Membranprotein vapA wurde eine Aminosäuresequenz, die wiederum ein wichtiges Epitop für die Immunantwort enthält, isoliert (TAOUJI et al., 2004). Zunächst wurde daraufhin die Immunantwort auf ein synthetisches Peptid, das diese Sequenz beinhaltet, an Mäusen in Verbindung mit unterschiedlichen Adjuvantien untersucht. Die Versuche wurden danach mit Stuten wiederholt. Dabei wies die Kombination mit dem Adjuvans IMS3012 einen signifikanten Anstieg des opsonierenden Immunglobulins IgG<sub>1</sub> auf. Klinische Studien mit Fohlen zum Nachweis einer Schutzwirkung gegen *R. equi* liegen hier noch nicht vor. Im Mäuseversuch konnte gezeigt werden, dass eine DNA-Vakzine kombiniert mit dem virulenzassoziierten Protein A (vapA) die Immunantwort gegen *R. equi* verbessert (HAGHIGHI und PRESCOTT, 2005).

Neue Vakzinationsansätze beschäftigen sich mit der Entwicklung von DNA-Vakzinen zur Förderung der mukosalen Immunantwort.

### **2.1.10 Therapie der *Rhodococcus equi*-Infektion**

Da *Rhodococcus equi* zu einem hohen Prozentsatz intrazellulär vorliegt, ist die Therapie davon abhängig, möglichst hohe antimikrobielle Konzentrationen in den Phagozyten zu erreichen (AINSWORTH, 1999). Die beiden empfohlenen Antibiotika in der Therapie der *R. equi*-Pneumonie des Fohlens sind Erythromycin (25 mg/kg KGW 3x täglich per os) und Rifampicin (10 mg/kg KGW 2x täglich per os) (PRESCOTT und SWEENEY, 1985; HILLIGDE, 1987; AINSWORTH, 1999). Als Nebenwirkung tritt bei Fohlen gelegentlich Durchfall auf, der aber in der Regel selbstlimitierend ist und keine Therapieumstellung erforderlich macht (GIGUÈRE und PRESCOTT, 1997; AINSWORTH, 1999). Erythromycin sollte immer in einer Kombinationstherapie angewandt werden, um Resistenzbildung zu vermeiden (PRESCOTT et al., 1984; SWEENEY et al., 1987; AINSWORTH, 1999).

Auch die Kombination von Rifampicin mit Azithromycin erwies sich als wirksam. Allerdings ist diese Variante noch kostenintensiver. Dem gegenüber steht der Vorteil nur einer Applikation pro Tag und die bessere Akzeptanz durch die Fohlen im Gegensatz zu Erythromycin (PILTZ, 2004). Im Vergleich zu Erythromycin hat Azithromycin eine höhere Bioverfügbarkeit und erreicht höhere Konzentrationen im Gewebe und den Phagozyten (GIGUÈRE, 2001; JACKS et al., 2001). Nach der

oralen Gabe von 10 mg/kg KGW Azithromycin an Fohlen wurden keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen festgestellt (JACKS et al., 2001).

Die Therapie dauert lange und sollte mindestens bis zum Abklingen der klinischen Symptome und der Rückkehr zu labordiagnostischen Referenzwerten fortgeführt werden. Dies setzt eine systemische antibiotische Behandlung über 6 bis 8 Wochen voraus (PRESCOTT und SWEENEY, 1987; AINSWORTH, 1999; PILTZ, 2004).

### **2.2 Weitere Erreger von Lungenabszessen bei Fohlen: *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus***

*Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* (kurz: *Strep. zooepidemicus*) gehört zu den  $\beta$ -hämolisierenden, grampositiven Streptokokken der Lancefield Gruppe C. Der Erreger besiedelt auch bei gesunden Pferden die Tonsillen und die Mukosa des Nasopharynx (WELSH, 1984; LÈGUILETTE, 2002). Bei 88 von 101 untersuchten Fohlen mit einer Infektion der tiefen Atemwege wurde *Strep. zooepidemicus* in der bronchoalveolären Lavage nachgewiesen (HOFFMAN et al., 1993). Der Erreger kommt ubiquitär vor und spielt häufig als opportunistischer Keim eine Rolle, wie in Situationen mit bereits vorliegender Virusinfektion, z.B. einer Influenza-Infektion (TIMONEY, 2004).

Bei Stresssituationen wie beim Transport, im Training für die Rennbahn und durch die Belastung im Rennsport sind erwachsene Pferde vermehrt anfällig für eine Infektion. Weiterhin sind hohe Temperaturen im Sommer und eine hohe Populationsdichte mit wechselnden Gruppenszusammenstellungen als Risikofaktoren für die Entwicklung einer *Strep. zooepidemicus*-Pneumonie zu nennen. Für Fohlen sind das Absetzen, ein schlechter Ernährungszustand, Parasitenbefall oder auch eine Schwächung des Immunsystems durch andere Erkrankungen Situationen, in denen *Strep. zooepidemicus* Auslöser für Erkrankungen der tiefen Atemwege sein kann (TIMONEY, 1991; LÈGUILETTE et al., 2002). Als Infektionsquelle gelten infizierte erwachsene Pferde mit eitrigen Prozessen. *Strep. zooepidemicus* kann aber auch bereits intrauterin oder postnatal über den Nabel übertragen werden. Eine nasale und/ oder orale Infektion ist ebenfalls möglich (BOSTEDT et al., 1999).

Die klinischen Symptome bei einer Infektion mit *Strep. zooepidemicus* sind Fieber, purulenter Nasenausfluss, erhöhte Atemfrequenz, Husten, geschwollene Lymph-

knoten, sowie manchmal Speicheln und Schluckbeschwerden. Weiterhin kann *Strep. zooepidemicus* sowohl beim Fohlen als auch beim erwachsenen Pferd Lungenabszesse verursachen (LAVOIE et al., 1994; OIKAWA et al., 1994). Die röntgenologischen Befunde sehen dabei denen einer *Rhodococcus equi*-Pneumonie ähnlich (LAVOIE et al., 1994). Häufig liegt auch eine Mischinfektion vor, da in TBS-Proben vielfach sowohl *R. equi* als auch *Strep. zooepidemicus* nachgewiesen wird (GIGUÈRE et al., 2002; MEYER-HAMME, 2004). Für eine Studie wurden experimentell zehn Pferde im Alter zwischen zwei und vier Jahren mit *Strep. zooepidemicus* intrabroncholar infiziert (YOSHIKAWA et al., 2003). In der Sektion dreißig Minuten post infektionem zeigten sich im frühen Stadium kleine purulente Pneumonien in dem Lungenbereich, wo der Erreger inokuliert wurde. Die innerhalb der folgenden zwanzig Stunden seziierten Lungen wiesen hämorrhagische, purulente Pneumonien auf, nach zwei Wochen lag eine purulente nekrotisierende Pneumonie vor. Weiterhin stellten sie fest, dass *Strep. zooepidemicus* in der Lage zu sein scheint, die Phagozytose durch die Alveolarmakrophagen zu verhindern. In Blutuntersuchungen natürlich infizierter Pferde fällt eine Hyperfibrinogenämie, eine geringgradige Anämie mit Leukozytose und eine Granulozytose auf (LAVOIE et al., 1994).

Die bei *R. equi*-Pneumonien angewandte Therapie mit der Kombination von Erythromycin und Rifampicin ist auch bei *Strep. zooepidemicus* bedingten Lungenabszessen wirksam, da der Erreger gewöhnlich empfindlich gegenüber Erythromycin ist (HIRSH und JANG, 1987). Ungeachtet des Kostenfaktors wird daher diese Antibiotikakombination als erste Wahl bei der Therapie von Lungenabszessen von LAVOIE et al. (1994) vorgeschlagen.



## **2.3 Immunologie**

### **2.3.1 Immunologie des equinen Respirationstraktes**

Der Respirationstrakt stellt eine direkte Verbindung der Außenwelt zum Inneren des Körpers dar. Inhalierte Partikel treffen durch die turbulente Strömung der Luft auf die Mukusschicht der oberen Atemwege auf und werden mechanisch mittels Zilienschlag wieder nach oral befördert und abgeschluckt.

Partikel, die kleiner sind als 5µm, können bis zu den Alveolen gelangen, wo sie von den Alveolarmakrophagen phagozytiert werden (TIZARD, 1993). Die Alveolarmakrophagen wiederum produzieren Entzündungsmediatoren und Cytokine wie z.B. Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  hat eine aktivierende Wirkung auf Makrophagen und induziert deren Produktion von Stickstoffmonoxid, welches eine Rolle bei der Abtötung phagozytierter Bakterien spielt. IL-1 aktiviert ebenfalls weitere Makrophagen aber auch T-Zellen und kann Fieber auslösen. Außerdem dienen Alveolarmakrophagen als antigenpräsentierende Zellen für die B- und T-Lymphozyten (JANEWAY und TRAVERS, 1997).

Im lymphatischen Gewebe des Respirationstraktes des Pferdes, insbesondere in oberen Bereichen, wird vorwiegend IgA produziert. In den Bronchiolen und Alveolen ist IgG die größte Fraktion der Immunglobuline. TIZARD vermutet, dass IgA bereits der Anheftung von Antigenen entgegenwirkt und IgG erst bei Vorliegen einer akuten Entzündung wichtig wird, z. B. bei der Entwicklung von Pneumonien (TIZARD, 1993). Beim Fohlen liegt zum Zeitpunkt der Geburt kein organisiertes lymphatisches Gewebe in der Lunge vor. Lymphozyten und Plasmazellen sind während der ersten Lebenswoche im Respirationstrakt praktisch nicht vorhanden. Ab einem Alter von 8 Wochen verfügt die Fohlenlunge über immunglobulinproduzierende Plasmazellen und ab der 12. Woche ist das bronchus- und bronchiolenassoziierte Lymphgewebe gut ausgeprägt (BANKS et al., 1999). Nach der Kolostrumaufnahme befinden sich IgG-Subtypen auf den Nasenschleimhäuten des neonaten Fohlens. IgA Moleküle, die beim erwachsenen Pferd am stärksten vertretene Immunglobuline, sind erst nach einem Monat beim Fohlen nachweisbar (SHEORAN et al., 2000).

Beim neugeborenen Fohlen liegen bei der Flüssigkeit der bronchoalveolären Lavage (BALF) im Vergleich zu der Anzahl an Lymphozyten und zum erwachsenen Pferd sehr hohe Anteile an Makrophagen vor (BALSON et al., 1997; ZINK und JOHNSON, 1984). In einem Alter von etwa drei Monaten sind die Verhältnisse denen des

erwachsenen Pferdes angeglichen (40-65 % Makrophagen, 30-70 % Lymphozyten in der BALF) (BALSON et al., 1997; FLAMINIO et al., 2000). Wie auch im peripheren Blut ist in den ersten beiden Lebensmonaten des Fohlens die Anzahl an CD4+ (T-Helfer-Zellen) und CD8+T-Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) in der BALF gering und steigt ab dem dritten Monat an (BALSON et al., 1997; FLAMINIO et al., 1999). In einer in vitro Studie wurde festgestellt, dass die Phagozytoserate für *R. equi* von Alveolarmakrophagen exponierter Fohlen der eines erwachsenen Pferdes entspricht. Die Opsonierung von *R. equi* verstärkt allerdings dabei signifikant die Aufnahme und Abtötung des Erregers (HIETALA, 1987).

### **2.3.2 Immunsystem des Fohlens in der peripartalen Phase**

Das Immunsystem des Fohlens entwickelt sich bereits in der fetalen Lebensphase. Bei der Geburt ist ein Fohlen praktisch immunkompetent. Studien haben gezeigt, dass funktionale T-Lymphozyten beim equinen Fetus ab dem 100. Trächtigkeitstag und B-Lymphozyten ab dem 200. Tag vorliegen (PERRYMAN et al., 1980; MACKENZIE, 1975; GIGUÈRE et al., 2005). Durch die Placenta epitheliochorialis der Stute werden während der Trächtigkeit keine maternalen Antikörper über das Blut an das Fohlen weitergegeben. Obwohl das Fohlen also bei der Geburt immunkompetent ist, braucht die Immunantwort einige Tage bevor sie in der Lage ist, gezielten Schutz vor Infektionen durch eindringende Erreger zu gewährleisten. Diese Zeit wird durch die mit dem Kolostrum aufgenommenen Immunglobuline, überwiegend Immunglobulin G (IgG), überbrückt. Ein gesundes Fohlen nimmt Kolostrum innerhalb von zwei Stunden nach der Geburt auf. Vier bis sechs Stunden später sind dann Antikörper im Fohlenserum nachweisbar (JEFFCOTT, 1974). Die Konzentration maternaler Immunglobuline im Blut des Fohlens erreicht ein Maximum 18 bis 24 Stunden nach der Geburt und nimmt dann kontinuierlich innerhalb der ersten vier Lebenswochen wieder ab (SHEORAN et al., 2000).

In einer Studie wurde sechs Fohlen für 36 Stunden nach der Geburt der Zugang zu Kolostrum verwehrt. Sie wurden zur Vermeidung von Komplikationen eine Woche mit Gentamicin behandelt. Weitere fünf Fohlen dienten der Kontrolle, konnten Kolostrum der Mutterstute aufnehmen und wurden unter den gleichen Bedingungen aufgezogen. Allen Fohlen wurden in regelmäßigen Abständen Blutproben entnommen, wobei bei der Kontrollgruppe die erste Blutentnahme vor der ersten Kolostrumaufnahme erfolgte. Dabei wurde mittels eines Tests zur hämolytischen

Komplementaktivitätsbestimmung festgestellt, dass das Komplementsystem beim neonaten Fohlen nur zu 13% aktiv ist. Bei Fohlen, die Kolostrum erhielten, steigt die Aktivität mit einem Monat auf 64% und mit fünf Monaten Lebensalter bis auf 85% im Vergleich mit dem erwachsenen Pferd. Bei Fohlen, die ohne Kolostrum aufgezogen wurden, lag die Aktivität zunächst höher und pendelte sich nach etwa vier Monaten auf den Level eines „normalen“ Fohlens ein (BERNOCO et al., 1994).

### **2.3.3 Besonderheiten der Immunabwehr im Zusammenhang mit der *Rhodococcus equi*-Infektion**

#### 2.3.3.1 Die zelluläre Immunantwort

Aufgrund des fakultativ intrazellulären Charakters von *R. equi* scheint die zelluläre Immunantwort die Hauptkomponente beim Schutz vor einer Erkrankung zu sein. Dafür gab eine Studie an experimentell mit *R. equi* infizierten Ponies Hinweise. Im Blut der infizierten Ponies zeigte sich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg im Lymphozyten-Stimulationstest (ELLENBERGER et al., 1984). In vitro-Versuche zeigten, dass die Phagozytierungs- und die Abtötungsraten für *R. equi* von neutrophilen Granulozyten beim neonaten Fohlen bereits ähnliche Werte wie beim erwachsenen Pferd erreichen (HIETALA et al., 1987; MARTENS et al., 1988; DEMMERS et al., 2001). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die phagozytierenden Zellen bei einem neonaten Fohlen zwar einsatzfähig, ihre chemotaktischen und phagozytierenden Eigenschaften aber aufgrund der geringen Anzahl von Opsoninen im Serum zunächst begrenzt sind (GIGUÈRE et al., 2005).

*R. equi* ist sehr resistent gegen oxidativen Stress. Die in den Phagozyten nach einer Phagozytose produzierten reaktiven Sauerstoffverbindungen sind nicht in der Lage, den Erreger abzutöten. Dies kann sowohl mit der Katalaseaktivität des Erregers zusammenhängen, als auch mit seinen Virulenzplasmiden (BENOIT et al., 2002).

Im Mäuseversuch zeigte sich, dass eine Abtötung von *R. equi* Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) abhängig ist (DARRAH et al., 2000). Zusammen mit dem Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) löst IFN- $\gamma$  die Produktion von Stickstoff- und Sauerstoffderivaten aus. Diese Radikale wiederum verbinden sich zu Peroxynitrit, welches zum Tod intrazellulärer Bakterien führt (DARRAH et al., 2000).

In einem Versuch an Mäusen wurde beobachtet, dass die immunkompetenten experimentell mit virulentem *R. equi* infizierten Tiere eine  $T_H1$  vermittelte Zytokin-Antwort entwickelten und die Infektion eliminierten. Mäuse, bei denen über eine monoklonale Antikörperadministration gegen Interferon- $\gamma$  eine  $T_H2$ -vermittelte Immunantwort ausgelöst wurde, entwickelten nach der Infektion mit *R. equi* Lungengranulome (KANALY et al., 1993-1996).  $T_H1$ -Zellen aktivieren Makrophagen und veranlassen die Fusion der Lysosomen mit den Vesikeln, die Bakterien enthalten. Sie setzen auch Zytokine frei, die Makrophagen an den Infektionsherd locken. Somit sind sie ein entscheidender Faktor bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger durch das Immunsystem des Wirtes.  $T_H2$ -Zellen, auch T-Helferzellen oder  $CD4+$ Helferzellen, genannt, sind für die Aktivierung von B-Lymphozyten erforderlich und sind somit vor allem beim Vorliegen von extrazellulären Erregern wichtig (JANEWAY und TIZARD, 1997).

Ein weiterer Weg des Immunsystems, intrazelluläre Erreger zu bekämpfen, ist die direkte Zytotoxizität. Das Erkennen von Antigenen durch T-Zellen ist MHC-restringiert (MHC-abhängig, MHC = Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex). T-Zellen können nur in Gegenwart von körpereigenen MHC-Molekülen stimuliert werden. Sie erkennen ein Antigen deshalb normalerweise nur in Form von Peptiden, die an körpereigene MHC-Moleküle gebunden sind (JANEWAY und TRAVERS, 1997). MHC-I-transgene Mäuse, die keine  $CD8+$ T-Lymphozyten besitzen, sind in der Lage zuvor per Inhalation inoculierten *R. equi*, aus der Lunge zu eliminieren. MHC-II-transgenen Mäusen ohne  $CD4+$ T-Lymphozyten gelingt dies hingegen nicht und sie entwickelten granulomatöse Lungenveränderungen (KANALY et al., 1993). Hiermit wurde die zentrale Rolle der  $CD4+$ T-Zellen bei der Immunantwort auf eine *R. equi*-Infektion bewiesen.

Weiterhin besteht der Anschein, dass *R. equi* immunmodulatorische Eigenschaften besitzt und somit möglicherweise in der Lage ist, die Immunantwort des Wirtes in Richtung einer ineffektiven  $T_H2$ -zellgebundenen Reaktion zu verschieben.  $T_H2$ -Zellen setzen die Cytokine Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-5 (IL-5) und Interleukin-10 (IL-10) frei. Dabei setzt IL-10 die Makrophagenaktivität herab (AINSWORTH, 1999).

Aus den Bronchiallymphknoten von experimentell mit einem virulenten *R. equi*-Stamm infizierten Fohlen wurden  $CD4+$ T-Zellen (T-Helferzellen) isoliert. Diese hatten im Vergleich zu den Lymphozyten der Fohlen, die mit einem avirulenten, virulenzplasmidfreien Erreger aus dem gleichen Stamm infiziert wurden, eine deutlich ver-

ringerte IFN- $\gamma$  Produktion. Gleichzeitig war die Konzentration des IL-10, welches die T<sub>H</sub>1-vermittelte Immunantwort herabreguliert, bei der Infektion mit dem virulenten Erreger höher (GIGUÈRE et al., 1999).

Eine andere Studie zeigte hingegen, dass die Eliminierung von virulentem *R. equi* bei experimentell infizierten erwachsenen Pferden verbunden ist mit einer erhöhten Anzahl von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>T-Lymphozyten (HINES et al., 2003). Diese Unterschiede in der Immunantwort bei adulten Pferden gegenüber Fohlen in Gegenwart von *R. equi* haben ihre Ursache vermutlich in Besonderheiten des Immunsystems des Fohlens. Sie könnten aber auch in unterschiedlichen experimentellen Vorgehensweisen begründet sein (MEIJER und PRESCOTT, 2004). Während gesunde, immune Fohlen und adulte Pferde eine IgGa dominierte Immunantwort auf virulenzassoziierte Proteine entwickelten, fanden HOOPER-MCGREY et al. (2003) eine IgGb und IgGT- dominante Antwort bei an Rhodokokkose erkrankten Fohlen. Dies ist sowohl eine Bestätigung für die Vermutung der immunmodulatorischen Eigenschaften von *R. equi* als auch für die zentrale Rolle seiner virulenzassoziierten Proteine, die heute im Mittelpunkt der Forschung stehen.

### 2.3.3.2 Die humorale Immunantwort

Fohlen von vakzinieren Mutterstuten werden durch den passiven Transfer von Antikörpern nicht vor einer *R. equi*-Infektion geschützt (MARTENS et al., 1991; MADIGAN et al., 1991). Vielmehr könnten die hohen Konzentrationen maternal vermittelter Immunglobuline zu einem Mangel an eigener Antikörperproduktion des Fohlens führen, und somit dessen Fähigkeit, auf natürliche Exposition und Vakzination zu reagieren, schwächen (FLAMINIO et al., 1999). Wichtig sei, dass die Antikörper durch Kolostrumaufnahme oder auch durch eine Hyperimmunplasma-Transfusion dem Fohlen vor der Erstexposition mit *Rhodococcus equi* zur Verfügung stehen, da ein wirkungsvolles Abtöten des Erregers durch Alveolarmakrophagen eine vorherige immunologische Aktivierung (Opsonierung) erfordert (ZINK et al., 1985; FLAMINIO et al., 1999; HIETALA und ARDANS, 1987). Mit Hilfe eines Lymphozyten-Blastogenese-Assays wurde in einer Studie mit sechs klinisch *R. equi* kranken und sechs gesunden Kontrollfohlen die Involvierung der spezifischen natürlich gebildeten

Antikörper in die Immunabwehr des Erregers demonstriert (ARDANS et al., 1986). Es wurde gezeigt, dass mittels Opsonierung die Phagozytose- und die Inaktivierungsrate der Alveolarmakrophagen von nicht-infizierten Fohlen gesteigert werden kann.

Die schützende Funktion spezifischer Antikörper gegen *R. equi* ist bisher noch nicht belegt. Da bisher keine einheitliche Meinung zur Wirksamkeit von Hyperimmunplasma zur Vorbeugung der Fohlen-Rhodokkose herrscht (MULLER et al., 1992; BECÙ et al., 1997; MADIGAN et al., 1991; MARTENS et al., 1991; HURLEY et al., 1995; HOOPER-MCGREY et al., 2001; SCHULTE, 2004; PAUL, 2004), liefern die Studien keinen Beweis über die Rolle der Antikörper in der effektiven Bekämpfung von *R. equi* durch das Immunsystem des Fohlens. Antikörper gegen *R. equi* sind in der Pferdepopulation weit verbreitet (HIETALA et al., 1985; SANADA et al., 1992). In natürlich exponierten Pferden verschiedener Altersklassen findet man eine große Schwankungsbreite an Antikörpertitern (ELLENBERGER et al., 1984b). Eine abschließende Klärung der Bedeutung der Antikörper in der Immunabwehr bei einer *Rhodococcus equi*-Infektion bleibt noch offen.

## **2.4 Paramunitätsinducer**

### **2.4.1 Allgemeines und Begriffsdefinition**

Der durch die ständige aktive und erfolgreiche Auseinandersetzung mit den unterschiedlichsten exogenen und endogenen Noxen erworbene erhöhte antigenunspezifische Schutz wird als Paramunität bezeichnet. Unter Paramunisierung versteht man die medikamentöse Stimulierung der zellulären Anteile des paraspezifischen Immunsystems und der damit verbundenen Bildung von Zytokinen (MAYR, 1993). Die funktionelle Grundlage hierfür bilden sowohl Zellen, wie z.B. Makrophagen, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen, als auch lösliche Faktoren (Lysozym, Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktor, koloniestimulierende Faktoren (G-CSF), Interferone, Lektine), die erregere- oder antigenunspezifisch reagieren (GUBELMANN, 1993). Paramunitätsinducer sind definiert als paraspezifische, nicht immunisierende Vakzinen aus attenuierten, inaktivierten Pockenvirusstämmen.

Für einen prophylaktischen Einsatz von Paramunitätsinducern werden u.a. folgende Indikationen genannt: Akut infektionsgefährdete Tiere, schnelle Aktivierung der

Immunabwehr bei Neugeborenen und Einsatz vor erwarteten Stresssituationen (Transport- und Umstallungsprophylaxe) (MAYR, 1993).

### 2.4.2 Substanzen und Präparate zur Immunstimulierung

Dr. William Coley setzte im Jahr 1907 als erster gezielt ein Immunstimulans beim Menschen ein. Er hatte beobachtet, dass mehrere seiner Patienten, die eine Septikämie aufwiesen, eine spontane Tumorregression zeigten. Daraufhin entwickelte er das sogenannte „Coley Toxin“, eine Mischung aus inaktivierten typischen Bakterien einer Septikämie.

Viele Bakterien besitzen immunstimulatorische Eigenschaften, darunter auch Mykobakterien, von denen Zellwandfraktionen eingesetzt werden (Equimune-I.V.<sup>®</sup>, Regressin-V<sup>®</sup>, zugelassen für Pferde in den USA), *Bordetella pertussis* und bestimmte anaerobe coryneforme Keime, wie z.B. *Propionibacterium acnes* (Eqstim<sup>®</sup>, für Pferde, IMMUNOVET Inc. of Tampa, Florida, USA). Eqstim<sup>®</sup>, zugelassen in den USA für respiratorische Erkrankungen beim Pferd, hatte in einer unkontrollierten Studie mit sechs Absatzfohlen nach dreimaliger intravenöser Injektion eine erhöhte CD4+T-Zellexpression und eine erhöhte Aktivität der Lymphozyten im Blut und in der BALF zur Folge. Als weitere Hinweise auf eine immunstimulierende Wirkung zeigte sich eine erhöhte Phagozytoserate bei den Blutleukozyten für nicht-opsonierte Partikel (FLAMINIO et al., 1998). Bei der Anwendung von Equimune I.V.<sup>®</sup> (Fa. Bioniche Animal Health, USA), bei dem als Indikation ebenfalls eine Förderung der Immunantwort bei respiratorischen Erkrankungen angegeben wurde, kam es bei Pferden zu schwerwiegenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen (VIEL und KENNEY, 1993) (s. auch 2.4.4.2).

Komplexe Kohlenhydrate wie z.B. Mannosepolymere aus Aloe vera-Extrakten (Acemannan Immunostimulant<sup>®</sup>, USA) und Glukane aus Zellwandbestandteilen von Hefen können ebenfalls immunstimulierende Eigenschaften aufweisen (RUSH, 2001).

Als synthetisches Immunstimulans in der Veterinärmedizin wird in der Literatur Levamisol, ein als Anthelminthikum bekannter Wirkstoff, erwähnt (TIZARD, 1993). In einer kontrollierten Studie mit 18 Stuten wurde eine Steigerung der IgG-Werte im Kolostrum der Stuten, die innerhalb von vier bis sechs Wochen dreimalig Levamisol in einer Dosis von 2,5 mg/kg Körpergewicht intramuskulär injiziert bekamen, fest-

gestellt. Den gleichen Effekt hatte 1,3/1,6-Glukan. Bei den Fohlen dieser Stuten wurde durch regelmässige Blutentnahmen und in vitro-Testverfahren eine signifikante Steigerung der zellulären Abwehrmechanismen, wie Phagozytose und Abtötung durch neutrophile Granulozyten, gegenüber den Fohlen der Kontrollgruppe nachgewiesen (KRAKOWSKI et al., 1999).

Als sogenannte endogene Immunstimulantien werden Interferon- $\alpha$  und der sog. G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) aufgeführt (RUSH, 2001).

Auf das auf inaktiviertem *Parapoxvirus ovis* basierende Präparat Zylexis<sup>®</sup> (Fa. Pfizer, Karlsruhe), vormals Baypamun<sup>®</sup> (Fa. Bayer), wird im folgenden Kapitel ausführlich eingegangen.

Immunstimulatorische Eigenschaften, z.B. die Aktivierung von antigenunspezifischen humoralen sowie zellulären Abwehrmechanismen, werden überwiegend durch Makrophagen vermittelt. Aktivierte Makrophagen produzieren hauptsächlich drei Cytokine: Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). IL-1 ist das stärkste endogene Pyrogen, IL-6 fördert die B-Zell-Differenzierung und die Synthese von Immunglobulinen, TNF- $\alpha$  führt in vitro zur Nekrose von bestimmten Tumoren (TIZARD, 1993).

Nach der Gabe von Immunstimulantien kann bei den Probanden Fieber auftreten, dies wird als systemische Reaktion auf das freigesetzte Interleukin-1 gewertet und stellt einen Hinweis auf eine Aktivierung der Immunabwehr dar (FLAMINIO et al., 1998; RUSH, 2001).

Auch im Respirationstrakt gibt es eine bakteriologische Normalflora. TIZARD (1993) stellt daher die Hypothese auf, dass es möglich sein könnte, mit dem Einsatz eines Immunstimulans und dem Verzicht auf eine Antibiotikagabe bessere Therapieerfolge bei Atemwegsinfektionen zu erzielen.

### **2.4.3 Immunstimulantien aus Pockenviren**

Die Poxviridae sind die größten bekannten Viren bei Mensch und Tier. Mit ihrer sehr komplexen genetischen Struktur und daher starken immunogenen Eigenschaften haben sie im Gegensatz zu kleineren Viren andere Strategien, um das Immunsystem zu umgehen (ANTOINE et al., 1998; FACHINGER et al., 2000). Anstatt Latenz, langsamer Replikation oder hohen Mutationsraten verfügen Poxviren über eine



Vielfalt genetisch kodierter Proteine, die mit dem Wirtsimmunsystem interagieren und ihnen ein Überleben im Körper des Wirtes ermöglichen.

Parapoxviren sind ein eigenständiges Genus innerhalb der Chordopoxvirinae, komplex strukturierter, behüllter DNS-Viren. *Parapoxvirus ovis* ist der Erreger des Ecthyma contagiosum (auch Orf oder Lippengrind genannt) beim kleinen Wiederkäuer. Der für Schafe und Ziegen hochkontagiöse Erreger, der auch auf den Menschen übergehen kann, ist weltweit verbreitet. Eine erworbene Immunität gegenüber dem Parapoxvirus nach einer natürlichen Infektion oder Impfung ist überwiegend zellulärer Natur (MAYR et al., 1984). Nach überstandener Infektion wird eine Immunität erreicht, die jedoch nicht sehr stabil ist und nach relativ kurzer Zeit (max. acht Monate) durchbrochen werden kann. Antikörper sind, vor allem bei Lämmern, bereits nach drei Wochen nicht mehr regelmäßig nachweisbar (ROLLE und MAYR, 1993). Parallel zu dem Aufbau einer virusspezifischen Immunität werden durch das Parapoxvirus aber auch erregerunspezifisch lokal und systemisch wirkende Abwehrmechanismen aktiviert, die für einen immunstimulierenden Effekt sorgen können (BÜTTNER et al., 1987; MAYR et al., 1997). Wenn diese Viren inaktiviert werden, kann ihre starke Immunogenität noch immer Immunreaktionen des Wirtes induzieren. Es gibt vermehrt Anhaltspunkte (s. auch 2.4.3.1) dafür, dass diese Reaktion nicht nur auf einer Eliminierung des Erregers basiert, sondern einen allgemein immunstimulierenden Effekt hat (FACHINGER et al., 2000).

Besonders MAYR beschäftigte sich mit der Charakterisierung dieses Zustandes und führte für diesen die Definition „Paramunität“ ein.

### 2.4.3.1 Studien zur klinischen Wirksamkeit von Parapoxviruspräparaten

1978 wurde das Potential von inaktivierten Poxviren zur Stimulierung des Immunsystems erstmals bemerkt. Inaktivierte Parapoxviren und Vogelpockenviren senkten signifikant die Mortalitätsrate bei experimentell mit *Pseudomonas aeruginosa* infizierten Mäusen (MAYR et al., 1978). Der Virusstamm 1701 des *Parapoxvirus ovis* (aus dem Genus Parapoxvirus) wurde isoliert, anschließend attenuiert und dann als Immunmodulator eingesetzt (MAYR, 1981). Am Mausmodell wurde die Wirkung von Paramunitätsinducern in vivo auf die Gesamtheit der paraspezifischen Immunität geprüft (MAYR et al., 1986). So konnte gezeigt werden, dass die Applikation des inaktivierten Parapoxvirus (Laborbezeichnung: PIND-ORF) 20 bis 24 Stunden vor

einem Infektionsversuch mit definierten Erregern die Mortalität der Mäuse im Versuch senkte. Dabei fiel besonders die 50 – 60%ige Senkung der Mortalität nach einer subkutanen Gabe von PIND-ORF und anschließender intraperitonealer Infektion mit Aujeszky-Virus auf (MAYR et al., 1986).

In weiteren Mäuseversuchen wurde bei mit PIND-ORF vorbehandelten Tieren im Vergleich zu einer Placebogruppe 8 bis 24 Stunden nach der Applikation ein signifikanter Anstieg der Interferonwerte im Serum festgestellt (MAYR et al., 1986). Bei in vitro Untersuchungen an verschiedenen Zellkulturen konnten mit PIND-ORF inkubierte Mäusehybridomazellen zur Sekretion potenter Mediatoren, wie IL-1 und IFN- $\alpha$ , angeregt werden, die wiederum im in-vivo-Belastungsmodell antivirale Abwehrleistungen induzierten (REUBEL, 1986). Nach der Applikation von verschiedenen Paramunitätsinducern an Kälber innerhalb von sechs Stunden post natum und am siebten Lebenstag, darunter auch PIND-ORF, wurde in in-vitro-Tests eine gesteigerte Phagozytoseaktivität, Neutrophilie und ein Anstieg der Bakterizidie gegen *E. coli* im Blut beobachtet (GIESE et al., 1989).

Es liegen nur wenige Studien zur Wirksamkeit von Baypamun<sup>®</sup> (Fa. Bayer) mit Pferden vor. Zylexis<sup>®</sup> ist lediglich ein neuer Produktname, der seit dem Übergang der Lizenz auf die Firma Pfizer eingeführt wurde. In einer klinischen, placebo-kontrollierten Blindstudie mit 53 zwischen vier und zehn Monate alten Pferden, die dem Stress von Absetzen, Transport und Neugruppierung ausgesetzt wurden, konnten signifikant bessere klinische Scores bei den Tieren der Baypamun<sup>®</sup>-Gruppe festgestellt werden. In dieser Studie injizierte man den Pferde am Tag 0, 2 und 9 jeweils zwei Milliliter Baypamun<sup>®</sup> bzw. Plazebo intramuskulär. Tag 0 war der Tag, an dem die Pferde in einem Stall zusammengestellt wurden. (ZIEBELL et al., 1997). Vom Einsatz von PIND-AVI (Laborbezeichnung für das inaktivierte Avipoxvirus) auf acht Gestüten, bei denen durch Paramunisierung der Fohlen sofort nach der Geburt sowie acht und 24 Stunden später durch subkutane Injektion die generelle Morbidität von 70-90% vorangegangener Abfohlperioden auf 7% gesenkt werden konnte, berichtet MAYR-BIBRACK (1980).

Der prophylaktische Einsatz von inaktiviertem *Parapoxvirus ovis* in einer Blindstudie reduzierte durch einmalige intramuskuläre Injektion innerhalb von vier bis sechs Tagen vor dem Absetzen die Inzidenz von respiratorischen Erkrankungen bei den

behandelten Fohlen (7,9%) im Vergleich zur Placebogruppe (24%) (BÖTTCHER, 1994).

Die Wirksamkeit einer zweimaligen Paramunisierung mit Baypamun® zu unterschiedlichen Zeitpunkten prae infektionem bei 16 neun Monate alten Rindern zur Prophylaxe einer experimentellen Infektion mit dem Virus der Infektiösen Bovinen Rhinotracheitis wurde von STRUBE et al. (1989) untersucht. Die paramunisierten Tiere erkrankten weniger häufig nach experimenteller Infektion, schieden über 99% weniger infektiöses IBR-Virus aus und reagierten bezüglich der Interferonsynthese schneller auf die Virusinfektion als die nicht-paramunisierten Tiere. Es zeigte sich auch, dass die vollständige Etablierung des Schutzzustandes bis zu drei Tage benötigt, da erst dann ein signifikanter Anstieg des Interferons im Blut auftrat.

Es wird davon ausgegangen, dass die immunstimulierende Aktivität nach der Applikation eines inaktivierten *Parapox ovis*-Präparates für maximal acht Tage anhält (RUSH, 2001).

#### 2.4.3.2 Labordiagnostischer Nachweis von immunologischen Reaktionen auf Parapoxviruspräparate

Paramunitätsinducer aus Pockenviren können die Natürlichen Killerzellen aktivieren und mit der spontanen, zellvermittelten Zytotoxizität interagieren (MAYR, 1982; BÜTTNER et al., 1983 + 1987). Bei Mäusen konnte nach einer Injektion mit chemisch inaktivierten Parapoxvirus-Präparaten eine Erhöhung der zytotoxischen Aktivität der Natürlichen Killerzellen erreicht werden. Die parallel laufenden kinetischen Studien zeigten maximale Aktivität innerhalb von zehn Stunden nach der Injektion (STRUBE et al., 1994).

Acht verschiedene Poxvirus-Stämme aus den drei Genus Orthopoxvirus, Avipoxvirus und Parapoxvirus wurden in vitro auf ihre Fähigkeit, Zellen des angeborenen und spezifischen Immunsystems des Schweines zu aktivieren, getestet (FACHINGER et al., 2000). Dabei zeigte sich, dass kein Poxvirus in der Lage war, die Phagozytoseraten, die Abtötung von Erregern über reaktive Sauerstoffverbindungen (sog. oxidative burst) oder die Aktivität der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) beim Schwein zu steigern. Stattdessen fanden sie eine vermehrte Aktivität von CD4+T-Helferzellen, die für einen starken Anstieg und Freisetzung von Interleukin-2,

$\alpha$ -Interferon und  $\gamma$ -Interferon sorgen. Diese aufgrund einer Stimulation durch ein Poxvirus freigesetzten Zytokine haben antivirale und immunmodulatorische Eigenschaften, die mildere Symptome und schnellere Rekonvaleszenz bei behandelten Tieren gegenüber unbehandelten Kontrollgruppen bewirken könnten (STRUBE et al., 1989; ZIEBELL et al., 1997; FACHINGER et al., 2000). Dabei haben die Zytokine unterschiedliche Aufgaben in der Aktivierung des Immunsystems des Probanden. Die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen wird durch den Wachstumsfaktor Interleukin-2 gesteuert, der von den aktivierten T-Zellen selbst gebildet wird.

Das Interferon- $\alpha$  gehört zu den antiviralen Interferonen. Es behindert die virale Replikation und erhöht - über die verstärkte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen in körpereigenen Zellen - die Resistenz gegenüber Viren. Ebenso aktiviert IFN- $\alpha$  die NK-Zellen, die wiederum virusinfizierte Zellen töten (JANEWAY und TRAVERS, 1997). Interferon- $\gamma$ , ist ein Makrophagen-aktivierendes Zytokin, das die Phagosom-Lysosom-Fusion fördert und die Expression von Fc-Rezeptoren heraufsetzt. Im Mäuseversuch wurde gezeigt, dass eine Abtötung von *R. equi* auch von Interferon- $\gamma$  abhängig ist (DARRAH et al., 2000).

Die Ergebnisse von FACHINGER et al. (2000) unterstreichen eine zellvermittelte Immunreaktion auf inaktivierte Parapoxviren. Die dementsprechend spät einsetzende Poxvirus-induzierte Zytokinfreisetzung (ein Maximum wird nach sieben bis acht Tagen erreicht) erklärt, warum lediglich eine prophylaktische und metaphylaktische, aber keine therapeutische, Wirksamkeit beobachtet wird (KYRIAKIS et al., 1998; FACHINGER et al., 2000).

Es gibt nur wenige in vitro Untersuchungen unter Verwendung von Zellen des equinen Immunsystems, die zur Wirksamkeit von Poxviruspräparaten durchgeführt wurden.

Die Steigerung der Phagozytoseaktivität von equinen Granulozyten ist nach einer Inkubation mit Parapoxvirus ovis in vitro nachgewiesen worden (FÖRSTER, 1991). Beim Pferd konnte weiterhin die Hemmung des stressinduzierten Kortisolanstiegs nach vorheriger Behandlung mit PIND-ORF festgestellt werden (SIEBERT, 1988, MAYR und SIEBERT, 1990). In einer Studie an Islandpferden wurde auch nach vielfacher Wiederholung über Monate und unterschiedlichen Dosierungen kein Einfluß des Immunmodulators Baypamun<sup>®</sup> auf die Typ-I-Allergie des Pferdes

nachgewiesen (GEIBEN, 2003). Allerdings konnten in den Serumproben der Probanden auch keine Hinweise auf eine Sensibilisierung gegenüber Baypamun<sup>®</sup> gefunden werden, so dass es trotz seiner Immunogenität vermutlich nicht zu allergischen Reaktionen führen kann. Die Immunogenität von Baypamun<sup>®</sup> zeigte sich in dieser Studie durch die Induktion von spezifischen Antikörpertitern unterschiedlicher IgG-Subtypen.

### **2.4.4 Der Immunmodulator Zylexis<sup>®</sup>**

#### 2.4.4.1 Indikation, Herstellung und Inhaltsstoffe

Der Immunmodulator „Zylexis<sup>®</sup>“ der Firma Pfizer (Karlsruhe) ist für die Unterstützung bei der Vorbeugung und Behandlung von infektiösen und/oder stressbedingten Erkrankungen bei Hund, Katze, Pferd, Rind und Schwein zugelassen. Das Präparat soll die Proliferation von Lymphozyten stimulieren und die Produktion von antiviralen Interferonen und Interleukinen in den Lymphozyten induzieren.

Das Präparat setzt sich zusammen aus inaktiviertem *Parapoxvirus ovis* (Stamm D1701), Polygeline und Aqua ad injectionem.

Für die Produktion von Zylexis<sup>®</sup> wird der Stamm D1701 des *Parapoxvirus ovis* auf Rindernierenzellkulturen angezüchtet. Nach einer Titration wird das Produkt von Zelldebris gereinigt. Das Virus wird dann mit binärem Ethylenimin chemisch inaktiviert und mittels Ultrafiltration konzentriert. Anschließend erfolgt eine Resuspendierung in Medium und eine Einstellung auf den Produkttiter von  $10^{6.75}$  GKID<sub>50</sub>/ml (Gewebekultur-Infektiöse-Dosis). Vor der Lyophilisierung werden zur Stabilisierung 25 mg/ml Polygeline dazugegeben (FACHINGER et al., 2000). Die Lagerung erfolgt bei +2 bis +8°C.

Direkt vor dem Gebrauch wird das Lyophilisat wieder in dem mitgelieferten Aqua ad injectionem aufgelöst. Es sollte dann innerhalb von acht Stunden verbraucht werden.

### 2.4.4.2 Anwendung: parenteral versus lokal

Eine Dosis Zylexis<sup>®</sup> beträgt, unabhängig von Alter und Gewicht, für Pferde zwei Milliliter. Diese Dosis entspricht mindestens 460 Interferon Einheiten, die im Wirksamkeitstest von der Firma Pfizer, Karlsruhe bestimmt worden sind. Die in der Packungsbeilage empfohlene Anwendungsart für Pferde, Rinder und Schweine ist die intramuskuläre Injektion. Bei Hund und Katze ist eine subkutane Injektion vorgesehen. Dies entspricht den gängigen Applikationsmethoden bei diesen Tierarten und wurde bei der Zulassung nicht weiter berücksichtigt (persönl. Mitteilung Fa. Bayer).

Die Unterhaut verfügt über spezielle immunologische Abwehreinrichtungen im Gegensatz zum Muskel. Daher ist für die parenterale Anwendung eine subkutane Injektion für einen Immunmodulator auch beim Pferd interessant. Der Muskel allerdings wird stärker durchblutet und hat eine hohe Stoffwechselrate. Bei den angewandten kleinen Volumina spielt aber die verzögerte Verstoffwechslung des Produktes in der Unterhaut eine eher untergeordnete Rolle. Die meisten Impfstoffe werden beim Pferd ebenfalls durch Injektion verabreicht. Der Nachteil aus immunologischer Sicht besteht darin, dass für die meisten Erreger, gegen die die Impfung gerichtet ist, eine Injektion nicht der übliche Infektionsweg ist (JANEWAY und TRAVERS, 1997). Auch eine *R. equi*-Infektion findet mit hoher Wahrscheinlichkeit über den Atmungstrakt statt. Die intranasale Applikation wiederum zielt darauf, die mukosale Immunantwort im Respirationstrakt zu aktivieren. Es existieren zur Zeit noch keine Erfahrungen zu einer intranasalen und/oder mukosalen Anwendung von Zylexis<sup>®</sup>.

Hingegen sind zahlreiche Studien über den intranasalen Einsatz von BCG (Bacillus Calmette-Guérin), einem attenuierten Stamm von *Mycobacterium tuberculosis*, beschrieben. Durch intranasale Vakzinierung mit BCG bei Mäusen wird ein Schutz, der auch Infektionsversuchen mit pathogenen Mykobakterien-Stämmen standhielt, erreicht. In der Lunge und der Milz wurde so eine hundertfache Reduzierung der CFUs (cell forming units) erreicht (FALERO-DIAZ et al., 2000). In einer weiteren Studie bot die intranasale Vakzination von Mäusen mit BCG einen hohen Schutz gegen die intravenöse Infektion mit einem *Mycobacterium bovis* Feldisolat. Dieser Schutz korrelierte mit einer schnellen Interferon- $\gamma$ -Produktion der T-Zellen der Lunge (LYADOVA et al., 2001).

Die BCG-Vakzination durch subkutane Injektion verglichen mit der intranasalen Vakzination bei Mäusen untersuchten CHEN et al. (2004). Sie fanden, dass beide Wege zu einem vergleichbaren Status der primären Immunantwort in Milz und Lymphknoten führten. Die intranasale Verabreichung dagegen induzierte einen höheren Interferon- $\gamma$ -Spiegel und einen Anstieg der antigenspezifischen Lymphozyten. Zusätzlich war die zelluläre Immunantwort in der Lunge bei intranasal vakzinierten Mäusen bei den folgenden Infektionsversuchen schneller (CHEN et al., 2004). In Neuseeland wurden Studien durchgeführt, um die endemische Infektion mit boviner Tuberkulose unter in freier Wildbahn lebenden Opossums über eine Aerosolvakzination mit BCG mittels automatischer Systeme zu reduzieren. Erste Ergebnisse scheinen positive Wirkung der Impfung zu zeigen (CORNER et al., 2001 + 2002; DOOLIN et al., 2002). Dabei stellte sich auch heraus, dass eine häufigere (zwölfmal im wöchentlichen Abstand) intranasale Vakzination in Infektionsversuchen mit intratrachealer Verabreichung eines *Mycobacterium bovis*-Stammes die beste Schutzwirkung hatte (CORNER et al., 2002).

Diesen äußerst positiven Erfahrungen bezüglich der Wirksamkeit des Einsatzes von BCG in der Infektionsprophylaxe stehen erhebliche mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen gegenüber. So wurde an Mäusen, die intranasal mit BCG behandelt wurden eine dosisabhängige granulomatöse Infiltration der Lunge beobachtet. Dies trat bei einer subkutanen Injektion nicht auf. Höhere Dosen intranasal verabreichten BCGs boten einen besseren Schutz in Infektionsversuchen mit *M. tuberculosis*, waren aber gleichzeitig verbunden mit einer gesteigerten Anzahl granulomatöser Veränderungen in der Lunge (TREE et al., 2004).

Beim Menschen wird BCG als Lebendvakzine zur Therapie beim Harnblasenkarzinom intravesical instilliert. Dabei wurde sowohl eine systemische als auch lokale Immunstimulation festgestellt (ELSASSER-BEILE, 2000). Auch in dieser Therapieform wird von pathologischen Lungenreaktionen berichtet. Bei etwa 1 % der Patienten traten interstitielle Pneumonien mit disseminierten Lungengranulomen auf (DE DIEGO et al., 1997).

Bei vier Pferden wurden nach der intravenösen Gabe von gereinigten Zellwandextrakten von Mykobakterien (Equimune I.V.<sup>®</sup>) unerwünschte Reaktionen in der Lunge festgestellt (VIEL und KENNEY, 1993). Alle getesteten Pferde (n = 3) wiesen eine deutliche lokale Reaktion auf den intradermalen Hauttest mit Equimune I.V.<sup>®</sup> auf. Die pulmonalen Veränderungen traten nach der Anwendung auf und reichten

von granulomatöser Pneumonie über Bronchiolitis bis zu progressiver Lungenfibrosierung. Die klinischen Anzeichen waren dabei Husten, Fieber, Tachypnoe und Lethargie. Labordiagnostisch fiel eine Leukozytose auf. In der BALF fanden sich erhöhte Zellzahlen und eine deutliche lymphozytäre Inflammation. Röntgenaufnahmen des Thorax deuteten auf eine diffuse interstitielle Verteilung der Lungenveränderungen hin.

Wie bereits erwähnt, ist *Rhodococcus equi* eng verwandt mit den Mykobakterien, besonders mit *Mycobacterium tuberculosis*, so dass sogar ein Großteil seiner Gensequenzen sehr ähnlich ist (RAHMAN et al., 2003). Aufgrund der oben mit einigen Studien angeführten Nebenwirkungen erscheint aber ein Einsatz von BCG in einer großen klinischen Studie mit neugeborenen Fohlen sehr riskant. Dagegen wurde die klinische Wirksamkeit und Unschädlichkeit des Präparates Zylexis® (Fa. Pfizer, Karlsruhe), das zuvor von der Firma Bayer unter dem Namen Baypamun® vertrieben wurde, in in vivo und in vitro Studien bereits belegt. Daher ist das Nebenwirkungsrisiko für dieses Präparat als geringer einzustufen.



### **3 Probanden, Material und Methode**

In dieser Studie sollte die Wirksamkeit des Paramunitätsinducers Zylexis® (Fa. Pfizer, Karlsruhe) für die Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen untersucht werden. Dafür wurde in einer klinischen, kontrollierten und randomisierten Studie das Präparat in festgelegten Zeitabständen, beginnend am Tag der Geburt, an 45 Fohlen systemisch und an weitere 45 Fohlen intranasal verabreicht. Eine Kontrollgruppe von 45 Fohlen blieb ohne Medikation. Die Fohlen wurden über fünf Monate regelmäßig klinisch und ultrasonographisch untersucht.

#### **3.1 Probanden**

Die vorliegende Studie wurde auf einem norddeutschen Warmblutgestüt mit endemischer Rhodokokkose bei den Fohlen im Zeitraum von Anfang April bis Oktober 2005 durchgeführt. Die Fohlen gehörten unterschiedlichen Warmblutpferderassen an und wuchsen unter gleichen Haltungsbedingungen auf.

Jedes Fohlen erhielt auf dem Gestüt eine Karte, auf der Abstammung, Geburtsverlauf, postkolostraler IgG-Wert, Abzeichen und die Ergebnisse der regelmäßigen Untersuchungen dokumentiert wurden. Vor dem Verlassen des Abfohlstalles wurde jedem Fohlen ein Mikrochip mit einer individuellen Nummer an der linken Halsseite unter die Haut implantiert, so dass es mittels eines Chiplesegerätes stets eindeutig identifizierbar war.

In die Studie wurden 134 Fohlen (62 Stuten und 72 Hengste) aufgenommen, die im Zeitraum vom 8. April bis 12. Mai 2005 geboren wurden.

#### **3.2 Haltung und Fütterung**

Die hochtragenden Stuten wurden ca. zwei Wochen vor dem errechneten Abfohltermin aus Gruppenlaufställen in Einzelboxen in einem separaten Abfohlbereich umgestallt. Dieser wurde vor jeder Neubelegung zunächst mittels Hochdruckreiniger gründlich gereinigt, getrocknet und dann mit Neopredisan 4% (Menno-Chemie, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Nach den Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen wurden die 3 x 4 m großen Boxen mit Stroh eingestreut.

Der Abfohlbereich war nur durch eine Hygieneschleuse für Besucher und Personal zu betreten. Dort wurde das Schuhwerk gewechselt und die für diesen Stalltrakt vorgesehenen Kittel angezogen. Die Desinfektionsmatten im Eingangsbereich

wurden mit dem Desinfektionsmittel Neopredisan 4% (Menno-Chemie, Norderstedt, Deutschland) getränkt.

Post partum blieben die Stuten mit ihrem Fohlen für mindestens sieben Tage in der Einzelbox. Danach erfolgte eine Aufstallung in auf gleiche Weise vorgereinigten und mit Stroh eingestreuten überdachten Gruppenlaufställen, die über einen nicht-überdachten betonierten Auslauf verfügten. Die Gruppengrößen lagen dabei zwischen acht und zwölf Stuten mit Fohlen, so dass jeder Stute ungefähr eine Troglänge von einem Meter zugänglich war. Stroh stand den Tieren dort zur freien Verfügung. Ab Mitte Mai erfolgte der Weideaustrieb in Gruppen von etwa dreißig Stuten mit ihren Fohlen, die nach dem Alter der Fohlen zusammengestellt wurden. Grundsätzlich blieben die Fohlen bis zu einem Alter von mindestens vier Wochen im Laufstall und wurden von dort mit den Stuten auf die Weide gebracht. Die Weidesaison dauerte dank guter Witterungsverhältnisse bis Mitte Oktober.

Im Falle einer Erkrankung wurden die Stuten mit ihren Fohlen zurück in die Laufställe gebracht.

### ***3.3 Geburtshygiene und –überwachung sowie Erstversorgung der Fohlen***

Die Stuten wurden im Abfohlstall Tag und Nacht vom Personal überwacht. Bei Anzeichen einer anstehenden Geburt wurde der Schweif der Stute einbandagiert.

Sofern notwendig wurde während der Geburt Zughilfe geleistet. Nach dem Austritt des Fohlens und dem Abriß der Nabelschnur wurde der Nabel erstmals mit einer iodhaltigen Lösung (Braunovidon<sup>®</sup>, Braun, Melsungen, 1:10 mit Wasser verdünnt) desinfiziert. Um eine ausreichende Kolostrumaufnahme innerhalb der ersten beiden Lebensstunden zu erreichen, leistete das Personal den schwachen neonaten Fohlen nach einer Stunde Aufstehhilfe und führte sie ans Euter. Geling dies nicht, wurde den Neugeborenen abgemolkenes Kolostrum der Stute in einer Babyflasche angeboten, bis sie mindestens 250 Milliliter aufgenommen hatten.

Acht bis zehn Stunden post natum wurde das Fohlen tierärztlich untersucht. Dabei erfolgte eine klinische Allgemeinuntersuchung mit Auskultation von Lunge, Trachea und Herz, Palpation des Nabels und eine Kontrolle auf eventuelle Missbildungen. Eine Bestimmung der Immunglobulin-G Konzentration im Blut wurde mittels eines IgG-Tests (Snap<sup>®</sup> Foal IgG-Test, Idexx GmbH, Wörrstadt) ebenfalls durchgeführt. Lag der zu diesem Zeitpunkt nachgewiesene Immunglobulingehalt im Blut des Fohlens

unter 8 g/L, so erhielt das Fohlen 500 ml aufgetautes Kolostrum guter Qualität (IgG > 60 g/L) aus der gestütseigenen Kolostrumbank. Wenn nach erneuter Bestimmung nach sechs Stunden der IgG-Gehalt immer noch zu niedrig war, so wurde dem Fohlen ein Liter Plasma infundiert, da die Aufnahme von Immunglobulinen über den Darm zwar noch bis 24 Stunden post natum möglich, aber bereits deutlich herabgesetzt ist. Das Plasma hierfür stammte von adulten Pferden des Betriebes und wurde für diesen Zweck vorrätig gehalten.

Der Nabel wurde während der ersten Lebenstage täglich bis zum endgültigen Abtrocknen mit verdünnter Iodlösung gedippt.

### **3.4 Bedingungen für die Aufnahme in die Studie**

In die Studie wurden nur klinisch gesunde neonate Fohlen aufgenommen. Zur Prüfung des Gesundheitszustandes diente die tierärztliche Untersuchung innerhalb von acht bis zehn Stunden post natum. Der IgG-Gehalt im Blut des Fohlens sollte zu diesem Zeitpunkt, der gleichzeitig den ersten Applikationszeitpunkt von Zylexis® darstellte, über acht g/l betragen. Weiterhin wurden nur termingerecht geborene Fohlen von klinisch gesunden Mutterstuten in die Untersuchungen mit einbezogen. Hierbei wurde eine Tragzeit von 336 Tagen +/- 21 Tage festgelegt.

Fohlen, die diese Einschlusskriterien erfüllten, wurden am ersten Lebenstag einer ultrasonographischen Untersuchung der Lunge unterzogen. Somit war sichergestellt, dass nicht bereits direkt post natum Veränderungen an Pleura und/ oder Lunge vorlagen. Es gingen nur Fohlen in die Studie ein, die auf dem Gestüt unter gleichen Hygienebedingungen geboren wurden und unter gleichen Haltungsbedingungen aufwuchsen.

### **3.5 Impfungen und Entwurmungen**

Die Stuten des Zuchtbetriebes wurden regelmäßig entwurmt. Dreimal jährlich wurden alle Stuten gegen equine Herpesvirus-Infektionen geimpft und zweimal jährlich gegen Influenza.

Die Fohlen erhielten am Tag der Geburt und am darauffolgenden Tag ein stallspezifisches Oralplasma gegen Rota- und Coronaviren (Eurovet, Smöaunn, Dänemark). Die erste Entwurmung der Fohlen erfolgte am 12. Lebenstag mit Ivermectin ( Ivomec-P® , Fa. Merial, Hallbergmoos).

Die weiteren Entwurmungen der Fohlen wurden 4-wöchentlich durchgeführt, dabei wurde Pyrantelmoat (Banminth®-Pferdepaste, Fa. Pfizer, Karlsruhe) im Wechsel mit Ivermectin (Ivomec-P®, Fa. Merial, Hallbergmoos) angewandt.

### **3.6 Einteilung in Gruppen**

Nach der Geburt als klinisch gesund beurteilte Fohlen wurden alternierend in drei Gruppen eingeteilt. Die Zuteilung zu den Gruppen erfolgte nach dem Zufallsprinzip und wurde vor Beginn der Studie festgelegt. Jedes Fohlen war somit zum Zeitpunkt seiner Geburt schon einer festen Gruppe zugeordnet. Alle Fohlen, die den festgelegten Kriterien dieser Studie entsprachen, wurden geordnet nach Geburtsdatum und –zeit aufgenommen. Es wurden die folgenden drei Gruppen gebildet:

Gruppe A : erhielt den Paramunitätsinducer Zylexis® subkutan  
(n=45, davon 22 Hengste und 23 Stuten)

Gruppe B: erhielt den Paramunitätsinducer Zylexis® intranasal  
(n=45, davon 29 Hengste und 16 Stuten)

Gruppe C: diente als Kontrollgruppe und blieb ohne Medikation  
(n=44, davon 21 Hengste und 23 Stuten)

#### **3.6.1 Gruppe A (Zylexis® s.c.)**

Diese Gruppe bestand aus 45 Fohlen. Die Tiere erhielten pro Injektion zwei Milliliter des Paramunitätsinducers Zylexis® subkutan. Dabei erfolgten die ersten Injektionen bis zu einem Alter von einem Monat unter die Haut an der vorderen Brustmuskulatur. Die folgenden Dosen wurden aus Sicherheitsgründen bei Abwehrreaktionen des Fohlens für die Helfer, die das Fohlen fixieren, und den Anwender seitlich am Hals appliziert.

Zwei Fohlen dieser Gruppe wurden im Alter von zwei Monaten euthanasiert. Fohlen Nr. 44 aufgrund von Kolik, Fohlen Nr. 45 aufgrund einer perakuten interstitiellen Pneumonie.

### **3.6.2 Gruppe B (Zylexis® i.n.)**

Bei den 45 Fohlen dieser Gruppe wurde Zylexis® intranasal angewandt. Eine Dosis betrug auch hier zwei Milliliter des resuspendierten Produktes, diese wurde aufgeteilt in je 1 ml pro Nüster. Dafür wurden in zwei sterile 2 ml Spritzen jeweils 1ml Zylexis® zusammen mit 1 ml Luft aufgezogen. Ein 65 mm langer und vom Durchmesser 5 mm starker Intranasalapplikator aus Plastik mit Lueransatz (Fa. Pfizer, Karlsruhe) wurde für die Applikation verwendet. Er wurde in den ventralen Nasengang bei leicht hochgehaltenem Kopf des Fohlens, welches von zwei Helfern fixiert wurde, eingeführt. Beim Druck auf den Stempel der Spritze wurde durch die feine Austrittsöffnung des Applikators ein feiner Sprühnebel erzeugt. Die Luft in der Spritze diente dazu, das gesamte Produkt bei der Applikation aus dem Aufsatz zu verdrängen. Um dies zu gewährleisten, wurde die Austrittsöffnung des Applikators während der Anwendung immer leicht nach unten gehalten.

In dieser Gruppe musste das Fohlen Nr. 90 im Alter von 34 Tagen aufgrund unstillbaren, therapieresistenten Durchfalls euthanasiert werden.

### **3.6.3 Gruppe C (Kontrollgruppe)**

Die Gruppe C diente als Kontrollgruppe. Die 44 Fohlen erhielten kein Zylexis®, wurden aber ansonsten nach dem gleichen Protokoll wie die beiden Versuchsgruppen mituntersucht. Auch von diesen Fohlen wurden alle zwei Wochen Blutproben entnommen und sie wurden ebenfalls der ultrasonographischen Untersuchung der Lunge unterzogen.

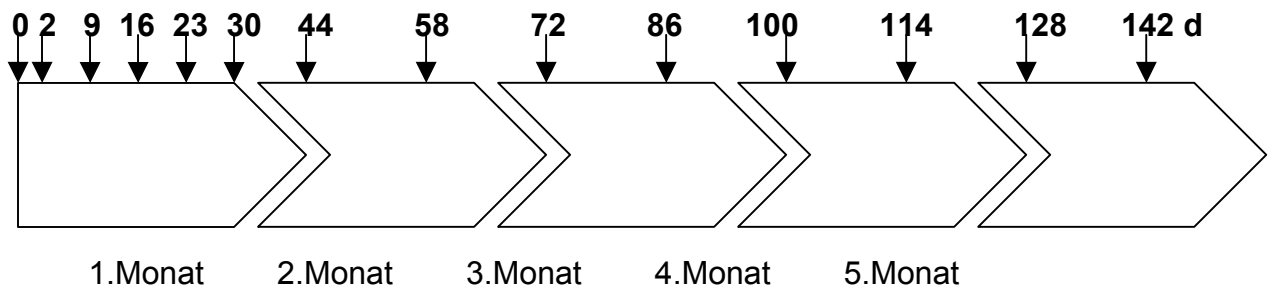
Das Fohlen Nr. 112 wurde mit dreieinhalb Monaten aufgrund einer purulenten Gelenksentzündung euthanasiert. Es befand sich zu diesem Zeitpunkt bereits seit fünf Wochen in spezifischer Antibiotikabehandlung aufgrund einer Sprunggelenksentzündung mit anfänglichem Fieber.

## **3.7 Die Applikationszeitpunkte von Zylexis® für ein Fohlen im Laufe der Studie**

Die Fohlen der Versuchsgruppen A (Zylexis® s.c.) und B (Zylexis® i.n.) erhielten zwei Milliliter Zylexis® das erste Mal innerhalb von acht bis zehn Stunden post natum (= Tag 0) nach der ersten tierärztlichen Untersuchung (s. auch 3.4).

Weitere Applikationen fanden 48 Stunden später (Toleranz: +/- 6 h) und am neunten Lebenstag statt. Danach wurde Zylexis® dreimal in 7-tägigem (Toleranz: +/- 1 Tag) Abstand angewendet. Ab dem zweiten Lebensmonat erfolgte die Gabe alle zwei Wochen bis zu einem Alter des Probanden von fünf Monaten. Jedes Fohlen der Gruppen A und B erhielt so im Laufe der Studie vierzehn Mal den Paramunitätsinducer Zylexis® in den aufgeführten Abständen. Erkrankte Fohlen blieben weiterhin in der Studie und im Applikationsrhythmus.

In Abb. 1 wurde zur besseren Übersicht der Verlauf der Studie nochmals graphisch dargestellt. Dabei wurden die Applikationstage (d) beginnend mit Tag 0 (=Tag der Geburt) in den jeweiligen Lebensmonaten des Fohlens dargestellt.



**Abb. 1.** Applikationszeitpunkte von Zylexis® bei den Fohlen der Gruppen A und B

### 3.8 Der Paramunitätsinducer Zylexis®

Für diese Studie stand Zylexis® (Fa. Pfizer, Karlsruhe) in lyophilisierter Form zur Verfügung. Eine Dosis betrug jeweils zwei Milliliter Zylexis® pro Fohlen. Dabei enthält ein Milliliter des resuspendierten Produktes nach Herstellerangaben chemisch inaktiviertes Parapoxvirus ovis, Stamm D 1701 mit mindestens 230 Einheiten IFN und ca. 25 mg Polygeline (Stabilisator) gelöst in Aqua ad injectionem.

Alle Packungen mit Zylexis® wurden im Kühlschrank bei Temperaturen von +2 - +8°C auf dem Gestüt gelagert. Zur Verfügung standen zwei verschiedene Packungsgrößen. Es wurde die Abpackung in fünf Einzeldosen à fünf Glasflaschen mit Trockensubstanz, die jeweils mindestens 460 Einheiten Interferon (IFN) enthielten, mit dazugehörigen fünf Flaschen mit je zwei Milliliter Suspensionsmittel, verwendet. Ebenso zur Anwendung kam die Verpackungseinheit mit einer Glasflasche mit Trockensubstanz, die mindestens 4600 Einheiten Interferon enthielt,

mit dazugehöriger Flasche mit zwanzig Milliliter Suspensionsmittel. Die letztgenannte Packungsgröße reichte für zehn Einzeldosen á zwei Milliliter. Die Trockensubstanz wurde erst direkt vor dem Verbrauch unter aseptischen Bedingungen resuspendiert. Zur Resuspension der zwei Milliliter Äquivalente wurde das gesamte Volumen des entsprechenden Suspensionsmittels in die Flasche mit der Trockensubstanz überführt. Bei den zwanzig Milliliter Äquivalenten der gefriergetrockneten Zubereitung wurden zunächst vier Milliliter des Suspensionsmittels in die Flasche mit der Trockensubstanz überführt. Nach vorsichtigem Schwenken (um zu starke Schaumbildung zu vermeiden) wurde die vollständig resuspendierte Lösung komplett in die Flasche mit dem restlichen Suspensionsmittel übertragen. Unmittelbar vor der Anwendung wurden alle Flaschen nochmals geschüttelt. Das resuspendierte Produkt wurde innerhalb von acht Stunden verbraucht.

### **3.9 Klinische Untersuchung der Fohlen**

Alle Fohlen wurden zweiwöchentlich bis zu einem Alter von fünf Monaten klinisch untersucht. Die Fohlen wurden für die Untersuchung von zwei Helfern an Kopf und Schweif fixiert. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Untersuchung des Respirationstraktes (s. auch 3.9.1). Um ein klinisches Gesamtbild des Gesundheitszustandes des Fohlens zu erhalten, wurde außerdem die Rektaltemperatur gemessen. Es wurde außerdem auf Umfangsvermehrungen, vermehrt gefüllte Gelenke, Fehlstellungen und eventuelle Lahmheit geachtet. Die Schweifunterseite wurde auf Spuren von Durchfall beurteilt. Der Nabel wurde adspektorisch und bei Auffälligkeit sonographisch beurteilt sowie Nabelbrüche notiert.

#### **3.9.1 Spezielle Untersuchung des Respirationstraktes**

Dabei erfolgte die Auskultation von Trachea und Lunge über mindestens zwei Atemzüge. Sowohl auf der rechten als auch auf der linken Thoraxseite wurde die Lunge an drei verschiedenen Stellen auskultiert: cranial (Spitzenlappen), Mitte (Bronchialbaum), caudodorsal (kaudaler Lungenflügel). Dabei lauteten die Befunde von gering- bis hochgradig verschärftem physiologischen Atemgeräusch bis zum Rasseln oder Giemen.

Die Lymphonodi mandibulares wurden palpatorisch untersucht und Auffälligkeiten notiert.

Weiterhin wurde der Nasenausfluß und seine Qualität (serös, mukös, purulent) beurteilt.

Während der Untersuchung wurde auf spontanes Husten geachtet. Husten galt als auslösbar, wenn auf leichten Druck auf die ersten Trachealspangen hinter dem Kehlkopf mehrfaches Husten auftrat.

Die Befunde wurden auf Untersuchungsbögen notiert. Um eine objektive Beurteilung des Lungenstatus zu erhalten, bekam jeder Befund eine Note. Die Summe dieser Noten wurde gebildet und als „klinischer Score“ nach Ohnesorge et al. (1998) angegeben (s. Tab. 1). Fohlen mit einem Gesamtscore von 0 – 1 wurden als gesund eingestuft. Bei einem Score von 2 – 3 gelten die Fohlen als geringgradig, bei 4 – 6 als mittelgradig und bei über 7 als hochgradig erkrankt.

**Tab. 1. Klinischer Score zur Beurteilung des Schweregrades einer Lungenerkrankung (nach OHNESORGE et.al., 1998)**

Merkmal	Befund	Punktzahl
Atemfrequenz	< 80	0
	> 80	1
Nasenausfluß	nein	0
	serös, seromukös, mukös	1
	mukopurulent, purulent	2
Husten	nicht auslösbar	0
	mehrfach	1
	spontan	2
Lnn. mandibulares	o.b.B.	0
	vergrößert	1
Ruhedyspnoe	nein	0
	Einsinken der Interkostalräume, Nüsternblähen	3
Lungenauskultation	vesikulär, vesikulär verschärft	0
	hochgradig verschärft	1
	Rasseln, Knistern, Giemen	2
Tracheaauskultation	o.b.B.	0
	Rasseln	2
Gesamtscore		0 – 13



### **3.10 Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut**

Alle 14 Tage fand auch eine Blutentnahme aus der Vena jugularis zur Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut statt. Die Vene wurde mit einer sterilen Einmal-Kanüle (Sterican<sup>®</sup>, 1,20 x 40 mm, 18 G x 1 ½“, Fa. Braun, Melsungen) punktiert und etwa 1 ml Blut in einem mit Antikoagulans beschichteten Röhrchen (EDTA-Röhrchen, 4ml, Fa. Sarstedt) aufgefangen. Anschließend wurde im Labor die Leukozytenzahl im Blut mit Hilfe des Blutanalysegerätes „Sysmex KX 21N“ (Sysmex, Hamburg) bestimmt und in G/l angegeben.

Lag der Blutleukozytenwert über 13000 G/l und die ultrasonographische Untersuchung der Lunge zeigte (noch) keine Lungenabszesse, so wurde die Blutprobe bereits in der darauffolgenden Woche wiederholt.

### **3.11 Ultrasonographische Untersuchung der Lunge**

Alle Fohlen dieser Studie wurden routinemäßig 14-tägig im Rahmen der klinischen Untersuchung auch einer ultrasonographischen Untersuchung der Lunge unterzogen. Lag der Blutleukozytenwert über  $13 \times 10^9/l$ , so wurde das betreffende Fohlen bereits nach einer Woche wieder sonographisch untersucht. Diese Untersuchung diente der diagnostischen Früherkennung einer *R. equi*-Pneumonie, wenn dabei im Ultraschallbild Lungenabszesse darstellbar waren.

Die erste sonographische Untersuchung am Tag der Geburt wurde genutzt, um perinatale Veränderungen von Pleura und/ oder Lunge des Probanden auszuschließen.

Bei den erkrankten und in Behandlung befindlichen Fohlen fand vor dem Absetzen der Antibiotika eine sonographische Untersuchung der Lunge statt, um bei noch vorhandenen Befunden (mehrere Pneumonien oder Abszess) gegebenenfalls die Therapie zu verlängern.

#### **3.11.1 Durchführung der ultrasonographischen Untersuchung**

Für die Untersuchungen stand ein tragbares Ultrasonographiegerät (SONOVET 2000, Osteosys Co., Seoul, Korea) mit einem 7,5 MHz-Linearschallkopf zur Verfügung. Das Gerät konnte sowohl mit Akkus betrieben werden als auch mittels Verlängerungskabel direkt an den Strom angeschlossen werden. Die Untersuchungen wurden im Stall durchgeführt, da Sonnenlichteinfall auf den Bildschirm

des Gerätes die Sicht des Untersuchers stark verschlechterte. Bei der Untersuchung war die Eindringtiefe der Ultraschallwellen auf sechs Zentimeter eingestellt. Für die Untersuchung wurden die Fohlen nicht sediert, jedoch von zwei Helfern an Hals und Schweif fixiert. Im Bereich des Lungenfeldes wurde das Fell mit einer Schermaschine (Fa. Lister, Lüdenscheid) auf beiden Seiten des Brustkorbes gekürzt. Um eine gute Ankopplung von Schallkopf und Haut zu erreichen, wurde das Untersuchungsfeld mit einer 50%igen Alkohollösung eingesprüht und mit einem Tuch in Fellrichtung leicht abgewischt. Auf den so entfetteten Bereich wurde das Ultraschallgel (BLR sonic, Fa. Waldeck, Münster) aufgebracht.

Das Untersuchungsfeld für die ultrasonographische Untersuchung der Lunge wurde dorsal vom Musculus longissimus dorsi, kranial vom Musculus triceps brachii, ventral von Herz, und kaudo-ventral vom Zwerchfell begrenzt. Der Thorax wurde von dorsal nach ventral in die drei Bereiche A, B und C und von kranial nach kaudal vom vierten bis zum zwölften Interkostalspalt eingeteilt. Bei der Untersuchung wurde der Schallkopf so gehalten, dass die Pleuraechos parallel zum oberen Bildrand verlaufen. Die Befunde wurden in die entsprechenden Felder eines Untersuchungsbogens eingetragen, der weiterhin Daten zur Identifikation des Fohlens wie Stutennummer und Standort sowie Datum, Name des Untersuchers und verwendetes Ultraschallgerät enthielt (s. Abb. 7 im Anhang).

### **3.11.2 Befunde der ultrasonographischen Untersuchung**

Auf dem Ultraschallbild stellten sich die Muskelschichten am oberen Bildrand dar und darunter folgten das parietale und das viscerale Blatt der Pleura. Unter der Pleura spiegelten sich die Luftartefakte des gut belüfteten Lungengewebes in mehreren parallelen hyperechogenen Linien wieder. Ein solches Bild wurde mit dem Befund „0“ bewertet.

Ein Abszess stellt sich als runder, scharf begrenzter schalleitender Bezirk dar (REEF, 1998). Als Abszess wurden solche Befunde einer Größe von zehn Millimetern und mehr beurteilt. Bis zu einer Größe von neun Millimetern wurden diese nicht als Abszess gewertet, sondern als Pneumonie im Befundbogen notiert. Die Tiefe jedes Lungenabszesses wurde auf dem gespeicherten Bild am Bildschirm gemessen. Die Summe der Abszesstiefen ergab den sogenannten „Abszess-Score“.

Bei einem Abszess-Score von über fünfzig Millimetern galt das Fohlen als sofort therapiewürdig, bei einem geringeren Score wurde individuell unter Beachtung der weiteren Ergebnisse aus der klinischen Untersuchung entschieden (s. auch 3.13).

### **3.12 Gewinnung von Tracheobronchialsekret zum Erregernachweis**

Stichprobenartig wurden die klinisch und sonographisch auffälligen Fohlen aus dieser Studie endoskopiert und Tracheobronchialsekret zur weiteren mikrobiologischen Untersuchung gewonnen.

Die Untersuchung wurde mit einem flexiblen Endoskop (60512, Fa. Storz) mit einer Arbeitslänge von 1,50 Metern und einem Durchmesser von 8,4 Millimetern verbunden mit einer Lichtquelle (Xenon Nova, 20131520, Fa. Storz, Tuttlingen) durchgeführt. Die Fohlen wurden dazu mit 0,5 mg/kg KM Xylazin i.v. sediert und von zwei Helfern fixiert. Vor dem Einführen des Endoskopes wurden die Nüstern mit einem mit einem alkoholgetränkten Tupfer gereinigt. Anschließend wurde das Endoskop über den ventralen Nasengang vorgeschoben. Für die Probenentnahme wurde eine 1,70 m lange sterile Plastiksonde durch den Arbeitskanal des Endoskops in das Sekret der Luftröhre vorgeschoben und Tracheobronchialsekret (TBS) mittels einer sterilen 20 ml Spritze aspiriert. Das gewonnene Material wurde direkt auf einen sterilen Transporttupfer (Heinz Herenz Medizinalbedarf, Hamburg) aufgetragen. Dieser wurde mit der Identifikationsnummer des Fohlens und dem Datum versehen und bis zum Versand im Kühlschrank aufbewahrt. Der Nachweis der Erreger aus den TBS-Proben wurde im Rahmen der Dissertation von ROTHAAAR (2006) im Zentrum für Infektionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover geführt.

### **3.13 Beurteilung des Gesundheitsstatus eines Fohlens**

Die abschließende Beurteilung des Gesundheitszustandes des Fohlens erfolgte unter Berücksichtigung der Befunde der klinischen Untersuchung und der sonographischen Lungenuntersuchung.

Als erkrankt wurden in dieser Studie Fohlen mit einem mittels Ultrasonographie festgestellten Lungenabszesses bezeichnet. Auch klinisch unauffällige Fohlen, bei denen aber Lungenabszesse ultrasonographisch während der Routineuntersuchung darstellbar waren, galten als erkrankt. Ebenso als erkrankt wurden Fohlen eingestuft, die aufgrund von anhaltendem Fieber, starkem Husten oder hochgradigen

auskultatorischen Lungenbefunden - also nicht aufgrund eines Lungenabszesses - auffielen und einer Rhodokokken-Therapie unterzogen wurden.

Ab einem Abszess-Score von über fünf oder einer Leukozytenanzahl im Blut von über 18000 G/l, Fieber und Giemen der Lunge wurden Fohlen mit Lungenabszessen sofort behandelt. Die Fohlen mit Lungenabszessen, deren Befunde unterhalb der genannten Werte lagen, blieben zunächst ohne Behandlung. Sie standen unter genauester Beobachtung und wurden weiter im Abstand von drei Tagen klinisch und ultrasonographisch untersucht. Stellte sich hierbei eine Besserung der klinischen Symptome ein und waren in der sonographischen Untersuchung keine Lungenabszesse mehr darstellbar, dann wurde das Fohlen zunächst im wöchentlichen Rhythmus weiter untersucht. War hierbei dreimal in Folge die klinische Untersuchung ohne besonderen Befund, war die Leukozytenanzahl gesunken und kein Lungenabszess sonographisch darstellbar, so galt das Fohlen als genesen und wurde wieder in den üblichen zweiwöchentlichen Ablauf eingegliedert (s. Diss. GRAVERT, 2006).

Verschlechterte sich dagegen der Gesundheitszustand über die oben genannten Grenzen hinaus, so wurde umgehend mit der spezifischen Antibiotikagabe (s. 3.14) begonnen. Auch während der sechswöchigen Therapie wurden die Fohlen weiter alle zwei Wochen klinisch untersucht und eine sonographische Lungenuntersuchung durchgeführt, um den Heilungsverlauf zu beurteilen.

### **3.14 Behandlung der erkrankten Fohlen**

Erkrankte Fohlen erhielten einmal wöchentlich das Antibiotikum Tulathromycin (Draxxin<sup>®</sup>, Fa. Pfizer) intramuskulär in einer Dosierung von 2,5 mg/kg KM. Weiterhin wurde zweimal täglich im Abstand von acht Stunden oral Rifampicin (10 mg/ kg KM, Rifa<sup>®</sup> 600, Grünenthal, Aachen) verabreicht. Zusätzlich zu dem Antibiotikum wurde Clenbuterol als Bronchospasmolytikum (0,8 µg/kg KM, Ventipulmin<sup>®</sup>, Boehringer, Ingelheim), Acetylcystein als Mukolytikum (10 mg/kg KM, Equimucin<sup>®</sup>, cp-Pharma, Burgdorf) und Glukose zur Verbesserung der Akzeptanz (ca. 35 mg/ kg KM) verabreicht. Um eine breiige Konsistenz zu erhalten, wurde ein diätetisches Ergänzungsfuttermittel für Pferde (Pronutrin<sup>®</sup> Boehringer, Ingelheim) in Wasser aufgelöst und die einzelnen Komponenten darin eingemischt.

Die Behandlung erfolgte grundsätzlich über sechs Wochen bis die Ergebnisse der klinischen Untersuchung und der Ultraschalluntersuchung der Lunge

zufriedenstellend waren. Lag nach der sechswöchigen Behandlung noch eine deutliche Lungensymptomatik vor, betrug die Blutleukozyten-Werte über 13000 G/l und/oder zeigte die sonographische Untersuchung noch mehrere Pneumonien oder gar einen Abszess, so wurde die Behandlungsdauer bis zu einer erneuten Untersuchung um zwei Wochen verlängert. Auch während der Behandlung mit Tulathromycin und Rifampicin erhielten betroffene Fohlen der Gruppen A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) und B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) weitere laut Protokoll vorgesehene Applikationen mit Zylexis<sup>®</sup>.

### **3.15 Statistische Auswertung**

Zur statistischen Auswertung lagen die Daten von 134 Fohlen vor.

Die Auswertung wurde mit dem Programmpaket STATISTICA der Firma Statsoft, Inc., Tulsa, USA durchgeführt (StatSoft, Inc.: STATISTICA für Windows [Computer-Programm-Handbuch, Version 6.1]; Eigenverlag: Tulsa, OK, USA, 2002).

Bei allen Fragestellungen sollte die mögliche Beeinflussung der Parameter durch die subkutane oder intranasale Anwendung des Paramunitätsinducers Zylexis<sup>®</sup> gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Die Auswertung befasste sich daher mit folgenden Fragestellungen:

- 1) Vergleich des Anteils erkrankter Tiere zwischen den Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe
- 2) „Überlebenszeitanalyse“ als statistisches Verfahren zum Vergleich des Erkrankungsalters zwischen den Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe
- 3) Vergleich der Parameter „klinischer Score“, „Leukozytenzahl“, „Anzahl der Lungenabszesse“ und „Abszess-Score“ am Tag der Diagnosestellung zwischen den Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe
- 4) Vergleich des Erkrankungsverlaufes in Bezug auf Therapie oder Spontanremission ohne Antibiotikabehandlung zwischen den Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe
- 5) Vergleich des Alters bei Therapiebeginn sowie des zeitlichen Abstandes von Diagnose und Therapiebeginn zwischen den drei Fohlengruppen
- 6) Nabelentzündungen als Entzündungsparameter bei den Fohlen der Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe

- 7) Vergleich des Anteils hochdosierter Antibiotikagaben in den ersten Lebenstagen zur Behandlung von Fehlstellungen zwischen den drei Fohlengruppen und Untersuchung auf eine mögliche Beeinflussung der Erkrankungsrate
- 8) Einfluss der Haltung auf die Erkrankungsrate

Die angewendeten statistischen Verfahren werden jeweils im Zusammenhang mit den Ergebnissen dargestellt.

Das Signifikanzniveau wurde für die angewandten Tests auf  $p \leq 0,05$  festgesetzt, d.h. ein Unterschied zwischen bestimmten Tiergruppen wurde als signifikant bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit ( $p$ ) kleiner als fünf Prozent war (s.Tab. 2).

Für den Fall  $p \geq 0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch nicht signifikant bewertet, d.h. ein Zusammenhang oder Unterschied war dann nicht mit ausreichender Sicherheit nachzuweisen.

**Tab. 2. Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) zur Darstellung der Signifikanz**

p-Wert	Signifikanz
$p < 0,001$	hoch signifikant
$p < 0,01$	signifikant
$p < 0,05$	schwach signifikant
$p > 0,05$	nicht signifikant

## 4 Ergebnisse

Für die Untersuchung der Wirksamkeit des Immunmodulators Zylexis® zur Prophylaxe von Lungenabszessen wurden drei Fohlengruppen gebildet. Dabei sollte die subkutane Anwendung mit der intranasalen Anwendung verglichen werden. Eine dritte Gruppe ohne Medikation diente als Kontrollgruppe. Alle Fohlen wurden einer zweiwöchentlichen klinischen Untersuchung, einer Bestimmung der Blutleukozyten sowie einer sonographischen Lungenuntersuchung unterzogen. Insgesamt wurden 134 Fohlen in diese Studie einbezogen.

### 4.1 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen von Zylexis®

Während der gesamten Dauer der Studie traten bei den 45 Fohlen der Gruppe B, denen Zylexis® intranasal verabreicht wurde, keine erkennbaren unerwünschten Wirkungen auf. Bei zwei Fohlen der Gruppe A (Zylexis® s.c.) trat an der Injektionsstelle etwa acht Stunden nach der Applikation von 2 ml Zylexis® oberhalb der vorderen Brustmuskulatur eine weiche, verschiebliche, nicht schmerzhaft umfängsvermehrung von ca. 5 cm im Durchmesser auf. Diese war jeweils nach drei Tagen ohne Behandlung vollständig zurückgegangen. Die Fohlen zeigten auf darauffolgende Injektionen von Zylexis® keine Hautreaktion mehr.

Nahezu alle 45 Fohlen zeigten bei der subkutanen Injektion eine unterschiedlich stark ausgeprägte Abwehrreaktion während des Absetzens des Präparates unter die Haut. Eine längerfristige Beeinträchtigung trat aber nicht ein, d.h. die Fohlen versuchten nicht, sich an der Injektionsstelle zu scheuern oder zu beißen.

### 4.2 Anzahl erkrankter Fohlen

Von allen 134 Fohlen dieser Studie erkrankten 52 % (n = 70). Von den erkrankten Fohlen waren 37 (53 %) Stuten und 33 (47 %) Hengste (Anhang, Tab. 12-Tab. 20). In diese Zahlen gingen alle Fohlen mit ein, bei denen sonographisch ein Lungenabszess diagnostiziert wurde. Weiterhin galten auch Fohlen als erkrankt, die wegen hochgradiger klinischer Befunde wie starkem Husten, hohem Fieber und/oder hochgradigen auskultatorischen Lungenbefunden (Rasseln, Giemen) aufgrund des Verdachtes einer *R. equi*-Pneumonie behandelt wurden.

In Gruppe A (Zylexis® s.c.) erkrankten 25 Tiere (56 %), 20 blieben gesund. Der Anteil der erkrankten Tiere lag in Gruppe B (Zylexis® i.n.) bei 51 % (23 von 45 Fohlen) und in Gruppe C (Kontrolle) bei 50 % (22 von 44 Fohlen) (s. Tab. 3).

Bei zwei Fohlen der Gruppe B (Zylexis® i.n.) (Nr. 47 und 62, s. Anhang Tab. 15 u. Tab. 16) wurden keine Lungenabszesse sonographisch dargestellt, es bestand aber der dringende Verdacht auf ein *R. equi*-bedingte Erkrankung. Beide Fohlen wurden aufgrund von Fieber behandelt, dass sich erst mit der Gabe von Tulathromycin und Rifampicin senken ließ. Die entnommenen Serumproben zum Herpesvirusnachweis waren negativ. Andere Antibiotika hatten zuvor keine Fiebersenkung erreichen können. Ein weiteres Fohlen (Nr. 63) der Gruppe B wurde aufgrund der hochgradigen klinischen Lungenbefunde und vorliegender Pneumonie in der Sonographie gegen Rhodokokken behandelt, nachdem eine 14-tägige Behandlung aufgrund hoher Leukozytenwerte (über  $22 \times 10^9/l$ ) und Fieber mit einer Trimethoprim/Sulfonamidkombination keine zufriedenstellende Wirkung brachte. In der Kontrollgruppe wurde ein Fohlen (Nr. 112) aufgrund von Fieber, schlechtem Allgemeinzustand (mager, lethargisch) und einer Gelenksentzündung gegen Rhodokokken behandelt. Nachdem vermehrt Kometenschweifartefakte sonographisch nachgewiesen wurden und Fieber auftrat, wurde zunächst mit Ceftiofur antherapiert. Unter dieser Therapie verschlechterten sich die Symptome und das Fieber stieg sogar weiter an. Dieses Fohlen schied im Alter von drei Monaten aus der Studie aus, da es mit infauster Prognose aufgrund einer osteolytischen Arthritis euthanasiert wurde.

Daraus folgt, dass von den als erkrankt zu bezeichnenden Fohlen in Gruppe A (Zylexis® s.c.) alle 25 sonographisch detektierbare Lungenabszesse aufwiesen. In Gruppe B (Zylexis® i.n.) waren es 20 von insgesamt 23 erkrankten Fohlen. In der Kontrollgruppe hatten 20 von 21 erkrankten Fohlen mindestens einen sonographisch sichtbaren Lungenabszess (s. Tab. 3)



**Tab. 3. Gesunde und erkrankte Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe**

Anzahl	Gesunde Fohlen	Kranke Fohlen	kranke Fohlen mit detekt. Lungenabszessen	Fohlen insges. pro Gruppe
Gruppe A (Zylexis® subkutan)	20 (44 %)	25 (56 %)	25 (56 %)	45 (100%)
Gruppe B (Zylexis® intranasal)	22 (49 %)	23 (51 %)	20 (44 %)	45 (100%)
Gruppe C (Kontrollgruppe)	22 (50 %)	22 (50 %)	21 (48 %)	44 (100%)

Die Unterschiede hinsichtlich des Anteils erkrankter Tiere zwischen den drei Gruppen waren statistisch nicht signifikant. Die im Chi<sup>2</sup>-Test ermittelte Irrtumswahrscheinlichkeit p lag bei 0,86. Auch wenn man nur die Fohlen mit abszedierender Pneumonie betrachtet, ergibt sich - trotz größerer Unterschiede in absoluten Zahlen - ebenfalls kein signifikanter Unterschied (p = 0,6) zwischen den Fohlengruppen.

#### **4.3 Fohlen, die vorzeitig aus der Studie ausschieden**

Von den 134 Fohlen, die in diese Studie aufgenommen wurden, mussten vier euthanasiert werden. Aus der Gruppe A (Zylexis® s.c.) verstarb das Fohlen Nr. 44 im Alter von zwei Monaten an einer akuten Kolik. Bis zu diesem Zeitpunkt war das Fohlen nicht an einer Pneumonie erkrankt. Es hatte aber in der ersten Lebenswoche eine Gelenksentzündung und wurde antibiotisch und mit Fohlenlähmeserum behandelt. Eine Nabelentzündung entwickelte dieses Fohlen im Alter von fünf Wochen. Das Fohlen Nr. 45 (Grp. A, Zylexis® s.c.) blieb ebenfalls nur zwei Monate in der Studie. Es wurde aufgrund akuter Atemnot euthanasiert. In der Sektion, die vom Institut für Pathologie der Tierärztlichen Hochschule durchgeführt wurde, wurde eine interstitielle Pneumonie diagnostiziert, deren Genese unbekannt blieb. Die Lunge wies keine Abszesse auf. In Gruppe B (Zylexis® i.n.) wurde ein Fohlen (Nr. 90) im Alter von einem Monat ohne Vorerkrankungen wegen einer therapieresistenten Colitis mit infauster Prognose euthanasiert.

Ein Fohlen der Kontrollgruppe (Nr. 112) wurde mit elf Wochen aufgrund purulenter Arthritis euthanasiert. Im Alter von einer Woche wurde dieses Fohlen wegen einer eitrigen Nabelentzündung zehn Tage unter Antibiotika gestellt. Bevor es euthanasiert

wurde, war über fünf Wochen eine regelmäßige Spülung des entzündeten Sprunggelenkes vorgenommen worden. Das auftretende Fieber sank erst unter der Rhodokokken-Therapie mit Tulathromycin und Rifampicin, nach einer initialen erfolglosen Therapie mit Ceftiofur. Ein Erregernachweis aus Synovialflüssigkeit wurde erst einige Tage nach Therapiebeginn eingeleitet und war daher wenig aussagekräftig (mäßiger Gehalt an koagulase-negativen Staphylokokken).

Weiterhin liegen für ein Fohlen (Nr. 122) aus der Kontrollgruppe nur für die ersten vier Lebensmonate Daten vor, da es vorzeitig von der Mutterstute abgesetzt und darauf unter anderen Bedingungen gehalten wurde. In diesen vier Monaten erkrankte das Fohlen nicht an einer Pneumonie (Daten zu den Fohlen Tab. 12-Tab. 20, Anhang).

#### **4.4 Auftreten von Rezidiven**

Bei zwei Fohlen wurde nach einer ersten Genesung zu einem späteren Zeitpunkt nochmals ein Abszess in der sonographischen Lungenuntersuchung diagnostiziert. Beide Fohlen gehörten zur Gruppe A (Zylexis® s.c.). Bei einem Fohlen (Nr. 8) wurde mit 69 Tagen erstmals ein Lungenabszess erkannt, dieser war nach sieben Tagen ohne Therapie zurückgebildet und das Fohlen zeigte zu dem Zeitpunkt weder klinische Symptome einer respiratorischen Erkrankung noch eine Leukozytose. Im Alter von 146 Tagen allerdings machte der vorliegende Abszess-Score von sechs Zentimetern eine Therapie notwendig. Das andere Fohlen (Nr. 17) wies nach einer sechswöchigen Therapie mit Tulathromycin und Rifampicin, die am 79. Lebenstag begann, am Tag 150 wieder einen Abszess bei der sonographischen Lungenuntersuchung auf. Diesmal blieb das Fohlen ohne Therapie und zeigte nach 16 Tagen keinen Abszess mehr (Daten zu diesen Fohlen im Anhang, Tab. 12-Tab. 13). Diese beiden Fohlen gingen nur einmal zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in die statistischen Auswertungen bezüglich der Anzahl der erkrankten Fohlen mit ein.

**4.5 Befunde der klinischen und hämatologischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung**

Bei der klinischen Untersuchung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung lag der klinische Score zwischen null und sieben Punkten bei Gruppe A (Zylexis® s.c.), sowie zwischen null und vier Punkten bei den Gruppen B (Zylexis® i.n.) und der Kontrollgruppe C (s. Einzelwerte Anhang, Tab. 12-Tab. 20). Von insgesamt 66 Fohlen mit sonographisch detektierten Lungenabszessen wurden 31 (47 %) laut klinischem Score als gesund (0 – 1) eingestuft (s. Tab. 4). Diese klinisch unauffälligen Fohlen hatten eine erhöhte Blutleukozytenzahl und wiesen in der sonographischen Untersuchung Lungenabszesse auf.

**Tab. 4. Klinischer Score der erkrankten Fohlen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den beiden Zylexis®-Gruppen und der Kontrollgruppe**

Klinischer Score	0 – 1	2 – 3	4 - 6	Anz. Fohlen mit sonogr. detekt. Lungenabszessen
Gruppe A (Zylexis® subkutan)	12 (48 %)	9 (36 %)	4 (16 %)	25
Gruppe B (Zylexis® intranasal)	9 (45 %)	10 (50 %)	1 (5 %)	20
Gruppe C (Kontrolle)	10 (47,6 %)	9 (42,9 %)	2 (9,5 %)	21
Gesamt	31 (47 %)	28 (42 %)	7 (11 %)	66

Die Anzahl der Blutleukozyten lag zwischen  $7 \times 10^9/l$  und  $25,9 \times 10^9/l$  in Gruppe A, sowie zwischen  $4,9 \times 10^9/l$  und  $20,6 \times 10^9/l$  in Gruppe B und  $6,5 \times 10^9/l$  und  $21,0 \times 10^9/l$  in Gruppe C. Es fiel auf, dass bei insgesamt 38 % der erkrankten Fohlen (s. Tab. 5), der Leukozytenwert im Blut zum Zeitpunkt der Diagnose nicht über  $13 \times 10^9/l$  lag.

**Tab. 5. Anzahl der Fohlen mit einem Leukozytenwert im Blut über  $13 \times 10^9/l$**

Leukozyten Über $13 \times 10^9$	Gruppe A (Zylexis® s.c.)	Gruppe B (Zylexis® i.n.)	Gruppe C (Kontrolle)	Gesamt
Nein	11 (44 %)	6 (30 %)	8 (38 %)	25 (38 %)
Ja	14 (56 %)	14 (70 %)	13 (62 %)	41 (62 %)
Alle Fohlen mit Lungenabszessen	25	20	21	66

Die Einzelwerte für jedes erkrankte Fohlen sind in den Übersichtstabellen (Tab. 12-Tab. 20) im Anhang aufgelistet. Aus diesen Werten wurden für jede Fohlen-Gruppe die Mittelwerte und Standardabweichung berechnet. Die Werte lagen für die Fohlen aller Gruppen sehr dicht beieinander (s. Tab. 6). Der klinische Score lag durchschnittlich bei  $1,7 \pm 1,3$  in der Kontrollgruppe C, bei  $1,6 \pm 1,0$  in Gruppe B (Zylexis® i.n.) und  $1,9 \pm 1,9$  in Gruppe A (Zylexis® s.c.). Für die Mittelwerte der Blutleukozytenanzahl gilt ähnliches. Hier lagen Gruppe A und C mit  $14,3 \pm 4,0$  bzw.  $14,1 \pm 3,9 \times 10^9/l$ , sowie Gruppe B mit  $13,9 \pm 4,1 \times 10^9/l$  nahezu gleich.

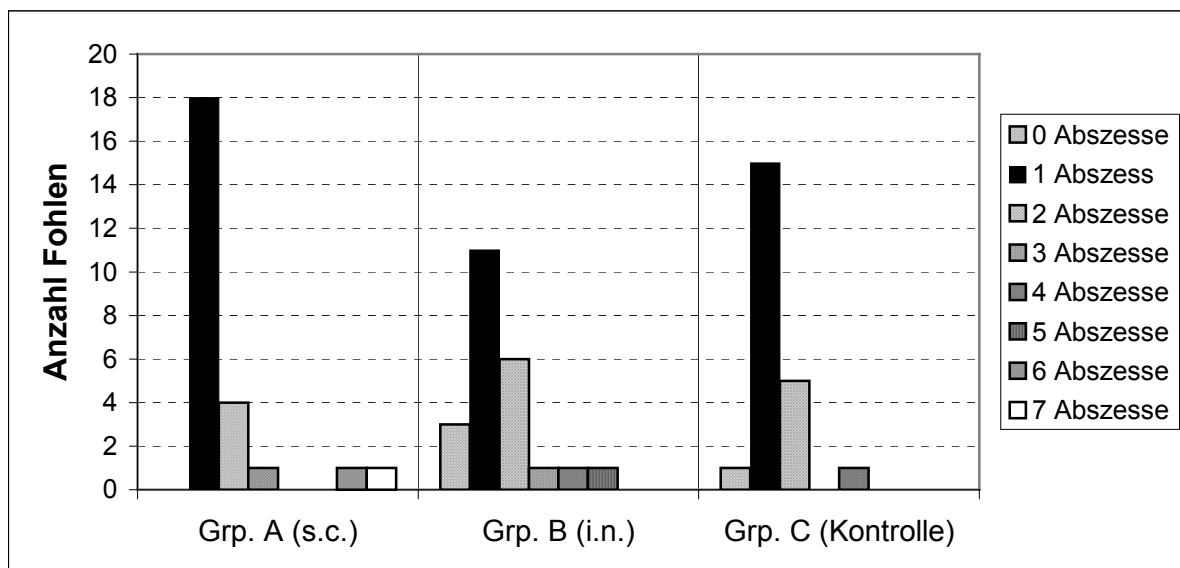
**Tab. 6. Mittelwert der klinischen Scores und der Blutleukozytenanzahl der Fohlen mit Lungenabszessen den Zylexis®-Gruppen und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Diagnosestellung**

Gruppe	Anzahl	Klinischer Score	Leukozytenzahl [ $\times 10^9/l$ ]
A (Zylexis® s.c.)	25	$1,9 \pm 1,9$	$14,3 \pm 4,0$
B (Zylexis® i.n.)	20	$1,6 \pm 1,0$	$13,9 \pm 4,1$
C (Kontrolle)	21	$1,7 \pm 1,3$	$14,1 \pm 3,9$
Alle Fohlen mit Lungenabszessen	66	$1,7 \pm 1,4$	$14,1 \pm 4,0$

Der Mittelwert des klinischen Scores sowie der Anzahl der Blutleukozyten zwischen den drei Gruppen unterschied sich nicht signifikant ( $p= 0,7$  bzw.  $p= 0,9$ ).

#### 4.6 Befunde der sonographischen Untersuchung der Lunge zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

Während der Studie wurden alle Fohlen regelmäßig ab dem Tag der Geburt einer sonographischen Untersuchung der Lunge unterzogen. In Gruppe A (Zylexis® s.c.) wurden zehn (45 %) Fohlen, in Gruppe B (Zylexis® i.n.) sieben (15 %) Fohlen und in Gruppe C (Kontrolle) acht (18 %) Fohlen, die klinisch gesund waren oder geringgradige Befunde (Score ≤ 3) und einen Leukozytenwert unter  $13 \times 10^9/l$  hatten, nur mittels der routinemäßigen sonographischen Lungenuntersuchung als erkrankt erkannt. Im folgenden sind die Befunde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung berücksichtigt. Insgesamt wiesen 66 Fohlen sonographisch nachweisbare Lungenabszesse auf (Einzelwerte s. Anhang, Tab. 12-Tab. 20). Da nicht nur die Anzahl, sondern auch die Größe der Abszesse zu berücksichtigen ist, wurde der Parameter Abszess-Score (= Summe der Durchmesser der Abszesse) ebenfalls gruppenvergleichend dargestellt (Abb. 2 und Abb. 3). Die jeweiligen Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen sind in Tab. 7 angegeben. In der Gruppe A (Zylexis® s.c.) reichte die Anzahl an detektierten Lungenabszessen von einem bis zu sieben Abszessen pro Fohlen. Bei der Gruppe B (Zylexis® i.n.) wies ein Fohlen mit fünf Lungenabszessen den höchsten Wert auf. Der maximale Wert in der Kontrollgruppe lag bei vier Abszessen.



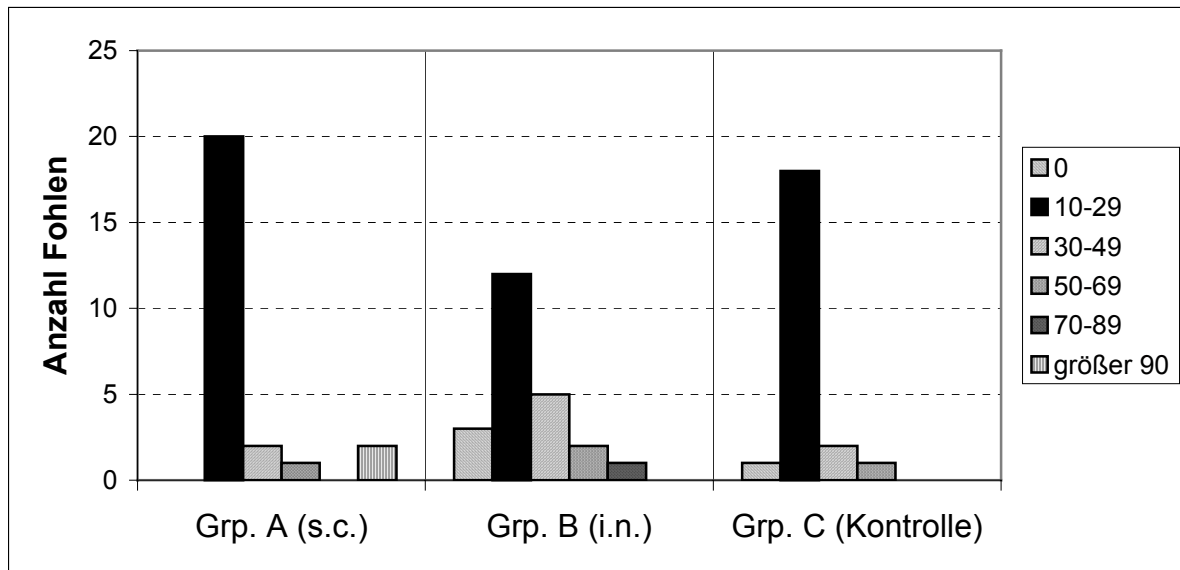
**Abb. 2.** Ultrasonographisch detektierte Abszesse aller kranken Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen A und B sowie der Kontrollgruppe C

Die mittlere Abszessanzahl lag bei den 66 an Lungenabszessen erkrankten Fohlen mit  $1,7 \pm 1,6$  in Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.),  $1,8 \pm 1,1$  in Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) und  $1,4 \pm 0,7$  in der Kontrollgruppe dicht beieinander (s. Tab. 7). Zwischen den Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Abszessanzahl zum Erkrankungszeitpunkt nachgewiesen (Varianzanalyse,  $p = 0,58$ ).

**Tab. 7. Anzahl an detektierten Lungenabszessen und Abszess-Score der drei Fohlengruppen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Mittelwert und Standardabweichung)**

Gruppe	Anzahl	Anzahl detektierter Abszesse Pro Fohlen	Abszess-Score (mm)
<b>A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.)</b>	25	$1,7 \pm 1,6$	$28,8 \pm 35,6$
<b>B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.)</b>	20	$1,8 \pm 1,1$	$27,2 \pm 18,8$
<b>C (Kontrolle)</b>	21	$1,4 \pm 0,7$	$19,0 \pm 12,2$
<b>Fohlen mit detektierten Lungenabszessen</b>	66	$1,6 \pm 1,1$	$25,0 \pm 22,2$

Bei 50 von 66 Fohlen (75,8 %) via Sonographie erfassten Lungenabszessen lag die Summe der Durchmesser der Lungenabszesse, der sog. Abszess-Score bei zehn bis 29 Millimetern. Der Abszess-Score, betrug 145 mm als höchsten Wert bei einem Fohlen der Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.). Der niedrigste Wert in dieser Gruppe lag bei zehn Millimetern. In Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) war der maximale Score 85 mm, in Gruppe C (Kontrolle) 60 mm (s. Abb. 3). Auch für den Abszess-Score ließ sich allerdings statistisch mittels Varianzanalyse kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen feststellen ( $p = 0,39$ ).



**Abb. 3.** Abszess-Score (in mm) bei allen kranken Fohlen in den Gruppen A (Zylexis® s.c.), B (Zylexis® i.n.) und C (Kontrolle) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung

#### 4.7 Ergebnisse des Erregernachweises

Hier wurde untersucht, ob die Impfung mit Zylexis möglicherweise einen Einfluss auf die Erregerbesiedlung der Atemwege der Fohlen hat. Ebenso soll nachgewiesen werden, welche Erreger die Lungenabszesse bei den Fohlen verursachen. Im Rahmen der Doktorarbeit von ROTHAAAR (2006) wurden stichprobenartig erkrankte Fohlen dieser Studie endoskopisch untersucht und Tracheobronchialsekret zur Bestimmung der Erreger gewonnen. Von insgesamt 23 untersuchten Fohlen dieser Studie wurde bei 17 Fohlen *Rhodococcus equi* nachgewiesen, das heißt 74 % der Proben waren *R. equi* positiv. In den Proben, die *R. equi* enthielten, konnte bei 56,5% auch *Strep. equi ssp. zooepidemicus* nachgewiesen werden. In den sechs Proben die *R. equi* negativ waren, wurde *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* festgestellt (s. Tab. 21, Anhang). In Gruppe A (Zylexis® s.c.) wurden sechs Fohlen endoskopiert. Von den gewonnenen Proben waren alle sechs *R. equi* positiv, fünf enthielten außer *R. equi* auch *Strep. zooepidemicus*. Bei den sieben Proben der Gruppe B (Zylexis® i.n.) war in fünf Proben *R. equi* nachweisbar und bei zwei Proben wurde nur *Strep. zooepidemicus* nachgewiesen. Bei den zehn Fohlen der Kontrollgruppe war der Erregernachweis viermal für beide Erreger positiv, bei weiteren vier war der Nachweis *Strep. zooepidemicus* und bei zwei Fohlen nur *R. equi* positiv (s. Tab. 8).

**Tab. 8. Erregernachweis aus Tracheobronchialsekretsekret der erkrankten Fohlen in den Gruppen A, B und C**

Befund	<i>R. equi</i>	<i>Strep. zooepid.</i>	<i>R.equi</i> + <i>Strep.</i> <i>zooepid.</i>	Endoskop. Fohlen
Gruppe A (Zylexis® s.c.)	1	0	5	6
Gruppe B (Zylexis® i.n.)	1	2	4	7
Gruppe C (Kontrolle)	2	4	4	10
Erregernachweis bei den kranken Fohlen	4	6	13	23

#### **4.8 Vergleich des Erkrankungsalters**

Hiermit soll gezeigt werden, ob der Einsatz von Zylexis® das Alter in dem die Fohlen an abszedierenden Pneumonien erkranken beeinflusst, d.h. ob unter Zylexis® eine Erkrankung früher oder später im Vergleich zur Kontrollgruppe stattfindet.

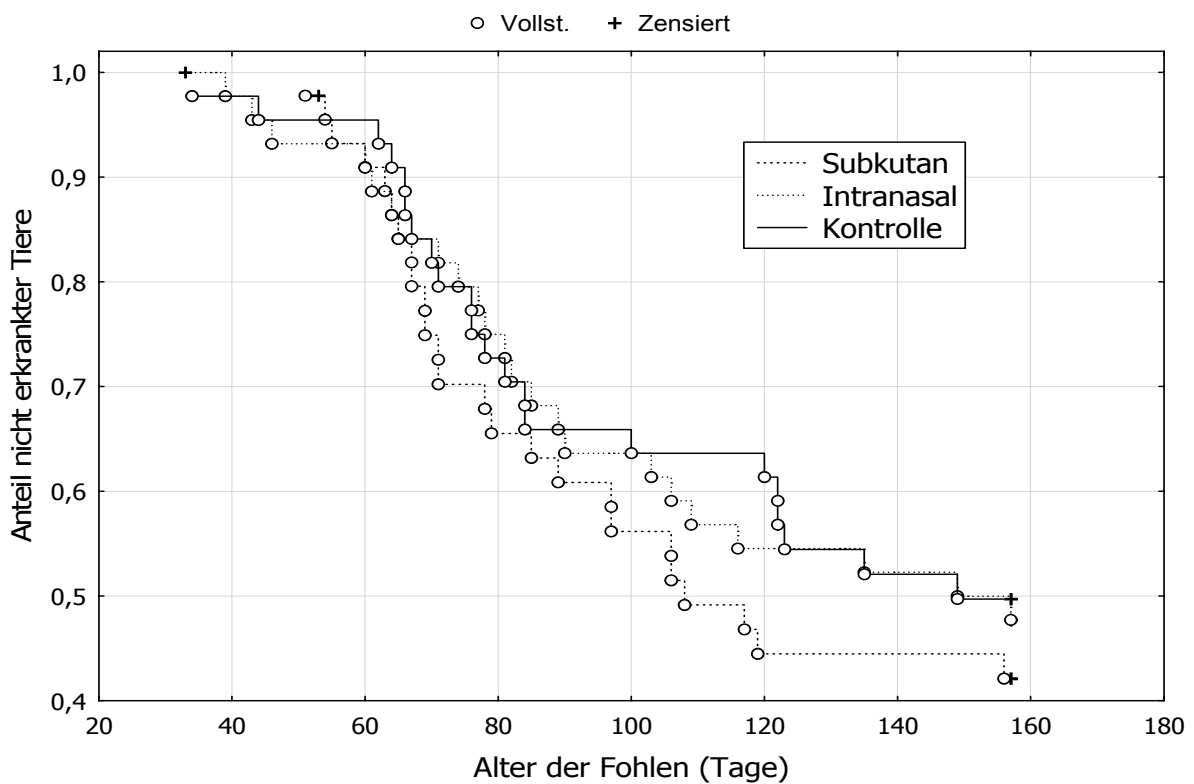
Das Alter, in dem während dieser Studie mittels klinischem Score, Analyse der Blutleukozytenzahl und Sonographie der Lunge eine Erkrankung diagnostiziert wurde, wies eine große Schwankungsbreite auf. Das jüngste Fohlen, bei dem ein Lungenabszess sonographisch dargestellt wurde, war eines aus der Kontrollgruppe und 34 Tage alt. Dagegen erkrankten zwei Fohlen aus der Gruppe B (Zylexis® i.n.) erst mit 149 Tagen und ein Fohlen aus der Gruppe A (Zylexis® s.c.) mit 156 Tagen (Einzelwerte im Anhang, Tab. 12-Tab. 20). Im folgenden wurden zwei unterschiedliche Verfahren zur statistischen Absicherung eines Unterschiedes im Erkrankungsalter der Fohlen zwischen den Fohlen-Gruppen angewandt.

#### *Überlebenszeitanalyse:*

Die Überlebenszeitanalyse ist eine statistische Untersuchung, um Unterschiede hinsichtlich der Dauer zwischen zwei definierten Ereignissen innerhalb von betrachteten Gruppen herauszustellen. Im Rahmen dieser Studie wurde dabei der Zeitraum zwischen dem Tag der Geburt und dem Tag der Erkrankung betrachtet. Als „Überlebenszeit“ wurde die Zeit zwischen diesen beiden Zeitpunkten bezeichnet. Die



Fälle, bei denen im Laufe des Untersuchungszeitraumes die Erkrankung eintrat, werden als „vollständig“ bezeichnet. „Zensiert“ sind dagegen Fälle, bei denen die Erkrankung (noch) nicht eingetreten war. Hierunter fielen Fohlen, die im Untersuchungszeitraum von fünf Monaten nicht erkrankten. Für die korrekte Berücksichtigung der zensierten Fälle wurde das statistische Verfahren von Kaplan-Meier angewandt. Dabei wurde der Anteil nicht erkrankter Tiere in Abhängigkeit vom jeweiligen Lebensalter dargestellt (s. Abb. 4). Der Wilcoxon-Test diente schließlich dem Vergleich der Gruppen untereinander und der Prüfung auf eine statistische Signifikanz der Unterschiede.



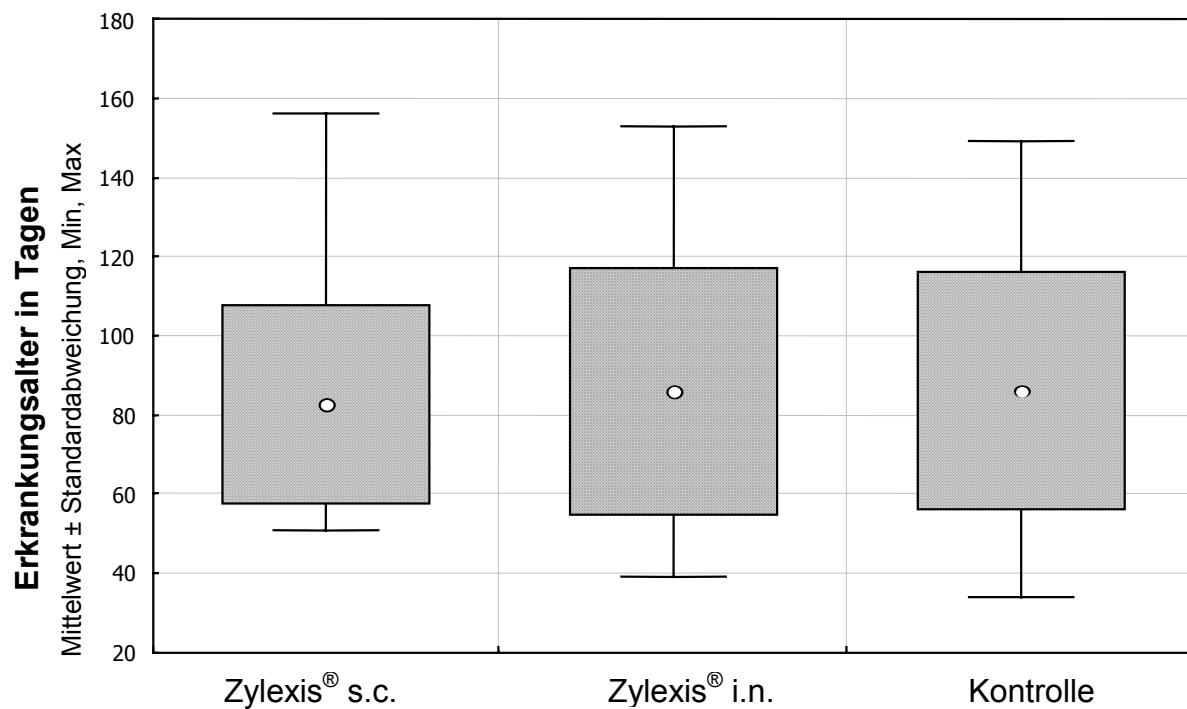
**Abb. 4.** Vergleich der Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe hinsichtlich des Anteils nicht erkrankter Tiere in Abhängigkeit vom Alter der Fohlen

Der Vergleich der drei Gruppen mit Hilfe dieses statistischen Verfahrens ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied ( $p = 0,68$ ).

*Varianzanalyse:*

Werden nur die tatsächlich erkrankten Tiere berücksichtigt, dann ist ein Vergleich mit einer einfachen Varianzanalyse möglich. Bezogen auf alle kranken Fohlen dieser Studie liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 84,8 Tagen. Das mittlere Erkrankungs-

alter liegt bei den Fohlen der Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) bei 82,5 Tagen. Bei Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) mit 85,9 Tagen und bei der Kontrollgruppe mit 86,1 Tagen ist das mittlere Erkrankungsalter nahezu identisch (s. Abb. 5). Auch hier lässt sich kein statistisch nachweisbarer Unterschied zwischen den Gruppen ableiten. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt für diese Daten bei  $p = 0,89$ .



**Abb. 5.** Erkrankungsalter der Fohlen der Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe

Auch wenn nur die Fohlen berücksichtigt werden, die zum Zeitpunkt der Erkrankung Lungenabszesse aufwiesen, ändert dies an der grundsätzlichen Aussage nichts. Bei den Fohlen mit sonographisch detektierten Lungenabszessen liegt in Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) das mittlere Erkrankungsalter bei  $82,52 \pm 25,3$  Tagen, in Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) bei  $82,85 \pm 29,7$  und in der Kontrollgruppe bei  $86,86 \pm 30,7$  Tagen ( $p = 0,86$ ).

#### **4.9 Vergleich der Behandlung der an Lungenabszessen erkrankten Fohlen**

Durch den Vergleich der beiden Zylexis®-Gruppen und der Kontrollgruppe sollte festgestellt werden, ob Fohlen denen regelmäßig Zylexis® appliziert wurde evt. besser alleine, d.h. ohne eine Antibiotikatherapie, nach Feststellung einer abszedierenden Pneumonie wieder genesen.

Erkrankte Fohlen wurden, wenn bestimmte Grenzwerte des klinischen Scores und der sonographischen Befunde überschritten wurden, sofort behandelt (= sofort Therapie). Dies trat ein, bei einem sonographisch ermittelten Abszess-Score von über 5 cm oder bei einem Fohlen mit einem Lungenabszess und einer Blutleukozytenzahl über 18000 G/l. (s. auch Kap 3.13).

Alle anderen Fohlen, die erkrankten und deren Werte unterhalb den oben genannten lagen, blieben zunächst ohne Behandlung und wurden fortan zweimal wöchentlich untersucht. Besserten sich die klinischen Symptome und waren keine Lungenabszesse sonographisch mehr nachweisbar, so wurden diese Fohlen als gesund entlassen (= ohne Therapie). Verschlechterte sich in der Beobachtungsphase der Gesundheitszustand des Fohlens, so wurde noch an diesem Tag die Behandlung eingeleitet (= später Therapie).

Von den 66 Fohlen, die insgesamt im Verlauf der Studie wegen Lungenabszessen behandelt wurden, wurden 16 (24 %) sofort behandelt. Dies traf für jeweils sechs Fohlen der Gruppe A (Zylexis®s.c.) und C (Kontrolle) zu und für vier Fohlen der Gruppe B (Zylexis® i.n.). Ohne Therapie wurden 29 (44 %) Fohlen wieder gesund. Hierbei handelt es sich um zehn Fohlen aus Gruppe A (Zylexis®s.c.), acht Fohlen aus Gruppe B (Zylexis® i.n.) und elf Fohlen der Kontrollgruppe, bei denen es spontan auch ohne eine Behandlung zu einer Genesung kam. Bei 21 (32%) der Fohlen verschlechterte sich der Zustand nach dem Zeitpunkt der Diagnosestellung, so dass sie dann doch behandelt werden mussten. Dies war für neun Fohlen der Gruppe A, acht Fohlen der Gruppe B und vier Fohlen der Kontrollgruppe notwendig (s. Tab. 9, Einzelwerte im Anhang Tab. 12-Tab. 20). Für keinen der Parameter ließen sich Unterschiede zwischen den Gruppen als statistisch signifikant nachweisen (Pearson Chi<sup>2</sup>-Test, p = 0,65).

**Tab. 9. Zeitpunkt der Behandlung der Fohlen mit detektierten Lungenabszessen bei den mit Zylexis® geimpften Fohlen und der Kontrollgruppe**

Kranke Fohlen	Ohne Therapie	Später Therapie	Sofort Therapie	Alle Fohlen pro Gruppe
<b>Gruppe A</b> (Zylexis® s.c.)	10 (40 %)	9 (36 %)	6 (24 %)	25 (100 %)
<b>Gruppe B</b> (Zylexis® i.n.)	8 (40 %)	8 (40 %)	4 (20%)	20 (100 %)
<b>Gruppe C</b> (Kontrolle)	11 (52 %)	4 (19 %)	6 (29 %)	21 (100 %)
<b>Alle Fohlen mit detekt. Lungenabszessen</b>	29 (44%)	21 (32 %)	16 (24 %)	66 (100 %)

#### **4.10 Zeitpunkt des Therapiebeginns**

Hier wurden die Fohlen, die im Laufe der Studie erkrankten und eine Therapie erhielten, berücksichtigt. Dies betrifft also die Fohlen, die nach der Diagnosestellung sofort behandelt wurden und auch Fohlen, die zunächst ohne Therapie blieben und erst später behandelt wurden. Wiederum wurden die Fohlen-Gruppen untereinander verglichen, um einen möglichen Effekt durch Zylexis®, im Sinne von erhöhter Resistenz, durch gesteigerte Immunabwehr herauszuarbeiten.

In Gruppe A, also bei den Fohlen, die Zylexis® subkutan erhielten, wurden insgesamt 16 (35 %) Fohlen gegen Lungenabszesse behandelt. Das mittlere Alter bei Therapiebeginn lag in dieser Gruppe bei  $91,7 \pm 29,6$  Tagen. Die zwölf Fohlen mit abszedierender Pneumonie der Gruppe B (Zylexis® i.n.) wurden durchschnittlich mit  $100,8 \pm 25,9$  Tagen behandelt. Das Alter der zehn Fohlen mit Lungenabszessen der Kontrollgruppe C lag bei Behandlungsbeginn durchschnittlich bei  $104,3 \pm 27,2$  Tagen (s. Tab. 10). Die kranken Fohlen in Gruppe A (Zylexis® s.c.) waren zum Zeitpunkt des Therapiebeginns also etwa zehn Tage jünger als die Fohlen der Vergleichsgruppen. Die Dauer von dem Tag der Diagnosestellung an bis zum Therapiebeginn betrug in der Kontrollgruppe durchschnittlich  $10,3 \pm 18,4$  Tagen. Bei Fohlen der Gruppe B (Zylexis® i.n.) betrug der Abstand von der Diagnose bis zur Behandlung  $8,1 \pm 13,8$  Tage. Fohlen der Gruppe A (Zylexis® s.c.) benötigten im Mittel bereits nach  $4,8 \pm 7,8$  Tagen eine Therapie.

**Tab. 10. Dauer zwischen Diagnose und Behandlung sowie Alter der Fohlen mit detektierten Lungenabszessen bei Therapiebeginn in den beiden Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe**

Gruppe	Dauer zwischen Diagnose und Behandlungsbeginn (in Tagen)		Alter bei Therapiebeginn (in Tagen)	
	N	Mittelwert ± Standardabweichung	n	Mittelwert ± Standardabweichung
<b>A (Zylexis® s.c.)</b>	16	4,8 ± 7,8	16	91,7 ± 29,6
<b>B (Zylexis® i.n.)</b>	12	10,1 ± 14,9	12	100,8 ± 25,9
<b>C (Kontrolle)</b>	10	11,3 ± 19,1	10	104,3 ± 27,2
<b>Insgesamt</b>	38	8,7 ± 13,9	38	98,9 ± 27,6

Der Unterschied des Alters der Fohlen bei Therapiebeginn und der Dauer vom Tag der Diagnose bis zum Beginn einer Behandlung zwischen den Gruppen wurde durch eine Varianzanalyse ermittelt.

Trotz der in absoluten Zahlen zum Teil groß erscheinenden Unterschiede, ließ sich für keinen Parameter ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisen (Alter:  $p=0,5$ / Dauer:  $p=0,4$ ). Zylexis® hat folglich keinen Einfluss auf den Therapiebeginn bei den Fohlen gehabt.

#### **4.11 Dauer der Behandlung**

Die Behandlungsdauer mit Rifampicin und Tulathromycin betrug üblicherweise sechs Wochen. Nach dieser Zeit erfolgte vor dem Absetzen der Therapie eine Evaluierung des klinischen Scores und der Leukozytenzahl sowie eine sonographische Lungenuntersuchung. Da aber in Einzelfällen eine Verlängerung der Therapie notwendig wurde und andere Fohlen aufgrund von anderen Symptomen (z.B. Fieber, Husten) vorsorglich behandelt wurden, sind hier alle Ausnahmen aufgeführt (s.auch Tab. 12-Tab. 20 Anhang). In Gruppe A (Zylexis® s.c.) musste die Behandlungsdauer bei zwei Fohlen auf acht Wochen verlängert werden, in Gruppe B (Zylexis® i.n.) bei einem Fohlen. Weiterhin wurde ein Fohlen der Gruppe B (Nr. 51) nur vier Wochen behandelt, nachdem vormals sonographisch festgestellte Lungenabszesse bereits spontan abgeheilt waren, starker Husten aber eine Behandlung notwendig machte. Aufgrund von hohem Fieber wurde ein Fohlen (Nr. 62) drei Wochen, ein anderes (Nr. 47) fünf Wochen behandelt. Ein weiteres Fohlen der Gruppe B (Zylexis® i.n.; Nr. 63) musste wegen hochgradigen Lungenbefunden behandelt werden. Bei diesem Fohlen konnte bereits nach drei Wochen die Therapie abgesetzt werden, da die klinische

und ultrasonographische Untersuchung ohne besonderen Befund waren. Diese letztgenannten drei Fohlen wiesen vormals keine Lungenabszesse auf (s. auch 4.2). In der Kontrollgruppe wurde ein Fohlen (Nr. 94), bei dem bereits keine Lungenabszesse mehr nachweisbar waren, wegen starkem Husten über vier Wochen behandelt. Ein anderes (Nr. 112) wurde wegen Fiebers und Arthritis fünf Wochen behandelt, bevor es aufgrund osteolytischer Gelenksveränderungen euthanasiert werden musste.

#### ***4.12 Zeit bis zur Spontanremission bei den erkrankten Fohlen ohne Behandlung***

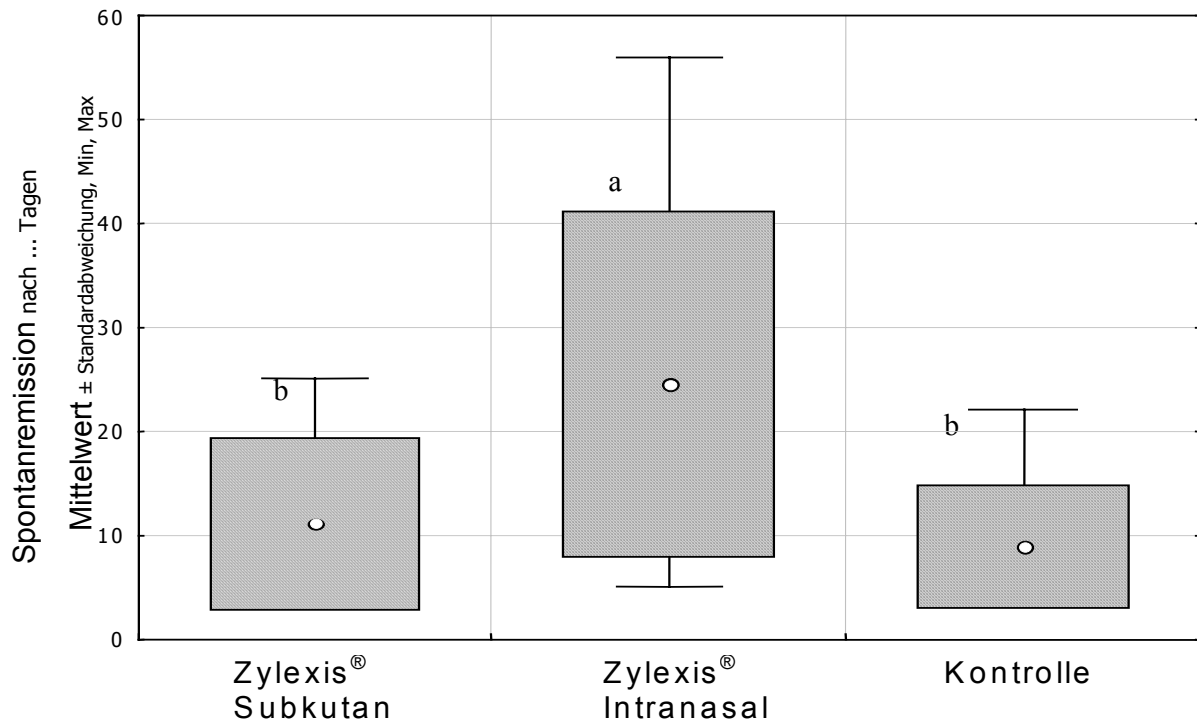
Wie bereits erwähnt, blieben 29 von insgesamt 66 Fohlen mit sonographisch detektierten Lungenabszessen in dieser Studie unter bestimmten Voraussetzungen ohne eine spezifische Behandlung (s. auch Diss. GRAVERT, 2006). Die Voraussetzung hierfür waren eine Leukozytenzahl unter  $18 \times 10^9/l$  und ein Abszess-Score unter fünf Zentimetern. Als wieder gesund wurden Fohlen angesehen, die in drei aufeinanderfolgenden Untersuchungen im Abstand von einer Woche keinen Lungenabszess mehr aufwiesen und verbesserte klinische Befunde hatten. Um einen möglichen Einfluss des Präparates Zylexis<sup>®</sup> auf die spontane Ausheilung nachzuweisen, wurde die Zeit von der Diagnosestellung bis zur ersten sonographischen Lungenuntersuchung ohne Abszess für jedes Fohlen in der jeweiligen Gruppe bestimmt (s. Tab. 11). Sowohl in Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) als auch in der Kontrollgruppe wurde jeweils ein Fohlen (Nr. 56 u. 98) während dieser Phase unterstützend mit einer Trimethoprim-Sulfonamid-Kombination über 14 Tage behandelt. Beide Fohlen sind hier mitberücksichtigt worden, da die Behandlung erst stattfand, als bereits keine Abszesse mehr sonographisch darstellbar waren. In der Kontrollgruppe C betrug der Abstand zwischen Erkrankungsbeginn und Spontanremission im Mittel neun Tage, in Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) elf Tage. In Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) mit etwa 25 Tagen (Mittelwert) war der Abstand am längsten (Einzelwerte im Anhang Tab. 12-Tab. 20).

**Tab. 11. Anzahl der Fohlen ohne Behandlung und gruppenbezogene Mittelwerte (mit Standardabweichung) der Zeit bis zur spontanen Genesung**

Gruppe	Anzahl der Fohlen ohne Behandlung	Genesung nach x Tagen
A (Zylexis® s.c.)	10	10,8 ± 8,4 <sup>b</sup>
B (Zylexis® i.n. )	8	25,6 ± 17,5 <sup>a</sup>
C (Kontrolle)	11	8,9 ± 6,0 <sup>b</sup>
Gesamt	29	14,4 ± 12,9

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>: unterschiedliche Buchstaben geben signifikante Unterschiede an.

Die Dauer bis zur Spontanabheilung der Lungenabszesse betrug in Gruppe A mit subkutaner Zylexis®-Applikation (n= 10) 10,8 ± 8,4 Tage, in Gruppe B (Zylexis® i.n.) lag diese Zeit bei 25,6 ± 17,5 Tagen und in der Kontrollgruppe bei 8,9 ± 6,0 Tagen.(s. auch Abb. 6).



a, b: signifikante Unterschiede

**Abb. 6.** Dauer bis zur spontanen Abheilung von Lungenabszessen in den drei Fohlen-Gruppen (in Tagen)

Statistisch war hier mittels Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied bezüglich der Dauer bis zu einer spontanen Ausheilung von Lungenabszessen ( $p= 0,008$ ) zwischen den drei Fohlengruppen festzustellen. Mittels LSD-Post-hoc-Test wurden die Unterschiede zwischen jeweils zwei Gruppen geprüft. Bei den Fohlen von Gruppe A (Zylexis® s.c.) und C (Kontrolle) war die Dauer zwischen Diagnose und Spontanabheilung der Lungenabszesse signifikant kürzer als in Gruppe B (Zylexis® i.n.) (A/B:  $p= 0,012$ ; C/B:  $p= 0,003$ ). Die Gruppen A (Zylexis® s.c.) und C (Kontrolle) sind statistisch nicht signifikant unterschiedlich bezüglich einer Spontanremission von Lungenabszessen bei kranken Fohlen ( $P= 0,66$ ). Die Berechnung wurde unter Einfügung eines konstanten Abszess-Scores, der gerade seinem Mittelwert für alle Fohlen entspricht, wiederholt. Diese Covariable diente dazu, den Einfluss der Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung als beeinflussenden Faktor auszuschließen. Diese statistische Auswertung führte zum gleichen Ergebnis (A/B:  $p= 0,016$ ; A/C:  $p= 0,66$ ; B/C:  $p= 0,004$ ), d.h. die Fohlen der Gruppe B (Zylexis® i.n.) brauchen statistisch am längsten bis zu einer spontanen Abheilung der sonographisch festgestellten Lungenabszesse.

#### **4.13 Einfluss der Haltung auf die Erkrankungsrate**

Hier sind die Fohlen aufgeführt, die während der Studie anders als der Rest der Fohlen gehalten wurden aufgeführt, um den möglichen Einfluss der Haltung auf eine Erkrankung zu dokumentieren.

Sieben Fohlen wurden während der Studie durchgehend in einem mit Stroh eingestreuten Laufstall gehalten und kamen nicht wie die anderen auf die Weide. Stattdessen stand ein angrenzender Sandpaddock den Stuten mit ihren Fohlen einige Stunden am Tag zur Verfügung. Die Fohlen kamen aus allen drei Gruppen (Gruppe A (Zylexis® s.c.): 2; Gruppe B (Zylexis® i.n.): 3; Gruppe C (Kontrolle): 2). Von diesen sieben Fohlen erkrankten vier (57 %) an Lungenabszessen (Gruppe A: Nr. 13; Gruppe B: Nr. 55 und 56; Gruppe C: Nr. 100). Somit lag die Erkrankungsrate bei diesen Fohlen geringfügig, aber statistisch nicht signifikant, über der der gesamten Fohlenanzahl mit 52 %. Ein Einfluss dieser Haltungsform auf die Ergebnisse der Studie ist daher unwahrscheinlich, zumal die Fohlen gleichmäßig über alle drei Gruppen verteilt waren.

Weitere vier Fohlen wurden aufgrund von Unverträglichkeiten der Stuten auf einer kleinen Weide separat gehalten. Die gesamte Gruppengröße war hierbei nie größer



als sechs Stuten mit Fohlen. Ein Fohlen gehörte zu Gruppe A (Nr. 26), zwei Fohlen zu Gruppe B (Nr. 84 und 86) und ein Fohlen zu Gruppe C (Nr. 127). Alle vier Fohlen blieben im Laufe dieser Studie gesund. Im Vergleich zwischen gesunden und erkrankten Fohlen und ihrer Haltung (große wechselnde Gruppe/ kleine konstante Gruppe) ergab sich hier ein statistisch schwach signifikanter Unterschied (Test: Fisher exakt, zweiseitig,  $p=0,049$ ). Das heißt, die Erkrankungsrate bei den Fohlen, die separat in einer kleinen Gruppe gehalten wurden, war schwach signifikant niedriger.

#### ***4.14 Auftreten von Nabelentzündungen***

Während der Untersuchung wurde als infektiöse und entzündliche Erkrankung bei den Fohlen die Nabelentzündung mit in die Auswertung aufgenommen, um eine mögliche Wirksamkeit von Zylexis<sup>®</sup> bezüglich dieses Parameter aufzuzeigen. Beim Verdacht auf eine vorliegende Entzündung des Nabels, wurde diese stets auch sonographisch verifiziert.

In Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) und der Kontrollgruppe hatten 7 % ( $n=3$  von 45 bzw.  $n=3$  von 44) der Fohlen eine Nabelentzündung. In Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) hatten 9 % ( $n=4$  von 45) Fohlen einen entzündeten Nabel. Hier lag nach Pearson  $\chi^2$ -Test kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen der Fohlen dieser Studie vor ( $p=0,9$ ).

#### ***4.15 Einfluss einer Antibiotikagabe in der neonatalen Phase auf die Erkrankungsrate***

Wurde ein Fohlen mit einer Gliedmaßenfehlstellung im Sinne eines Stelzfusses geboren, so wurde diesem innerhalb der ersten Lebenstage drei Gramm Oxytetracyclin verdünnt mit steriler Kochsalzlösung intravenös verabreicht (KÖHLER und LEENDERTSE, 1996). Bei Bedarf wurde dies bis zu dreimal innerhalb von drei bis vier Tagen wiederholt. Da eine solche Gabe von Antibiotika möglicherweise Auswirkungen auf das Immunsystem des neugeborenen Fohlens haben könnte, wurde diese Behandlung in der Auswertung mitberücksichtigt. Insgesamt erhielten zwanzig Fohlen, die zu dieser Studie gehörten eine solche Behandlung. In der Gruppe A (Zylexis<sup>®</sup> s.c.) war dies bei acht Fohlen (18 %), bei Gruppe B (Zylexis<sup>®</sup> i.n.) bei fünf Fohlen (11%) und bei der Kontrollgruppe bei sieben Fohlen (16 %) notwendig (s. Tab. 12-Tab. 20). Ein signifikanter Unterschied lag somit zwischen den

drei Gruppen nicht vor (Pearson  $\chi^2$ -Test,  $p= 0,7$ ). Allerdings war in der Gruppe aller gesundgebliebenen Fohlen der Anteil dieser antibiotischen Behandlungen mit 8 % ( $n= 5$  von 64) signifikant niedriger als in der Gruppe der erkrankten Tiere mit 21 % ( $n= 15$  von 70) (statistischer Test: Fisher exakt, zweiseitig,  $p= 0,03$ ). Hiermit gibt es Hinweise dafür, dass sich eine solche intensive antibiotische Behandlung in den ersten Lebenstagen negativ - im Hinblick auf den Gesundheitsstatus der betroffenen Fohlen dieser Studie - ausgewirkt haben könnte.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Untersuchung wurden 134 Fohlen eines Gestütes, auf dem *Rhodococcus equi*-Erkrankungen endemisch vorkamen, regelmäßig klinisch, sonographisch und labordiagnostisch untersucht. Davon erhielten 90 Fohlen den Paramunitätsinducer Zylexis® nach einem vorgegebenen Applikationsschema. Ziel der Arbeit war es, die Wirksamkeit von Zylexis® im Hinblick auf die Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen zu beurteilen. Die erste Applikation fand hierfür bereits innerhalb von acht bis zehn Stunden nach der Geburt statt. Neben der parenteralen wurde auch die mukosale Anwendung bei zwei unterschiedlichen Fohlengruppen mit jeweils 45 Fohlen überprüft. Eine dritte Gruppe von 44 Fohlen diente der Kontrolle. Die untersuchten Parameter sollten Aufschluss darüber geben, ob sich die Erkrankungsrate bezüglich abszedierender Pneumonien mit Zylexis® senken lässt.

### 5.1 Probanden

Die Prüfung eines Medikamentes auf bestimmte Wirkungseigenschaften erfordert ein möglichst homogenes Probandenmaterial. Alle Fohlen dieser Studie wurden in demselben Betrieb und unter den gleichen hygienischen Bedingungen geboren und aufgezogen. Sie kamen weiterhin innerhalb eines sehr eng begrenzten Zeitraumes (vom achten April bis zum zwölften Mai des Jahres 2005) auf die Welt. Daher sind jahreszeitliche Einflüsse bezüglich der Inzidenz der *R. equi*-Pneumonien (HONDALUS, 1997) für die Fohlen dieser Studie einheitlich und eine Auswirkung auf die Ergebnisse ist unwahrscheinlich.

Die Fohlen dieses Betriebes standen unter einem permanent hohen Infektionsdruck. *R. equi* kam endemisch vor und es wurden in den vorangegangenen Jahren bei etwa 80 % der Fohlen sonographisch Lungenabszesse diagnostiziert. Sowohl im sehr sandigen Boden der Weiden und Paddocks als auch im Stallbereich, sogar im Abfohlbereich, wurde *R. equi* mikrobiologisch nachgewiesen (MEYER-HAMME, 2004). Für den Nachweis der beteiligten Erreger wurden einige Fohlen (n= 23) mit detektierten Lungenabszessen während dieser Studie endoskopiert und TBS-Proben entnommen. In diesen war *R. equi* in 74 % (n= 17) aller untersuchten Proben nachzuweisen. Aber auch *Strep. zooepidemicus* befand sich in zahlreichen TBS-

Proben. Der Erreger konnte immerhin bei 57 % der endoskopierte 23 Fohlen mit Lungenabszessen neben *R. equi* festgestellt werden. Das spiegelt die Aussagen anderer Studien wieder, die *Strep. zooepidemicus* bei Atemwegsinfektionen bei Fohlen in über 80% der Fälle nachweisen konnten (HOFFMAN et al., 1993). Neben der potentiellen Ursache für Lungenabszesse spielt *Strep. zooepidemicus* hier sicherlich eine Rolle als opportunistischer Keim, wie ihn bereits TIMONEY (2004) für Influenzavirus-Erkrankungen beschrieb. Die mikrobiologischen Untersuchungen belegen, dass typische Erreger abszedierender Pneumonien bei den erkrankten Fohlen dieser Studie vorliegen.

Mit jeweils 45 Fohlen in den beiden Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und 44 Fohlen in der Kontrollgruppe stand eine aussagekräftige Anzahl an Tieren zur Verfügung.

Alle Fohlen wurden innerhalb von acht bis zehn Stunden post natum tierärztlich untersucht. Eine gute Kolostrumversorgung wurde gewährleistet und zusätzlich mittels IgG-Test überprüft. Somit hatten die in diese Studie aufgenommenen Fohlen die gleichen Ausgangsbedingungen und waren auch aus diesem Grund als Probanden gut geeignet.

### **5.2 *Haltungsbedingungen***

Bis zu einem Alter von vier Wochen blieben die Tiere in Laufställen, um dann auf die umliegenden Weiden gebracht zu werden. Lediglich vier Fohlen standen mit den Mutterstuten, aufgrund von Unverträglichkeiten und Konditionsproblemen der Stuten, auf einer separaten Weide in einer konstanten, kleinen Gruppe. Keines dieser Fohlen erkrankte an einer abszedierenden Pneumonie, was einen Einfluss der Haltung auf die Erkrankung bei diesen Fohlen vermuten lassen könnte. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine geringere Staubbelastung der Tiere sein, da sie nicht wie die anderen über sandige Treibgänge für Untersuchungen (Stutengynäkologie, klinische Untersuchung der Fohlen) von den Weiden zum Stall getrieben wurden. Die Inhalation mit *R. equi* kontaminierter Staubpartikel wird in der Literatur als wahrscheinlicher Infektionsweg diskutiert (HILLIGDE, 1986; TAKAI et al., 1987; GIGUÈRE, 2001; MEIJER u. PRESCOTT, 2004). Weiterhin entspricht dieses Ergebnis anderen Studien, in denen eine häufig wechselnde Pferdepopulation auf einem Betrieb sowie eine Haltung von einer großen Anzahl an Pferden auf denselben Flächen einen negativen Effekt auf die Inzidenz von *R. equi*-Pneumonien hatte (AINSWORTH, 1999; CHAFFIN et al., 2003; COHEN et al., 2005). Die hier

vorliegenden Fallzahlen für eine besondere Haltung sind allerdings sehr klein. Andererseits entstand während der Studie eine andere kleine, konstante Pferdegruppe. Sieben Stuten mit ihren Fohlen aus unterschiedlichen Gruppen blieben während der Dauer der Studie in einem Laufstall mit stündlich begrenztem Auslauf auf einem Sandpaddock. Die Erkrankungsrate bei diesen Fohlen lag mit 57 % etwas über dem Durchschnitt der gesamten Gruppe (52 %). Der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant. Obwohl diese Fohlen also ebenfalls in einer kleinen, konstanten Gruppe aufwuchsen, hatte dies keinen positiven Einfluss auf die Inzidenz der Erkrankung. Dies kann Zufall sein, aber auch mit anderen Faktoren wie z.B. der höheren Staubentwicklung auf dem Paddock zusammenhängen. Weiterhin könnten soziale Stresssituationen durch die mangelnden Ausweichmöglichkeiten vor ranghöheren Pferden im Laufstall zu einer andauernden Belastungssituation und somit einer erhöhten Anzahl von Erkrankungen beigetragen haben. Der Einfluss der Haltung auf das Erkrankungsgeschehen war aber nicht Thema der Studie, die geschilderten Befunde entstanden zufällig. Um zum Einfluss der Gruppengröße bezüglich der Inzidenz von *R. equi* Pneumonien eine eindeutige Aussage zu erhalten, wären allerdings Studien mit größeren Fallzahlen und identischen Haltungsbedingungen der Vergleichsgruppen notwendig.

### **5.3 Auswahl des Präparates**

Neben den eingeführten hygienischen Maßnahmen wurde auf dem betroffenen Gestüt nach einer Möglichkeit zur Senkung der Inzidenz von abszedierenden Pneumonien unter den Fohlen gesucht. Geeignete Impfstoffe gegen *R. equi* existieren zur Zeit nicht. Der Einsatz von BCG (Bacillus Calmette-Guèrin, attenuierter Mykobakteriumstamm zur Immunstimulierung), um die zelluläre Immunantwort zu steigern, erschien zu dem Zeitpunkt der Studie aufgrund der möglichen gravierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen, u.a. der Entwicklung von granulomatösen Pneumonien (VIEL und KENNEY, 1993; DE DIEGO et al., 1997; TREE et al., 2004), als zu riskant und tierschutzrechtlich nicht vertretbar für eine große klinische Studie an Fohlen.

Die Wahl fiel auf Zylexis® (Fa. Pfizer), einem Präparat aus inaktiviertem Parapoxvirus ovis, welches als Immunmodulator auch für Pferde zugelassen ist. Das identische Produkt war vormals unter dem Namen Baypamun® von der Firma Bayer bereits seit über zwanzig Jahren im Handel. Bei diesem Produkt sind keine unerwünschten

Arzneimittelwirkungen, bis auf eine Schwellung an der Injektionsstelle bekannt. Neben der parenteralen Anwendung wurde in dieser Studie an einer Gruppe von 45 Fohlen erstmals die lokale Anwendung als intranasal angewendetes Spray versucht. In anderen Studien, die allerdings mit BCG stattfanden, wurden über die Applikation als Aerosol sehr gute Erfolge in der Prophylaxe von mykobakteriell bedingten Erkrankungen erzielt (FALERO-DIAZ et al., 2000; LYADOVA et al., 2001; CHEN, 2004). Es war also davon auszugehen, dass es möglich ist über eine Aktivierung der mukosalen Immunantwort eine schnellere, effektivere Immunabwehr gegen eindringende Erreger zu erzielen.

Durch die Bestandteile des Parapoxvirus ovis sollte eine Stimulation der nicht-spezifischen Immunmechanismen erreicht werden. Vor allem eine Verbesserung der zellulären Abwehr könnte einen möglichen Schritt zur Bekämpfung des über die Atemwege eindringenden Erregers *R. equi* darstellen. Daß inaktivierte Poxviren dazu in der Lage sind, CD4+T-Zellen zu aktivieren, wiesen FACHINGER et al. (2000) (allerdings an Zellen von Schweinen) nach. Diese CD4+T-Zellen wiederum steigern die Freisetzung von Zytokinen. Unter anderem wird dabei Interferon- $\gamma$  freigesetzt, welches Makrophagen aktivieren kann, die Phagosom-Lysosom-Fusion fördert und daher mitentscheidend für eine Abtötung von *R. equi* ist (DARRAH et al., 2000; FACHINGER et al., 2000).

Bei der intranasalen Anwendung ist allerdings nicht gesichert, wie weit das Präparat in den Atmungstrakt vordringt. Es ist hierbei davon auszugehen, dass ein Grossteil der Flüssigkeitspartikel nur bis auf die Nasenschleimhäute gelangt und nur ein geringerer Anteil weiter bis zur Lunge gelangt. Ebenso ist beim Versprühen immer damit zu rechnen, dass ein Teil wieder abläuft, wenn das Fohlen nach der Applikation den Kopf wieder senkt. Andererseits findet eine *R. equi*-Infektion höchstwahrscheinlich auch über den Respirationstrakt statt, so dass die geplante intranasale Prophylaxe am gleichen Ort wie die Infektion ansetzt und somit trotz der Einschränkungen interessant ist.

Die parenterale Anwendung mittels subkutaner Injektion stellt die Verabreichung der gesamten gewünschten Dosis des Präparates sicher. Allerdings ist hier eine generalisierte, systemische Stimulierung des Immunsystems zu erwarten, die der lokalen, mukosalen bei der intranasalen Anwendung gegenübersteht.

So standen zwei Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen mit unterschiedlichen Verabreichungswegen, deren Effektivität bezüglich der Prävention abszedierender Pneumonien beim Fohlen

untersucht werden sollte, einer unbehandelten gleichgroßen Kontrollgruppe gegenüber.

#### **5.4 Verabreichungsprotokoll für Zylexis®**

Das Protokoll sah eine gestaffelte regelmässige Gabe von Zylexis® an die jeweils 45 Fohlen der beiden Versuchsgruppen vor. Die erste Applikation erfolgte bereits innerhalb von acht bis zehn Stunden nach der Geburt. Dies geschah im Hinblick auf die sofortige Erregerexposition, die auch trotz strenger hygienischer Maßnahmen nicht zu vermeiden ist. Ziel des Applikationsschemas war es eine anhaltende Stimulierung des Immunsystems zu erreichen, die zu einer besseren Erregerabwehr führen sollte. In früheren klinischen Blindstudien konnte die Inzidenz von respiratorischen Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Absetzen und einer Neugruppierung von Fohlen durch mehrmalige Verabreichung von Baypamun® (Fa. Bayer, Präparat heißt jetzt Zylexis®, Fa. Pfizer) signifikant gesenkt werden (BÖTTCHER, 1994; ZIEBELL et al, 1997). Die ersten Applikationen von Zylexis® erfolgten nach dem in der Gebrauchsanweisung empfohlenen Schema (0.,2. und 9.Tag, bei erwartetem Hauptinfektionsdruck innerhalb von 14 Tagen nach erster Gabe). Der ersten Gabe innerhalb von acht bis zehn Stunden post natum folgte eine weitere 48 Stunden später. Bereits in einer anderen Studie konnte durch die ebenfalls subkutane Anwendung eines inaktivierten Parapoxvirus (PIND-AVI) die allgemeine Morbidität bei Fohlen in den ersten Lebenswochen signifikant gesenkt werden (MAYR-BIBRACK, 1980). Leider fehlten in dieser Literaturquelle genauere Angaben zu Material und Methode sowie zu den untersuchten Parametern. Ansonsten gibt es keine veröffentlichten Studien zur gezielten Erkrankungsprophylaxe mit inaktivierten Parapoxviren beim neonaten Fohlen.

Die Applikation von Zylexis® wurde in der vorliegenden Studie im Wochenabstand fortgeführt bis zu einem Alter der Fohlen von drei Monaten. Bis Ende des fünften Monates erhielten die Fohlen alle zwei Wochen Zylexis®. Dieses Protokoll wurde gewählt, da eine Infektion mit *R. equi* täglich ab dem Tag der Geburt stattfinden kann. Das jüngste Fohlen, bei dem eine *R. equi*-Pneumonie auf demselben Gestüt diagnostiziert wurde, war erst zwölf Tage alt (ALTHAUS, 2004). Typischerweise erkranken Fohlen in einem Alter zwischen vier Wochen und sechs Lebensmonaten (BARTON u. HUGHES, 1980; PRESCOTT, 1987; GIGUÈRE, 2001). Inzwischen wird

allerdings davon ausgegangen, dass eine Infektion mit *R. equi* bereits in der ersten Lebenswoche stattfindet (COHEN et al., 2001; ALTHAUS, 2004).

Mit Zylexis<sup>®</sup> gibt es keine Studien bezüglich der kontinuierlichen Anwendung als Prophylaxe von Lungenerkrankungen bei Fohlen, die eine andauernde Schutzwirkung zum Ziel hatten. Eine wiederholte Applikation schien aber in Studien mit BCG (*Bacillus Calmette-Guèrin*), einem attenuierten Stamm von *Mycobacterium tuberculosis*, der ebenfalls als Immunstimulans eingesetzt wird, bei der intranasalen Anwendung zu einer Verbesserung der Wirkung beizutragen (CORNER et al., 2002). Eine Sensibilisierung gegenüber den Inhaltsstoffen von Zylexis<sup>®</sup> war eher unwahrscheinlich. In einer anderen Studie zur Typ-I-Allergie mit 39 Islandpferden mit zum Teil wesentlich höheren eingesetzten Konzentrationen von Baypamun<sup>®</sup> und wiederholter Exposition konnte keine derartige Nebenwirkung festgestellt werden (GEIBEN, 2003).

Um eine Vergleichbarkeit der Fohlen der beiden Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen zu erhalten, wurde oben genanntes Verabreichungsprotokoll eingehalten. Eine bessere Wirksamkeit hätte eventuell dann erzielt werden können, wenn die Gabe von Zylexis<sup>®</sup> nach subjektiven Anforderungen für das einzelne Fohlen erfolgt wäre. Beispielsweise wäre eine prophylaktische Behandlung aller Fohlen einige Tage vor dem Umstallen von den Einzelboxen im Abfohlstall in die Gruppenlaufställe evt. sinnvoll, um das Immunsystem des Fohlens gezielt in dieser Phase des vermehrten Infektionsdruckes und Stresses zu unterstützen (wie in den Studien von ZIEBELL et al. (1997) und BÖTTCHER (1994)). Ein weiterer Ansatz wäre evt. den Fohlen, die zwar klinisch noch unauffällig sind und deren Blutleukozyten bereits eine steigende Tendenz zeigen, mit dem Paramunitätsinducer zu versorgen. Andererseits sollte über die regelmäßige Applikation eine anhaltende Stimulation der Immunabwehr erfolgen, mit dem Ziel, dass das unspezifische Immunsystem der Fohlen jederzeit schnell auf eindringende Erreger reagieren kann. Dies konnte mit diesem Protokoll anscheinend nicht erreicht werden, da sich die Fohlengruppen hinsichtlich der Erkrankungsrate nicht signifikant unterschieden.



### **5.5 Auswahl der Untersuchungsparameter**

Es gab viele unterschiedliche Ansätze das Ausmaß von *R. equi*-Pneumonien bei Fohlen zu begrenzen. Ein erster Weg führt auf endemisch betroffenen Gestüten über die Einführung eines Früherkennungssystems, da klinische Anzeichen häufig erst im späten Stadium der Erkrankung auftreten (MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, D., 1999; GIGUÈRE, 2001). Ein solches System mit den Parametern klinischer Score, Blutleukozytenwert und sonographische Lungenuntersuchung bewährte sich auch während dieser Studie.

Der Schweregrad der Erkrankung wurde im wesentlichen an den Befunden der sonographischen Untersuchung der Lunge festgemacht. Ein Fohlen mit einem Abszess-Score (= Summe aller detektierten Abszess-Durchmesser) von beispielsweise zehn Zentimetern weist mehr Lungenveränderungen auf und ist deshalb schwerer erkrankt als ein Fohlen mit einem Score von einem Zentimeter. Sehr viele Fohlen wiesen bei der Diagnosestellung nur einen einzigen sonographisch detektierten Lungenabszess auf und waren dabei klinisch unauffällig. Das verdeutlicht den Nutzen der Sonographie als Hilfe bei der Früherkennung von Pneumonien, den bereits ALTHAUS (2004) beschrieb.

In der vorliegenden Studie lag die Morbidität in der Gesamtgruppe bei 52 %. Kein Fohlen verstarb aufgrund von Lungenabszessen. Unter den in dieser Studie als erkrankt aufgeführten Fohlen wiesen vier keine mittels Sonographie der Lunge darstellbaren Abszesse auf. Sie fielen stattdessen aufgrund von Fieber (Gruppe B (Zylexis® i.n.): Nr. 47 u. 62, Gruppe C (Kontrolle): Nr. 94), Arthritis und Fieber (Gruppe C: Nr. 112) oder hochgradigen Lungenbefunden (Gruppe B: Nr. 63) auf. Da nicht alle Lungenabszesse ultrasonographisch darstellbar sind, wäre bei diesen Tieren möglicherweise eine Röntgenaufnahme des Thorax aufschlussreich gewesen. So hätte man möglicherweise axial gelegene Lungenabszesse erkennen können (REEF, 1998). Die Röntgentechnik stellt in solchen Fällen eine gute Ergänzung zur Sonographie dar. Im direkten Vergleich zwischen Röntgen und Sonographie in der Diagnostik abszedierender Pneumonien beim Fohlen zeigte sich aber, dass die Sonographie die überlegene Variante ist, mit der mehr Abszesse eindeutig erkannt werden konnten (persönl. Mitteilung WALTHER, S., 2006). Weiter gibt es keine Angaben in der Literatur, ab welcher Größe ein Lungenabszess beim Fohlen radiologisch nachweisbar ist.

Als weitere Hilfsparameter im Früherkennungssystem wurden der klinische Score nach OHNESORGE et al. (1998) und die Anzahl der Leukozyten im Blut herangezogen. 47 % der als erkrankt erkannten Fohlen wurden allerdings zum Zeitpunkt der Diagnose der Pneumonie mittels klinischem Score als klinisch gesund bis geringgradig erkrankt beurteilt. Diese Feststellung stimmt mit anderen Studien überein, die klinische Symptome erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium einer *R. equi*-Pneumonie beschrieben (MARTENS et al., 1982; AINSWORTH, D., 1999; GIGUÈRE, 2001). Auch der Leukozytenwert im Blut lag nur bei 63 % der Fohlen über dem in dieser Studie festgelegten Grenzwert von  $13 \times 10^9/l$ . Dies verdeutlicht, dass stets mehrere Parameter erhoben werden müssen, um den Verdacht auf eine *R. equi*-Pneumonie zu erhärten. Einen wirklich eindeutigen Hinweis liefert dann erst eine sonographische Untersuchung der Lunge und unter Umständen auch die Röntgenaufnahme.

29 Fohlen wurden auch ohne eine Therapie wieder gesund. Dies war der erste Ansatz, Fohlen mit Lungenabszessen ohne Therapie zu belassen (Diss. GRAVERT, 2006). Viele dieser Fohlen wären bei einer rein klinischen Untersuchung zu keinem Zeitpunkt auffällig gewesen und wurden nur durch die routinemässige Sonographie entdeckt. Dies verdeutlicht nochmals den Nutzen der Sonographie in der Früherkennung abszedierender Pneumonien beim Fohlen.

### **5.6 Schweregrad der Erkrankungen und Erkrankungsformen**

Bezüglich der mittleren Dauer bis zu einer spontanen Ausheilung von detektierten Lungenabszessen, die über wiederholte sonographische Kontrollen ermittelt wurde, schnitt die Gruppe B (Zylexis® i.n.) unerwartet und statistisch signifikant am schlechtesten ab. Die Fohlen der Gruppe B brauchten hier im Durchschnitt mehr als doppelt so lange für die Rückbildung der Abszesse im Vergleich zu den Fohlen der Subkutangruppe und der Kontrollgruppe. Man könnte hieraus schlussfolgern, dass die intranasale Verwendung von Zylexis® eine Tendenz hat beim Vorliegen von Lungenabszessen die Heilung evt. sogar nachteilig zu beeinflussen. Dies müsste aber mit größeren Fallzahlen überprüft werden. Eine subkutane Anwendung von Zylexis® hingegen, schien keinen Einfluss auf die spontane Abheilung der Lungenabszesse zu haben. Hier lag kein Unterschied zu den Fohlen der unbehandelten Kontrollgruppe vor. In einer Studie zu BCG zeigte sich ebenfalls ein

Unterschied zwischen der subkutanen und der intranasalen Anwendung. Die intranasale Verabreichung von BCG führte bei Mäusen dosisabhängig zu einer Lungengranulombildung, während dieser Effekt bei einer subkutanen Gabe nicht auftrat (TREE et al., 2004). Der genaue Effekt, der zu diesem Phänomen führt, ist noch nicht bekannt.

Bemerkenswert war weiterhin, dass es bei zwei Fohlen (Nr. 8 und 17) der Gruppe A, die also Zylexis<sup>®</sup> subkutan erhielten, zu einem Rezidiv nach Ersterkrankung kam. Bei einem dieser Fohlen lag eine spontane Remission des diagnostizierten Lungenabszesses am 69. Tag vor. Am Tag 146 wurde dann eine Therapie gegen *R. equi* aufgrund mehrerer Lungenabszesse eingeleitet. In diesem Fall könnte es möglich sein, dass während der gesamten Zwischenzeit Abszesse in der Tiefe der Lunge vorlagen, die aber sonographisch nicht sichtbar waren. Hier hätte eine Röntgenaufnahme des Thorax möglicherweise Aufschluß bieten können (REEF, 1998).

Arthritis ist im Zusammenhang mit einer *R. equi*-Erkrankung bereits mehrfach jeweils für einzelne Fälle beschrieben worden (WILSON, 1955; SWEENEY, 1987; MADISON und SCARRAT, 1988; COLLATOS et. al., 1990; KENNEY, 1994; CHAFFIN und MARTENS, 1997; DESJARDINS und VACHON, 1999). Das bei den betroffenen Fohlen dieser Studie erst auf eine spezifische Rhodokokktherapie das Fieber sank, weist auf eine wahrscheinliche *R. equi*-Erkrankung hin, ein Erregernachweis wurde aber nicht geführt.

### **5.7 Effektivität von Zylexis<sup>®</sup> in der Prävention abszedierender Pneumonien**

In der vorliegenden Studie ergaben sich keine Unterschiede hinsichtlich der Morbidität zwischen den beiden Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen und der Kontrollgruppe bezüglich abszedierender Pneumonien. Auch bezogen auf die mittlere Schwere der Erkrankung und das durchschnittliche Alter der Fohlen bei einer Erkrankung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bisher lagen noch keine Untersuchungen mit Zylexis<sup>®</sup> hinsichtlich der wiederholten, mit dem Tag der Geburt beginnenden Applikation beim Fohlen vor. Ein völlig neuer Ansatz war zudem die lokale Anwendung als Sprühlösung. Auch dies konnte die Fohlen dieser Studie nicht vor einer abszedierenden Lungenerkrankung schützen. Dieses Ergebnis mag u. U. auch mit dem hohen Infektionsdruck bei den Tieren eines so großen Zuchtbetriebes

zusammenhängen (s. Probanden). Allerdings waren die Versuchsbedingungen insofern ideal, dass alle Fohlen eine sehr homogene Gruppe bildeten, d.h. gleiche Bedingungen von der Geburt bis zum Ende der Studie hatten. Ausgehend von den untersuchten Parametern konnte also unabhängig vom Applikationsweg kein Effekt einer wiederholten Gabe von Zylexis<sup>®</sup> beobachtet werden. Es wurden allerdings während der Studie keine weiterführenden labordiagnostischen Parameter miteinbezogen, die evt. Aufschluss über die Art der Beeinflussung des Immunsystems geben könnten. Da es sich bei Zylexis<sup>®</sup> um inaktiviertes Virusmaterial handelt, wird es sich wohl kaum inert verhalten, sondern es ist zu erwarten, dass eine Immunreaktion stattfindet. Um den Effekt bei lokaler, mukosaler Anwendung darzustellen, wären Stimulationstests mit Alveolarmakrophagen aus der BALF beispielsweise eine mögliche Variante gewesen; um einen Einfluss Zylexis<sup>®</sup> nachzuweisen. Eine weitere Methode wäre z.B. die Bestimmung von Zytokinen im Blut als Anhaltspunkt für die Beeinflussung durch Zylexis<sup>®</sup> gewesen. Bei Zellen des Schweines wurde in vitro nach Einwirkung inaktivierter Poxviren bereits eine erhöhte Freisetzung von makrophagen-aktivierenden Zytokinen nachgewiesen (FACHINGER et al., 2000).

### **5.8 Schlussfolgerung**

Die vorliegende Arbeit sollte Informationen zur Wirksamkeit des Paramunitäts-inducers Zylexis<sup>®</sup> für die Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen liefern. Des Weiteren sollten die Applikationswege mittels intranasalem Spray und als parenterale Injektion auf Unterschiede in der Wirkung untersucht werden. Die aufgeführten Ergebnisse belegen, dass beide Applikationsarten von Zylexis<sup>®</sup> bei den Fohlen dieser Studie keinen Erfolg hinsichtlich der Prävention abszedierender Pneumonien hatten. Das verwendete Präparat war in dieser Art der Anwendung und der verwendeten Dosierung alleine nicht in der Lage, abszedierenden Pneumonien bei den Fohlen dieser Studie vorzubeugen. Die Fohlen der beiden Zylexis<sup>®</sup>-Impfgruppen unterschieden sich bezüglich der Inzidenz von detektierten Lungenabszessen nicht von denen der Kontrollgruppe.

## 6 Zusammenfassung

### **Baumann, Ina: Untersuchung der Wirksamkeit des Paramunitätsinducers Zylexis® zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirksamkeit von Zylexis®, einem Paramunitätsinducer bestehend aus inaktiviertem Parapoxvirus ovis, zur Prophylaxe von Lungenabszessen beim Fohlen zu überprüfen. Dabei sollten die parenterale Anwendung und die intranasale Applikation hinsichtlich einer prophylaktischen Wirkung gegen abszedierende Pneumonien bei wiederholter Gabe verglichen werden.

Zu diesem Zweck wurden 134 termingerecht geborene, klinisch gesunde Fohlen eines privaten Gestütes in Norddeutschland mit endemischer Rhodokokkose der Fohlen randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt. Neben einer Fohlengruppe von 45 Tieren, die Zylexis® subkutan (Gruppe A) erhielten, und einer weiteren gleichgroßen Gruppe von Fohlen, bei denen Zylexis® intranasal (Gruppe B) appliziert wurde, gab es eine aus 44 Fohlen bestehende Kontrollgruppe. Alle Fohlen wurden beginnend mit dem Tag der Geburt regelmäßig klinisch untersucht und die Blutleukozytenzahl bestimmt. Zusätzlich wurden alle 134 Fohlen routinemäßig alle 14 Tage einer sonographischen Untersuchung der Lunge bis zur Vollendung des fünften Lebensmonates unterzogen. Die Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen erhielten bereits innerhalb von acht bis zehn Stunden post natum die erste Dosis von zwei Millilitern des resuspendierten Präparates subkutan bzw. intranasal injiziert. Nach einer Wiederholung 48 Stunden später erfolgten die Applikationen mit Zylexis® fortan wöchentlich bis zum Ende des dritten Lebensmonates. Im vierten und fünften Lebensmonat sah das Protokoll eine zweiwöchentliche Applikation vor.

Als erkrankt galt ein Fohlen sobald sonographisch ein Lungenabszess festgestellt wurde. Stichprobenartig wurde aus TBS-Proben erkrankter Fohlen ein Erregernachweis geführt, wobei *Rhodococcus equi* und/oder *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus* in allen Proben (n= 23) vorhanden war. *R. equi* war dabei in 74 % (n=17) der Proben nachweisbar und dabei bei über der Hälfte vergesellschaftet mit *Strep. zooepidemicus*..

Hinsichtlich der Anzahl der kranken Fohlen, deren Alter bei Erkrankung und dem Schweregrad der Erkrankung ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Fohlen der beiden Zylexis<sup>®</sup>-Gruppen und denen der Kontrollgruppe. Bezüglich einer spontanen Heilung von Lungenabszessen brauchten die Tiere der Gruppe, die Zylexis<sup>®</sup> intranasal appliziert bekamen, signifikant länger als die Fohlen der Kontrollgruppe und der Gruppe, die Zylexis<sup>®</sup> subkutan erhielt. Die Sonographie der Lunge bestätigte sich in dieser Arbeit erneut als geeignete Maßnahme zur Früherkennung einer *R. equi*-Pneumonie beim Fohlen. Bei 25 Fohlen mit einem klinischen Score unter drei und einem Leukozytenwert unter  $13 \times 10^9/l$  wurden während der routinemäßigen Sonographie dennoch Lungenabszesse festgestellt. Zusätzlich wurde als Hinweis auf eine Wirkung von Zylexis<sup>®</sup> gegen entzündliche Erkrankungen der Parameter Nabelentzündung mit in die Auswertung mit aufgenommen. Auch hier war keine protektive Wirksamkeit des Paramunitätsinducers gegeben. In beiden Fohlengruppen, die Zylexis<sup>®</sup> erhielten, entwickelten ebenso viele Tiere eine Omphalitis wie in der Kontrollgruppe.

## 7 Summary

### **Baumann, Ina D.: The potency of the paramunity inducer Zylexis® to protect foals against lung abscesses**

The objective of this study was to determine the protective potency of Zylexis®, an immunomodulator containing inactivated Parapoxvirus ovis, towards lung abscesses in the foal. Therefore a repeated systemic and intranasal application should be compared to check the efficacy of Zylexis® against abscessing pneumonia in a controlled, randomised study.

For this purpose 134 healthy newborn foals on a private stud farm in Northern Germany, where rhodococcal infections are endemic, were divided into three groups. One group of 45 foals was treated with Zylexis® subcutaneously, another group of 45 foals got Zylexis® intranasally and 44 foals belonging to the control group remained without injections. Beginning on the day of birth all foals were regularly clinically examined and their blood leucocytes were counted. Additionally as a means of early recognition of *Rhodococcus equi*-pneumonia ultrasonic examination of the lung (ALTHAUS, 2004) was performed every second week until the foals were five month old. Starting within eight to ten hours after birth the foals of the two Zylexis®-groups were treated subcutaneously or intranasally with the first dose of two milliliters resuspended product. This was repeated after 48 hours and later on weekly until the end of the third month. Within the fourth and fifth month of life the foals were treated every second week. As soon as a lung abscess was noticed by sonography, the prophylaxis was supposed to have failed. In the foals with lung abscesses that were endoscopically examined *R. equi* and/ or *Strep. equi ssp. zooepidemicus* could be detected. In 74% (n= 17) of the total TBS-samples (n= 23) *R. equi* was present and 56% were also *Strep. zooepidemicus* positive.

Morbidity rates, age at diagnosis and severity of the developed pneumonia did not show a significant difference between the Zylexis®-treated foals and the foals of the untreated control group. In fact the spontaneous recovery from lung abscesses took significantly longer in foals which had been treated with Zylexis® intranasally compared to the others.

The ultrasonographic examination of the lung was confirmed as a valuable tool in early recognition of *R. equi*-pneumonia in the foal. Among foals which showed only

## SUMMARY

---

very mild clinical symptoms and white blood cell count less than  $13 \times 10^9/l$ , 25 had sonographically detectable lung abscesses.

Additionally the omphalitis as a typical inflammation and infection of neonatal foals had been included in the statistical analysis. The incidence of omphalitis did differ not significantly between foals who got the immunomodulator Zylexis<sup>®</sup> and foals of the untreated control group.



## 8 Literaturverzeichnis

AINSWORTH, D., BECK, K.A., BOATWRIGHT, C.E., SNEDDEN, K.A. und REBHUN, W.C. (1993)

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

Am. J. Vet. Res.; 54: 2115-20

AINSWORTH, D., EICKER, S.W., YEAGAR, A.E., SWEENEY, C.R., VIEL, L., TESAROWSKI, D., LAVOIE, J-P., HOFFMAN, A., PARADIS, M.R., REED, S.M., ERB, H.N., DAVIDOW, E. und NALEVANKO, M. (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. Ass. 213: 510 –515

AINSWORTH, D. (1999)

Rhodococcal infections in foals

Equine Veterinary Education (1999); 11(4): 191-198

ALTHAUS, O. (2004)

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

Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Diss.

ANTOINE, G., SCHEIFLINGER, F., DORNER, F. und FALKNER, F.G. (1998)

The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses

Virology 244: 365-396

ARDANS, A.A., HIETALA, S.K., SPENSLEY; M.S. und SANSOME, A. (1986)

Studies of natural occurring and experimental *Rhodococcus equi*pneumonia in foals

Proc. Am. Ass. Equine Pract., 32: 129-143

ARLOTTI, M., ZOBOLI, G., MOSCATELLI, G.L., MAGNANI, G., MASERATI, R., BORGHI, V., ANDREONI, M., LIBANORE, M., BONAZZI, L., PISCINA, A. und CIAMMARUGHI, R. (1996)

*Rhodococcus equi* infection in HIV-positive subjects: a retrospective analysis of 24 cases

Scand. J. Infect. Dis. 28: 463-467

BALDWIN, J.L., BERTONE, J.J., SOMMER, M.M., BAYHA, R. et al. (1992)

*Rhodococcus equi* enteritis, colonic lymphadenitis and peritonitis in three foals with nonresponsive *Rhodococcus equi* pneumonia

Equine Pract. 1992; 14: 15-18

BALSON, G.A., SMITH, G.D. und YAGER, J.A.

Immunophenotypic analysis of foal bronchoalveolar lavage lymphocytes

Vet Microbiol 1997; 56 (3-4):237-46

BANKS, E.M., KYRIAKIDOU, M., LITTLE, S. et al. (1999)

Epithelial lymphocyte and macrophage distribution in the adult and fetal equine lung

J Comp Pathol 1999; 120(1):1-13

BARTON, M.D. und HUGHES, K.L. (1980)

*Corynebacterium equi*: A review

Vet. Bull. 1980, 50, 65-80

BARTON, M.D. und FULTON, J.C. (1980a)

Antibiotic sensitivity of *Corynebacterium equi*

Aust. Vet. J.; 56: 339-342

BARTON, M.D. und HUGHES, K.L. (1984)

Ecology of *Rhodococcus equi*

Vet. Microbiol., 9: 65-76

BAVERUD, V., FRANKLIN, A., GUNNARSSON, A., GUSTAFSSON, A. und HELLANDER-ERDMANN, A. (1998)

*Clostridium difficile* associated with acute colitis in mares when their foals are treated with erythromycin and rifampicin for *Rhodococcus equi*-Pneumonia

Equine Vet. J. 30: 482-488

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

Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals

Vet. Microbiol.; 56: 193-204

BEHRMANN, K. (1995)

Prophylaktischer, metaphylaktischer und therapeutischer Einsatz des Paramunitätsinducers Baypamun<sup>®</sup> bei Atemwegserkrankungen von Kälbern unter Praxisbedingungen

Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Diss.

BENOIT, S., BENACHOUR, A., TAOUJI, S., AUFFREY, Y. und HARTKE, A. (2002)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence plasmid determinants in *Rhodococcus equi*

Infect. Immun. (2002) 70: 3768-76

BERNOCO, M.M., LIU, I.K. und WILLITS, N.H. (1994)

Hemolytic complement activity and concentrations of its third component during maturation of the immune response in colostrum-deprived foals

Am J Vet Res 1994; 55(7):928-33

BEUTEL, M. (1992)

Klinische und mikrobiologische Untersuchungen über die Wirkung intranasal applizierter Paramunitätsinducer beim Kalb

München, Vet. Med. Diss.

BLOGG, J.R., BARTON, M.D., GRAYDON, R. und CUST, R.E. (1983)

Blindness caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal

Equine Vet J, Suppl. 2: 25-26

BOSTEDT, H. (1999):

Erkrankungen des Bewegungsapparates – Fohlenseptikämie (Fohlenlähme).

in: DIETZ, O., und B. HUSKAMP (Hrsg.): Handbuch Pferdepraxis

Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 2. Auflage, 172-173

BÖTTCHER, E. (1994)

Clinical trials and field experience with parapoxvirus-based immunostimulants in companion animals

In: Immunomodulator Symposium of the WAVMI and specialists in Infectious disease. p. 28-33

BRUMBAUGH, G.W., DAVIS, L.E., THURMAN, J.C., et al. (1990)

Influence of *Rhodococcus equi* on the respiratory burst of resident alveolar macrophages from adult horses

Am J Vet Res 1990; 51: 766-771

BÜTTNER, M. (1983)

Stimulierung der natürlichen (spontanen) zellvermittelten Zytotoxizität mit verschiedenen Inducern

Fortschr. Vet. Med. 37: 15 Kongreßbericht, p. 261-266

BÜTTNER, M., STRUBE, W., WOLF, G., HOERSTKE, M. (1987)

Parapoxvirus als Induktor unspezifischer Abwehrmechanismen

Tierärztl. Umschau 1987, 42: 14 - 21

BÜTTNER, M. (1993)

Review: Principles of paramunization. Option and limits in veterinary medicine

Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis., Vol. 16, No. 1: 1-10

BYRNE, B.A., PRESCOTT, J.F., PALMER, G.H., et al. (2001)

Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted antigens

Infect. Immun. 2001; 69: 650-656

CHAFFIN, M.K., MARTENS, R.J. und MARTENS, J.G. (1991)

Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia

Equine Vet. J.; 21(Suppl.): 23-29

CHAFFIN, M.K., HONNAS, CM, CRABILL, MR. et al. (1995)

Cauda equina syndrome, diskospondylitis, and a paravertebral abscess caused by *Rhodococcus equi* in a foal

J Am Vet Med Assoc 1995; 206: 215-220

CHAFFIN, M.K. und MARTENS, R.J. (1997)

Extra pulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: a retrospective study of 61 cases (1988 – 1996)

Proc. Am. Ass. Eq. Pract. 43, 79-80

CHAFFIN, M.K., COHEN, N.D., MARTENS, R.J., EDWARDS, R.F. und NEVILL, M. (2003A)

Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infection

JAVMA, Vol 223, No. 12, December 15, 2003

CHAFFIN, M.K., COHEN, N.D., MARTENS, R.J. (2003B)

Evaluation of equine breeding farm characteristics as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals

J Am Vet Med Assoc 2003; 222: 467 – 475

CHEN, L., WANG, J., ZGANIACZ, A. und XING, Z. (2004)

Single intranasal mucosal *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis

Infect. Immun.; 72(1): 238-46

CHRISTLEY, R.M. und HODGSON, D.R. (1994)

*Rhodococcus equi* pneumonia in foals and the effect on subsequent racing performance

Austr. Equine Vet.; 12:76-79

CIMPRICH, R.E. und ROONEY, J.R. (1977)

*Corynebacterium equi* enteritis in foals

Vet. Pathol. 14: 95 – 102

COHEN, N.D., CHAFFIN, M.K. und MARTENS, R.J (2000)

Control and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals

Compend. Cont. Educ. Pract. Vet 2000; 22: 1062 - 1070

COHEN, N.D., HOROWITZ, M., TAKAI, S., BECU, T., CHAFFIN, M.K.,  
MAGDESIAN, G., CHU, K. und MARTENS, R.J. (2001)

Evidence that foals with *Rhodococcus equi* pneumonia become infected early in life

AAEP proceedings/ Vol. 47/ 2001

COHEN, N.D., CHAFFIN, M.K. und MARTENS, R.J. (2002)

How to prevent and control pneumonia caused by *Rhodococcus equi* at affected farms

AAEP proceedings, Vol. 48, 2002

COHEN, N.D., CHAFFIN, M.K., VANDENPLAS, M.L., EDWARDS, R.F., et al. (2005)

Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia

Equine Vet J. 2005 May; 37(3):212-6

COLLATOS, C. CLARK, E.S., REEF, V.B. und MORRIS, D.D. (1990)

Septicemia, atrial fibrillation, cardiomegaly, left atrial mass and *Rhodococcus equi* septic osteoarthritis in a foal

J. Am. Vet. Med. Ass. 197: 1039 –42

CORNER, L.A., BUDDLE, B.M., PFEIFFER, D.U. und MORRIS, R.S. (2001)

Aerosol vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) with bacille Calmette-Guerin: the duration of protection

Vet. Microbiol. ; 81 (2):181-91

- CORNER, L.A., BUDDLE, B.M., PFEIFFER, D.U. und MORRIS, R.S. (2002)  
Vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) against *Mycobacterium bovis* infection with bacille Calmette-Guerin: the response to multiple doses  
Vet. Microbiol.; 84 (4): 327-36
- DARRAH, P.A., HONDALUS, M.K., CHEN, Q., ISCHIROPOULUS, H. und MOSSER, D.M. (2000)  
Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages  
Infect Immun. 68: 3587-93
- DEBEY, M.C. und BAILEY, W.E. (1987)  
*Rhodococcus equi* in fecal and environmental samples from Kansas horse farms  
Vet. Microbiol. 14: 251-7
- DEMMERS, S., JOHANNISSON, A., GRONDAHL, G.(2001)  
Neutrophil functions and serum IgG in growing foals  
Equine Vet J ; 33(7):676-80
- DESJARDINS, M.R. und VACHON, A.M. (1990)  
Surgical management of *Rhodococcus equi* metaphysitis in a foal  
J. Am. Vet. Med. Ass. 197, 608 – 612
- DOOLIN, E., WEDLOCK, D.N., BUDDLE, B.M. und SKINNER, M.A. (2002)  
Mucosal immunity in the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*): detection of antibody in serum and at female reproductive sites after intranasal immunization  
Immunol. Cell. Biol. 2002 Aug; 80 (4): 358-63
- ELLENBERGER, M.A., KAEBERLE, M.L. und ROTH, J.A. (1984a)  
Equine cell-mediated immune responses to *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi*  
Am. J. Vet. Res. 45: 2424-2427

- ELLENBERGER, M.A., KAEBERLE, M.L. und ROTH, J.A. (1984b)  
Equine humoral immune responses to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*  
Am. J. Vet. Res. 45: 2428-2430
- ELLENBERGER, M.A. und GENETZKY, R.M. (1986)  
Rhodococcus equi infections: a literature review  
Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 8: 414-423
- ELISSALDE, G.S., RENSCHAW, H.W. und WAHLBERG, J.A. (1980)  
*Corynebacterium equi*: an interhost review with emphasis on the foal  
Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 3: 433-445
- FACHINGER, V., SCHLAPP, T., STRUBE, W., SCHMEER, N. und SAALMÜLLER, A. (2000)  
Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes  
J. of Virology, Vol. 74, No.17: 7943-7951
- FALERO-DIAZ, G., CHALLACOMBE, S., BANERJE, D., DOUCE, G., BOYD, A., IVANYI, J. (2000)  
Intranasal vaccination of mice against infection of *Mycobacterium tuberculosis*  
Vaccine, 81(2): 181-91
- FALCON, J., SMITH, B.P., O'BRIEN, T.R., CARLSON, G.P. und BIBERSTEIN, E. (1985)  
Clinical and radiographical findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals  
J. Am. Vet. Med. Ass. 186: 593- 599
- FLAMINIO, M:J:, RUSH, B.R. und SHUMAN, W. (1998)  
Immunologic function in horses after non-specific immunostimulant administration  
Vet. Immun. Immunopathol. 1998; 63: 303-315



FLAMINIO, M.J., RUSH, B.R. und SHUMAN, W. (1999)

Subpopulationen peripherer Blut-Lymphozyten und Immunglobulin-Konzentrationen bei gesunden und an *Rhodococcus equi*-Pneumonie erkrankten Fohlen

J Vet Int Med 13: 206-212

FÖRSTER, J.F. (1991)

Durchflußzytometrische Untersuchungen bezüglich Virusphagozytose, Phagozytose von Latexpartikeln und Respiratory-Burst-Aktivität von equinen und humanen polymorphkernigen Blutleukozyten nach in vitro Inkubation mit verschiedenen Pockenviruspräparaten

Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München, Diss.

FREESTONE, J.F., HIETALA, S., MOULTON, J. Und VIVRETTE, S (1987)

Acquired immunodeficiency in a seven-year-old horse

J.Am. vet. Med. Ass. 190: 689-691

GARTON, N.J., GILLERON, M., BRANDO, T., DAN, H.H., GIGUÈRE, S., PUZO, G., PRESCOTT, J.F. und SUTCLIFFE, I.C. (2002)

A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production

J. Biol. Chem. 277: 31722-33

GIGUÈRE, S. und LAVOIE, J.P. (1994)

*Rhodococcus equi* vertebral osteomyelitis in 3 Quarter Horse colts

Equine Vet J 1994; 26:79-82

GIGUÈRE, S. und PRESCOTT, J.F. (1997)

Review: Clinical manifestation, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals

Vet. Microbiol. 1997, 56: 313-334

GIGUÈRE, S., WILKIE, B.N. und PRESCOTT, J.F. (1999)

Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*

Infect. Immun., 67: 5041-47

GIESE, J. RIEDEL-CASPARI, G. und SCHMIDT, F.-W. (1991)

Zum Einsatz von Immunmodulatoren beim neugeborenen Kalb –  
Wirksamkeitsprüfung mittels In-vitro Methoden

Tierärztl. Umschau 1991, 46: 336-344

GIGUÈRE, S., HONDALUS, M.K., YAGER, J.A. et al. (1999b)

Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid- encoded virulence-associated protein A  
in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*

Infect. Immun. 1999; 67: 3548-3557

GIGUÈRE, S. (2001)

*Rhodococcus equi* Pneumonia

AAEP Proceedings 2001, Vol. 47:456-467

GIGUÈRE, S., HERNANDEZ, J., GASKIN, J., MILLER, C. und BOWMAN, J.L. (2003)

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. 2003; 222(6): 775-81

GIGUERE, S. und POLKES, A.C. (2005)

Immunologic disorders in neonatal foals

Vet. Clin. Equine, 21: 241-272

GOTOH, K., MITSUYAMA, M., IMAIZUMI, S. et al. (1991)

Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi*  
for mice

Microbiol. Immunol. 1991; 35: 175-185

GUBELMANN, P. (1993)

Das Prinzip der Paramunisierung in der tierärztlichen Praxis: Grundlagen und  
Wirkungsmechanismen – Nutzung und Anwendungsmöglichkeiten von Baypamun  
bei Nutz- und Hobbytieren

Swiss. Vet., 10, Nr.10, 7-10

GUSTAFSSON, A., BAVERUD, V., GUNNARSSON, A., HORN, M., LINDHOLM, A. und FRANKLIN, A. (1997)

The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden  
*Equine Vet. J.*, 29: 314-318

HAGHIGHI, H.R. und PRESCOTT, J.F. (2005)

Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection  
*Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005 Apr 8; 104 (3-4):215-25

HARVEY, J.W., ASQUITH, R.L., MCNULTY, P.K., KIVIPELTO, J. und BAUER, J.E. (1984)

Haematology of foals up to one year of age  
*Equine Vet. J.* 1984; 16: 347-353

HARRINGTON, J.R., GOLDING, M.C., MARTENS, R.J., HALBERT, N.D. und COHEN, N.D. (2005)

Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*  
*Am J Vet Res* 2005 May; 66(5): 755-61

HIETALA, S.K., ARDANS, A.A., und SANSOME, A. (1985)

Detection of *Corynebacterium equi*-specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay  
*Am J Vet Res* 1985, 46: 13-15

HIETALA, S.K. und ARDANS, A.A. (1987a)

Neutrophil phagocytic and serum opsonic response of the foal to *Corynebacterium equi*  
*Vet Immunol Immunopathol* 1987; 14(3):279-94

HIETALA, S.K. und ARDANS, A.A. (1987b)

Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi* –exposed and non exposed foals  
*Vet Microbiol* 1987; 14(3):307-20

HIGUCHI, T., HASHIKURA, S., HAGIWARA, S., GOJO, C., INUI, T., SATOH, S., YOSHIDA, M., ISHIYAMA, T., YAMADA, H. und TAKAI, S. (1997)

Clinical evaluation of the serodiagnostic value of enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* infection in foals

Equine Vet. J., 29: 274-278

HIGUCHI, T., ARAKAWA, T., HASHIKURA, S., et al. (1999)

Effect of administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infections in foals from endemically affected farms

Zentralblatt Veterinärmed. [B] 1999; 46: 641-648

HILLIDGE, C.J. (1986)

Review of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* lung abscesses in foals: pathogenesis, diagnosis and treatment

Vet. Rec., 119: 262-264

HILLIDGE, C.J. (1987)

Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia

Vet. Micro., 14: 337-342

HINES, S.A., STONE, D.M., HINES, M.T., ALPERIN, D.C., KNOWLES, D.P. et al. (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

HIRSH, D.W. und JANG, S.S. (1987)

Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens from horses

Vet. Clin. North Am., 3: 181-190

HOFFMAN, AM., VIEL, L., PRESCOTT, JF., ROSENDAL, S. und THORSEN, J. (1993)

Association of microbiologic flora with clinical, endoscopic, and pulmonary cytologic findings in foals with distal respiratory tract infection

Am J Vet Res.; 54(10): 1615-22

HONDALUS, M.K. und MOSSER, D.M. (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. 1997; 56: 257-268

HOOPER-MCGREVVY, K.E., GIGUERE, S., WILKIE, B.N. und PRESCOTT, J.F. (2001)

Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia

Am. J. Vet. Res., 62: 1307-1313

HOOPER-MCGREVVY, K.E., WILKIE, B.N. und PRESCOTT, J.F. (2003)

Immunoglobulin G sub-isotype response of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins

Clin. Diagn. Lab. Immunol., 10: 345-351

HUGHES, K.L. und SULAIMAN, I. (1987)

The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth

Vet. Microbiol., 14: 241-250

HURLEY, J.R. und A.P. BEGG (1995)

Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals

Aust. Vet. J., 1995, 72: 418-420

JACKS, S., GIGUÈRE, S., GRONWALL, R.R., BROWN, M.P., KELLY, A. und MERRITT (2001)

Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals

Am J Vet Res., 62:1870-75

JANEWAY, C.A. und TRAVERS, P. (1997)

Immunologie

Spektrum Lehrbuch, 2. Auflage

JEFFCOTT, LB. (1974)

Studies on passive immunity in the foal. 1. Gamma-globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and the onset of active immunity

J Comp Pathol 1974; 84 (1): 93-101

JOHNSON, J.A., PRESCOTT, J.F., MARKHAM, R.J. (1983)

The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection of foals following intragastric challenge

Vet. Pathol. 1983; 20: 450-459

KANALY, S.T., HINES, S.A. und PALMER, G.H. (1993)

Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice

Infect. Immun., 61: 4929-32

KANALY, S.T., HINES, S.A. und PALMER, G.H. (1995)

Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia

Infect. Immun., 63: 3037-41

KANALY, S.T., HINES, S.A. und PALMER, G.H. (1996)

Transfer of CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung

Infect. Immun., 64:1126-32

KENNEY, D.G., ROBBINS, S.C., PRESCOTT, J.F., KAUSHIK, A. und BAIRD, J.D. (1994)

Development of reactive arthritis and resistance to erythromycin and rifampicin in a foal during treatment for *Rhodococcus equi* pneumonia.

Equine vet. J., 25: 246- 248

KÖHLER, M. und LEENDERTSE, I. (1996)

Fohlenkrankheiten

Gustav Fischer Verlag Jena, 1996

KYRIAKIS, S.C., TZIKA, E.D., LYRAS, D.N., TSINAS, A.C., SAOULIDIS, K. und SARRIS, K. (1998)

Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets

Res. Vet. Sci., 64:187-190

LASKY, J.A., PULKINGHAM, N., POWERS, M.A. und DURACK, D.T. (1991)

*Rhodococcus equi* causing human pulmonary infection: review of 29 cases

So. med. J. 84: 1217-1220

LAVOIE, J.P., Fiset, I. und LAVERTY, S. (1994)

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

Equine Vet. J., 26: 348-352

LÈGUILLETTE, R., ROY, M.F. und LAVOIE, J-P. (2002)

Foal Pneumonia

In: Equine Respiratory Diseases, P. Lekeux (Ed.)

Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca, N.Y., USA

LYADOVA, I.V., VORDERMEIER, H.M., ERUSLANOV, E.B., et al. (2001)

Intranasal BCG vaccination protects BALB/c mice against virulent *Mycobacterium bovis* and accelerates production of IFN-gamma in their lungs

Clin. Exp. Immunol. 2001 Nov.; 126(2): 274-9

MACKENZIE, CD

Histological development of the thymic and intestinal lymphoid tissue of the horse

J S Afr Vet Assoc 1975; 46 (1):47-55

MADIGAN, JE, HIETALA, S., MULLER, N. (1991)

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

J. Reprod. Fertil. Suppl. 1991; 44: 571-578

MADISON, J.B. und SCARRAT, K.W. (1988)

Immune-mediated polysynovitis in four foals

J. Am. Vet med. Ass. 192: 1581–1584

MAGNUSSON, H. (1923)

Spezifische infektiöse Pneumonie beim Fohlen. Ein neuer Eitererreger beim Pferd

Arch. Wiss. Prakt. Tierheilk., 50: 22-38

MARTENS, R.J., FISKE, R.A. und RENSCHAW, H.W. (1982a)

Experimental subacute foal pneumonia induced by aerosol administration of *Corynebacterium equi*

Equine Vet. J. 1982, 14: 111-116

MARTENS; R.J., RUOFF, W.W. und RENSCHAW, H.W. (1982b)

Foal pneumonia: a practical approach to diagnosis and therapy

Compend. Contin. Educ. Pract. Vet. 1982, 4: 361-373

MARTENS, JG, MARTENS, RJ und RENSCHAW, HW (1988)

*Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: bactericidal capacity of neutrophils from neonatal and adult horses

Am J Vet Res 1988; 49 (3): 295-9



MARTENS, RJ, MARTENS JG, FISKE, R.A. (1989)

Rhodococcus equi pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals

Equine Vet. J. 1989; 21, 249-255

MARTENS, RJ, MARTENS JG, FISKE, R.A. (1991)

Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia

Equine Vet. J. 1991 (Suppl.), 12: 19-22

MARTENS, R.J., COHEN, N.D., CHAFFIN, M.K., TAKAI, S., DOHERTY, C.L., ANGULO, A.B. und EDWARDS, R.F. (2002)

Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals

JAVMA, Vol 221, No. 6, Sept. 15,2002

MAYR, A., HIMMER, B., BALJER, G. und SAILER, J. (1978)

Erregerunspezifische Prophylaxe und Therapie von Pseudomonas-aeruginosa-Wundinfektion mittels Paramunisierung im Mäusemodell

Zentbl. Bakteriол. Hyg. Parasitenkd. Infektionskr. Abt. 1 Orig. Reihe A ;176:506-14

MAYR-BIBRACK, B. (1980)

Paramunisierung bei Neugeborenen

Der praktische Tierarzt 1980; 9: 715-718

MAYR, A., BÜTTNER, M., WOLF, G., MEYER, H. und Czerny, C. (1989)

Experimenteller Nachweis paraspezifischer Wirkungen von gereinigten und inaktivierten Pockenviren

J Vet Med B 1989; 36: 81-99

MAYR, A. und SIEBERT, M. (1990)

Untersuchung über die Wirksamkeit des Paramunitätsinducers PIND-ORF auf den durch Transportstress ausgelösten Kortisolanstieg beim Pferd

Tierärztl. Umschau 45: 677-682

MAYR,A. (1993)

Die paraspezifische Immunabwehr: Möglichkeiten und Grenzen

Tierärztl. Praxis 1993; 21:1-9

MAYR, A., AHNE, W. und VILSMEIER, B. (1997)

Evaluation of in vitro and ex vivo-in-vitro experiments on the efficacy of inducers of nonspecific immunity prepared from poxviruses

Tierärztl. Umschau, 52, 3-11

MEIJER, W.G. und PRESCOTT, J.F. (2004)

*Rhodococcus equi*

Vet. Res., 35 : 383.396

MEYER-HAMME, B. (2004)

*Rhodococcus equi* und *Streptococcus equi subsp. Zooepidemicus* aus Nasentupfern und Tracheobronchialsekret von lungenkranken Fohlen

Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Diss.

MIESSNER, H. und WETZEL, R. (1923)

*Corynebacterium pyogenes (equi)* als Erreger einer infektiösen abszedierenden Pneumonie der Fohlen

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 31: 449 – 454

MULLER, N.S. und MADIGAN, J.E. (1992)

Methodes of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia

Proc. Am. Ass. Equine Pract. 1992, 38: 193-201

OIKAWA, M., KAMADA, M., YOSHIKAWA, Y. und YOSHIKAWA, T. (1994)

Pathology of equine pneumonia associated with transport and isolation of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*

J Comp Path 1994; Vol. 111: 205-212

PAUL, M. (2005)

Verlauf des *Rhodococcus equi*-Antikörpertiters beim Fohlen: Vergleich von Fohlen mit und ohne Anti-*Rhodococcus equi*-Hyperimmunserumgabe  
Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover, Diss.

PERRYMAN, LE, MCGUIRE, TC, TORBECK, RL (1980)

Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus  
Am J Vet Res 1980; 41 (8):1197-200

PILTZ, K. (2004)

Vergleichende Behandlung von *Rhodococcus equi*-Pneumonien bei Fohlen mit Azithromycin und Rifampicin in Kombination mit Erythromycin bzw. Trimethoprim/Sulfadiazin  
Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Diss.

PRESCOTT, J.F., MARKHAM, R.J., JOHNSON, J.A. (1979)

Cellular and humoral immune responses of foals to vaccination with *Corynebacterium equi*  
Can J Comp Med 1979; 43(4): 356-64

PRESCOTT, J.F. und NICHOLSON, V.M. (1984)

The effects of combinations of selected antibiotics on the growth of *Corynebacterium equi*  
J Vet Pharmacol Ther 1984; 7: 61-4

PRESCOTT, J.F. und SWEENEY, C.R. (1985)

Treatment of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals: a review  
J. Am .Vet. med. Ass. 187: 725-28

PRESCOTT, J.F. (1987)

Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses  
Vet. Microbiol., 14 : 211-14

PRESCOTT, J.F. , HOFFMAN; A.M. (1993)

*Rhodococcus equi*

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

PRESCOTT, J.F., FERNANDEZ, A.S., NICHOLSON, V.M. et al.

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

Equine Vet. J. 1996; 28: 344-349

RAHMAN, M., HERRON, L.L., KAPUR, V., MEIJER, W:G:, BYRNE, B.A., REN, J., NICHOLSON, V.M. und PRESCOTT, J.F. (2003)

Overview of a partial genome sequence of *Rhodococcus equi* ATCC33701

Vet. Microbiol., 94: 143-158

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

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

Vet. Radiology & Ultrasound, Vol. 45(2): 172-176

REEF, V.B. (1998)

Equine diagnostic ultrasound

W. B. Saunders, Philadelphia

REUBEL, G. (1984)

Gewinnung von Mediatoren aus Zellkulturen zur Stimulierung der unspezifischen Infektabwehr (Paramunisierung)

Vet. Med. Diss., München

RUSH, B.R. (2001)

Clinical use of immunomodulatory agents

Equine Vet. Educ. (2001) 13(1): 45-53

SANADA, Y., NODA, H. und NAGAHATA, H. (1992)

Serological survey of *Rhodococcus equi* infection in horses in Hokkaido

J Vet Med Sci 1992, 54: 649-52

SCHULTE, S. (2005)

Wirksamkeit von Hyperimmunserum zur Prophylaxe der *Rhodococcus equi* – Pneumonie beim Fohlen

Hannover, Stiftung Tierärztliche Hochschule, Diss. 2005

SELLON, DC., WALKER, K., SUYEMOTO M. et al. (1997)

Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids

Am. J. Vet. Res. 1997; 58: 1232 -1237

SHEORAN, A.S., TIMONEY, J.F. und HOLMES, MA.

Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses

J Am Vet Res 2000;61 (9):1099-105

SIEBERT, M. (1988)

Untersuchungen über den Einfluss des paraspezifischen Immunstimulanz „PIND-ORF“ (Paramunitätsinducer) auf den durch Transportstress ausgelösten Kortisolanstieg beim Voll- und Warmblut

Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München, Diss.

SIPPEL, W.L., KEAHEY, E.E. und BULLARD, T.L. (1968)

*Corynebacterium* infection in foals: etiology, pathogenesis and laboratory diagnosis

J. Am. Vet. Med. Assoc. 1968, 153: 1610-13

SMITH, J.E. (1966)

*Corynebacterium* species as animal pathogens

J. Appl. Bacteriol. 29, 119-130

SMITH, B.P. und ROBINSON, R.C. (1981)

Studies of an outbreak of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals

Equine vet. J. 13, 223-228

STRUBE, W., KRETDORN, D. , GRUNMACH, J. , BERGLE, R.-D., THEIN, P.  
(1989)

Wirksamkeit des Paramunitätsinducers Baypamun® (PIND-ORF) zur Prophylaxe und  
Metaphylaxe einer experimentellen Infektion mit Virus der Infektiösen Bovinen  
Rhinotracheitis beim Rind

Tierärztl. Praxis 17: 267-272

SWEENEY, C.R., SWEENEY, R.W., und DIVERS, T.J. (1987)

*Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy

Vet. Micro. 14. 329 – 336

TAKAI, S., KAWAZU, S und TSUBAKI, S. (1985)

Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of (*Corynebacterium*)  
*Rhodococcus equi* infection in foals

Am.J. Vet. Res. 46, 2166-2170

TAKAI, S., NARITA, K., ANDO, K. und TSUBAKI, S. (1986A)

Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in soil on a horse-breeding farm

Vet. Microbiol., 12, 169-177

TAKAI, S., OHKURA, H. und WATANABE, Y. (1986B)

Quantitative aspects of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals

J. Clin. Microbiol., 1986, 23: 794-6

TAKAI, S., FUJIMORI, T., KATSUZAKI, K. et al. (1987)

Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding  
farms

Vet. Microbiol. 1987; 14:233-239

TAKAI, S., SEKIZAKI, T., OZAWA, T. et al. (1991)

Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*

Infect. Immun. 1991; 59: 4056-60

TAKAI, S., OHBUSHI, S., KOIKE, K. et al. (1991)

Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections

J Clin Microbiol 1991; 29: 2887-9

TAKAI, S., WATANABE, Y., IKEDA, T. et al. (1993)

Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*

J Clin Microbiol 1993; 31: 1726-29

TAKAI, S., SASAKI, Y. Und TSUBAKI, S. (1995)

*Rhodococcus equi* infection in foal. Current concepts and implication for future research

J. Equine Sci., 6:105-.119

TAKAI, S., VIGO, G., IKUSHIMA, H., HIGUCHI, T., HAGIWARA, S.T., SASAKI, Y. Et al. (1998)

Detection of virulent *Rhodococcus equi* in tracheal aspirate samples by polymerase chain reaction for rapid diagnosis of *Rhodococcus equi*-pneumonia in foals

Vet. Microbiol., 61: 59-69

TAOUJI, S., NOMURA, I., GIGUÈRE, S., TOMOMITSU, S., KAKUDA, T., GANNE, V. und TAKAI, S. (2004)

Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*

Vaccine, 22(9-10): 1114-23

TIMONEY, J.F. (2004)

The pathogenic equine streptococci

Vet. Res. 35: 397-409

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

*Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization

J Clin Microbiol 1991; 29: 2696-2700

TIZARD, I. (1993)

Treatment of respiratory disease by means of immunomodulators

In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> Vet. Resp. Symposium,

Comparative Respiratory Society, Pennsylvania

TOYOOKA, K., TAKAI, S. und KIRIKAE, T. (2005)

*Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome

J Med Microbiol. 2005 Nov; 54(11): 1007-15

TREE, JA, WILLIAMS, A., CLARK, S., HALL, G., MARSH, PD. und IVANYI, J. (2004)

Intranasal bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine dosage needs balancing between protection and lung pathology

Clin. Exp. Immunol. 2004; 138 (3): 405-9

VALDES, A. und JOHNSON, J.R. (2005)

Septic pleuritis and abdominal abscess formation caused by *Rhodococcus equi* in a foal

J Am Vet Med Assoc. 2005 Sep 15; 227(6):960-3

WALL, D.M., DUFFY, P.S., DUPONT, C., PRESCOTT, J.F. und MEIJER, W.G. (2005)

Isocitrate lyase activity is required for virulence of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*

Infect. Immun. 2005 Oct.; 73(10): 6736-41

WELSH, RD. (1984)

The significance of *Streptococcus zooepidemicus* in the horse

Equine Pract. 1984; 6: 6-16



WILSON, M.M. (1955)

A study of *Corynebacterium equi* infection in a study of Thoroughbred horses in Victoria

Aust. Vet. J. 31, 175 – 181

WOOLCOCK, J.B., FARMER, A.T. und MUTIMER, M.D. (1979)

Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation

J. Clin. Microbiol. 9, 640-642

YAGER, J.A. (1987)

The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals

Vet. Micro. 14, 225-232

YOSHIKAWA, H., YASU, T., UEKI, H., OYAMADA, T. et al. (2003)

Pneumonia in horses induced by intrapulmonary inoculation of *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*

J. Vet. Med. Sci. (2003); 65(7): 787-92

ZIEBELL, K.-L., STEINMANN, H., KRETZDORN, D., SCHLAPP, T., FAILING, K. und SCHMEER, N. (1997)

The use of Baypamun N in crowding associated infectious disease: Efficacy of Baypamun N (freeze dried product) in 4-10 month old horses

J Vet Med B 44, 529-36

ZINK, M.C., YAGER, J.A., PRESCOTT, J.F. und WILKIE, B.N. (1985)

In vitro phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveolar macrophages of foals

Am. J. Vet. Res., 46, 2171 2174

ZINK, M.C., YAGER, J.A. und SMART, N.L. (1986)

*Corynebacterium equi* infections in horses. 1958-1984: A review of 131 cases

Can. J. Vet. Res. 1986; 27: 213-17

## 9 Anhang

### 9.1 Untersuchungsergebnisse

#### Erläuterungen zu den folgenden Tabellen 20-21:

Gruppe A: Fohlengruppe, die Zylexis® subkutan erhielt

Gruppe B: Fohlengruppe, die Zylexis® intranasal erhielt

Gruppe C: Fohlen der Kontrollgruppe

abgeheilt nach x Tagen: gibt die Tage zwischen Diagnose eines Lungenabszesses und der spontanen Abheilung an

Behandlungsgrund: nur angegeben, wenn abweichend (d.h. nicht aufgrund von Lungenabszessen behandelt)

nur Stall: bezeichnet die Fohlen, die während der Studie im Laufstall mit Paddock, aber ohne Weidegang gehalten wurden

Kleingruppe: Fohlen mit Mutterstuten, die während der Studie separat auf einer kleinen Weide gehalten wurden

Monate in Studie: Studiendauer bis Ende fünfter Lebensmonat, einige Fohlen schieden früher aus

Bei Fohlen, die erst später behandelt wurden, sind in der ersten Zeile die Befunde zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und in der zweiten Zeile die Befunde bei Therapiebeginn angegeben.

Tab. 12. Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 1 bis 15: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe A	lfd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten- anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs- alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs- dauer (Wochen)	Behandlungs- grund	Rezidiv	Nabel- entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
kranke Fohlen	1	w	6	11100	1	1	156				x		6							5
			7	11400	1	1	158					2								
	2	m	2	10200	1	2	69	x	20								ja			5
	3	w	2	14600	1	1	67	x	3											5
	4	m	0	17100	1	2,5	67				x		6							5
			3	18500	1	2,5	68					1								
	5	m	2	12300	2	2	108				x		6							5
			2	15900	4	6	111					3								
	6	m	5	14900	2	3,5	97				x		6				ja			5
	7	w	2	8300	1	2	106	x	10											5
	8	w	1	12300	1	1	69	x	7								ja			5
			4	14500	4	6	146				x		6		x					
	9	m	1	13300	2	2,5	97	x	8											5
	10	w	3	21800	1	2	106				x		6				ja			5
	11	m	6	18600	1	1	117				x		6			ja				5
12	m	0	17800	6	14,5	79				x		6							5	
13	w	0	7000	1	1,5	89	x	8									ja		5	
14	m	1	17200	3	5	85				x		6							5	
15	m	2	12600	1	2	51	x	4								ja			5	

Tab. 13. Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 16 bis 30: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe A	Ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abzess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs - alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs- dauer (Wochen)	Behandlungs- grund	Rezidiv	Nabel- entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
kranke Fohlen	16	m	1	13700	1	2	54				x		6							5
			0	12800	3	8	62					8								
	17	w	0	13400	2	2	65				x		6							5
			0	19700	1	2	79						14							
			1	16900	1	1,5	150	x	16						x					
	18	w	0	14900	1	3,5	78				x		6			ja				5
			2	18300	1	2,5	92						14							
	19	w	2	12900	1	1	119				x		6							5
			3	15000	2	5	147						28							
	20	w	0	16800	1	1	63				x		6							5
			2	21700	1	1	66						3	8						
	21	m	2	12100	1	1	64	x	3											5
	22	m	1	11700	1	2	60	x	20											5
	23	w	6	15300	1	1	55				x		6							5
			7	14100	2	4,5	58						3							
24	w	1	12100	1	1	71	x	25											5	
25	m	2	25900	7	14	71				x		8							5	
Gesund	26	w																ja	5	
	27	w																	5	
	28	w																	5	
	29	w																	5	
	30	m																	5	

Tab. 14. Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 31 bis 45: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe A	ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten- anzahl	Abzess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs- alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs- dauer (Wochen)	Behandlungs- grund	Rezidiv	Nabel- entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
gesunde Fohlen	31	w																		5
	32	m																		5
	33	w																		5
	34	m																		5
	35	w															ja			5
	36	m																		5
	37	w																		5
	38	m																		5
	39	w														ja				5
	40	m														ja				5
	41	w																		5
	42	m																		5
	43	m																		5
	44	w													ja					2
	45	m														ja				2

Tab. 15. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 46 bis 60: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe B	Ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs-alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs-dauer (Wochen)	Behandlungs-grund	Rezidiv	Nabel-entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
kranke Fohlen	46	m	2	17200	2	4	116				x		6			ja	ja			5
			2	13500	8	9						4								
	47	m	2	14400	0	0	85				x		5	Fieber						5
	48	m	2	4900	1	1,5	39	x	56				6			ja				5
	49	w	2	19200	2	5	89				x		6							5
	50	m	2	11400	1	1,5	109				x		6							5
				3	18100	1	1						7							
	51	m	1	15200	2	2,5	78	x	16		x									5
				3	13100	0	0	118					40	4	Husten					
	52	m	1	10900	1	1	106	x	30				6							5
	53	w	0	15000	1	2,5	64	x	40				6							5
	54	w	1	5800	1	1	46	x	5				6							5
	55	w	2	19600	1	3	65				x		6					ja		5
	56	w	2	13800	4	5	103	x	14 (TMS)				6					ja		5
	57	w	2	11600	1	1,5	43				x		8							5
				4	19800	0	0						42		Husten					
	58	w	0	13300	1	1	71				x		6							5
				2	12300	1	4						12							
	59	m	1	15500	3	4	82				x		6			ja				5
				2	16300	5	6,5						5							
60	m	3	14300	5	8,5	135				x		6							5	

Tab. 16. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 61 bis 74: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe B	Ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs-alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs-dauer (Wochen)	Behandlungs-grund	Rezidiv	Nabel-entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
kranke Fohlen	61	m	4	19800	1	1				x		6								5
	62	m	0	16100	0	0	81			x		3	Fieber							5
	63	m	5	12500	0	0	153			x		3	Lunge							5
	64	w	2	15800	1	1	77				x	6								5
			1	20600	2	2,5						6								
	65	m	1	13800	2	3	60	x	6			6								5
	66	m	2	14300	2	3	74				x	6								5
			1	20200	2	3						5								
	67	m	1	8600	1	2	90	x	22			6								5
68	w	0	17400	2	2,5	61	x	32			6								5	
gesunde Fohlen	69	m																		5
	70	m																		5
	71	m																		5
	72	m																		5
	73	m																		5
	74	m													ja					5

Tab. 17. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 75 bis 90: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe B	Ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs - alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs- dauer (Wochen)	Behandlungs- grund	Rezidiv	Nabel- entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
gesunde Fohlen	75	m																		5
	76	w																		5
	77	w																		5
	78	m																		5
	79	m														ja				5
	80	w																		5
	81	m															ja			5
	82	w																		5
	83	w													ja					5
	84	m																ja		5
	85	w																		5
	86	m													ja			ja		5
	87	m																		5
	88	m																		5
	89	m														ja				5
	90	w																		1



Tab. 18. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 91 bis 106: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe C	lfd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs-alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs-dauer (Wochen)	Behandlungs-grund	Rezidiv	Nabel-entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								Keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
kranke Fohlen	91	w	1	8800	1	1	44	x	4				6							5
	92	m	5	17100	2	4	122			x			6				ja			5
	93	w	2	20300	1	1	123			x			6							5
	94	w	1	15800	1	2	66				x									5
				5	9500	0	0						55	4	Husten					
	95	w	5	17600	1	1	122			x			6	Fieber						5
	96	m	0	12900	1	2	67	x	4				6				ja			5
	97	m	1	12300	1	1	64				x						ja			5
				2	21000	1	1						22	6						
	98	w	1	14100	1	1,5	120	x	16 (TMS)				6							5
	99	w	2	21000	1	1,5	84			x			6			ja	ja			5
	100	m	2	6500	2	2	84	x	22				6					ja		5
	101	m	2	14700	2	2,5	66				x									5
				1	18000	3	5,5						4	6						
	102	m	0	13100	1	1	81	x	4				6							5
	103	w	2	14800	4	6	149			x			6							5
	104	w	2	11400	2	3	135	x	7				6							5
105	m	1	10400	1	1,5	78	x	9				6				ja			5	
106	w	0	15400	1	1	62	x	10				6							5	

ANHANG

Tab. 19. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 107 bis 120: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe C	Ifd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs - alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs- dauer (Wochen)	Behandlungs- grund	Rezidiv	Nabel- entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie	
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie									
kranke Fohlen	107	m	2	11200	1	2	76	x	5				6							5	
	108	m	1	16500	1	2	76	x	4				6							5	
	109	w	3	19100	1	1	100			x			6							5	
	110	w	2	7800	1	1	71	x	13				6				ja			5	
	111	w	1	16000	2	2	34				x						ja			5	
			2	19900	1	2					x			6							
	112	m	0	14600	0	0	70				x				Fieber		ja				2
gesunde Fohlen	113	w																		5	
	114	m																		5	
	115	w																		5	
	116	m																		5	
	117	m																		5	
	118	w																		5	
	119	m																		5	
	120	m																		5	

ANHANG

Tab. 20. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 121 bis 134: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung

Gruppe C	lfd. Nr.	Geschlecht	Klin. Score	Leukozyten-anzahl	Abszess-Anz.	Abszess-Score	Erkrankungs-alter (Tage)	Behandlung					Behandlungs-dauer (Wochen)	Behandlungs-grund	Rezidiv	Nabel-entzündung	Antibiot. wg. Fehlstellung	nur Stall	Kleingruppe	Monate in Studie
								keine	abgeheilt nach x Tagen	sofort	später	Tage zw. Diagnose u. Therapie								
gesunde Fohlen	121	m																ja		5
	122	m																		5
	123	w																		4
	124	m													ja					5
	125	m																		5
	126	w																		5
	127	w																		5
	128	w																ja		5
	129	m																		5
	130	w																		5
	131	w																		5
	132	w																		5
	133	m																		5
	134	w																		5

**Tab. 21. Erregernachweis aus TBS in Gruppe A (Zylexis® s.c.), B (Zylexis® i.n.)  
und der Kontrollgruppe C**

<b>Gruppe</b>	<b>lfd. Nr.</b>	<b>geb. am</b>	<b>Geschlecht</b>	<b><i>R. equi</i></b>	<b><i>S. zooepidemicus</i></b>
<b>A</b>	<b>2</b>	13.04.2005	m	x	x
<b>A</b>	<b>4</b>	16.04.2005	m	x	x
<b>A</b>	<b>15</b>	29.04.2005	m	x	x
<b>A</b>	<b>16</b>	29.04.2005	m	x	-
<b>A</b>	<b>18</b>	02.05.2005	w	x	x
<b>A</b>	<b>24</b>	11.05.2005	w	x	x
<b>B</b>	<b>48</b>	14.04.2005	m	-	x
<b>B</b>	<b>53</b>	20.04.2005	w	x	x
<b>B</b>	<b>54</b>	23.04.2005	w	x	-
<b>B</b>	<b>57</b>	26.04.2005	w	-	x
<b>B</b>	<b>59</b>	29.04.2005	m	x	x
<b>B</b>	<b>64</b>	04.05.2005	w	x	x
<b>B</b>	<b>66</b>	07.05.2005	m	x	x
<b>C</b>	<b>91</b>	09.04.2005	w	-	x
<b>C</b>	<b>96</b>	17.04.2005	m	-	x
<b>C</b>	<b>97</b>	19.04.2005	m	x	x
<b>C</b>	<b>100</b>	25.04.2005	m	-	x
<b>C</b>	<b>102</b>	30.04.2005	m	x	x
<b>C</b>	<b>105</b>	03.05.2005	m	x	x
<b>C</b>	<b>107</b>	05.05.2005	m	x	x
<b>C</b>	<b>108</b>	06.05.2005	m	x	-
<b>C</b>	<b>110</b>	10.05.2005	w	x	-
<b>C</b>	<b>111</b>	10.05.2005	w	-	x

*R. equi* = *Rhodococcus equi*

*S. zooepidemicus* = *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

x = nachgewiesen

**9.2 Befundbögen**

**Tab. 22. Befundbogen für ein Fohlen für die Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchungen**

Stutennummer:

Wochen	Datum	Lunge			Trachea		Nasenausfluss					Lnn.		Husten		Nabel	Leukos	Sonographie		Therapie
		obB	verschärft	Rasseln/ Giemen	obB	rasseln	ohne	serös	mukös	purulent	obB	vergrößert	spontan	auslösbar	links			rechts		
1																				
2																				
3																				
4																				
5																				
6																				
7																				
8																				
9																				
10																				
11																				
12																				
13																				
14																				
15																				

## Ultraschalluntersuchung der Lunge

Stutennummer, Stall	Datum	Gruppe	Untersuchung Nr.:
---------------------	-------	--------	-------------------

	12.	11.	10.	9.	8.	7.	6.	5.	4.
A									
B									
C									
	rechts								
	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
A									
B									
C									
	links								
	behandelt ab .....				mit .....				
	Nachkontrolle am: .....				Untersucher: .....				
	Sonstiges:				Gerät: .....				

**Abb. 7.** Befundbogen für die sonographische Untersuchung der Lunge

### 9.3 *Abbildungsverzeichnis*

<b>Abb. 1.</b>	Applikationszeitpunkte von Zylexis® bei den Fohlen der Gruppen A und B .....	44
<b>Abb. 2.</b>	Ultrasonographisch detektierte Abszesse aller kranken Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen A und B sowie der Kontrollgruppe C.....	59
<b>Abb. 3.</b>	Abszess-Score (in mm) bei allen kranken Fohlen in den Gruppen A (Zylexis® s.c.), B (Zylexis® i.n.) und C (Kontrolle) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung .....	61
<b>Abb. 4.</b>	Vergleich der Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe hinsichtlich des Anteils nicht erkrankter Tiere in Abhängigkeit vom Alter der Fohlen.....	63
<b>Abb. 5.</b>	Erkrankungsalter der Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe.....	64
<b>Abb. 6.</b>	Dauer bis zur spontanen Abheilung von Lungenabszessen in den drei Fohlen-Gruppen (in Tagen).....	69
<b>Abb. 7.</b>	Befundbogen für die sonographische Untersuchung der Lunge .....	124

## 9.4 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.	Klinischer Score zur Beurteilung des Schweregrades einer Lungenerkrankung (nach OHNESORGE et.al., 1998).....	46
Tab. 2.	Irrtumswahrscheinlichkeit (p-Wert) zur Darstellung der Signifikanz .....	52
Tab. 3.	Gesunde und erkrankte Fohlen der Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe .....	55
Tab. 4.	Klinischer Score der erkrankten Fohlen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den beiden Zylexis®-Gruppen und der Kontrollgruppe .....	57
Tab. 5.	Anzahl der Fohlen mit einem Leukozytenwert im Blut über $13 \times 10^9/l$ .....	58
Tab. 6.	Mittelwert der klinischen Scores und der Blutleukozytenanzahl der Fohlen mit Lungenabszessen den Zylexis®-Gruppen und der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Diagnosestellung .....	58
Tab. 7.	Anzahl an detektierten Lungenabszessen und Abszess-Score der drei Fohlengruppen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (Mittelwert und Standardabweichung).....	60
Tab. 8.	Erregernachweis aus Tracheobronchialsekretsekret der erkrankten Fohlen in den Gruppen A, B und C.....	62
Tab. 9.	Zeitpunkt der Behandlung der Fohlen mit detektierten Lungenabszessen bei den mit Zylexis® geimpften Fohlen und der Kontrollgruppe .....	66
Tab. 10.	Dauer zwischen Diagnose und Behandlung sowie Alter der Fohlen mit detektierten Lungenabszessen bei Therapiebeginn in den beiden Zylexis®-Impfgruppen und der Kontrollgruppe .....	67
Tab. 11.	Anzahl der Fohlen ohne Behandlung und gruppenbezogene Mittelwerte (mit Standardabweichung) der Zeit bis zur spontanen Genesung .....	69
Tab. 12.	Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 1 bis 15: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	113
Tab. 13.	Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 16 bis 30: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	114
Tab. 14.	Gruppe A (Zylexis® s.c.) Fohlen Nr. 31 bis 45: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	115



Tab. 15. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 46 bis 60: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	116
Tab. 16. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 61 bis 74: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	117
Tab. 17. Gruppe B (Zylexis® i.n.) Fohlen Nr. 75 bis 90: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	118
Tab. 18. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 91 bis 106: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	119
Tab. 19. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 107 bis 120: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	120
Tab. 20. Gruppe C (Kontrolle) Fohlen Nr. 121 bis 134: Erhobene Daten zu klinischer Untersuchung, Sonographie, Erkrankungsalter, zur Behandlung, entzündlicher Erkrankung, Antibiotikagabe und Haltung .....	121
Tab. 21. Erregernachweis aus TBS in Gruppe A (Zylexis® s.c.), B (Zylexis® i.n.) und der Kontrollgruppe C.....	122
Tab. 22. Befundbogen für ein Fohlen für die Ergebnisse der klinischen und sonographischen Untersuchungen .....	123

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Klug möchte ich danken für die freundliche Überlassung dieses Dissertationsthemas.

Frau PhD Monica Venner danke ich für ihre permanente Erreichbarkeit, ihr Engagement und dafür, dass dann doch irgendwie alles geklappt hat.

Der Firma Pfizer gilt mein Dank für die Unterstützung und die großzügige Bereitstellung von Zylexis®.

Den Mitarbeitern des Gestütes Lewitz danke ich herzlich für ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung der Arbeit, die oft blaue Flecken bei allen Beteiligten verursachte...

Herrn F. Pieper danke ich für sein großes Engagement für „seine“ Doktoranden.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen meinen Mitdoktorand(t)en (Inke Gravert, Axel Hullmann, Nina Höhensteiger, Birte Reinhold, Eric Rothaar, Saskia (Puppi) Walther und Bianca Weimar).

Ich danke dem Ultrasonographiegerät und seinen Akkus für ihr Durchhaltevermögen.

Ein Riesen-Dankeschön gilt Ralf für seine uneingeschränkte Unterstützung, die Motivation bei moralischen Tiefs und die ständige Verbreitung von positiver Energie. Ohne Dich hätte ich es vielleicht nicht geschafft.

Ganz besonders herzlich möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Dissertation erst ermöglicht haben. Dankeschön auch dem Rest der Familie, dass ihr immer an mich geglaubt habt.