

University of Groningen

Studies on a new candidate vaccine for *Rhodococcus equi* infections in foals

Jacobs, Anton A. C.; Grommen, Ries; Hessels, Gerda; Dijkhuizen, Lubbert; van der Geize, Robert

Published in:
Tieraerztliche umschau

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Publication date:
2012

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Jacobs, A. A. C., Grommen, R., Hessels, G., Dijkhuizen, L., & van der Geize, R. (2012). Studies on a new candidate vaccine for *Rhodococcus equi* infections in foals. *Tieraerztliche umschau*, 67(10), 394-400.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/286710307>

Studies on a new candidate vaccine for *Rhodococcus equi* infections in foals

Article in *Tierärztliche Umschau* · October 2012

CITATIONS

0

READS

22

5 authors, including:



[Lubbert Dijkhuizen](#)

University of Groningen

533 PUBLICATIONS **15,415** CITATIONS

[SEE PROFILE](#)

Some of the authors of this publication are also working on these related projects:



Stevia [View project](#)



Carbohydrate processing enzymes from GH13, GH28, GH57, GH68 - structure-function relationships [View project](#)

Von ¹MSD Animal Health, Intervet International bv, Microbiological R&D, Boxmeer
und dem ²Groningen Biomolecular Sciences and Biotechnology Institute (GBB), Department of Microbiology, Universität
Groningen, Niederlande

Studie über einen neuen potenziellen Impfstoff gegen *Rhodococcus equi*-Infektionen bei Fohlen

von Anton A. C. Jacobs¹, Ries Grommen¹, Gerda Hessels², Lubbert Dijkhuizen² und Robert van der Geize²

(5 Abbildungen, 2 Tabellen, 22 Literaturangaben)

Kurztitel: Impfstoff gegen *Rhodococcus equi* Infektionen bei Fohlen

Stichworte: *Rhodococcus equi* – attenuiert – Impfstoff – Makrophage – Cholesterinkatabolismus – Fohlen

Zusammenfassung

Rhodococcus (R.) equi ist ein fakultativ-intrazelluläres pathogenes Bakterium, das schwere pyogranulomatöse Pneumonien bei Fohlen bis fünf Monate verursacht. Trotz des großen Bedürfnisses nach prophylaktischen Maßnahmen gegen diese schwere Lungenentzündung ist kein kommerzieller Impfstoff verfügbar. Heutzutage kann die Krankheit nur mittels einer langwierigen Behandlung mit Antibiotika therapiert werden. In früheren Veröffentlichungen haben wir berichtet, dass Gene, die am Cholesterinkatabolismus beteiligt sind, vielversprechende Ziele für einen abgeschwächten Lebendimpfstoff gegen Infektionen mit *R. equi* sind. Die Vermehrung des *R. equi*-Stamms RG2837, ein Δ ipdABipdAB2 Doppel-Gendeletionsmutant, wurde auf der Zwischenstufe 5-hydroxy-methylhexahydro-indanon-Propionat des Cholesterinkatabolismus beeinträchtigt. Zudem überlebte der genetisch veränderte

Stamm RG2837 weniger gut in Makrophagen und konnte Fohlen in einer Dosis, in der der Elternstamm des Wildtyps eine Lungenentzündung auslöste, gefahrlos intratracheal verabreicht werden (Van der Geize et al., 2011). Anschließend wurde der Stamm RG2837 weiter auf die Sicherheit und Wirksamkeit bei Fohlen getestet. Fohlen im Alter von einer Woche, die ein- oder zweimal oral geimpft und drei Wochen später einer intratrachealen Belastung ausgesetzt wurden, zeigten einen lückenhaften Impfschutz gegen die intratracheale Belastung mit dem virulenten *R. equi*. Eine eindeutige indirekte Korrelation zwischen dem Impfschutz und dem VapA Serum Antikörper-Titer $\geq 5,0 \log_2$ wurde jedoch nach der Impfung festgestellt. Dies erleichterte die darauffolgenden Versuche zur Optimierung des Impfplanes und des Verabreichungswegs und der Impfstoffzusammensetzung. Es wurde herausge-

funden, dass die rektale Impfung von fünf Monate alten Fohlen (im Gegensatz zur oralen Impfung) für einen höheren und konsistenteren Impfschutz (d. h. VapA Serum Antikörper-Titer $\geq 5,0 \log_2$) in einem kürzeren Zeitraum sorgte. Deshalb wurde dieser Ansatz auch bei Tieren im Zielalter getestet. Eine Woche alte Fohlen, die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen rektal geimpft wurden ($\geq 10^9$ KbE je Impfdosis) waren statistisch signifikant geschützt gegen eine intratracheale Belastung drei Wochen später. Nach der Verabreichung von 2×10^{10} KbE auf oralem Weg oder 1×10^{12} KbE auf rektalem Weg bei eine Woche alten Fohlen wurden keine impfbezogenen unerwünschten Nebenwirkungen festgestellt. Daraus lässt sich ableiten, dass der Impfstoff sicher ist. Diese vielversprechenden Ergebnisse eines potenziellen Impfstoffs gegen *R. equi* rechtfertigen weitere Studien unter Feldbedingungen.

Abstract

Studies on a new candidate vaccine for *Rhodococcus equi* infections in foals

Key words: *Rhodococcus equi* – attenuated – vaccine – macrophage – cholesterol catabolism – foal

Rhodococcus (R.) equi is a facultative intracellular pathogen that causes severe pyogranulomatous pneumonia in foals up to 5 months of age. Despite the great need for a prophylactic measure against this devastating disease, no commercial vaccine is available. Today only long-term and cumbersome antibiotic treatment is available to treat the

disease. Previously we reported that genes involved in cholesterol catabolism are promising targets for the development of a live-attenuated vaccine against *R. equi* infections. *R. equi* strain RG2837, a Δ ipdABipdAB2 double gene deletion mutant was impaired in growth on the cholesterol catabolic pathway intermediate 5-hydroxy-methylhexahydro-indanone-propionate. In addition, mutant strain RG2837 appeared hampered for macrophage survival and could be safely administered intra-tracheally to foals at a dose at which the parent wild type strain induced pneumonia (Van

der Geize et al., 2011). Subsequently, strain RG2837 was further tested for safety and efficacy in foals. One-week-old foals, vaccinated once or twice orally and challenged intra-tracheally 3 weeks later, appeared inconsistently protected against intra-tracheal challenge with virulent *R. equi*. However, a clear indirect correlation between protection and post-vaccination VapA serum antibody titres $\geq 5.0 \log_2$ was found which facilitated subsequent experiments, to optimize the vaccination schedule, vaccination route and vaccine composition. It was found that rectal vaccination of 5-month-old foals (in

contrast to oral vaccination) induced higher and more consistent protective responses (i.e. VapA serum antibody titres $\geq 5.0 \log_2$) in a shorter period of time. Therefore this approach was also tested in target-age animals. One-week-old foals vaccinated rectally on two consecutive days ($\geq 10^9$ CFU per dose) were significantly protected against intra-tracheal challenge 3 weeks later. After administration of 2×10^{10} CFU by the oral route or 1×10^{12} CFU by the rectal route to one-week-old foals, no vaccine related abnormalities were observed, indicating that the vaccine is safe. These promising results on a candidate vaccine against *R. equi* warrant further studies under field conditions.

1 Einleitung

Rhodococcus (R.) equi gehört zu den Nocardien (stäbchenförmige, grampositive Bakterien), die ubiquitär im Erdboden vorkommen, insbesondere auf Weiden und Paddocks. Es handelt sich um ein fakultativ-intrazelluläres Pathogen, das eine lebensbedrohliche pyogranulomatöse Bronchopneumonie bei jungen Fohlen bis zum Alter von fünf Monaten auslöst (Meijer und Prescott, 2004; Giguère et al., 2011). Neben der Pneumonie kann *R. equi* auch andere extrapulmonale Krankheiten wie Enteritis, Lymphadenitis und Serositis auslösen (Giguère et al., 2011). Obwohl seltener, kann *R. equi* auch nicht-equine Arten befallen, wie Schweine, Rinder, Schafe, Ziegen, Katzen und Hunde, wobei in diesen Tierarten meistens andere Stämme pathogen sind. Beim Menschen kann das Bakterium, allerdings equinen fremde Stämme, kavitäre Pneumonien verursachen, jedoch gilt dies vorwiegend für immungeschwächte Personen (z. B. HIV-Patienten).

Die Virulenz von *R. equi* beruht auf ei-



Abb. 1 Beispiel für eine pyogranulomatöse *Rhodococcus*-Pneumonie.

Gruppe	Intratracheale Dosis	Pneumonie/gesamt	Durchschnitt Lungenläsion
RE1- Δ ipdAB	$7,1 \times 10^6$ KbE	0/3	0
RE1	$4,3 \times 10^6$ KbE	3/3	203

Sechs 3–5 Wochen alte Fohlen wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen von drei Tieren aufgeteilt. Eine Gruppe wurde intratracheal mit dem RE1- Δ ipdAB Stamm belastet und die andere Gruppe mit dem Elternstamm RE1 des Wildtyps. Drei Wochen nach der Belastung wurde der prozentuale Pneumonie-Anteil in jedem Lungenlappen bewertet. Der Gesamtwert wurde durch Addition der einzelnen Lungenlappenwerte ermittelt, mit einem Höchstwert von 500 (Van der Geize et al., 2011).

nem Plasmid (ca. 85 – 95 kb), welches *R. equi* zum Überleben und zur Vermehrung in Makrophagen benötigt (Takai et al., 1991; Giguère et al., 1999; Takai et al., 2000; Jain et al., 2003; Letek et al.; 2008). Dieses Virulenzplasmid trägt eine Pathogenitätsinsel, welche für eine Anzahl von verwandten Virulenz-assoziierten Proteinen (Vap) kodiert, einschließlich das immundominante Oberflächen-exprimierte Protein VapA oder VapB. Diese letzteren Genprodukte, die sich gegenseitig ausschließen (sie treten also nicht im gleichen Isolat auf), werden mit Wirtstropismus assoziiert.

Die Virulenzplasmide von *R. equi* lassen sich in drei allgemeine Typen unterteilen: VapA⁺, VapB⁺ und VapAB⁻. Jeder dieser Plasmidtypen ist nahezu ausschließlich mit einem spezifischen nicht-humanen Wirtstier assoziiert: Pferd, Schwein bzw. Rind (Ocampo-Sosa et al., 2007). Weil VapA wesentlich für die Virulenz in Fohlen ist, wurde es in Impfstoffstudien zur Prävention von *R. equi*-Infektionen umfassend untersucht (Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2010; Haghghi und Prescott, 2005; Phumoonna et al., 2008), bisher resultierte jedoch keine dieser Studien in einem wirksamen kommerziellen Impfstoff für Fohlen.

Die Pneumonie von Fohlen durch *R. equi* tritt weltweit auf und ist durch eine subakute bis chronische pyogranulomatöse Bronchopneumonie mit extensiver Abszessbildung (Abb. 1) gekennzeichnet. Ohne Therapie kann die Erkrankung letal enden oder die Tiere können, wenn sie überleben, in der Entwicklung zurück bleiben. Die Therapie besteht, wegen der teilweise intrazellulären Natur des Bakteriums, in einer Langzeitbehandlung mit speziellen Antibiotika.

Abgesehen von der Frage der Tiergesundheit haben Gestüte, bei denen die Erkrankung enzootisch auftritt, sehr hohe Kosten für tierärztliche Versor-

gung, Langzeittherapien mit Antibiotika und Mortalität der Fohlen zu tragen. So sind z. B. für die antibiotische Behandlung etwa 2.000 Euro pro Tier aufzuwenden. Zusätzlich zu den signifikanten Direktkosten wirkt sich die Pneumonie durch *R. equi* auch langfristig auf die Pferdewirtschaft nachteilig aus, weil Vollblutfohlen, die sich von der Erkrankung erholen, als ausgewachsene Tiere weniger für Rennen in Betracht kommen. Außerdem sind Langzeitbehandlungen wegen der zunehmenden Resistenz verschiedener Bakterien gegen Antibiotika nach Möglichkeit zu vermeiden.

Impfstoffe gegen Pneumonie durch *R. equi* sind nicht verfügbar und die einzige prophylaktische Maßnahme, die von wenigen großen Gestüten durchgeführt wird, ist eine Plasmatherapie (Transfusion von Plasma geimpfter Stuten). Diese Maßnahme bewirkt jedoch nur einen partiellen Schutz und verhindert nicht das Auftreten von Pneumonien (Martens et al., 1989; Giguère et al., 2011). Deshalb beschloss MSD Animal Health in Zusammenarbeit mit der Universität Groningen (Niederlande), ein Projekt zur Entwicklung eines Impfstoffs zu starten.

2 Wahl des Impfstoffs

Inaktivierte Ganzzell-Impfstoffe für Fohlen wurden in der Vergangenheit getestet, induzierten aber keine ausreichende Immunität (Giguère et al., 2011). Grund dafür war möglicherweise das unausgereifte Immunsystem der Fohlen, das nicht adäquat auf derartige Impfstoffe reagiert. Zudem benötigen inaktivierte Impfstoffe häufig wiederholte Impfungen, um eine adäquate Reaktion zu induzieren, und jegliche Immunität würde wahrscheinlich zu spät induziert werden, da die Fohlen in der Regel kurz nach der Geburt infiziert werden.

Um diese Probleme zu lösen, wurde ein

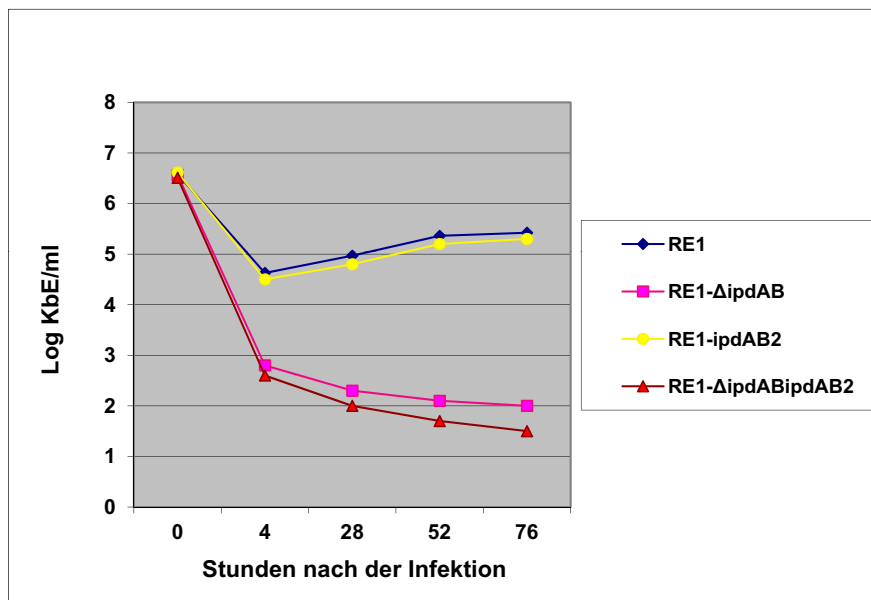


Abb. 2: Überleben von *Rhodococcus equi*-Mutanten in Makrophagen

Humane Makrophagen (U937, Sundstrom et al., 1976) wurden mit den verschiedenen (genetisch veränderten) *R. equi*-Stämmen infiziert (Multiplizität der Infektion (MOI) von ungefähr 10 Bakterien pro Makrophage). Eine Stunde nach der Infektion wurde das Kulturmedium durch ein mit 100 µg/ml Gentamycin angereichertes Kulturmedium ersetzt, um alle eventuellen extrazellulären Bakterien zu vernichten. Nach einer einstündigen Inkubationszeit wurden die Makrophagen geerntet und in frisches Medium mit 10 µg/ml Gentamycin suspendiert. Die Kultur wurde über vier Kolben verteilt, die dann für 4, 28, 52 und 76 Stunden bebrütet wurden. Nach der entsprechenden Zeit wurden die Makrophagen durch Zentrifugieren geerntet, mit 1 % Triton X-100 lysiert und die lebensfähigen *R. equi*-Zellen wurden auf einem Blutagar gezählt (Van der Geize et al., 2011).

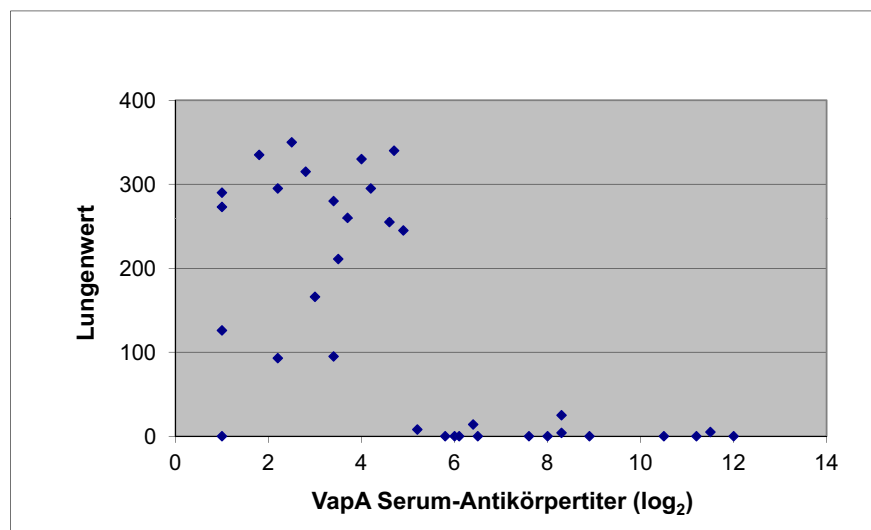


Abb. 3: Korrelation zwischen VapA Serum-Antikörpertiter und Lungenläsionswerten

In vier verschiedenen Experimenten mit Impfung und Belastungsinfektion wurden 34 Fohlen im Alter von 1 – 4 Wochen ein- oder zweimal oral mit dem *R. equi*-Impfstoff geimpft (Spektrum 1×10^7 und 1×10^{10} KbE/Dosis). Zwei bis vier Wochen nach der Impfung wurde Blutserum gewonnen, um die VapA Antikörper zu bestimmen (ELISA), und wurden die Fohlen intratracheal mit dem Wildtyp von *R. equi* belastet (Spektrum 4×10^6 – 8×10^6 pro Dosis). Drei Wochen nach der Belastung wurde der prozentuale Pneumonie-Anteil in jedem Lungenlappen bewertet. Der Gesamtwert wurde durch Addition der einzelnen Lungenlappenwerte ermittelt (Höchstwert: 500).

Teilimpfstoff (Extrakt) auf der Basis von inaktiviertem VapA an Stuten getestet. Der Impfstoff verursachte hohe Antikörper-Titer im Kolostrum, die auf die Fohlen übergingen, sodass die Fohlen kurz nach der Geburt hohe Antikörper-Titer hatten. Die Schutzwirkung für die Fohlen gegenüber Belastungsinfektionen war jedoch enttäuschend (Jacobs, nicht veröffentlichtes Ergebnis) und deshalb wurde dieser Impfstoff nicht weiter verfolgt.

Die ungenügende Wirksamkeit war vermutlich darauf zurückzuführen, dass mit dem Kolostrum zwar Antikörper übertragen werden, aber für die Schutzwirkung, im Hinblick auf die fakultativ-intrazelluläre Natur des Bakteriums, viel mehr eine zelluläre Immunantwort benötigt wird.

Weil die Impfung der Stuten nicht ausreichend effektiv war und die Fohlen den Impfschutz in einem sehr jungen Alter benötigen, sollte über einen anderen Impfstofftyp nachgedacht werden. Außerdem sollte bei den Fohlen eine zelluläre Immunantwort gefördert werden, welche erfahrungsgemäß durch einen abgeschwächten Lebendimpfstoff induziert wird.

Derartige Impfstoffe sorgen bekanntermaßen für ein schnelles Einsetzen der Immunität und häufig zelluläre Reaktionen. Tatsächlich haben Hooper-McGrevy et al. (2005) gezeigt, dass eine orale Verabreichung des Wildtyps *R. equi* an junge Fohlen einen Schutz gegen eine nachfolgende Belastungsinfektion bewirkte. Wenngleich die Verwendung eines nicht abgeschwächten Wildtypstamms als Impfstoff im Feld inakzeptabel ist (weil dieser Krankheitssymptome des Magen-Darm-Traktes und andere unerwünschte Nebenwirkungen hervorrufen kann), zeigte die Arbeit von Hooper-McGrevy et al., dass die orale Impfung mit einem Lebendimpfstoff ein guter Ansatz zur Vorbeugung der Krankheit sein könnte. Traditionell werden Lebendimpfstoffe durch chemische oder physische Mutagenese oder in mehreren Laborpassagen hergestellt. Diese Impfstoffe haben allerdings einige Einschränkungen, beispielsweise führen sie zu zufälligen und nicht definierten (Punkt-)Mutationen, d. h. es ist häufig nicht bekannt, wo sich die Mutation(en) befindet/befinden und welche(s) Gen(e) betroffen ist/sind. Zudem können derartige Mutanten ihre Virulenz zurückgewinnen.

Andere nicht definierte Mutationen können mittels Insertion von Transposonen durch Knock-out-Mutagenese generiert werden, d. h. kleine DNA-Fragmente werden zufällig in die Gene eingeführt und unterbrechen deren Leserahmen, was zu verkürzten, funktionsunfähigen Genprodukten führt. Diese Methode hat jedoch dieselben Nachteile, weil die Stelle der Mutation nicht bekannt ist und sich die Insertion spontan umkehren kann, sodass wieder ein virulenter Stamm entsteht. Zudem wird neue DNA (die zuvor nicht vorhanden war) in das Genom eingebracht, was diesem Stamm theoretisch neue Eigenschaften verleihen könnte.

Moderne DNA-Techniken erlauben jedoch die zielgerichtete Gendeletion (engl. delete »löschen«), sodass stabile abgeschwächte Impfstämme mit gut festgelegten Eigenschaften gewonnen werden können. In der Welt der Wissenschaft ist man sich einig, dass derartige »unmarkierte Deletionsmutanten« ein im Vergleich zu undefinierten Mutanten und/oder Insertionsmutanten bevorzugter Impfstoffansatz sind, weil sie ihre Virulenz nicht zurückgewinnen können und weil keine neue DNA in das Genom eingebracht wird (Frey, 2007). Deshalb hat man sich für einen unmarkierten Deletionsmutanten entschieden. Zunächst wurde in einem ersten Schritt eine Methode zur Herstellung unmarkierter Deletionsmutanten von *R. equi* entwickelt (Van der Geize et al., 2008). Im Anschluss stellte sich die Frage, welches Gen/welche Gene ins Visier genommen werden sollten.

3 Impfstamm RG2837

R. equi gehört zu den *Nocardiaceae*, einer Gruppe von Bakterien mit verschiedenen pathogenen Erregern, die in Makrophagen überleben können und hauptsächlich daraus ihre Virulenz gewinnen (z. B. *R. equi*, *Nocardia seriolae*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Johne's-Disease), *Mycobacterium bovis* subsp. *bovis* und subsp. *tuberculosis*). Transposon-Knockout-Studien in *Mycobacterium (M.) tuberculosis* haben gezeigt, dass zwei benachbarte Gene, *rv3551* und *rv3552*, im Cholesterinkatabolismus-Gencluster von *M. tuberculosis* wesentlich für das Überleben in Makrophagen und das in vivo-Überleben in Mäusen sind (Rengarajan et al., 2005). Die ent-

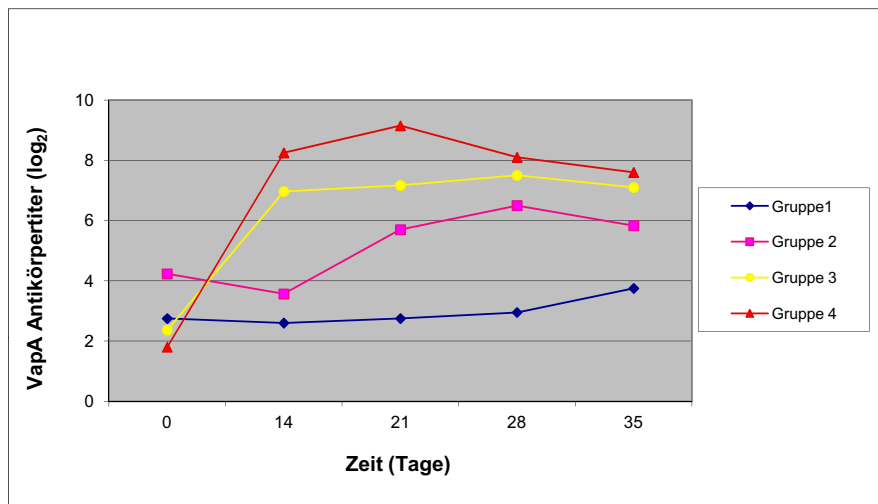


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf des VapA-Antikörpertiters (log₂) nach oraler oder rektaler Impfung

Die Antikörperantwort nach oraler oder rektaler Impfung von entwöhnten (5 Monate alten) Fohlen. Jede Behandlungsgruppe bestand aus zwei oder drei Tieren. Die Ergebnisse sind als durchschnittlicher Titer wiedergegeben.

Gruppe 1: n=2, orale Impfung mit Pronutrin-Gel, 10¹⁰ KbE pro 25 ml Dosis am Tag 0 und einer Wiederholungsimpfung am Tag 14.

Gruppe 2: n=3, orale Impfung mit Alginat-Gel, 10¹⁰ KbE pro 25 ml Dosis am Tag 0 und einer Wiederholungsimpfung am Tag 14.

Gruppe 3: n=2, rektale Impfung 10¹⁰ KbE pro 3 ml Dosis an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1).

Gruppe 4: n=3, rektale Impfung 10¹⁰ KbE pro 3 ml Dosis an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1) und einer Wiederholungsimpfung an den Tagen 14 und 15.

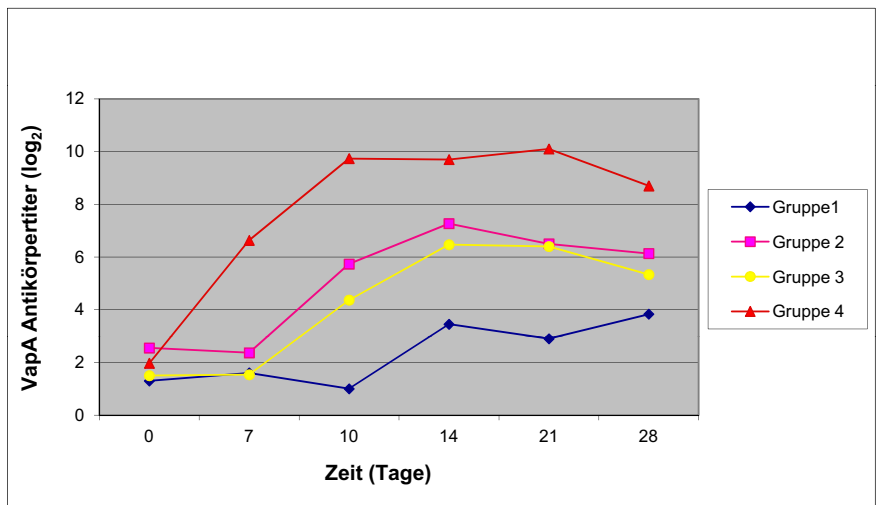


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf des VapA-Antikörpertiters (log₂) nach rektaler Impfung

Die Antikörperantwort nach rektaler Impfung von entwöhnten (5 Monate alten) Fohlen. Jede Behandlungsgruppe bestand aus drei Tieren. Die Ergebnisse sind als durchschnittlicher Titer wiedergegeben.

Gruppe 1: eine rektale Impfung 10⁸ KbE pro 3 ml Dosis (Tag 0)

Gruppe 2: eine rektale Impfung 10⁹ KbE pro 3 ml Dosis (Tag 0)

Gruppe 3: eine rektale Impfung 10¹⁰ KbE pro 3 ml Dosis (Tag 0)

Gruppe 4: zwei rektale Impfungen 10¹⁰ KbE pro 3 ml Dosis an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0 und 1)

sprechenden Gene wurden im Cholesterinkatabolismus-Gencluster von *R. equi* identifiziert, namentlich *ipdA* bzw. *ipdB*. Beide Gene kodieren zwei Subeinheiten einer CoA-Transferase, die an

der Cholesterinzwischenabbaustufe 5-hydroxy-methylhexahydro-indanon-Propionat beteiligt ist (Van der Geize et al., 2011). Ein unmarkierter *ipdAB* Deletionsmutant des *R. equi*-Stamms RE1

Tabelle 2: Schutzwirkung bei Fohlen nach rektaler Impfung

Gruppe	Impfdosis	Ungeschützt gesamt	Gesamtdurchschnitt Klinischer Wert	Durchschnitt Lungenläsion
1	1x10 ¹⁰ KbE	3/11	57 ^a	120 ^a
2	1x10 ⁹ KbE	5/11	84 ^a	135 ^a
3	1x10 ⁸ KbE	8/9	172	262
4	Kontrollgruppe	8/10	217	261

^a p<0,05 (GEE kumulatives Logit-Modell) im Vgl. mit Gruppe 3 und 4

40 Fohlen im Alter von einer Woche wurden nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen von jeweils 9 – 11 Tieren aufgeteilt. Die Gruppen 1, 2 und 3 wurden rektal geimpft mit jeweils einer 1x10¹⁰, 1x10⁹ und 1x10⁸ KbE/Dosis. Die vierte Gruppe diente als nicht geimpfte Kontrollgruppe. Die Impfung erfolgte zwei Mal an zwei aufeinanderfolgenden Tagen. Drei Wochen nach der Impfung wurden alle Fohlen intratracheal mit dem *R. equi* Wildtypstamm 85F (3x10⁶ KbE) belastet. Innerhalb der drei auf die Belastung folgenden Wochen wurden die Fohlen täglich klinisch untersucht, wobei ein numerisches klinisches Bewertungssystem angewandt wurde (Parameter: allgemeiner Eindruck, Anorexie, Temperatur, Ausfluss aus Nüstern und Augen, Herz- und Atemfrequenz, Respirationstyp, Husten und Auskultation). Jedem Parameter wurde je nach Schwere ein Wert zugewiesen. Der gesamte klinische Wert wurde durch Addition der Tageswerte nach der Belastung berechnet. Drei Wochen nach der Belastung wurde der prozentuale Pneumonie-Anteil in jedem Lungenlappen bewertet. Der Gesamtwert wurde durch Addition der einzelnen Lungenlappenwerte ermittelt (Höchstwert: 500).

wurde erzeugt und überlebte weniger gut in Makrophagen (siehe Abb. 2 und Van der Geize et al., 2011). Um zu testen, ob diese Deletionsmutante auch bei Fohlen abgeschwächt ist, wurden drei 3 – 5 Wochen alte Fohlen intratracheal mit einer Dosis von 7,1x10⁶ KbE des Deletionsmutanten RE1-*ΔipdAB* belastet, während drei andere gleichaltrige Tiere eine intratracheale Dosis von 4,3x10⁶ KbE des Elternstamms RE1 des Wildtyps erhielten.

Trotz der höheren Dosis entwickelte keines der mit der Deletionsmutante belasteten Fohlen eine Pneumonie, während die drei Fohlen, denen der Elternstamm verabreicht wurde, eine typische pyogranulomatöse Pneumonie entwickelten. Dies wurde in einer drei Wochen nach der Belastung durchgeführten Sektion bestätigt (Tab. 1 und Van der Geize et al., 2011). Dies zeigte deutlich die Abschwächung des RE1-*ΔipdAB* Mutanten bei Fohlen.

Das Genom von *R. equi* kodiert einen zweiten Satz gleichartiger Proteine, die mit IpdA2 und IpdB2 bezeichnet werden, mit einer Übereinstimmung der Proteinsequenz von 51 bzw. 55 %. Diese beiden Gene (außerhalb des Cholesterinkatabolismus-Gencluster) wurden ebenfalls deletiert, um sicherzustellen, dass die Deletionen nicht durch interne Rekombination oder funktionale Komplementierung repariert werden könnten. Diese zusätzliche Deletion führte nicht zu einer weiteren Abschwächung des Überlebens in Makrophagen, und das Überleben in Makrophagen einer einfachen Deletionsmutante dieses zweiten Gensatzes (RE1-*ΔipdAB2*) wurde nicht verhindert (siehe

Abb. 2). Der Doppel-Deletionsmutant RE1-*ΔipdABipdAB2* wurde für weitere Impfstoffstudien ausgewählt und als Stamm RG2837 bezeichnet (Van der Geize et al., 2011).

4 Wirksamkeitsstudien an Fohlen

Die ersten Versuche zur Entwicklung eines sicheren und wirksamen Impfstoffs für Fohlen fanden auf oralem Weg statt. Nach der oralen Impfung von 1 – 4 Wochen alten Fohlen bot der Impfstoff (Stamm RG2837) Schutz bei ungefähr 25 – 50 % der Fohlen, was als unzureichend betrachtet wurde. Es wurde allerdings ein eindeutiger (indirekter) Zusammenhang zwischen den VapA Serum-Antikörpertitern und dem Impfschutz beobachtet. Alle Fohlen die einen Serumtiter $\geq 5,0 \log_2$ erworben hatten, zeigten sich gegen Lungenläsionen geschützt (Abb. 3).

Dies war sehr wahrscheinlich eine indirekte Korrelation, da sich in Studien über die Impfung von Stuten mit einem inaktivierten Impfstoff auf der Basis von VapA ebenfalls sehr hohe VapA-Antikörpertiter ergaben, die auf die Fohlen übertragen wurden. Diese Fohlen waren jedoch nicht gegen Belastung geschützt. Zudem waren in unseren Belastungsstudien nicht geimpfte Fohlen mit einem hohen natürlichen, von der Mutter übertragenen Antikörperanteil ebenfalls nicht geschützt (Jacobs, nicht veröffentlichte Ergebnisse).

Offensichtlich, falls die Impfung eine serologische Reaktion über einem Titer von 5,0 \log_2 auslöst, wird ein anderer Teil des Immunsystems (beispielsweise

die zelluläre Immunität) ebenfalls angesprochen. Die Tatsache, dass ein Fohlen mit einem Titer von nur 1,0 \log_2 dennoch vollständig geschützt war (Abb. 3), scheint eine Bestätigung für die wichtige Rolle der zellulären Immunantwort zu sein. Diese (indirekte) Korrelation zwischen dem VapA Serum-Antikörpertiter und dem Schutz wurde in anschließenden Studien genutzt, um das Impfprotokoll, den Verabreichungsweg und die Zusammensetzung des Impfstoffs weiter zu optimieren.

Es wurde angenommen, dass das Eindringen des Impfstoffs in das lymphatische Darmgewebe wesentlich für den Aufbau einer Schutzwirkung ist, weshalb die rektale Impfung ebenfalls untersucht wurde, da Lymphgewebe in der gesamten rektalen Schleimhaut reichlich vorhanden ist. Eine Studie mit entwöhnten Fohlen zeigte, dass die Stimulation des Immunsystems auf rektalem Weg im Vergleich zur oralen Impfung eine viel bessere und schnellere Schutzwirkung erzeugt. Zeichen für eine schützende Immunantwort wurden innerhalb von 14 Tagen nach der rektalen Impfung gemessen (Abb. 4). Weitere Studien zeigten, dass die Wirkung von der Impfdosis abhängig ist und dass die Impfung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen beim Aufbau der Schutzwirkung viel effektiver ist als eine einzelne Impfung (Abb. 5). Eine Schutzwirkung wurde sogar innerhalb von sieben Tagen nach der Impfung beobachtet.

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurde die rektale Impfung bei Tieren im Zielalter (eine Woche alte Fohlen) getestet. Eine Gruppe von 40 Fohlen wurde nach dem Zufallsprinzip in vier Gruppen mit jeweils 9 – 11 Tieren aufgeteilt. Die erste Gruppe (Gruppe 1) wurde mit 10¹⁰ KbE je Dosis geimpft, die zweite Gruppe (Gruppe 2) mit 10⁹ KbE je Dosis, die dritte Gruppe (Gruppe 3) mit 10⁸ KbE je Dosis. Die vierte Gruppe wurde nicht geimpft und diente als Kontrollgruppe. Der Impfstoff wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen in einem Dosisvolumen von 3 ml ungefähr 15 cm tief in das Rektum verabreicht. Nach der Probelastung waren jeweils 7/10, 6/11, 1/9 und 2/10 Fohlen der Gruppe 1, 2, 3 und 4 (teilweise) gegen Pneumonie durch *R. equi* geschützt (Tab. 2). Die klinischen Werte sowie die Werte der Lungenläsion

der Gruppen 1 und 2 waren statistisch wesentlich niedriger als die Werte der Kontrollgruppe. Obwohl der Schutz nicht komplett war, zeigten die Ergebnisse, dass die rektale Impfung auch bei sehr jungen Fohlen für eine bessere Schutzwirkung sorgte als die orale Impfung.

5 Studien zur Sicherheit des Impfstoffes

Zusätzlich zu den oben genannten Studien wurde die Sicherheit des Impfstoffs weiter über die orale und rektale Verabreichung getestet. Die Impfstoffsicherheit bei oraler Verabreichung wurde in einer Gruppe von zehn eine Woche alten Fohlen, einschließlich drei Vollblut-Fohlen, getestet. Die Fohlen erhielten eine orale Dosis von 2×10^{10} KbE und zwei Wochen später eine weitere Impfung mit 2×10^9 KbE. Es wurden zwei gleichaltrige Kontrolltiere zur Gruppe hinzugefügt, um die Übertragung des Impfstamms zu testen. Die Fohlen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen täglich klinisch untersucht.

Es wurden keine impfungsassoziierten unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet, was bedeutet, dass der Impfstoff selbst in hohen Dosen bei Fohlen sicher ist. Der Impfstoff breitete sich auch nicht auf die Kontrolltiere aus, wie aus negativen nasalen und rektalen Abstrichen hervorging.

Die Impfstoffsicherheit bei rektaler Verabreichung wurde ebenfalls in einer Gruppe von zehn eine Woche alten Fohlen, einschließlich drei Vollblut-Fohlen, getestet. Den Fohlen wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen eine rektale Dosis von 10^{12} KbE ($>10 \times$ die erwartete Felddosis) verabreicht, der zwei Wochen später eine Wiederholungsimpfung mit 10^{11} KbE ebenfalls an zwei aufeinanderfolgenden Tagen folgte. Es wurden zwei gleichaltrige Kontrolltiere zur Gruppe hinzugefügt, um die Übertragung des Impfstamms zu testen. Die Fohlen wurden über einen Zeitraum von vier Wochen täglich klinisch untersucht. Es wurden keine impfungsassoziierten Nebenwirkungen beobachtet, was wiederum bedeutet, dass der Impfstoff sicher ist. Der Impfstoff breitete sich auch nicht auf die Kontrolltiere aus, wie aus negativen nasalen und rektalen Abstrichen hervorging.

Obwohl der Impfstamm VapA⁺ (Tropismus für Fohlen) ist, wurde seine Sicherheit an mehreren anderen Tierarten, und zwar Mäusen, Ratten, Hühnern, Schweinen und Kälbern, getestet. Während dieser Studien (oronasale Verabreichung von Dosen von etwa 1×10^9 KbE) wurden keine impfungsassoziierte Nebenwirkungen beobachtet und nasale und/oder rektale Abstriche zeigten, dass der Impfstamm diese Tiere nicht kolonisierte.

Fälle von *Rhodococcus*-Infektionen beim Menschen beschränken sich auf immungeschwächte Personen, wie beispielsweise AIDS-Patienten und außerdem durch Pferde-fremde Stämme (Takai et al., 1994; Takai et al., 2002). Da der Impfstamm nicht in menschlichen Makrophagen überleben kann, kann gefolgert werden, dass das pathogene Potenzial des Impfstamms bei Menschen geringer ist im Vergleich zu dem des Wildtyps *R. equi*, der ubiquitär in der Umwelt vorkommt.

6 Fazit

Diese vielversprechenden Ergebnisse in Bezug auf Sicherheit und Wirksamkeit eines potenziellen Impfstoffs gegen *R. equi* rechtfertigen weitere Studien unter Feldbedingungen. Die Entwicklung eines wirksamen Impfstoffs wäre wertvoll zur Prävention dieser schweren Erkrankung bei Fohlen und würde die langwierige und belastende Antibiotikabehandlung auf ein Mindestmaß beschränken, auch zum Vorteil des Menschen.

Literatur

1. Frey, J. (2007): Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines. *Vaccine* 25, 5598-5605.
2. Giguere, S., M. K. Hondalus, J. A. Yager, P. Darrah, D. M. Mosser, J. F. Prescott (1999): Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 67, 3548-3557.
3. Giguere S., Cohen M., Keith Chaffin M., Skovis M.N., Hondalus M.K., Hines S.A. and Prescott J.F. (2011a): Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi*. *J. Vet Intern Med* 25:1209-1220.
4. Giguere, S., M. Cohen, M. Keith Chaffin, S. A. Hines, M. K. Hondalus, J. F. Prescott, N. M. Slovis (2011b): *Rhodococcus equi*: Clinical manifestations, virulence and immunity. *J. Vet. Intern. Med.* 25, 1221-1230.
5. Haghghi, H. R., J. F. Prescott (2005): Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 215-225.
6. Hooper-McGrevy, K. E., B. N. Wilkie, J. F. Prescott (2005): Virulence-associated protein-specific serum immune globulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. *Vaccine*

23, 5760-5767.

7. Letek, M., A. A. Ocampo-Sosa, M. Sanders, U. Fogarty, T. Buckley, D. P. Leadon, P. González, M. Scorti, W. G. Meijer, J. Parkhill, S. Bentley, J. A. Vázquez-Boland (2008): Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host-associated vapA and vapB virulence plasmids. *J. Bacteriol.* 190, 5797-5805.
8. Jain, S., B. R. Bloom, M. K. Hondalus (2003): Deletion of vapA encoding Virulence Associated Protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol. Microbiol.* 50, 115-128.
9. Martens, R. J., J. G. Martens, R. A. Fiske (1989): *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Vet. J.* 21, 249-255.
10. Meijer, W. G., J. F. Prescott (2004): *Rhodococcus equi*. *Vet. Res.* 35, 383-396.
11. Ocampo-Sosa, A., D. Lewis, J. Navas, F. Quigley, R. Callejo, M. Scorti, D. Leadon, U. Fogarty, J. Vázquez-Boland (2007): Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers. *J. Infect. Dis.* 196, 763-769.
12. Oliveira, A. F., L. C. Ferraz, M. Brocchi, M. C. Roque-Barreira (2007): Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. *Microbes. Infect.* 9, 382-390.
13. Oliveira, A. F., L. P. Ruas, S. A. Cardoso, S. G. Soares, M. C. Roque-Barreira (2010): Vaccination of mice with salmonella expressing VapA: mucosal and systemic Th1 responses provide protection against *Rhodococcus equi* infection. *PLoS One* 5: e8644.
14. Phumoonna, T., M. D. Barton, T. Vanniasinkam, M. W. Heuzenroeder (2008): Chimeric vapA/groEL2 DNA vaccines enhance clearance of *Rhodococcus equi* in aerosol challenged C3H/He mice. *Vaccine* 26, 2457-2465.
15. Rengarajan, J., B. R. Bloom, E. J. Rubin (2005): Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 8327-8332.
16. Sundstrom, C., K. Nilsson (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer* 17, 565-577.
17. Takai, S., T. Sekizaki, T. Ozawa, T. Sugawara, Y. Watanabe, S. Tsubaki (1991): Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect. Immun.* 59, 4056-4060.
18. Takai, S., S. A. Hines, T. Sekizaki, V. M. Nicholson, D. A. Alperin, M. Osaki, D. Takamatsu, M. Nakamura, K. Suzuki, N. Ogino, T. Kakuda, H. Dan, J. F. Prescott (2000): DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* AT-CC33701 and 103. *Infect. Immun.* 68, 6840-6847.
19. Takai, S., Y. Sasaki, T. Ikeda, Y. Uchida, S. Tsubaki, T. Sekizaki (1994): Virulence of *Rhodococcus equi* Isolates from Patients with and without AIDS. *J. Clin. Microbiol.* 32, 457-460.
20. Takai, S. et al. (2002): Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 52-55.
21. Van der Geize, R., W. De Jong, G. I. Hessels, A. W. F. Grommen, A. A. C. Jacobs, L. Dijkhuizen (2008): A novel method to generate unmarked gene deletions in the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using 5-fluorocytosine. *Nucl. Acids Res.* 36, 151-161.
22. Van der Geize, R., A. W. F. Grommen, G. I. Hessels, A. A. C. Jacobs, L. Dijkhuizen (2011): The steroid catabolic pathway of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* is important for pathogenesis and a target for vaccine development. *Plos Pathogens* 7:1-15 (e1102181).

Korrespondenzadresse:

Dr. Ton Jacobs
MSD Animal Health
Intervet International BV
5830 AA Boxmeer
The Netherlands
Ton.Jacobs@Merck.com