



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap

Rhodococcus equi-
Profylaktiska åtgärder för att minska
prevalensen

Rhodococcus equi- management and
prophylactic work to lower the prevalence

Jonna Martinsson

Uppsala
2019

***Rhodococcus equi*- profylaktiska åtgärder för att minska prevalensen**

***Rhodococcus equi*- management and prophylactic work to lower the prevalence**

Jonna Martinsson

Handledare: *Ingrid Hansson, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap; enheten för bakteriologi och livsmedelssäkerhet*

Examinator: *Maria Löfgren, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: Grundnivå, G2E

Kurstitel: *Självständigt arbete i veterinärmedicin*

Kursansvarig institution: *Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

Kurskod: EX0862

Program/utbildning: *Veterinärprogrammet*

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: *<http://stud.epsilon.slu.se>*

Nyckelord: *Rhodococcus equi, förebyggande åtgärder, hyperimmuniserad plasma*

Key words: *Rhodococcus equi, prophylactic, management, hyperimmune plasma*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	4
Allmänt om bakterien <i>Rhodococcus equi</i>	4
<i>Kliniska tecken</i>	4
<i>Diagnostik</i>	5
Verkningsmekanism och virulens	5
<i>Exponering</i>	5
<i>Virulens</i>	5
Immunförsvaret	6
<i>Varför främst föl i viss ålder drabbas</i>	6
Miljöbetingelser för <i>R equis</i> överlevnad	7
Management för minimera risken för infektion	8
<i>Kontamination av marken</i>	8
<i>Földensiteten</i>	8
<i>Dammkontroll</i>	8
Veterinära förebyggande diagnostiska tekniker	9
<i>Användande av ultraljud</i>	9
<i>Andel vita blodkroppar i blodet</i>	9
Profylaktiska behandlingar och åtgärder	10
<i>Hyperimmuniserad plasma</i>	10
<i>Vaccination av det dräktiga stoet</i>	10
<i>Vaccinering av det nyfödda fölet</i>	11
Behandling	11
Diskussion	11
Litteraturförteckning	14

SAMMANFATTNING

Infektioner orsakade av *Rhodococcus equi* kan ge upphov till allvarliga pneumonier hos föl under dess första halvår i livet. Bakterien är en saprofyt som kan använda sig av dött material i jorden för att överleva. Bakterien kan även livnära sig på flyktiga fettsyror som finns i växtätarens avföring, vilket innebär att jorden i beteshagar för hästar är en ypperlig plats för bakterien att överleva i.

Föl är mycket infektiösa under sina första månader i livet då deras immunförsvar inte är helt utvecklat. Det är av yttersta vikt att fölet får i sig råmjölk, kolostrum, inom de första 24 timmarna i livet. Passagen för antikroppar börjar nämligen sakteligen stängas redan 12 timmar efter födseln. Hästars placenta är utformad på ett sådant sätt att det inte sker en transplacental överföring av antikroppar från modern till fölet, därmed kolostrums extremt avgörande roll för fölets överlevnad och hälsa.

På grund av bakteriens förmåga att överleva i marken är det svårt att bli av med bakterien, den förekommer hos de flesta stora stuterier. Det som avgör hur många föl som insjuknar och hur sjuka de blir på de olika stuterierna beror på om marken har virulenta stammar av bakterien eller inte. Även klimatet samt vilken typ av jord betet har är av betydelse för hur mycket av de virulenta stammarna fölen andas in med aerosolen. Inhalation av bakterien är den vanligaste smittvägen för pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi* hos föl.

Syftet med denna litteraturstudie är att beskriva vilka förebyggande strategier som kan användas för att minska prevalensen samt svårighetsgraden av pneumonier orsakade av *Rhodococcus equi* hos föl. Vilka förebyggande åtgärder kan genomföras för att motverka att bakterien överförs till fölen samt vilka åtgärder krävs för att hålla smittrycket i marken så lågt som möjligt? Vilka medicinska profylaktiska åtgärder kan genomföras, finns det medel att administrera till fölen för att minska prevalensen och allvarlighetsgraden av pneumonin?

Resultatet av studien indikerar att det inte finns en enkel lösning för att minska prevalensen och allvarlighetsgraden av pneumonier orsakade av *Rhodococcus equi*. För att sänka smittryck, prevalens samt allvarlighetsgraden krävs flera olika strategiska åtgärder och ett planerat arbete för att lyckas. Det krävs arbete med att hålla markerna lagom blöta och gräsbeklädda för att minska dammbildning med virulenta *R. equi* som kan inhaleras av fölen. Screening av föl kan vara av stor betydelse för att tidigt upptäcka drabbade individer på stuterier som tidigare haft återkommande problem. Detta kan göras med bland annat ultraljud av thorax samt blodprover för att analysera andelen vita blodkroppar.

För att stärka fölens motståndskraft mot *R. equi* på gårdar där bakterien finns, kan administrering av hyperimmuniserad plasma (HIP) vara en del i arbetet mot att minska prevalensen. I och med fölens outvecklade immunförsvar kan detta vara en viktig åtgärd för att minska prevalensen på endemiskt drabbade gårdar.

En annan profylaktisk åtgärd är vaccinering av det dräktiga stoet för att minska prevalensen, resultatet av sådana åtgärder är dock inte klarlagda. Ytterligare studier behövs för att säkerställa effekten av vaccinering.

SUMMARY

One of the most common causes of pneumonia in foals is the bacteria *Rhodococcus equi*. It causes problems for foals in the ages between one till six months of age. The bacteria is a soil saprophyte which can survive on dead organic material in the soil. Horse manure is a great source of nutrition for the bacteria due to the volatile fatty acids it is containing. These fatty acids are end products of microbial fermentation. The presence of the volatile fatty acids result in colonisation of the bacteria in fields used for horses, especially on bigger stud farms.

The neonatal foal has not yet developed a full immune response, which makes it very susceptible to infection during the first months. The colostrum plays a vital role in the health and survival of the foal. It is extremely important that the foal ingests the colostrum within the first 12 hours after birth. That is when the barrier in the intestine is closing for antibodies to pass through. There is no transplacental transfer of antibodies between the mother and the foal, therefore the importance of colostrum.

The bacteria is common on most of the bigger stud farms, however not all of them are endemically affected. The prevalence of pneumonia caused by *R. equi* is depending on the concentration of virulent strains of *R. equi* in the soil and on which type of ground the horses are grazing. It is also depending on the climate as well as the grounds. Dry, warm climate and dusty fields contribute to aerosol containing the bacteria which the foals then will inhale. Inhalation of the bacteria is the main route of infection.

This literature review aims to highlight what kind of yard management and prophylactic treatments that can be used to minimise the prevalence of pneumonia caused by *R. equi*.

The conclusion of this study indicates that there is no “gold standard” how to lower the prevalence. However, a combination of yard management as in keeping the pens less dusty, prophylactic administration of hyperimmune plasma as well as screening of foals for early detection of affected individuals with the help of among other things ultrasound, has been seen helpful in controlling and lowering the prevalence.

More research is needed in order to get an effective vaccine that poses no risk to the young foals.

INLEDNING

Rhodococcus equi är en bakterie som kan orsaka allvarliga pneumonier hos föl framförallt i åldern en till fyra månader. Det är viktigt att hästuppfödare har kunskaper om sjukdomen eftersom den är livshotande och kräver långa och dyra behandlingar (Chaffin *et al.*, 2003). Därmed är preventiva behandlingar samt förebyggande strategier för att minska prevalensen av stor vikt.

De flesta föl som drabbas av infektion med *Rhodococcus equi* visar kliniska symptom innan fyra månaders ålder, även om fölen kan drabbas upp till sex månaders ålder. Bakterien finns på de flesta gårdar men på vissa orsakar den sporadiska fall medan andra drabbas endemiskt (Giguere & Prescott, 1997).

Vad som i miljön predisponerar för utvecklingen av pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi* samt hur man kan förebygga detta med hjälp av profylax är därför ytterst intressant. Denna litteraturstudie ämnar utreda huruvida strategiskt arbete kan minska förekomsten av sjukdomsutbrott av *Rhodococcus equi* på endemiskt drabbade gårdar samt vilka profylaktiska åtgärder som kan rekommenderas.

MATERIAL OCH METODER

De databaser som använts för litteratursökningen är Web of Science, Scopus, Pubmed och Google scholar.

Dessa sökord och fraser har använts: ((prophylaxis OR prevention)) AND (Rhodococcus equi infection) AND (foals or foal) NOT human

(Rhodococcus equi AND (persist* OR preval*) AND environment*)

Early AND (Diagnosis OR detedt*) AND (Rhodococcus equi)

Då det finns mycket information kring det immunologiska svaret vid en *R. equi* infektion gjordes en avgränsning i hur mycket information om immunsvaret som krävdes för att få en förståelse för virulensen och sjukdomen.

En del reviewartiklar har även använts för den mer allmänt kända informationen om bakterien.

LITTERATURÖVERSIKT

Allmänt om bakterien *Rhodococcus equi*

Bakterien är en grampositiv aerob saprofyt, vilket innebär att den kan livnära sig på dött organiskt material i jorden. Den är orörlig samt en fakultativ intracellulär patogen (Johns I, 2013).

Pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi* är ett problem för hästnäringen världen över. Sjukdomen yttrar sig framför allt som en pyogranulomatös bronkopneumoni hos föl från en till sex månaders ålder (Muscatello, 2012a), fölen blir dock ofta infekterade redan under de första dagar i livet (Prescott *et al.*, 1989). *Rhodococcus equi* tillhör ordningen *Corynebacteriales* vilket även mykobakterier som till exempel *Mycobacterium tuberculosis* gör (Meijer & Prescott, 2004). *Rhodococcus equi* kan liksom mykobakterier infektera makrofager. Tack vare bakteriens speciella hölje kan den även undkomma bland annat lysosomal nedbrytning i makrofagerna (Bicudo Cesar, 2018). Höljet innehåller mykolsyra, polysackarider samt glykolipider. Denna sammansättning av höljet skiljer dessa bakterier från andra grampositiva och gramnegativa bakterier. Det skapar en stark barriär mot hydrofila komponenter, det finns dock poriner i cellväggen för att bakterien ska kunna ta in hydrofila molekyler för sitt egna näringsbehov. Det har observerats att sammansättningen av bakteriens hölje och cellvägg är en viktig bidragande faktor till bakteriens motståndskraft och förmåga att överleva i svåra förhållanden. Exempel på detta är överlevnadsförhållandena i makrofager samt att bakterien klarar av stressade situationer som lågt pH och oxidativ stress (Meijer & Prescott, 2004).

Kliniska tecken

Föl som drabbas får framförallt pyogranulomatös bronkopneumoni med abscesser, vilka förekommer spritt i lungorna. Detta har givit upphov till smeknamnet ”rattles” på grund av det karakteristiska rasslande ljudet som hörs vid auskultation av thorax hos drabbade föl (Muscatello, 2012a). Sjukdomen är svår att upptäcka i tid på grund av en långsam spridning av infektionen i lungorna samt fölens förmåga att kompensera för progressiv förlust av lungkapacitet. De första kliniska tecknen är en något förhöjd andningsfrekvens och lätt feber. Dessa är symptom som lätt kan missas eller ignoreras, framförallt om fölen går på bete och lösdrift, vilket gör att förloppet kan fortskrida. När väl tydliga symptom observeras har sjukdomen redan fortsatt in i ett akut-kroniskt förlopp med patologiska förändringar på framförallt lungorna. I detta skede kan kliniska symptom då ses som minskad aptit, mild letargi, feber från 38,8–41,5 °C, samt takypne och ökad andningssvårighet med vidgade näsborrar och ökat bukrörelsemönster. Hosta och bilateralt nosflöde kan, men behöver inte förekomma (Giguere & Prescott, 1997).

En liten andel föl drabbas av en subakut form. Dessa föl hittas ofta med hög feber och med en akut andnöd utan att tidigare visat symptom. De dör ofta inom ett par dagar trots behandling (Giguere & Prescott, 1997).

Rhodococcus equi kan utöver den vanligaste pyogranulomatösa bronkopneumonin även drabba andra platser i kroppen. Dessa extrapulmonära sjukdomar (EPD) orsakade av *R. equi* kan ses som enterit, hepatit, septisk artrit, polysynoviter och uveit. Föl utan EPDs har visat sig ha större chans att överleva (Reuss *et al.*, 2009).

Diagnostik

Det är svårt att i ett tidigt skede av sjukdomen skilja mellan infektion orsakad av *Rhodococcus equi* och nedre luftvägsinfektioner orsakade av annan luftvägspatogen. Framförallt om besättningen inte har någon tidigare historia av fall med *R. equi* (McCracken & Slovis, 2009).

Det finns ett flertal diagnostiska tester som används för att skilja på infektion orsakad *R. equi* och andra patogener. Till exempel ett heltäckande blodprov där man mäter vita och röda blodkroppar, hemoglobin, hematokrit samt blodplättar. Andra undersökningar som kan vara till hjälp är fibrinogennivåer i blodet, ultraljud av thorax samt röntgen. Bakteriologisk odling och PCR samt mikroskopisk undersökning från trachealinspirat anses dock vara "the gold standard" (McCracken & Slovis, 2009). Vid PCR-analys letar man efter förekomsten av *vapA*, bakteriens främsta virulensfaktor, för att undersöka om den påvisade stammen är virulent eller inte. En bakteriologisk odling görs i princip alltid men det tar minst ett dygn eller mer för att odla samt verifiera resultatet. Då är det en tillgång att kunna använda PCR för att undersöka om stammen är virulent eller inte (McCracken & Slovis, 2009).

Verkningsmekanism och virulens

Exponering

Exponeringsvägarna för *R. equi* är antingen genom inhalation av aerosol och/eller dammpartiklar från jorden, oralt intag tillsammans med föda eller om bakterien tar sig in i sår eller slemhinnor. Inhalation av virulenta stammar *R. equi* är det som oftast orsakar den allvarligaste formen av sjukdomen. Den orala smittvägen orsakar inte pneumoni i samma omfattning, såvida inte fölet har utsatts för en hög dos med bakterier (Agrawal *et al.*, 2009).

Virulens

Virulenta och avirulenta stammar av *R. equi* kan förekomma samtidigt i omgivningen samt i marker med avföring från hästar. In vitro-studier har gjorts för att undersöka i vilken utsträckning plasmidöverföring av avirulenta och virulenta stammar sker mellan fölen och dess närmiljö. Virulensen och verkningsmekanismen är beroende av en 85- till 95-kb virulens-associerad plasmid och dess uttryck av proteinet "virulence-associated plasmid A" (*vapA*). Det är speciella patogena delar på dessa stora plasmider, pathogenicity islands (PI), som kodar för sju olika virulensassocierade proteiner. *vapA* är ett av dessa sju protein (Meijer & Prescott, 2004).

Närvaro av *vapA* avgör om stammen är virulent eller icke virulent (Stoughton *et al.*, 2013). Det är *vapA* hos *R. equi* som kräver de stora 85- till 95-kb virulensplasmiderna för att finnas. *vapA* är lokaliserad på bakteriens yta vilket gör att dess uttryck framförallt är temperatur-reglerat, studier har visat på att uttryck sker mellan 34-41°C, liknande kroppens egna temperatur (Takai *et al.*, 1996).

Uttryck av de patogena delarna på plasmiden (PI) beror även på pH, oxidativ stress, magnesium och järn (Ren & Prescott, 2003). Låga järnnivåer samt lågt pH har observerats vara avgörande för uttryck av *vap*-virulensfaktorerna, medan låga magnesiumnivåer tycks motverka uttrycket (Ren & Prescott, 2003).

I vilken grad plasmidöverföringen sker mellan bakterierna är avgörande för vilka åtgärder som bör tas. Sker det i hög grad måste åtgärder vidtas för att kontrollera smittan i marken medan liten grad plasmidöverföring av virulensen skulle betyda att arbete för att förhindra att smittan kommer till miljön över huvud taget hade varit det enda rätta (Stoughton *et al.*, 2013).

Grunden till *Rhodococcus equi* patogenes är förmågan att föröka sig i och destruera alveolarmakrofager. Bakteriens intracellulära förmåga är begränsad till monocyt-makrofaglinjen, det vill säga att neutrofiler bibehåller sin bakteriocida förmåga gentemot *R. equi* (Meijer & Prescott, 2004). Bakteriens förmåga att replikera och överleva i makrofager beror på 85-kb plasmiden, avsaknad av plasmiden innebär att fölen inte drabbas av den allvarliga bronkopneumonin samt att bakterien försvinner från lungorna inom två veckor (Giguere *et al.*, 1999).

Trots att den stora 85-95 kb plasmiden är nödvändig för virulensen så är den inte ensamt ansvarig för patogenesen, bakteriens speciella hölje och cellvägg anses ge upphov till granulomen. Uttryck av endast *vapA* ger inte förmågan att överleva och replikera i makrofager. Ytterligare studier krävs för att kunna utröna vilka andra virulensgener som uttrycks på de stora plasmiderna samt deras funktioner och hur stor roll de, inklusive *vapA*, har (Giguere *et al.*, 1999a).

Immunförsvaret

Med anledning av att *R. equi* är en fakultativ intracellulär bakterie anses ett cellmedierat immunsvaret vara av största vikt, efter studier gjorda på möss. Svaret som eftersträvas och har setts vara effektivt är ett svar med CD4⁺ Th1-celler. Dessa kan binda in till MHC klass 2 som finns på bland annat makrofager. Th1-cellernas produktion av IFN γ och IL-2 är också mycket viktig för försvaret mot *R. equi* (Kanaly *et al.*, 1996). IFN γ är en viktig cytokin för aktivering av makrofager och neutrofilers avdödande förmåga (Dawson *et al.*, 2010). *R. equi* har förmågan att styra bort svaret från ett CD4⁺ Th1-svar samt nedreglera uttryck av IFN γ . Fler studier krävs för att identifiera de underliggande mekanismerna till det nedreglerade IFN γ -uttrycket (Giguere *et al.*, 1999b).

Varför främst föl i viss ålder drabbas

På grund av utformningen av hästars placenta, måste fölen få i sig alla antikroppar med kolostrum. Detta innebär att det är av största vikt att fölen så snabbt som möjligt får i sig råmjölken med de livsviktiga antikropparna. Passagen av antikroppar från kolostrum genom tarmslemhinnan börjar stängas cirka 12 timmar efter födseln. Skulle fölet inte få i sig tillräckligt mycket kolostrum eller inom tillräckligt kort tid, löper den större risk att drabbas av en infektion (Dawson *et al.*, 2010).

Tiden då moderns antikroppar från råmjölken börjar sjunka i koncentration hos fölet är den tid som *R. equi* brukar drabba fölen (Dawson *et al.*, 2010). Den endogena produktionen av IgG-antikroppar påbörjas vid 5-8 veckors ålder, medan de maternella antikropparna från kolostrum har halveringstider för IgG-subtyper mellan 17,6(IGga)-32(IGgb) dagar samt för IgA 3,4 dagar (Sheoran *et al.*, 2000). I och med individvariationer när de endogena antikropparna börjar

bildas, skapar detta ett fönster då fölet är mer utsatt för att infekteras av patogener så som *Rhodococcus equi*.

Det medfödda immunförsvaret spelar också en viktig roll. Neutrofilers fagocyterande förmåga är jämförbar med den hos fullvuxna hästar men fölserums opsoniserande förmåga med hjälp av komplementfaktorer eller IgG, för att underlätta neutrofilernas fagocytos, sågs vara begränsad i upp till 3-4 veckors ålder (McTaggart *et al.*, 2001).

Även underutvecklad förmåga till uttryck av MHC klass 2 har observerats hos föl upp till 3 månaders ålder. Makrofager och antigenpresenterande-celler presenterar främmande proteinfragment på MHC klass 2 för CD4+ Th1-celler att känna igen, minskat uttryck resulterar då i en minskad förmåga till antigenpresentation (Pargass *et al.*, 2009). De icke MHC-beroende CD8+ cytotoxiska T-lymfocyterna (CTL) verkar inte vara närvarande hos föl under 3 veckors ålder. Vid 8 veckors ålder har de dock utvecklats och finns tillgängliga (Patton *et al.*, 2005).

Begränsad förmåga till uttryck av MHC klass 2, frånvaro av CTL-celler, svag opsonisering med hjälp av komplementfaktorer för neutrofilers fagocytos, samt den senare tidpunkten då endogena IgG bildas gör allt tillsammans att föl under de första åtta veckorna i livet är väldigt känsliga för patogener.

Miljöbetingelser för *R. equi* överlevnad

Rhodococcus equi är saprofyt som finns i jord, vilket betyder att den kan livnära sig på dött organiskt material och har därmed många källor till näring. Bakteriens speciella hölje och cellvägg gör den extra motståndskraftig mot lågt pH och oxidativ stress. Bakterien kan även replikera och överleva i tarmar hos föl upp till två till tre månaders ålder (Giguere & Prescott, 1997).

R. equi kan använda flyktiga fettsyror, vilka förekommer i avföringen hos växtätare, som substrat för tillväxt vilket förklarar varför den förekommer på många hästgårdar (Hughes & Sulaiman, 1987). Bakterien ökar signifikant i antal under mitten av april. Den optimala tillväxttemperaturen är 37°C men bakterien växer även vid 20°C (Takai *et al.*, 1986).

Det har visat sig att antal år som marken har använts som bete till föl och hästar har betydelse för hur mycket bakterier som finns i jorden (Prescott *et al.*, 1984). Bakterien trivs i torr miljö och klarar uttorkning bättre än den klarar att leva i blöta marker. Vid provtagning av samma mark kunde bakterien inte påvisas när marken var blöt men kunde påvisas i prov från samma mark när jorden hade torkat upp (Barton & Hughes, 1984). Bakteriens tillväxt inhiberas av för mycket väta i marken (Williams *et al.*, 1972).

Australiensiska studier har visat att det är större sannolikhet att finna virulenta stammar av *R. equi* i marker med ett pH under 6 än i marker med pH lika med eller över 6. Högre koncentrationer av virulenta *R. equi* har observerats på gårdar med kort eller avbetat gräs och torr jord, då det även uppmätts högre koncentrationer i luften vilket lätt infekterar föl som andas in dammpartiklarna. Det är mängden virulenta bakterier i aerosolen som är avgörande för sjukdomsutvecklingen hos fölen, inte den uppmätta mängden bakterier i jorden. Därmed har

man observerat att sandjord genererar högre luftburna koncentrationer av virulenta *R. equi* än lerjord. Detta då lerjorden har en högre fuktighet.

Även om det främst är i den intracellulära miljön hos makrofagerna som uttryck av *vap*-gener sker, spekuleras det om liknande förhållanden utanför värden skulle kunna främja uppregleringen, överlevnaden och replikationen, även utanför bakteriens huvudvärd. Sandpaddockar har både mindre näring och lägre fuktighet. Det har diskuterats om det lägre näringsinnehållet i sandjord kan hjälpa till att uppreglera *vap*-gener i och med att den dåliga näringstillgången liknar förhållandena i makrofagernas endosomer (Muscatello *et al.*, 2006).

Management för minimera risken för infektion

Genom att göra förebyggande åtgärder i miljön hindras föl i den känsligaste åldern upp till åtta veckor att andas in höga koncentrationer av virulenta *R. equi*. Detta kan tillsammans med bra diagnostiska tester för snabb upptäckt av bakterien, minska prevalensen på gårdar som har bakterien i sin omgivning.

Kontamination av marken

Eftersom föl inte har hunnit bygga upp den anaerobiska tarmflora som vuxna hästar har, innebär det att *R. equi* lättare koloniserar tarmen hos föl upp till åtta veckors ålder. Bakterien är strikt aerob och kan inte föröka sig anaerobt och koloniserar därför inte vuxna hästars tarm (Hughes & Sulaiman, 1987). Bakterieförökningen i det unga fölets tarm innebär att marker där unga föl betar flera år i rad får en hög koncentration av bakterien i marken. Arbete med att forsla bort avföringen i beteshagarna och framförallt i mindre rasthagar, kan vara en del i att förebygga smittan (Prescott, 1987). Förutom detta bör även sjuka föl flyttas till annan hage för att förhindra att bidra till ökade koncentrationer av virulenta *R. equi* (Muscatello *et al.*, 2009).

Kunskap saknas om hur desinfektionsmedel påverkar *Rhodococcus equi*, dock är det känt att bakterien hämmas av både extremt sura och basiska miljöer. Därför skulle desinfektionsmedel som påverkar markens pH kunna minska förekomsten av virulenta *R. equi* (Hughes & Sulaiman, 1987).

Földensiteten

Ett ökat antal föl per hektar ökar risken för infektion av *R. equi*. Många föl på liten yta innebär mycket avföring samt även ofta mer avbetade marker, vilket är till bakteriens fördel med tanke på damm och smittspridning via luften. Gårdar med mycket mark löper större risk då det ofta är fler djur på dessa marker, vilket medför många föl per hektar. Att minska földensiteten på gårdar som är endemiskt drabbade kan därför vara en åtgärd i förebyggande syfte (Chaffin *et al.*, 2003).

Dammkontroll

Då bakterien trivs i torra marker, samt att inandning av virulenta *R. equi* i damm är den främsta infektionsvägen, är arbetet med att förhindra att damm bildas och andas in viktigt. I en studie i Australien observerades att konstbevattning av torra och upptrampade delar av hagen minskade risken för fölen att drabbas av sjukdom (Muscatello, 2012b).

Att hålla föl i hagar på lerjord istället för på sandjord under tiden då de är som mest utsatta för att drabbas av infektion är att föredra eftersom ökad vattenhalt i marken medför minskad aerosolbildning (Muscatello *et al.*, 2006). För att förebygga inandning av bakterien från ströbäddar kan åtgärder vara att minska tiden för uppställning, förbättra ventilationen samt ha noggrann sanering och desinficering av boxar eller liggplatser där sjuka eller behandlade föl vistats (Muscatello, 2012b).

Veterinära förebyggande diagnostiska tekniker

Att tidigt kunna upptäcka att ett föl infekterats med *Rhodococcus equi* är den viktigaste aspekten för att förhindra ökad smitta i maken, minska dödligheten, samt minska kostnaderna för behandlingen. Därför är det viktigt att ha rätt verktyg och tester för att kunna agera i tid. Det har observerats att med hjälp av en tidig diagnos, kunde tiden för antibiotikabehandling minska till under 10 dagar. Rekommenderad antibiotikakur för en pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi* har varit en mellan 4-9 veckor lång och dyr behandling (Muscatello, 2012b).

Användande av ultraljud

På endemiskt drabbade gårdar kan upptäckt av infektion orsakad av *R. equi* göras tidigare med hjälp av upprepade ultraljudsundersökningar varannan vecka på föl mellan 4 och 8 veckors ålder (McCracken & Slovis, 2009). I McCracken och Slovis studie från 2009 om att använda ultraljud som metod för att förhindra *R. equi* infektion beskrivs det hur transtracheal-aspirat och bakteriologisk odling bara gjordes på de första fallen på samma gård, där det visat sig vara *Rhodococcus equi* som var orsaken till sjukdom. Orsaken till att prover för bakteriologiska tester bara togs på de första insjuknade fölen var bland annat ekonomiska anledningar samt infektionsrisken vid provtagningen (McCracken & Slovis, 2009).

Ultraljud anses vara en enkel icke-invasiv metod för att konstatera pneumoni orsakad av *R. equi* (McCracken & Slovis, 2009). Kritik angående att det med ultraljud endast går att se pleuran, utsidan av lungorna och ej djupare, har diskuterats. Dock har det observerats att majoriteten av drabbade föl har lesioner som når ut till pleuran. Det är dock inte patognomont för *R. equi* och det är värt att komma ihåg att hos föl äldre än tre månader kan även andra bakterier vara en orsak till lungabscesser (Ramirez *et al.*, 2004). I McCracken & Slovis studie från 2009 valde de att använda sig av en tiogradig skala för att gradera lesionerna. De som ansågs vara en tvåa eller högre behandlades och behandling avbröts till exempel om en avvikning som varit i graden av en trea hade minskat till en etta. Skulle en behandling visa sig inte ge något resultat eller minskning av storleken på lesionen togs transtracheal-aspirat för att säkerställa att det verkligen rörde sig om *Rhodococcus equi*. Även en resistensbestämning gjordes då. Ultraljudskontroller varannan vecka kan dock vara mycket tidskrävande och svår-applikerat på stora stuterier (McCracken & Slovis, 2009).

Andel vita blodkroppar i blodet

Mätningar av koncentrationen vita blodkroppar hos föl på endemiskt drabbade gårdar gör det möjligt att tidigt upptäcka pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi*. Det har observerats att 70% av de föl utan kliniska symptom men med koncentrationer över 14,000 celler/ μ L utvecklade pneumoni orsakad av *R. equi* under den 6 månaders långa observationsperioden. Även 78% av de föl med koncentrationer över 15,000 celler/ μ L utvecklade pneumoni. Rekommendationen

blev då att ta nya blodprov och utföra en utökad undersökning med bland annat ultraljud en gång i månaden på individer med koncentrationer över 13,000 celler/ μ L (Giguère *et al.*, 2003).

Ett föl med allvarliga kliniska symptom som tyder på pneumoni behöver snabbt börja behandlas. Det kan ta upp till 72 timmar att få bekräftat från laboratoriet att det rör sig om *Rhodococcus equi*. En säker diagnos är av största vikt för att ge fölet optimal behandling. Det är högst troligt att *R. equi* är orsaken till luftvägsproblemen om vita blodkroppskoncentrationen är över 20,000 celler / μ L, fibinogennivåerna i plasma är över 700 mg/dl samt att ultraljud och röntgen visar på lungabscesser (Leclere *et al.*, 2011).

Profylaktiska behandlingar och åtgärder

Hyperimmuniserad plasma

Syftet med att administrera hyperimmuniserad plasma (HIP) till föl som riskerar att infekteras med virulenta *Rhodococcus equi* är att tillföra framförallt antikroppar mot just virulensfaktorerna hos *R. equi*. Detta för att förstärka det antikropsmedierade svaret mot infektionen (Muscatello, 2012b).

Det har observerats att antikroppar mot *vapA* samt *vapC* är de viktigaste komponenterna i HIP, men även cytokiner, komplementfaktorer samt fibronektin är viktiga för försvaret (Hooper-McGrevy *et al.*, 2001). Det finns dock både studier som hävdar att HIP minskar prevalensen, och studier som inte kunnat visa på någon effekt. Dosen, tidpunkten för administrering, fölets medfödda försvar, annat förebyggande arbete på gården samt hur kontaminerad markerna är, är alla faktorer som tros ha betydelse för effekten av HIP. Kvaliteten på den hyperimmuniserade plasman kan också variera beroende på stoet som används som donator, hur är dock inte än klarlagt (Dawson *et al.*, 2010).

Administrering innan fölen har hunnit bli infekterade är viktigt (Chaffin *et al.*, 1991). Då fölen ofta infekteras tidigt i livet är rekommendationen att 1 liter HIP ska ges intravenöst inom de första 24 till 48 timmarna efter födseln (Giguère *et al.*, 2011). En andra dos bör ges 2 till 4 veckor efter födseln. Den lägsta effektiva dosen HIP är svår att fastställa då den beror på många faktorer som till exempel infektionsdosen, fölets motståndskraft, ålder, kön, vikt med mera (Higuchi *et al.*, 1999).

Vaccination av det dräktiga stoet

Studier om vaccination av ston har visat blandade resultat. Tidigare har det inte kunnat påvisats något samband mellan vaccination av stoet och minskad risk för infektion av *Rhodococcus equi* hos föl. Detta trots den ökade koncentrationen specifika antikroppar i kolostrum. Dock har en senare studie visat att ökad förmåga hos neutrofiler att fagocytera opsoniserat material samt ökade nivåer antikroppar mot *vapA* i blodet har en skyddande verkan efter att ha överförts via kolostrum till fölen (Cauchard *et al.*, 2004). I Argentina har tidigare studie visat att vaccinering av ston tillsammans med administrering av HIP gjorde att allvarlighetsgraden och prevalensen pneumonier orsakade av *R. equi* sjönk (Becu *et al.*, 1997).

Vaccinering av det nyfödda fölet

Många försök har gjorts för att ta fram ett vaccin som fungerar mot infektion orsakad av *Rhodococcus equi* (Dawson et al., 2010). Ett vaccin måste vara säkert för användning på så unga föl samt vara verksamt mot bakterien. Vaccin gjorda på traditionella sätt som levande, döda eller attenuerade har visat sig ineffektiva. Mer forskning krävs inom området (Muscatello, 2012b).

Behandling

Behandling av infektion orsakad av *R. equi* måste vara riktad då bakterien är fakultativt intracellulär. Förstahandsvalet är en makrolid i kombination med rifampicin. De makrolider som används är erytromycin, azitromycin eller claritromycin. Fölen kan drabbas av svåra diarréer under behandlingen och måste då hållas under uppsikt. De kan behöva få vätskeersättning mot uttorkningen och förlusten av elektrolyter. Moderstoet måste också hållas under uppsikt under fölets behandling då kraftig diarré orsakad av fölets antibiotikabehandling förekommer (Giguere, 2017).

DISKUSSION

Genom att minska andelen bakterier i marken på endemiskt drabbade gårdar, samt förhindra torra och dammiga beteshagar för föl i den känsligaste åldern, går det att sänka prevalensen av pneumoni orsakad av *Rhodococcus equi* (Prescott, 1987). Har ett föl i åldern 0-8 veckor konstaterats vara drabbad av *R. equi*, bör fölet inte gå tillsammans med andra föl. Anledningen till detta är att upp till 8 veckors ålder kan bakterien kolonisera och föröka sig i det unga fölets tarm som inte hunnit bli helt anaerob än. Det resulterar i att bakterier kan komma ut med avföringen och kontaminera marken ytterligare (Hughes & Sulaiman, 1987).

Det krävs mer studier angående strategier och vilken typ av desinfektionsmedel som skulle kunna användas för att behandla drabbade marker (Hughes & Sulaiman, 1987). Hur detta skulle kunna göras på ett sätt som inte riskerar varken miljön, människors eller fölens hälsa är för mig en intressant fråga. Används medel för att påverka bakterier i marken kommer det troligen påverka även andra bakterier, som antagligen har en funktion utan att orsaka problem för miljö, människor eller hästdjuren.

Ytterligare en strategi för att hålla nere prevalensen av pneumoni orsakad av *R. equi* på drabbade marker kan vara att hålla en lägre densitet föl per yta. Genom att ha färre djur per yta minskar risken att marken blir nedbetad och dammig på grund av avsaknad av gräs på ytlagret. En nedbetad beteshage löper större risk för aerosolbildning med damm och virulenta *R. equi* som virvlar runt i luften och kan infektera fölen (Chaffin et al., 2003). För att motverka att damm bildas med virulenta *R. equi* kan djurhållaren utnyttja konstbevattning för att motverka torra partier med nedtrampat gräs där bakterien trivs (Muscatello, 2012b). Att hålla föl på betesmarker med lerjord under det första känsligaste månaderna i livet kan vara en bra rekommendation om möjligheten finns. Bakterien trivs bättre i torra marker samt risken för dammbildning och aerosol med virulenta *R. equi* minskar (Muscatello et al., 2006). För uppstallade föl kan inandning av höga koncentrationer *R. equi* förhindras genom bra

ventilationen samt genom att vara noga med sanering och desinficering av boxar och liggplatser där sjuka djur har vistats (Muscatello, 2012b).

På stuterier där uppfödaren vet att *R. equi* finns, är undersökning av fölen för att tidigt upptäcka vilka föl som verkar vara drabbade, ett bra sätt att vara steget före en allvarlig sjukdomsutveckling. Ultraljudsundersökningar varannan vecka på föl mellan 4-8 veckors ålder har visat sig resultera i en tidigare upptäckt av drabbade föl (McCracken & Slovis, 2009).

I McCracken och Slovis studie från 2009 gjordes bakteriologisk undersökning endast på de första fölen. Hittade de sedan med hjälp av ultraljud ett föl med tillräckliga förändringar på lungorna behandlades det fölet för *R. equi* infektion utan att ta prov för en bakteriologisk undersökning för säkerställande av att det faktiskt var *R. equi* som var orsaken (McCracken & Slovis, 2009). I Sverige hade antagligen ett bakteriologiskt prov gjorts för alla föl som misstänkts vara drabbade, innan behandling påbörjats. Detta för att antibiotika ska användas riktat mot den bakterie det faktiskt rör sig om, samt för att förhindra överanvändning av antibiotika med tanke på risken för resistens. Ultraljudsundersökningen kan inte säga oss om fölet kommer att klara att rensa ut bakterien av egen kraft eller inte. Den snabba upptäckten kan då bidra till en ökad användning av antibiotika, där det används även i de fallen där fölen skulle klarat att bli friska på egen hand. Ultraljudsundersökning av fölen varannan vecka skulle även medföra en stor kostnad för stuterierna. Dessutom är det arbetskrävande att genomföra dessa undersökningar och skulle antagligen orsaka en del stress i flocken. Det kan diskuteras om kostnaderna för screeningen av fölen skulle väga upp för kostnaderna av en längre behandling av föl där infektionen upptäcks i ett senare stadie. En lösning för stora endemiskt drabbade stuterier skulle kunna vara att investera i en egen ultraljudsmaskin för att själva kunna hålla koll på sina föl i riskzonen. Och vid misstanke om *R. equi* infektion då kontakta veterinären för en full undersökning av fölet.

Att mäta andelen vita blodkroppar i blodet hos fölen kan var ett test som hjälper till att tidigt upptäcka infektion orsakad av *R. equi*. Att utföra ultraljud på individer med över 13,000 celler/ μ L för att följa förloppet kan vara att rekommendera. När andelen vita blodkroppar i blodet är 14,000-15,000 celler/ μ L var det få föl som inte utvecklade pneumoni orsakad av *R. equi* (Giguère *et al.*, 2003). Detta test tillsammans med ultraljud skulle kunna hjälpa hårt drabbade stuterier att få ner behandlingskostnader för långa antibiotikakurer till följd av sen upptäckt och långt utvecklat förlopp av pneumonin.

Trots olika resultat i studier angående användandet av hyperimmuniserad plasma så säger de flesta studierna att det minskar prevalensen av pneumonier orsakade av *R. equi* (Dawson *et al.*, 2010). Det är dock en dyr behandling.

Vaccinering av det dräktiga stoet kan ge minskad risk för infektion av *Rhodococcus equi*, fler studier måste dock genomföras. Cauchard *et al.* (2004) hade inte så många djur med i försöket, vilket kan vara en nackdel för att det ska kunna dras några säkra statistiska slutsatser av studien, även om den visade på ett ökat skydd mot bakterien. Däremot har studier visat att en kombination av administrering av HIP samt vaccination av stoet har minskat prevalens och allvarlighetsgraden av pneumonierna (Becu *et al.*, 1997).

Att vi i Sverige inte har lika stora problem med denna bakterien som andra delar i världen beror till stor del på vårt klimat och långa vintermånader. Vi har blöta höstar, kalla vintrar samt blöta vårar. Eftersom bakterien trivs bäst i torra marker, optimala tillväxttemperaturen är 37°C samt att virulensen uttrycks bäst i temperaturer mellan 34-41°C, så har vi inte de mest optimala förhållandena för *R. equi* i Sverige. I Sverige bedrivs inte uppfödning i samma utsträckning som till exempel i USA eller Australien där det bedrivs stuterier för galoppörer. Vi har inte lika många djur per hektar som de stora stuterierna har vilket innebär att gräset inte skadas i beteshagarna i samma utsträckning och därmed får vi inte lika mycket damm och aerosolbildning. Kanske har vi också mycket *R. equi* i marken, men troligen inte så stor andel virulenta stammar som i länder med ett något torrare och varmare klimat.

Efter denna litteraturstudie kan jag konstatera att det inte finns en självklar profylaktisk åtgärd som sänker prevalensen eller skyddar fölen helt från infektion. Däremot kan en kombination av arbete med att minska smittrycket i marken, undersökningar och tester för att tidigt upptäcka drabbade föl samt administrering av HIP och vaccination av dräktiga ston bidra till minskad prevalens och allvarlighetsgrad av pneumonier orsakade av *Rhodococcus equi* på endemiskt drabbade gårdar.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Agrawal, R., Pande, N., Katoch, R., Yadav, A. & Singh, A. (2009). Rhodococcus Equi Infection in Horses: An Overview. *Veterinary Practitioner*, 10(2), pp 187–188.
- Barton, M. D. & Hughes, K. L. (1984). Ecology of Rhodococcus equi. *Veterinary microbiology*, 9(1), pp 65–76.
- Becu, T., Polledo, G. & Gaskin, J. M. (1997). Immunoprophylaxis of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Veterinary microbiology*, 56(3–4), pp 193–204.
- Bicudo Cesar, F. (2018). RHODOCOCCUS EQUI IN THE FOAL–IMPROVING DIAGNOSTIC AND PREVENTION MEASURES.
- Cauchard, J., Sevin, C., Ballet, J.-J. & Taouji, S. (2004). Foal IgG and opsonizing anti-Rhodococcus equi antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary microbiology*, 104(1–2), pp 73–81.
- Chaffin, M. K., Cohen, N. D. & Martens, R. J. (2003). Evaluation of equine breeding farm characteristics as risk factors for development of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(4), pp 467–475.
- Chaffin, M. K., Martens, R. J., Martens, J. G. & Fiske, R. A. (1991). Therapeutic effects of immune plasma in foals with Rhodococcus equi pneumonia. *Equine veterinary journal*, 23(S12), pp 23–29.
- Dawson, T. R. M. Y., Horohov, D. W., Meijer, W. G. & Muscatello, G. (2010). Current understanding of the equine immune response to Rhodococcus equi. An immunological review of R. equi pneumonia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(1–2), pp 1–11.
- Giguere, S. (2017). Treatment of Infections Caused by Rhodococcus equi. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice*, 33(1), pp 67–+.
- Giguère, S., Cohen, N. D., Keith Chaffin, M., Slovis, N. M., Hondalus, M. K., Hines, S. A. & Prescott, J. F. (2011). Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by R hodococcus equi in Foals. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(6), pp 1209–1220.
- Giguère, S., Gaskin, J. M., Miller, C. & Bowman, J. L. (2002). Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by Rhodococcus equi in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(1), pp 59–63.
- Giguère, S., Hernandez, J., Gaskin, J., Miller, C. & 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. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(6), pp 775–781.
- Giguere, S., Hondalus, M. K., Yager, J. A., Darrah, P., Mosser, D. M. & Prescott, J. F. (1999a). Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in

- intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 67(7), pp 3548–3557.
- Giguere, S. & Prescott, J. F. (1997). Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, 56(3–4), pp 313–334.
- Giguère, S., Wilkie, B. N. & Prescott, J. F. (1999b). Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and immunity*, 67(10), pp 5041–5047.
- Higuchi, T., Arakawa, T., Hashikura, S., Inui, T., Senba, H. & Takai, S. (1999). Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 46(9), pp 641–648.
- Hooper-McGrevy, K. E., Giguere, S., Wilkie, B. N. & 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. *American journal of veterinary research*, 62(8), pp 1307–1313.
- Hughes, K. L. & Sulaiman, I. (1987). The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. *Veterinary microbiology*, 14(3), pp 241–250.
- Johns I (2013). Management of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Veterinary Medicine : Research and Reports*, 2013(default), pp 49–59.
- Kanaly, S. T., Hines, S. A. & Palmer, G. H. (1996). Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. *Infection and immunity*, 64(4), pp 1126–1132.
- Leclere, M., Magdesian, K. G., Kass, P. H., Pusterla, N. & Rhodes, D. M. (2011). Comparison of the clinical, microbiological, radiological and haematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria. *The Veterinary Journal*, 187(1), pp 109–112.
- Martens, R. J., MARTENS, J. G., Fiske, R. A. & HIETALA, S. K. (1989). *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine veterinary journal*, 21(4), pp 249–255.
- McCracken, J. L. & Slovis, N. M. (2009). Use of thoracic ultrasound for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia on endemic farms., 2009. pp 38–44.
- McTaggart, C., Yovich, J. V., Penhale, J. & Raidal, S. L. (2001). A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric techniques. *Research in Veterinary Science*, 71(1), pp 73–79.
- Meijer, W. G. & Prescott, J. F. (2004). *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research*, 35(4), pp 383–396.

- Muscatello, G. (2012a). Rhodococcus equi pneumonia in the foal - Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *Veterinary Journal*, 192(1), pp 20–26.
- Muscatello, G. (2012b). Rhodococcus equi pneumonia in the foal - Part 2: Diagnostics, treatment and disease management. *Veterinary Journal*, 192(1), pp 27–33.
- Muscatello, G., Anderson, G. A., Gilkerson, J. R. & Browning, G. F. (2006). Associations between the ecology of virulent Rhodococcus equi and the epidemiology of R-equi pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), pp 6152–6160.
- Muscatello, G., Gilkerson, J. R. & Browning, G. F. (2009). Detection of virulent Rhodococcus equi in exhaled air samples from naturally infected foals. *Journal of clinical microbiology*, 47(3), pp 734–737.
- Pargass, I. S., Wills, T. B., Davis, W. C., Wardrop, K. J., Alperin, D. C. & Hines, S. A. (2009). The influence of age and Rhodococcus equi infection on CD1 expression by equine antigen presenting cells. *Veterinary immunology and immunopathology*, 130(3–4), pp 197–209.
- Patton, K. M., McGuire, T. C., Hines, M. T., Mealey, R. H. & Hines, S. A. (2005). Rhodococcus equi-specific cytotoxic T lymphocytes in immune horses and development in asymptomatic foals. *Infection and immunity*, 73(4), pp 2083–2093.
- Prescott, J. F. (1987). Epidemiology of Rhodococcus equi infection in horses. *Veterinary microbiology*, 14(3), pp 211–214.
- Prescott, J. F., Travers, M. & Yager-Johnson, J. A. (1984). Epidemiological survey of Corynebacterium equi infections on five Ontario horse farms. *Canadian journal of comparative medicine*, 48(1), p 10.
- Prescott, J., Machangu, R., Kwiecien, J. & Delaney, K. (1989). Prevention of Foal Mortality Due to Rhodococcus-Equi Pneumonia on an Endemically Affected Farm. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*, 30(11), pp 871–875.
- Ramirez, S., Lester, G. D. & Roberts, G. R. (2004). Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with Rhodococcus equi pneumonia. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 45(2), pp 172–176.
- Ren, J. & Prescott, J. F. (2003). Analysis of virulence plasmid gene expression of intramacrophage and in vitro grown Rhodococcus equi ATCC 33701. *Veterinary microbiology*, 94(2), pp 167–182.
- Reuss, S. M., Chaffin, M. K. & Cohen, N. D. (2009). Extrapulmonary disorders associated with Rhodococcus equi infection in foals: 150 cases (1987–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(7), pp 855–863.
- Sheoran, A. S., Timoney, J. F., Holmes, M. A., Karzenski, S. S. & Crisman, M. V. (2000). Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *American journal of veterinary research*, 61(9), pp 1099–1105.

- Stoughton, W., Poole, T., Kuskie, K., Liu, M., Bishop, K., Morrissey, A., Takai, S. & Cohen, N. (2013). Transfer of the Virulence-Associated Protein A-Bearing Plasmid between Field Strains of Virulent and Avirulent *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(6), pp 1555–1562.
- Takai, S., Fukunaga, N., Kamisawa, K., Imai, Y., Sasaki, Y. & Tsubaki, S. (1996). Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. *Microbiology and immunology*, 40(8), pp 591–594.
- Takai, S., Narita, K., Ando, K. & Tsubaki, S. (1986). Ecology of *Rhodococcus (corynebacterium) Equi* in Soil on a Horse-Breeding Farm. *Veterinary Microbiology*, 12(2), pp 169–177.
- Williams, S. T., Shameemullah, M., Watson, E. T. & Mayfield, C. I. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil—vi. the influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry*, 4(2), pp 215–225.