

**Aus dem Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem Gluck Equine Research Center
Department of Veterinary Science
University of Kentucky, Lexington, KY, USA**

**Epizootiologische, klinische und immunologische Merkmale einer
experimentell erzeugten
Druse-Epizootie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin**

**Vorgelegt von
Beatrice Nesch
Tierärztin aus Kingston, NY, USA**

**Berlin 1996
Journal Nr. 1932**

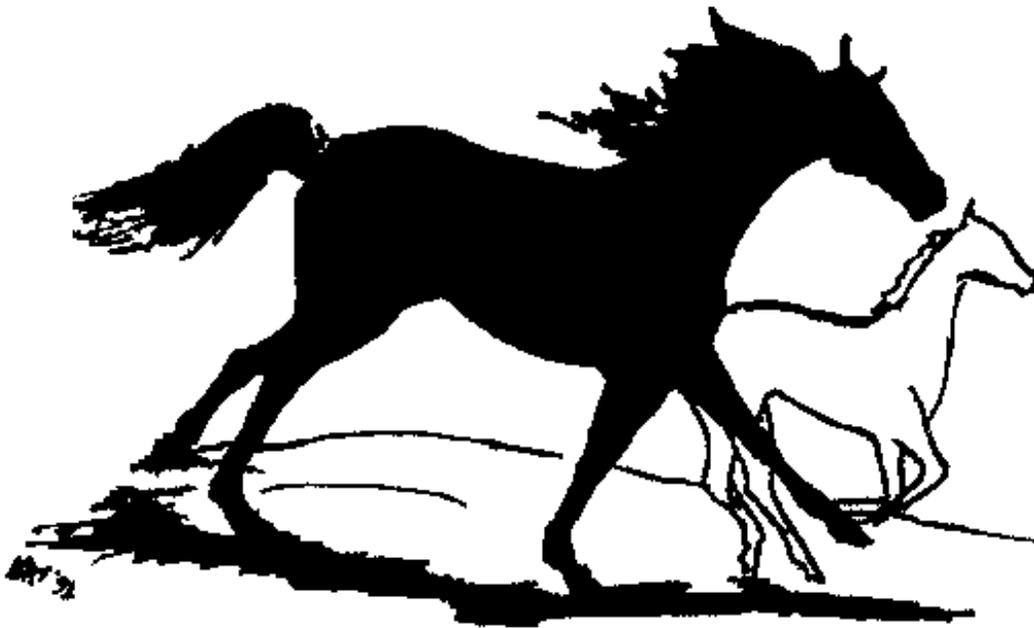
**Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K. Hartung

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. S. Grund

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Keller

Tag der Promotion: 23. Februar 1996



Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

2. Literaturübersicht 2

2.1. Definition der Druse 2

2.1.1. Epizootiologie 2

2.1.2. Symptomatik 3

2.1.3. Komplikationen 4

2.1.4. Diagnose 6

2.1.5. Therapie und Kontrolle 7

2.2. Geschichte 9

2.3. Ätiologie 10

2.4. Ausscheidung des Erregers 12

2.5. Tenazität des Erregers 13

2.6. Virulenzfaktoren des Erregers 14

2.6.1. Hyaluronsäure-Kapsel 14

2.6.2. M-Protein 15

2.6.3. Peptidoglycan 17

2.6.4. IgG bindender Rezeptor 17

2.6.5. Streptolysin O 18

2.6.6. Streptokinase 18

2.6.7. Cytotoxin 19

2.7. Immunität 19

2.7.1. Aktive Immunität 19

2.7.1.1. Systemische Immunität 19

2.7.1.2. Lokale Immunität 24

2.7.2. Passive Immunität 26

2.7.3. Zelluläre Immunität 27

2.7.4. Dauer der Immunität 29

3. Problemstellung 30

4. Material und Methoden 32

4.1. Tiermaterial und Versuchsplan 32

4.2. Intranasale Impfung 33

4.3. Experimentelle Inokulation mit virulentem S. equi 34

4.4. Klinische Untersuchungen 34

4.5. Entnahme und Verarbeitung von Proben 35

4.6. Bakteriologische Untersuchungen 37

4.7. Immunologische Untersuchungen 37

4.7.1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 37

4.7.1.1. Gewinnung und Reinigung von S. equi M-Protein 37

4.7.1.2. Überprüfung der Reinheit des S. equi M-Proteins 40

4.7.1.3. ELISA für M-Protein-spezifisches Serum Immunglobulin G (IgG) 42

4.7.1.4. ELISA für M-Protein-spezifisches IgG und IgA der

Nasengangsspülproben 44

4.7.1.5. Bestimmung der M-Protein-spezifischen IgA-Aktivität der

Nasengangsspülproben 45

4.7.1.6. Bestimmung der M-Protein-spezifischen IgG-Aktivität der

Nasengangsspülproben 46

4.7.1.7. ELISA für M-Protein-spezifisches IgM der Nasengangsspülproben 47

4.7.2. Bakterizidie-Test 47

4.7.3. Opsonisierungs-Test 49

4.7.4. Statistische Berechnungen 50

5. Ergebnisse 51

5.1. Vorversuch 51

5.2. Hauptversuch 51

5.2.1. Epizootiologische Daten 51

5.2.1.1. Inkubationszeit 51

5.2.1.2. Morbidität, Krankheitsverlauf und -dauer 53

5.2.1.3. Ausscheidung des Erregers 53

5.2.1.4. Tenazität des Erregers 55

5.2.2. Klinische Daten 55

5.2.2.1. Inzidenz der verschiedenen Symptome der Druse 55

5.2.2.2. Auftreten und Dauer der Symptome	56
5.2.2.3. Depression	57
5.2.2.4. Fieber	57
5.2.2.5. Nasenausfluß	58
5.2.2.6. Befunde der Kopflymphknoten	59
5.2.2.7. Lokalisation und Häufigkeit von Abszessen	60
5.2.2.8. Komplikationen	60
5.2.3. Immunologische Daten	61
5.2.3.1. Reinheit des S. equi M-Proteins	61
5.2.3.2. M-Protein-spezifisches Serum IgG	62
5.2.3.3. M-Protein-spezifisches IgG und IgA der Nasengangsspülproben	64
5.2.3.4. Konzentration und M-Protein-spezifische Aktivität des IgG und IgA der Nasengangsspülproben	66
5.2.3.5. M-Protein-spezifisches IgM der Nasengangsspülproben	67
5.2.3.6. Bakterizide Wirkung der Seren	67
6. Diskussion	70
6.1. <u>Vorversuch</u>	70
6.2. <u>Hauptversuch</u>	73
6.2.1. Epizootiologische Daten	73
6.2.1.1. Inkubationszeit, Morbidität, Krankheitsverlauf und -dauer	73
6.2.1.2. Ausscheidung des Erregers	75
6.2.1.3. Tenazität des Erregers	77
6.2.2. Klinische Daten	78
6.2.3. Immunologische Daten	80
7. Schlußfolgerungen	87
8. Zusammenfassung	88
9. Summary	90
10. Literaturverzeichnis	92
11. Anhang	120
11.1. <u>Tabellen, Listen und Abbildungen</u>	120
11.2. <u>Nährböden</u>	135
11.3. <u>Lösungen und Puffer</u>	136
11.3.1. Entnahme und Verarbeitung von Nasengangsspülproben	136
11.3.2. Agarose-Gel-Elektrophorese	136
11.3.3. SDS-PAGE	137
11.3.4. Western-Blotting	138
11.3.5. ELISA	139

Abkürzungen

AA/BA Acrylamid/Bisacrylamid

APS Ammoniumpersulfat

CNA Colistin-Nalidixin-Agar

EDTA Ethylendiamin-Tetraacetat

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

Fab antigenbindendes Fragment der Immunglobuline

Fc kristallines Fragment der Immunglobuline

HBSS Hank's Balanced Salt Solution

HMW-Marker High Molecular Weight Marker

IgA Immunglobulin A

IgG Immunglobulin G

IgM Immunglobulin M

KBE koloniebildende Einheiten

kD kiloDalton

log-Phase logarithmische Vermehrungsphase

OPD ortho-Phenylendiamin

PAGE Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PBS phosphatgepufferte Kochsalzlösung

RT Raumtemperatur

S Standardabweichung

SDS Natriumdodecylsulfat

S. equi Streptococcus equi subspecies equi

S. equisimilis Streptococcus equisimilis

SFM Standardfehler des Mittelwertes

sIgA sekretorisches IgA

S. zooepidemicus Streptococcus equi subspecies zooepidemicus

TEMED Tetramethylethylendiamin

THB Todd-Hewitt-Bouillon mit 0,2% Hefeextraktzusatz

well Mikrotiterplattenvertiefung

xg multipliziert mit der Erdbeschleunigung (9,81 m/s²)

1. Einleitung

Die Druse der Pferde stellt eine durch Streptococcus equi hervorgerufene, hoch ansteckende Infektionskrankheit dar, die in der Regel durch eine eitrige Entzündung der Lymphknoten des Kopfes gekennzeichnet ist. Zur Zeit der militärischen Nutzung der Pferde kam der Druse eine große Bedeutung zu. Aufgrund der hohen Morbidität, der großen Konditionsverluste erkrankter Tiere und der Möglichkeit schwerer Komplikationen im Rahmen der Druse handelt es sich auch heute noch um eine gefürchtete Erkrankung mit hohen wirtschaftlichen Einbußen. Mit seuchenartigen Ausbrüchen und großen Verlusten ist bei hochempfindlichen Jungtierherden und somit insbesondere auf Gestüten zu rechnen. Trotz zahlreicher Immunisierungs-versuche in den letzten 50 Jahren, gelang es bisher nicht, Pferden einen wirksamen Immunschutz gegen die Druse zu vermitteln. Neueren Untersuchungen zufolge könnte der Impferfolg auf

das Fehlen eines lokalen Immunschutzes am Eintrittsort des Erregers zurückzuführen sein. Die Entwicklung eines wirksamen Druse-Impfstoffes erfordert zunächst ein besseres Verständnis der durch eine *S. equi*-Infektion stimulierten immunologischen Vorgänge.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die lokale und systemische humorale Immunantwort junger Pferde nach aktiver lokaler Immunisierung mit einem avirulenten *S. equi*-Stamm und im Verlauf eines experimentell erzeugten Druseausbruches untersucht, mit dem Ziel, einen möglichen Zusammenhang zwischen Antikörpergehalt und Infektions- bzw. Krankheitsschutz aufzudecken. Zusätzlich wurden während des Druseausbruches epizootiologische und klinische Daten gesammelt, um weitergehende Einsicht in die Epizootiologie und Infektionsdynamik der Druse in einer Herde zu gewinnen.

2. Literaturübersicht

2.1. Definition der Druse

2.1.1. Epizootiologie

Die Druse (*Adenitis equorum*, *Coryza contagiosa equorum*) ist eine weltweit beschriebene, durch *Streptococcus equi* verursachte, hoch ansteckende Infektionskrankheit der Equiden. Die Erkrankung tritt bei Pferden jeder Altersgruppe auf (NEES 1994), befällt jedoch am häufigsten Pferde bis zu einem Alter von 5 Jahren (BEER 1987, SWEENEY et al. 1987a). Jüngere Pferde zeigen zudem in der Regel einen schwereren Krankheitsverlauf (FALLON 1969). Transportstreß, Kältestreß sowie schlechte Haltungs- und Fütterungsbedingungen führen zu einer erhöhten Krankheitsbereitschaft und sind als Risikofaktoren zu werten (EBERT 1969, GERBER 1982, TIMONEY 1993a). Eine Rassedisposition scheint nicht zu bestehen (REIF 1979, NEES 1994). KOGER (1967) und NEES (1994) beschreiben die zyklische Häufung von Druseerkrankungen im Abstand von etwa 5 Jahren. Diesem Phänomen könnte eine gesteigerte Erregervirulenz oder Empfänglichkeit der Pferdepopulation zugrunde liegen. Eine gesteigerte Empfänglichkeit ist bei Erstkontakt mit dem Erreger und daher insbesondere bei jungen Pferdepopulationen gegeben, könnte allerdings auch bei älteren Tieren im Sinne eines Nachlassens der Immunität nach überstandener Druse vorliegen (BRYANS und MOORE 1972). Morbiditätsraten von bis zu 100% bei empfänglichen Tieren wurden beschrieben (FORD und LOKAI 1980). Die Mortalität ist in der Regel gering (0-3%) (TODD 1910), kann bei gehäuften Auftreten von Komplikationen jedoch bis etwa 10% (RICHTERS 1929, FORD und LOKAI 1980) oder sogar 15% (WIRTH und DIERNHOFER 1950) betragen. Die Übertragung erfolgt in der Regel durch Kontakt- oder Tröpfcheninfektion sowohl direkt zwischen Tieren, als auch indirekt durch kontaminierte Gegenstände jeglicher Art (REIF 1979, GEORGE et al. 1983). Als Infektionsquelle sind neben klinisch kranken Tieren auch Pferde in der Inkubationszeit und stumme Ausscheider nach überstandener Erkrankung zu nennen. Laut TIMONEY (1993a) sind diese stummen Ausscheider als Ursache der Erregerpersistenz in einem Bestand zu sehen.

2.1.2. Symptomatik

Nach Eintritt des Erregers hauptsächlich durch Rachenschleimhaut und Tonsillen (PFEIFFER und MÜLLER 1912, LÜHRS 1927, TIMONEY 1988a), aber auch durch die Nasenschleimhaut (SCHÜTZ 1888, RICHTERS 1929), gelangt dieser auf lymphatischem Wege zu den regionalen Lymphknoten (TODD 1910). Die Inkubationszeit bei natürlicher Infektion wird von verschiedenen Autoren mit 2-6 (SWEENEY 1987a, TAYLOR 1992), 2-10 (WILSON 1988), 3-6 (SONEA 1987), 3-8 (TODD 1910, YELLE 1987), 3-14 (MAHAFFEY 1962, TIMONEY 1993a, AMES 1995), 4-8 (FRIEDBERGER und FRÖHNER 1892, CLABOUGH 1987) und 5-7 (KELLER und JAESCHKE 1984) Tagen angegeben. Erste Krankheitszeichen bestehen aus zumeist hohem Fieber (HANCKE 1931, GERBER 1982, KNIGHT et al. 1975, NEES 1994), gelegentlichem Husten (TIMONEY 1993a, NEES 1994), Depression, Anorexie, seromucösem Nasenausfluß und einer schmerzhaften Schwellung der Mandibular-, Retropharyngeal- und/oder Parotislymphknoten (KELLER und JAESCHKE 1984). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es in den meisten Fällen zu mucopurulentem Nasenausfluß und zur Bildung von Abszessen in den betroffenen Lymphknoten (BAMBAUER 1934, NEES 1994). Häufig treten Atembeschwerden (NEES 1994) sowie Schluckbeschwerden und Regurgitieren (GRATZL 1933, NEES 1994) auf und die Tiere zeigen eine unphysiologisch gestreckte Kopfhaltung (KELLER und JAESCHKE 1984, TIMONEY 1993a). Die Abszesse der Kopflymphknoten entleeren sich in der Regel in der zweiten Woche der Erkrankung und heilen zumeist komplikationslos aus (BRYANS und MOORE 1972). Anschließend tritt in den meisten Fällen eine rasche, vollständige Genesung ein (TIMONEY 1993a).

2.1.3. Komplikationen

Zahlreiche Komplikationen im Verlauf oder als Folge der Druse mit Komplikationsraten von 4% (PICHE 1984), 18% (NEES 1994) und 20% (SWEENEY et al. 1987b, WILSON 1988) wurden beschrieben. Abszesse der retropharyngealen Lymphknoten können durch Kompression des Kehlkopfes oder der Luftröhre zur akuten, hochgradigen, eine Tracheotomie erfordernden Atemnot führen, was der Erkrankung den Namen "strangles" im englischen Sprachraum verlieh (FORD und LOKAI 1980, TIMONEY 1993a). Laut HANCKE (1931) und NEES (1994) handelt es sich bei der hochgradigen Atemnot um die häufigste Komplikation im Rahmen der Druse.

Durch die im normalen Verlauf der Druse auftretende Entleerung medialer retropharyngealer Lymphknotenabszesse in einen oder beide Luftsäcke (GRATZL 1933, NEES 1994) kommt es zum Luftsackempyem (KNIGHT et al. 1975), das in etwa 3,2% der Drusefälle die Bildung von Luftsackkonkrementen zur Folge hat (NEES 1994). In seltenen Fällen führt das Luftsackempyem durch Schädigung benachbarter Nerven zu Fazialisnervnlähmung (SARNOWSKI 1927), Horner's Syndrom oder Dysphagie (SWEENEY et al. 1987c, AMES 1995). Letztere birgt die Gefahr der Aspirationspneumonie (GRATZL 1933), die zusammen mit den auf hämatogenem Weg entstandenen Bronchopneumonien die häufigste Todesursache im Rahmen der Druse darstellt (SWEENEY et al. 1987c, NEES 1994).

Bei der sogenannten "wandernden Druse" (bastard strangles) kommt es durch lymphogene und hämatogene Ausbreitung des Erregers zur metastatischen Abszedierung in den verschiedensten Organen (FRIEDBERGER und FRÖHNER 1892, BRYANS und MOORE 1972). Am häufigsten finden sich Metastasen im Gehirn (RAPHEL 1982, NEES 1994) und in der Bauchhöhle und dort insbesondere im Mesenterium (NEES 1994). Aber auch Organe wie die Lunge, Leber, Milz und Nieren können betroffen sein (COHRS 1941, SWEENEY et al. 1987c, FORD und LOKAI 1980). Abszesse wurden weiterhin in der Bauchspeicheldrüse, im Skrotum (FRIEDBERGER und FRÖHNER 1892), im Myokard (FORD und LOKAI 1980), periorbital (SWEENEY et al. 1987b), in den Periproktalymphknoten (KELLER und JAESCHKE 1984, PICHÉ 1984), Halslymphknoten (PICHÉ 1984), cranialen mediastinalen Lymphknoten (RIGG et al. 1985) und an den Halswirbeln (ROONEY 1979) beobachtet. Auch Metastasierung in die Gelenke wurde beschrieben (NEES 1994). Abszedierung der medialen retropharyngealen Lymphknoten (NEES 1994), der cranialen Halslymphknoten (BRYANS und MOORE 1972, TIMONEY 1993a) oder der cranialen Mediastinallymphknoten (RIGG et al. 1985) kann bei manchen Pferden durch Druckatrophie des Nervus laryngeus recurrens zum Kehlkopfpeifen führen (BRYANS und MOORE 1972). Unter den üblichen Haltungsbedingungen kommt es nur selten zur wandernden Druse. In einem Bestand mit extrem schlechten Haltungsbedingungen und fehlerhaftem Management wurden jedoch in 10% der Drusefälle innere Abszesse nachgewiesen (FORD und LOKAI 1980). Mit Mesenterialabszessen ist in weniger als 1% aller Drusefälle zu rechnen (WILSON 1988, NEES 1994).

Myokarditis ist eine weitere mögliche Komplikation der Druse (FORD und LOKAI 1980, SWEENEY et al. 1987c) und kann zum plötzlichen Tod durch Herzversagen führen. Bedeutende EKG-Veränderungen wurden bei Pferden in der akuten Phase (BERGSTEN und PERSSON 1966) und der Erholungsphase der Erkrankung (BRYANS et al. 1964) beobachtet. BERGSTEN und PERSSON (1966) raten deshalb zur Anfertigung eines Elektrokardiogrammes vor Aufnahme des Trainings nach überstandener Druse. Es wurde bisher nicht geklärt, ob es sich bei der Myokarditis um ein immunpathologisch oder toxisch bedingtes Phänomen handelt (TIMONEY 1993a).

Die Blutfleckenkrankheit (Morbus maculosus, Purpura hemorrhagica) ist eine zumeist bei erwachsenen Pferden auftretende (SWEENEY et al. 1987c, NEES 1994), in etwa 20% der Fälle fatale Komplikation (GERBER 1982, NEES 1994), die bei ungefähr 1-2% der Pferde etwa 2 bis 4 Wochen nach der akuten Druse in Form einer leukozytoklastischen Vaskulitis in Erscheinung tritt (TIMONEY 1993a). Der Nachweis von Immunkomplexen bestehend aus Immunglobulin A (IgA) und S. equi M-Protein im Serum erkrankter Tiere läßt vermuten, daß es sich um ein immunpathologisches Geschehen handelt (GALÁN und TIMONEY 1985a).

Weitere seltene Komplikationen im Rahmen der Druse sind das Auftreten von Oberkieferhöhlenempyemen und Fisteln (NEES 1994).

Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen periodischer Augenentzündung und Druse ist in manchen Fällen nicht auszuschließen (RICHTERS 1930, NEES 1994).

2.1.4. Diagnose

Die Diagnose der Druse beruht auf der Anwesenheit der klassischen Symptome der Erkrankung, insbesondere dem Auftreten von Fieber und der Anschwellung der Kopflymphknoten mit anschließender Abszedierung (SWEENEY et al. 1987a). Nasenausfluß tritt nicht bei allen Tieren in Erscheinung (AMES 1995). Da in vielen Fällen eine ausschließliche Abszedierung der medialen retropharyngealen Lymphknoten in einen oder beide Luftsäcke vorliegt (NEES 1994) und diese häufig durch alleinige klinische Untersuchung nicht diagnostiziert werden kann (WIRTH 1934, GERBER 1982), hat sich der Einsatz eines Laryngoskops zur Untersuchung der retropharyngealen Lymphknoten und der Luftsäcke als diagnostisches Hilfsmittel bewährt (KELLER und JAESCHKE 1984, NEES 1994). Ersatzweise können Veränderungen der Luftsäcke und der retropharyngealen Lymphknoten auch röntgenologisch dargestellt werden (KELLER und JAESCHKE 1984, NEES 1994).

Labordiagnostische hämatologische Befunde bestehen aus einer hochgradigen Neutrophilie (bis zu 30.000/l) und erhöhtem Serumfibrinogengehalt (> 0.5 g/dl) (WILSON 1988, TIMONEY 1993a, AMES 1995). Als weitere Leitsymptome gelten die typischen Veränderungen des roten Blutbildes, in Form einer Anämie und einer beschleunigten Blutkörperchen-Senkungsreaktion mit ausgeprägter Schleier-senkung (KELLER und JAESCHKE 1984).

In vielen Fällen gelingt die Isolierung von S. equi aus Luftsackproben (NEES 1994), Nasen-, Rachen-, oder Abszessstufferproben (SWEENEY et al. 1987a). Die Identifizierung von S. equi und Differenzierung von anderen β -hämolyisierenden Pferdestreptococcen beruht auf dessen Unfähigkeit Lactose, Sorbitol und Trehalose zu fermentieren (BAZELEY und BATTLE 1940). GRANT et al. (1993) konnten allerdings bei atypischen S. equi-Stämmen die Fermentation von Lactose und Trehalose nachweisen, was die Gefahr der Fehldiagnose als S. equisimilis birgt. Die Miteinbeziehung von Ribose in den Fermentationstest ermöglicht ihrer Meinung nach eine eindeutige Unterscheidung von atypischen S. equi-Stämmen von S. equisimilis.

Die wandernde Druse ist aufgrund der Vielzahl möglicher Symptome in Abhängigkeit der betroffenen Organsysteme schwer zu diagnostizieren. Depression, Gewichtsverlust, wiederholte Kolikanfälle und Fieberschübe, sowie Neutrophilie (HOFFERBER 1941, NEES 1994), Anämie, erhöhter Serumfibrinogen- und -Globulingehalt deuten auf das Vorliegen eines Abdominalabszesses hin (RUMBAUGH et al. 1978, WILSON 1988).

2.1.5. Therapie und Kontrolle

Bezüglich der wirksamsten Behandlungsmethode gegen die Druse bestehen auch heute noch Meinungsverschiedenheiten, insbesondere wenn es um den Einsatz von Antibiotika geht. BRYANS und MOORE (1972) vermuten, daß die Anwendung von Penicillin bei Pferden mit in Reifung befindlichen Abszessen zu einer negativen Beeinflussung der Immunantwort führt und dadurch eine erhöhte Gefahr metastatischer Abszedierung besteht. BAKER (1983), PICHÉ (1984) und NEES (1994) konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen antibiotischer Therapie und dem Auftreten von Drusemetastasen finden. WILSON (1988) sieht die Gefahr der wandernden Druse und der verzögerten Abszeßreifung bei unzureichender Dosierung und Behandlungsdauer. EBERT (1969) nimmt an, daß Antibiotika die Reifung und den Durchbruch von Abszessen verzögern. Eine ähnliche Meinung wird auch von ZELLER (1976) vertreten, der die Entstehung chronischer Lymphknotenabszesse im Kopfbereich als Folge einer falsch durchgeführten Antibiotikabehandlung sieht und folgendes konstatiert: "Eine antibiotische Allgemeinbehandlung bei der Druse führt nicht zur Heilung, sondern wir produzieren ein chronisch krankes Tier." SWERCZEK (1980), LEEMANN (1991), TIMONEY (1993a) und NEES (1994) raten vom Antibiotikaeinsatz bei in Reifung befindlichen Abszessen ab, da sie die Gefahr der Unterbrechung des Heilungsverlaufes und der Krankheitsverlängerung sehen. MAHAFFEY (1962) und EVERS (1968) sehen ein mögliches Einsatzgebiet der Antibiotika im Rahmen der Prophylaxe oder im Frühstadium der Erkrankung. Die frühzeitige Therapie mit Furaltadone führte bei experimentell infizierten Pferden zu einem milderem Verlauf der Erkrankung mit verkürzter Erkrankungs- und Erholungsphase (EVERS 1968). Laut TIMONEY (1993a) kann die Infektion durch antibiotische Therapie innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Auftreten von Fieber in der Regel beseitigt werden. Beim prophylaktischen Einsatz von Antibiotika muß bedacht werden, daß eine Immunantwort verhindert wird und das Tier nach Absetzen der Prophylaxe hochempfindlich für die Infektion ist (PICHÉ 1984, SWEENEY et al. 1987c). FORD und LOKAI (1980) sehen die Drainage der Abszesse und eine systemische antimikrobielle Therapie als ausreichende Maßnahmen bei einer unkomplizierten Druse. Andere Autoren sind der Meinung, daß man in unkomplizierten Fällen der Druse ihren Lauf lassen sollte und Antibiotika lediglich beim Auftreten von Komplikationen indiziert sind (GERBER 1982, CLABOUGH 1987, TIMONEY 1993a, NEES 1994). SWEENEY et al. (1987a) schlagen den Einsatz von Penicillin bei exponierten Pferden, Pferden in der Anfangsphase der Erkrankung und bei Pferden mit ernsthaftem oder kompliziertem Verlauf der Druse, einschließlich metastatischer Abszedierung, vor.

Allgemein anerkannte Maßnahmen im Rahmen der Druse sind die sofortige Absonderung kranker und exponierter Tiere, optimierte Haltungs- und Fütterungsbedingungen, die Beschleunigung der Abszeßreifung durch warme Umschläge und hyperämisierende Salben sowie die Spaltung reifer Abszesse und nachfolgende regelmäßige Spülung mit desinfizierenden Lösungen (SWEENEY et al. 1987a, WILSON 1988, TAYLOR 1992, AMES 1995). Neben der Förderung des Eiterabflusses durch Füttern und Tränken vom Boden aus, sollten zur Beschleunigung des Heilungsprozesses und Verhinderung der Konkrementbildung regelmäßige Luftsackspülungen mit milden Desinfektionslösungen durchgeführt werden (GRATZL 1933, NEES 1994). Kontrollmaßnahmen bestehen in Hygiene, Reinigung und Desinfektion kontaminierter Ställe und Gegenstände (CLABOUGH 1987), Isolierung erkrankter und rekonvaleszenter Tiere und in einer etwa 2- bis 3-wöchigen Quarantäne von Neuzugängen (WIRTH und DIERNHOFER 1950, YELLE 1987, AMES 1995). SWEENEY et al. (1989) sehen die Gefahr der anhaltenden Erregerausscheidung durch erkrankte Tiere und empfehlen deren Absonderung bis zu 5 Wochen nach Verschwinden der klinischen Symptome. Drei kulturnegative Nasentupferproben im Abstand von etwa einer Woche sind ihrer Meinung nach erforderlich, um ein Pferd frei von *S. equi* zu erklären.

2.2. Geschichte

Nach Angaben von SMITH (1919) war das Krankheitsbild der Druse und ihre Ansteckungsfähigkeit bereits den alten Römern bekannt. So beschrieb Publius Vegetius Renuis im 5. Jahrhundert typische Symptome druseerkrankter Pferde, einschließlich einer hochgradigen Atemnot, und Apsyrus bestand auf der Ansteckungsfähigkeit und besonderen Gefahr der Erkrankung für Fohlen. Als Ursache der Erkrankung wurden zu dieser Zeit göttlicher Zorn oder eine primäre Blutkrankheit, eine Dyskrasie, mit schädigender Flüssigkeitsansammlung im Gehirn und nachfolgendem Nasenausfluß aufgeführt. Behandlungen bestanden aus der Verabreichung von aus lebenden Tieren hergestellten Zubereitungen: "Ein gutes Heilmittel bestand aus löffelweiser Verabreichung eines Alkoholextraktes, gewonnen aus den Überresten eines lebend gebackenen Storches." Derlei Methoden hielten sich bis ins 17. Jahrhundert und waren nicht beschränkt auf die Veterinärmedizin.

SOLLEYSSEL (1664) verglich die Druse mit der Pockenerkrankung des Menschen und empfahl die sofortige Isolierung erkrankter Pferde, um die Ansteckung weiterer Tiere zu verhindern. Zur Behandlung des Nasenausflusses schlug er die lokale Verabreichung einer Mischung aus Butter, Essig, Olivenöl und Pfeffer während abnehmenden Mondes vor und warnte vor allzu großer Besorgnis über die unmittelbaren Folgereaktionen dieser Methode.

Im Jahre 1790 gelang Lafarse der experimentelle Nachweis, daß es sich bei der Druse um eine ansteckende Erkrankung handelt (TODD 1910). Etwa zur gleichen Zeit unternahm Richard Ford erste Impfversuche gegen die Druse in Analogie zur Pockenimpfung beim

Menschen (SMITH 1924). Anfang des 19. Jahrhunderts wurde von der dyskrasischen Pathogenese der Erkrankung Abstand genommen und die Druse als spezifisch katarrhalisches Leiden der oberen Luftwege mit sekundärer Beteiligung benachbarter Lymphdrüsen angesehen (SAND und JENSEN 1888, GRINI 1948).

2.3. Ätiologie

Im Jahre 1873 entdeckte Rivolta in Ketten liegende Cocci im Eiter von Druseabszessen (TODD 1910). SCHÜTZ (1888) gelang die Isolierung dieser Micrococci aus dem Eiter und ihre Anzucht in Serum und Fleischbrühe. Außerdem konnte er Mäuse durch subcutane Verabreichung des Eiters infizieren und den Erreger aus den entstandenen Abszessen oder dem Blut erneut isolieren. Anschließend subcutane Verabreichung an Pferde führte zur Abszeßbildung an den Impfstellen und intranasale Verabreichung zum typischen Krankheitsbild der Druse.

SAND und JENSEN (1888) wiesen im Nasenausfluß und Eiter drusekranker Pferde eine Streptococcusform mit typischer Wachstumscharakteristik auf Agar-Agar nach und nannten sie Streptococcus equi (GRINI 1948). Die experimentelle Erzeugung der Druse bei Pferden gelang ihnen allerdings nur nach mechanischer Vorschädigung der Nasenschleimhaut mittels intranasaler Einreibung einer Kultur.

Die Ätiologie der Druse blieb trotz der aufschlußreichen Versuche von SCHÜTZ (1888) und SAND und JENSEN (1888) lange umstritten. Die Ursache dafür lag in der Tatsache, daß die intranasale Verabreichung einer Reinkultur im Gegensatz zur Verabreichung streptococcenhaltigen Eiters in der Regel keine Druse erzeugte (BONGERT 1914, MAHAFFEY 1962, BRYANS et al. 1964). Dies gab Anlaß zu der Vermutung, daß es sich bei der Druse um eine primäre Virusinfektion handle und der Drusestreptococcus lediglich ein Begleitbakterium sei (RICHTERS 1935, KÖBE 1939). PFEIFFER und MÜLLER (1912) und DORSSSEN (1939), denen die Erzeugung von Druse mittels filtriertem Druseeiter mißlang, sahen in Streptococcus equi den alleinigen Erreger der Druse. Die endgültige Aufklärung dieses Dilemmas ist BAZELEY (1943) zu verdanken, der in Anlehnung an Beobachtungen von LOEWENTHAL (1938) nachwies, daß lediglich junge Kulturen des Streptococcus equi hochvirulent sind. Die in einer 6-Stunden-Kultur vorliegenden Microorganismen beschreibt Bazeley als Streptococci mit einer breiten Kapsel, äußerst diffusem Wachstum in der Flüssigkultur, starker β -Hämolyse und honigartigem, schleimigem Wachstum auf Blutagarplatten (BAZELEY 1942a, BAZELEY und BATTLE 1940). Der von ihm beobachtete Virulenzverlust älterer Kulturen ging mit einer Abnahme an Kapselmaterialeinher (BAZELEY 1940).

Neben SCHÜTZ (1888) und SAND und JENSEN (1888) trugen auch POELS (1888) und BARUCHELLO (1908) zur frühen Charakterisierung der morphologischen und kulturellen Eigenschaften des Erregers bei. Es handelt sich bei ihm um einen gram-positiven, unbeweglichen, fakultativ anaeroben Coccus (TODD 1910), der auf Blutagar kleine, tropfenartige, durchsichtige, schleimige Kolonien bildet, die von einer deutlichen Zone vollständiger Hämolyse umgeben sind (GRINI 1948). Nach SHERMAN (1937) zählt er zur Gruppe der pyogenen Streptococci. Einer serologischen Einteilung aufgrund gruppenspezifischer Kohlenhydrate zufolge gehört Streptococcus equi zur Lancefield Gruppe C (LANCEFIELD 1933). JONES (1919), OGURA (1929) und BAZELEY und BATTLE (1940) führten Fermentationsversuche mit hämolysierenden Pferdestreptococci durch, in denen sich Streptococcus equi als unfähig erwies, Lactose, Sorbitol und Trehalose zu fermentieren. Anhand dieses biochemischen Verhaltens läßt sich S. equi von anderen Streptococci der Gruppe C (S. zooepidemicus, S. equisimilis) unterscheiden. Aufgrund der in DNA-Hybridisierungs-Versuchen festgestellten engen Verwandtschaft zwischen S. zooepidemicus und S. equi (KILPPER-BÄLZ und SCHLEIFER 1984) wurde deren Umbenennung in Streptococcus equi subspecies zooepidemicus und Streptococcus equi subspecies equi vorgeschlagen (FARROW und COLLINS 1984) und von HOLT et al. (1994) übernommen. Neueste, auf Multilocus-Enzymelektrophorese beruhende Untersuchungen der genetischen Struktur β -hämolysierender Streptococci der Lancefield Gruppe C zeigten, daß S. zooepidemicus eine große genetische Vielfalt aufweist und manche Stämme eine sehr enge genetische Verwandtschaft zum genetisch einheitlichen S. equi besitzen (JORM et al. 1994). Die genannten Autoren sehen deshalb in S. zooepidemicus den Urtyp der Gattung und in S. equi einen von dieser Gattung abstammenden Klon. Aufgrund dieser Erkenntnisse schlagen sie eine Umbenennung des derzeitigen S. equi subsp. equi in S. zooepidemicus biovar equi vor.

2.4. Ausscheidung des Erregers

TODD (1910) beobachtete das Auftreten von Druse in Beständen ohne Neuzugang und ohne Kontakt zu drusekranken Tieren. Er war überzeugt, daß der Erreger in der Nasenschleimhaut mancher Tiere nach überstandener Erkrankung überlebt und für eine unbestimmte Zeit ausgeschieden wird. Auch RICHTERS (1930), COHRS (1941) und WIRTH und DIERNHOFER (1950) dokumentierten das Vorkommen echter Drusestreptococci auf der Nasenschleimhaut völlig gesunder erscheinender Pferde. RICHTERS (1930) sah ein großes Problem in der Erkennung und Bekämpfung dieser Keimträger. GRATZL und TRAUB (1942) konnten im Nasen-Rachenraum gesunder Tiere keine Drusebakterien nachweisen. FLOER (1972) mißlang der Nachweis von S. equi in Luftsacktipferproben, WOOLCOCK (1975a) in den Tonsillen, regionalen Lymphknoten und in Nasentipferproben klinisch unauffälliger Pferde. Der erste Beweis für das Auftreten asymptomatischer Träger wurde von GEORGE et al. (1983) erbracht. Sie konnten S. equi bei 3 drusekranken Pferden noch 6-19 Wochen nach Durchbruch der Lymphknotenabszesse nachweisen. Eine weitere Stute, mit nur mildem Krankheitsverlauf, beherbergte den Erreger sogar für 10 Monate (REIF et al. 1981), zeigte während dieser Zeit jedoch gelegentlich eitrigem Nasenausfluß und Schwellung der Mandibularlymphknoten. Ähnliches wurde von TIMONEY (1988a) berichtet, der in einer Herde mit mild erkrankten Ponies ein mindestens 8-monatiges Überleben des Erregers beobachtete. SWEENEY et al. (1989) beobachteten in 6 von 31 (19,4%)

Drusefällen die Ausscheidung des Erregers nach dem Verschwinden klinischer Symptome. Eines dieser Pferde schied den Erreger noch einen Monat danach aus. Bei Pferden mit Erregerkontakt, jedoch ohne nachfolgende Erkrankung, gelang ihnen der Nachweis von *S. equi* nicht. Letzteren kommt deshalb vermutlich keine große Bedeutung als Ausscheider zu. Vielmehr scheint der Ausbruch der Erkrankung die Voraussetzung für das Auftreten von Keimträgern zu sein (SWEENEY et al. 1987a). DALGLEISH et al. (1993) konnten allerdings in einer Herde von 19 Ponies nach einem Druseausbruch keine rekonvaleszenten Ausscheider nachweisen. Die bisher längste Ausscheidung von *S. equi* wurde bei einem Pony nach langer, schwerer Druse beobachtet, bei dem der Erreger noch ein Jahr im Anschluß an die Erkrankung nachweisbar war (WOOD et al. 1993). Das Tier zeigte dabei keinerlei Krankheitssymptome. *S. equi* konnte in diesem Falle außer im Nasen-Rachenraum auch im Luftsack nachgewiesen werden, der als möglicher Ort der Erregerpersistenz diskutiert wird. Andere Autoren vermuten, daß der Erreger bei Ausscheidern in den Tonsillen oder Kopflymphknoten überlebt (WOOLCOCK 1975a). Auch das Aufbrechen eines im Rahmen der wandernden Druse entstandenen Abszesses mit nachfolgender Erregeransiedlung und -ausscheidung im Nasen-Rachenraum ist denkbar (TIMONEY 1993a). Längeres, symptomloses Ausscheidertum scheint ein eher seltenes Phänomen zu sein, da sich vermutlich die Mehrheit drusekranker Tiere mittels einer effektiven Immunantwort des Erregers zu entledigen vermag (TIMONEY 1993a). Bei akut erkrankten Tieren ist in den meisten Fällen mit einer Erregerausscheidung bis zu 4 Wochen im Abszeßleiter (SONEA 1987) und bis zu 6 Wochen im Nasenausfluß (TIMONEY 1993a, AMES 1995) zu rechnen.

2.5. Tenazität des Erregers

RICHTERS (1929) untersuchte die Lebensfähigkeit der Drusestreptococci in Wasser und ihre Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknung, Fäulnis, Erhitzung und chemische Desinfektionsmittel. Im Wasser beobachtete er eine Vermehrungsfähigkeit des Erregers in den ersten 2 Tagen und eine Überlebensfähigkeit von 6-9 Tagen. An Holz, Stroh, Stoffen, Leder, Eisen, Stahl und auf der Haut des Pferdes spricht er von einer Widerstandsfähigkeit von mindestens 3-4 Wochen (RICHTERS 1930). Die Tenazität des Erregers im Eiter gibt er mit mindestens 5-6 Monaten an. Im gepackten Dünger (54-60° C) überlebten die Drusestreptococci für etwa 2 Wochen, waren nach 4 Wochen jedoch mit Sicherheit abgestorben. Durch Temperaturen von 70° C wurden die Streptococci im Eiter, Blut und in der Kultur innerhalb 1 Stunde abgetötet. RICHTERS (1930) schreibt weiterhin, "daß die im Eiter, Blut eingeschlossenen Drusestreptococci zu den widerstandsfähigsten vegetativen Keimen gehören, und die Einwirkung der im Überschuß und in möglichst heißer Lösung zur Anwendung gelangten Desinfektionsmittel sich über viele Stunden zu erstrecken hat." Die Anwendung von Chlorpräparaten zur Abtötung des Erregers im Tränkwasser erwies sich als ungeeignet, da die erforderlichen hohen Chlormengen das Wasser ungenießbar machten. Auch WIRTH und DIERNHOFER (1950) sehen die Drusestreptococci als Keime mit hoher Widerstandsfähigkeit gegen äußere Einwirkungen an, die bei Temperaturen von 70° C erst nach 2 Stunden vernichtet sind. EVERS (1968) konstatiert, daß *S. equi* Temperaturen von 62° C für längere Zeit überlebt und Austrocknung für Wochen widersteht. Er berichtet weiterhin, daß Temperaturen unter dem Gefrierpunkt den Erreger nicht abtöten. Laut CLABOUGH (1987) persistiert der Erreger in Beständen für ein Jahr oder länger, was zur enzootischen Druse führt. JORM (1992) gibt die Überlebensdauer von *S. equi*-Suspensionen auf sterilisiertem Glas oder Holz, bei Temperaturen von 2° C und 20° C, mit 7 bis 9 Wochen an. TIMONEY (1993a) weist darauf hin, daß die von JORM (1992) experimentell ermittelte Überlebensdauer des Erregers aufgrund optimaler Bedingungen in Form konstanter Luftfeuchtigkeit und Temperatur nicht den tatsächlichen Verhältnissen in der Umwelt entspricht, in welcher der Erreger der Einwirkung von Sonnenlicht und anderen Mikroorganismen ausgesetzt ist. Er vermutet deshalb, daß die Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt unter den von JORM (1992) angegebenen 7-9 Wochen liegt. Desinfektionsmittel wie Glutaraldehyd, Chlorhexidylgluconat und Jodlösungen führen zur Abtötung des Erregers innerhalb von 90 Minuten. Temperaturen von 56° C töten den Erreger innerhalb kurzer Zeit ab. Von infizierten Tieren beweidete Koppeln sind für mindestens einen Monat als kontaminiert zu sehen (TIMONEY 1993a).

2.6. Virulenzfaktoren des Erregers

2.6.1. Hyaluronsäure-Kapsel

S. equi besitzt eine Hyaluronsäurekapsel, die ihn vor Opsonisierung und anschließender Phagozytose durch neutrophile Granulozyten schützt (BAZELEY 1943, WOOLCOCK 1974, SRIVASTAVA et al. 1985). BAZELEY (1943) stellte in seinen Versuchen fest, daß kapseltragende *S. equi*-Kulturen in der logarithmischen Vermehrungsphase (log-Phase) wesentlich virulenter für Pferde und Mäuse waren und *in vitro* wesentlich schlechter von neutrophilen Granulozyten phagozytiert wurden als ältere, kapselarme Kulturen. Er vermutete, daß die stark negativ geladene Oberfläche kapseltragender Kulturen zu deren antiphagozytären Eigenschaften beiträgt.

Gelegentlich auftretende atypische, matte Kolonien bildende Varianten wurden von manchen Autoren mit einer mildereren Form von Druse in Zusammenhang gebracht (MAHAFFEY 1962, WOOLCOCK 1975b, PRESCOTT et al. 1982). TIMONEY (1988a) konnte jedoch sowohl schleimige als auch matte Kolonien von Pferden mit leichtem Krankheitsverlauf isolieren und vermutet, daß Wirtsfaktoren bestimmend für den Verlauf der Erkrankung sind. Eine phagencodierte Hyaluronidase ist verantwortlich für diese atypischen Stämme, die sich durch den Verlust der Kapsel in der 24-Stunden-Kultur auszeichnen (SPANIER und TIMONEY 1977, TIMONEY et al. 1982). Immunologisch unterscheiden sich die atypischen Stämme nicht von den typischen, mucoiden Stämmen (TIMONEY et al. 1984).

Das Kapselmaterial ist identisch mit der Hyaluronsäure im tierischen Gewebe und ist daher nicht immunogen (ERICKSON und

2.6.2. M-Protein

Das M-Protein ist ein trypsinempfindlicher, hitze- und säurebeständiger Bestandteil der Zellwand von *S. equi* (WOOLCOCK 1974, ERICKSON und NORCROSS 1975). Es hat antiphagozytäre Eigenschaften und wird als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren des Erregers angesehen (SRIVASTAVA et al. 1985; TIMONEY und MUKHTAR 1993). Eine Analogie dieses Proteins zum M-Protein der Streptococci der Lancefield Gruppe A wird von vielen Autoren vermutet (WOOLCOCK 1974, ERICKSON und NORCROSS 1975). Letzteres besteht aus zwei zur Superhelix gewundenen Proteinketten mit -Helix Struktur, ist in der Zellmembran verankert und erstreckt sich etwa 50 nm über die Zelloberfläche hinaus (FISCHETTI 1989, 1991). Im Gegensatz zu den Gruppe A-Streptococci (FISCHETTI et al. 1985) und zu *S. zooepidemicus* (TIMONEY und MUKHTAR 1992), bei denen das M-Protein große antigenetische Vielfalt aufweist, ist das M-Protein verschiedener *S. equi*-Stämme antigenetisch homolog (BAZELEY 1942a, MOORE und BRYANS 1970, GALÁN und TIMONEY 1988).

Mit Muramidase (Mutanolysin) extrahiertes *S. equi* M-Protein hat ein Molekulargewicht von 56-58 kiloDalton (kD) (GALÁN und TIMONEY 1987). Im Säureextrakt liegt das Molekül in Form verschiedener Polypeptidfragmente vor, von denen die immunologisch wichtigsten ein Molekulargewicht von 46 und 41 kD haben. Weitere Fragmente, mit einem Molekulargewicht von 55 und 31 kD, weisen Kreuzreaktionen mit Säureextrakten von *S. zooepidemicus* auf (TIMONEY und TRACHMAN 1985). Jüngste Untersuchungen geben Anlaß zu der Vermutung, daß *S. equi* 2 M-ähnliche Proteine besitzt und zwar ein *S. equi*-spezifisches (46/41 kD) und ein Homolog des M-Proteins von *S. zooepidemicus* (55/31 kD) (TIMONEY et al. 1994).

BOSCHWITZ und TIMONEY (1994a) zeigten, daß das M-Protein von *S. equi* die Anlagerung des Komplementfaktors C3 an dessen Zelloberfläche verhindert und der Erreger auf diese Weise der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten entgeht. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für *Streptococcus pyogenes* (Lancefield Gruppe A) beschrieben (HORSTMANN et al. 1988). Ein weiterer antiphagozytärer Effekt wird durch die Bindung von Fibrinogen durch das M-Protein bewirkt. Der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist nicht bekannt (BOSCHWITZ und TIMONEY 1994b). Falls es zur Phagozytose dieser Streptococci kommt, scheint das gebundene Fibrinogen sie zudem vor dem Abbau in neutrophilen Granulozyten zu schützen (TRAORE et al. 1991).

SRIVASTAVA und BARNUM (1983a) führten in vitro Untersuchungen über die Haftungsfähigkeit des Erregers auf Zungen- sowie Nasenschleimhaut- und Mundschleimhaut-Epithel von Ponies durch. Sie sehen das M-Protein als ursächlich für die Adhäsion von *S. equi* an der Eintrittspforte. Die Rolle des M-Proteins in der Adhäsion der zur Lancefield Gruppe A gehörenden Streptococci ist umstritten (ELLEN und GIBBONS 1972, BOTTA 1981, TYLEWSKA et al. 1988, COURTNEY et al. 1992). Laut CAPARON et al. (1991) ist es von geringer Bedeutung für die Adhäsion, könnte jedoch eine Rolle in der Kolonisierung nach initialer Anheftung spielen. Jüngsten Untersuchungen zufolge scheint das M-Protein neben Lipoteichonsäure und einem Fibronectin bindenden Protein an der Adhäsion der Gruppe A-Streptococci beteiligt zu sein (WANG und STINSON 1994).

2.6.3. Peptidoglykan (Murein)

Die Zellwand grampositiver Bakterien besitzt eine dicke Mureinschicht, die dem Organismus Form und strukturelle Integrität verleiht und für eine Reihe biologischer Effekte im Wirt verantwortlich ist. Peptidoglykan ist fieberrregend, thrombozytolytisch und aktiviert das Komplementsystem. Der dabei freigesetzte Faktor C5a hat eine starke chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, die daraufhin zum Infektionsort streben und zur Entstehung von Abszessen beitragen (HAGAN und BRUNER 1988).

MUKHTAR und TIMONEY (1988) zeigten, daß die Mureinschicht von *S. equi* sehr wirksam den alternativen Weg des Komplementsystems aktiviert, was die Freisetzung chemotaktischer Faktoren zur Folge hat. Ihre Beobachtungen waren in Übereinstimmung mit den über Streptococci der Gruppe A vorliegenden Erkenntnissen (TAUBER et al. 1976, GREENBLATT et al. 1978).

2.6.4. IgG bindender Rezeptor

Zahlreiche Streptococci der Lancefield Gruppe C besitzen Immunglobulin G (IgG) bindende Oberflächenproteine, die vermutlich von Bedeutung für die Pathogenese und Virulenz dieser Organismen sind (MYHRE und KRONVALL 1977, REIS et al. 1986). Diese Rezeptorproteine binden die F_c-Region der Immunglobuline, immobilisieren diese somit und verhindern die Erkennung und Bindung von Antigenen durch die F_{ab}-Region. Auf diesem Wege entgeht der Erreger vermutlich sowohl der Phagozytose durch neutrophile Granulozyten als auch einer spezifisch gegen ihn gerichteten Immunantwort. Das unspezifische Binden von Immunglobulinen durch *S. equi* ist ein bekanntes Phänomen; ein experimenteller Nachweis eines IgG F_c-Rezeptors wurde jedoch für *S. equi* bisher nicht erbracht.

2.6.5. Streptolysin O

Auf Blutagar wachsende Kolonien von *Streptococcus equi* sind von einer etwa 3mm breiten Zone vollständiger Hämolyse (β-Hämolyse) umgeben, die durch ein O₂-empfindliches Hämolysin (Streptolysin O) verursacht wird. Bereits BAZELEY (1943) beobachtete die

Freisetzung hämolytischer Enzyme durch junge, virulente Kulturen und spekulierte, daß sie zur Virulenz des Erregers beitragen. KNIGHT et al. (1975) vermuteten, daß *Streptococcus equi* seine hämolytische Wirkung auch in vivo entfaltet, was den bei der Druse beobachteten verminderten Hämatokritwert und Hämoglobingehalt erklären würde (EVERS 1968). Neben dem hämolytischen Effekt zeigt Streptolysin O eine toxische Wirkung auf Zellen und Zellorganellen wie zum Beispiel neutrophile Granulozyten, Thrombozyten, Herzmuskelzellen und Lysosomen (TIMONEY 1993b).

2.6.6. Streptokinase

McCOY et al. (1991) wiesen nach, daß Streptococcen der Gruppe C (*S. equi*, *S. zooepidemicus* und *S. equisimilis*) Streptokinasen produzieren. Es handelt sich dabei um von den Organismen sezernierte Proteine, die durch Aktivierung von Plasminogen und dessen Überführung in Plasmin eine fibrinolytische Wirkung hervorrufen. Außer dem Abbau von Fibrinolytin kann Plasmin auch zur Hydrolyse extrazellulärer Matrixproteine führen, was die Ausbreitung des Erregers im Gewebe begünstigen könnte. McCoy et al. zeigten zudem, daß Streptococcen der Gruppe C einen Oberflächenrezeptor für Plasmin besitzen. Die Aktivierung von Plasminogen und anschließende Bindung des entstandenen Plasmins an die Zelloberfläche könnte den Organismen unkontrollierte proteolytische Aktivität verleihen. Streptokinasen equiner Streptococcen aktivieren equines, nicht jedoch porcines oder humanes Plasminogen. Umgekehrt aktivieren Streptokinasen humaner Streptococcen humanes, nicht jedoch equines Plasminogen. Diese speziesspezifische Aktivierung könnte Grundlage der selektiven Virulenz dieser Bakterien für bestimmte Wirte sein und einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese pyogener Streptococcceninfektionen darstellen (MCCOY et al. 1991, NOWICKI et al. 1994).

2.6.7. Cytotoxin

BAZELEY (1942b, 1943) deutete an, daß *S. equi*-Kulturen in der log-Phase ein Exotoxin produzieren, welchem die Ödembildung während der Druse und toxische Effekte auf neutrophile Granulozyten zuzuschreiben sind. MUKHTAR und TIMONEY (1988) entdeckten einen im Kulturüberstand des Erregers vorhandenen, vom Hämolysin zu unterscheidenden Faktor mit cytotoxischer Wirkung auf polymorphkernige Leukozyten. Dieses Leukotoxin könnte zusammen mit der Kapsel und dem M-Protein der Phagozytose durch Leukozyten entgegenwirken und eine wichtige Überlebensstrategie des Erregers darstellen.

2.7. Immunität

2.7.1. Aktive Immunität

2.7.1.1. Systemische Immunität

SAND und JENSEN (1888) konnten durch intravenöse Injektion des Druseerregers bei Pferden Immunität gegen die spätere Infektion über die Nasenschleimhaut hervorrufen. Diese Immunisierung ging in der Regel mit einer Phlebitis und lokalen Entzündungsreaktionen einher und erwies sich deshalb als ungeeignet.

Die russische Methode war eines der ältesten Verfahren, um Immunität gegen die Druse in einem Bestand, in dem die Erkrankung enzootisch war, zu erlangen (TODD 1910). Zum Zwecke der Durchseuchung wurden dabei alle Fohlen eines Bestandes im Herbst einer heftigen Erkältung ausgesetzt, indem man sie eine halbe Stunde lang in einen Teich trieb, dann auf einem Hügel allseitig kalten Winden aussetzte und anschließend mit recht kaltem Wasser tränkte. Hierauf erkrankten sämtliche Tiere an der Druse, genasen nach 3 Wochen vollständig (FRIEDBERGER und FRÖHNER 1892) und waren rechtzeitig vor dem schweren russischen Winter immun (TIMONEY 1988b). Beim sogenannten "Durchdrusen" eines Bestandes wurden nach Auftreten des ersten Drusefalles sämtliche Tiere des Bestandes mittels infektiösem Eiter angesteckt, um eine möglichst schnelle Durchseuchung mit anschließender Immunität zu erreichen. RICHTERS (1929) erkannte, daß mit diesem Verfahren jedoch keine länger dauernde Immunität erzielt werden konnte. Da er im Durchdrusen zudem die Ursache schwerer Seuchengänge mit hohen Verlusten sah, riet er von diesem Verfahren ab.

TODD (1910) zitierte einige Anfang des 20. Jahrhunderts durchgeführte Impfversuche und kam zu der Feststellung, daß noch keine für die Praxis geeignete Methode der Immunisierung mit Lebend- oder Totimpfstoff gefunden worden war.

RICHTERS (1929) führte mit Farbstoff- und Formolvakzinen des Druseerregers Immunisierungen an Fohlen durch und stellte fest, daß beiden Impfstoffen keine schützende Wirkung zukam und die Farbenimpfstoffe lediglich in therapeutischer Hinsicht wirksam waren. RICHTERS (1929) schrieb dazu: " Bei der Immunisierung gegen Drusestreptococcen besteht die Hauptschwierigkeit in der Erzeugung einer Grundimmunität, die mit abgetöteten Kulturen oder ausschließlich mit Drusestreptococcentoxinen nur sehr schwer zu erreichen ist, da die Ausbildung der Immunität eng mit den aggressiven Eigenschaften der Drusestreptococcen zusammenhängt, die an den lebenden Erreger gebunden sind."

BAZELEY (1940) führte in Australien detaillierte, bahnbrechende Untersuchungen auf dem Gebiet der Immunität gegen *S. equi* durch. Den Mißerfolg von RICHTERS (1929) führte er auf die Anwendung alter, kapselloser Kulturen des Erregers oder übermäßige Einwirkung des Abtötungsverfahrens zurück. BAZELEY (1940) impfte zunächst Mäuse mit jungen, kapseltragenden, vorsichtig hitzgetöteten *S. equi*-Kulturen und notierte deren Überlebensrate nach anschließender experimenteller Infektion mit dem Erreger. Er

stellte fest, daß Mäuse sowohl nach dieser Impfung als auch nach Verabreichung von Serum gleichartig immunisierter Kaninchen vor einer Erkrankung durch experimentelle Infektion geschützt waren, während nicht immunisierte Mäuse unter Anzeichen einer Septikämie oder Pyämie verendeten. Die Anwendung dieses Impfstoffes führte auch bei australischen Kavalleriepferden zu befriedigenden Ergebnissen, wohingegen formalinisierte junge und 24 Stunden alte Kulturen als auch 30-Stunden-Kulturfiltrate keine immunisierende Wirkung zeigten (BAZELEY 1942b). BAZELEY (1940) sah in der Abtötung junger, kapseltragender Kulturen einen kritischen Schritt der Impfstoffbereitung, da bereits Temperaturen von 56° C über einen Zeitraum von mehr als 12 Minuten zur Schädigung des immunisierenden Antigens führten.

In weiteren Versuchen zeigte BAZELEY (1943), daß Serum erfolgreich immunisierter und rekonvaleszenter Pferde Mäusen Schutz vor der Erkrankung verleiht und *in vitro* zur gesteigerten Phagozytose des Erregers durch neutrophile Granulozyten führt. Die enge Korrelation zwischen Schutzwirkung im Mäuseversuch und gesteigerter Phagozytose führte er auf die Anwesenheit bakterizider, für die Immunität entscheidender Antikörper im Serum zurück, die im Serum geimpfter Tiere nach etwa 14 Tagen auftraten. Er war überzeugt, daß diese Antikörper für den Schutz der Pferde vor der Infektion mit *S. equi* verantwortlich waren. Dieser Schutz erstreckte sich allerdings nicht auf *Streptococcus pyogenes animalis* (heute *S. zooepidemicus*), der auch bei geimpften Tieren zu einem Katarrh der Nasenschleimhäute mit eitrigem Nasenausfluß führte (BAZELEY 1942b) und im Mäuseversuch letale Wirkung zeigte (BAZELEY 1942a).

BAZELEY (1942a) testete 32 verschiedene *S. equi*-Stämme aus Australien bezüglich Kreuzimmunität. Antiserum zu einem dieser Stämme verlieh im Mäuseversuch Schutz gegen alle 32 Stämme. Er nahm deshalb an, daß nur ein einziger antigenetischer *S. equi*-Typ existiert.

Bei der Suche nach dem immunisierenden Antigen des Erregers stellten BAZELEY et al. (1949) fest, daß Säureextrakte von *S. equi*, im Gegensatz zum Kulturüberstand und bereits extrahierten Bakterien, außerordentlich immunisierende Wirkung zeigen. Die Säureextraktion führten sie nach der Methode von Lancefield durch, die auf diese Weise schutzvermittelnde und gruppenspezifische Substanzen von Streptococccen der Gruppe A isolieren konnte. BAZELEY (1949) vermutete, daß *S. equi* eine den Streptococccen der Gruppe A vergleichbare, für die Bildung schützender Antikörper verantwortliche "M-Substanz" besitzt.

BRYANS und MOORE (1972) erkannten Anfang der sechziger Jahre mit zunehmendem Auftreten der Druse in den USA die Notwendigkeit der Herstellung eines geeigneten Impfstoffes. In Anlehnung an Bazeley's Erkenntnisse stellten sie einen Impfstoff aus inaktivierten log-Phasen-Kulturen eines *S. equi*-Stammes her, der sich in Feldversuchen als äußerst wirksam erwies. Nach kommerzieller Herstellung des Bacterins im Jahre 1964 (ENGELBRECHT 1969) wurde von diesem Impfstoff trotz gelegentlichem Auftreten lokaler und systemischer Nebenwirkungen (O'DEA 1969) großer Gebrauch gemacht.

Bei der Untersuchung von Säureextrakten 57 verschiedener *S. equi*-Kulturen fanden BRYANS und MOORE (1972) ein speziesspezifisches, trypsinempfindliches Proteinantigen sowohl in log-Phasen-Kulturen als auch in älteren, kapsellosen Kulturen. Sie vermuteten, daß es sich um ein Analog der "M-Antigene" handelte, auf denen die Typeneinteilung innerhalb der Gruppe A-Streptococccen basierte. Außerdem spekulierten sie, daß dem Virulenz- und Immunogenitätsverlust älterer Kulturen die Einwirkung einer endogenen Hyaluronidase auf die Kapsel und einer endogenen Proteinase auf das "M-ähnliche Protein" zugrunde lagen. Die antigenetische Analyse verschiedener *S. zooepidemicus*-Stämme zeigte, daß letztere ebenfalls ein Analog des M-Antigens aufwiesen, welches jedoch im Gegensatz zum homogenen M-Antigen von *S. equi* eine große antigenetische Vielfalt zeigte (MOORE und BRYANS 1970, BRYANS und MOORE 1972).

Untersuchungen von WOOLCOCK (1974) stützten die Hypothese der Existenz eines *S. equi* M-Proteins. Durch säulenchromatographische Reinigung eines Säureextraktes von *S. equi* konnte er einen trypsinempfindlichen Zellwandbestandteil nachweisen, der nach Verabreichung an Mäuse und Pferde die Bildung opsonisierender Antikörper zur Folge hatte. Nachfolgende immunochemische Untersuchungen der Zelloberflächenbestandteile von *S. equi* (ERICKSON und NORCROSS 1975) bestätigten diese Beobachtungen. Da eine Analogie zu den Streptococcceninfektionen der Gruppe A, bei denen das M-Protein erfolgreich in der Immunisierung angewendet wurde, nahe lag (REIF et al. 1981), wurden Impfstoffe aus M-Proteinextrakten von *S. equi* entwickelt. Zahlreiche Impfversuche mit M-Protein enthaltenden Säureextrakten (REIF et al. 1981, SRIVASTAVA und BARNUM 1981, SRIVASTAVA und BARNUM 1983b, HOFFMAN et al. 1991) oder enzymatischen Extrakten (BRYANT et al. 1985) des Druseerregers folgten. REIF et al. (1981), SRIVASTAVA und BARNUM (1981) und BRYANT et al. (1985) beobachteten einen teilweisen Schutz gegen eine natürliche *S. equi*-Infektion nach intramuskulärer Impfung von Pferden mit M-Protein-Extrakt. Dieser Schutz bestand in einer herabgesetzten Erkrankungsrate und milderem Krankheitsverlauf in der Impfgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In einem anderen Protokoll waren Fohlen nach intramuskulärer Impfung vor einer Kontaktinfektion geschützt. Zwei von 3 sowohl intranasal als auch intramuskulär geimpften Tieren erkrankten jedoch an Druse nach experimenteller, intranasaler Inokulation des Erregers (SRIVASTAVA und BARNUM 1983b). Auf einer Farm mit hohem Infektionsdruck zeigten dreifach geimpfte Fohlen wesentlich mildere Krankheitszeichen als ungeimpfte Fohlen (HOFFMAN et al. 1991).

Derzeit in den USA im Handel erhältliche Impfstoffe gegen die Druse bestehen aus jungen, inaktivierten *S. equi*-Kulturen (Equibac II, Fort Dodge Laboratories) oder aus säure- (Strepvax II, Cooper Animal Health) oder enzymatisch extrahiertem (Strepguard, Haver Lab.) *S. equi* M-Protein. Die Wirksamkeit dieser Impfstoffe wird von vielen Autoren in Frage gestellt (CLABOUGH 1987, TIMONEY 1988b). Bis heute existiert kein Impfstoff, der Pferden völligen Schutz gegen Druse vermittelt. Laut SONEA (1987) und WILSON (1988) bietet

die Impfung lediglich einen kurzen Schutz von 6 bis maximal 12 Monaten. Derzeit im Handel erhältliche Impfstoffe sind zudem mit zahlreichen lokalen und systemischen Nebenwirkungen verbunden (YELLE 1987, SMITH 1994). Richtlinien für die Impfung von Pferden in den USA raten von einer routinemäßigen Impfung ab und empfehlen die Anwendung von Impfstoffen lediglich in Beständen, in denen die Druse ein enzootisches Problem darstellt (AAEP 1995). Besonderen Wert sollte dabei auf die Impfung von Zuchtstuten in den letzten 4-6 Gestationswochen gelegt werden, die Fohlen nach der Geburt passiven Schutz verleiht. Die Impfung soll in solchen Beständen einen milderen Verlauf der Erkrankung und eine Reduktion der Morbidität um etwa 50% bewirken. Schwere Verlaufsformen der Erkrankung wurden allerdings auch bei geimpften Pferden beobachtet (TIMONEY und EGGERS 1985, SWEENEY et al. 1987b). TIMONEY und EGGERS (1985) vermuteten, daß dem Versagen der Impfstoffe eine mangelnde Stimulation oder Persistenz bakterizider Serumantikörper zugrunde liegen könnte. Sie wiesen nach, daß die Impfung mit Bacterin oder M-Protein-Extrakten zwar die Bildung bakterizider Antikörper bewirkt, diese jedoch keinen Schutz gegen die Erkrankung vermitteln. Außerdem waren in einer Untersuchung von GALÁN und TIMONEY (1985) selbst Pferde mit einem niedrigen bakteriziden Antikörpertiter resistent gegenüber einer experimentellen Infektion etwa 20 Tage nach überstandener Druse. TIMONEY und EGGERS (1985) stellten deshalb die allgemein anerkannte Auffassung, daß Serumantikörper für den Schutz gegen die Druse verantwortlich sind, in Frage. In Anlehnung an ähnliche Erkenntnisse auf dem Gebiet der Infektionen mit Gruppe A-Streptococcen (POLLY et al. 1975, D'ALESSANDRY et al. 1978, GUIRGUIS et al. 1982) stellten sie die Vermutung auf, daß die lokale Immunität im Nasen-Rachenraum ausschlaggebend für den Schutz der Pferde vor Invasion durch *S. equi* sein könnte.

2.7.1.2. Lokale Immunität

Bereits PFEIFFER und MÜLLER (1912) versuchten, bei Fohlen eine lokale Immunität an der Eintrittspforte des Druseerregers hervorzurufen. Dazu verabreichten sie einen aus *S. equi* gewonnenen Impfstoff subkutan zu beiden Seiten des Kopfes am Grunde der Ohren. Fohlen, die anschließend in infizierten Stallungen untergebracht wurden, erkrankten nicht und Fohlen, die mit hohen Infektionsdosen gefüttert wurden, erkrankten zwar, zeigten jedoch einen milden Krankheitsverlauf. Diese Autoren nahmen zunächst an, daß eine lokale Immunisierung ausreichen müßte, um die Tiere vor der Infektion mit *S. equi* zu schützen, konnten jedoch mit einer einmaligen, rein lokalen Impfung keine befriedigenden Resultate erzielen.

GALÁN und TIMONEY (1985b) wiesen bei rekonvaleszenten Tieren eine lokale Immunantwort bestehend aus *S. equi*-spezifischem IgA und IgG nach. Frisch genesene Pferde widerstanden experimenteller intranasaler Infektion mit *S. equi* und diese Resistenz schien unabhängig vom Gehalt bakterizider Serumantikörper zu sein. Deshalb vermuteten diese Autoren, daß die beobachtete lokale Immunantwort im Nasopharynx Schutz vor der Reinfektion vermittelte. Sie stellten zudem fest, daß IgA im Nasenschleim zwar mengenmäßig überwog, IgG jedoch wesentlich größere Aktivität im Radio-Immuno-Assay (RIA) zeigte. Während Serumantikörper mit einer Vielzahl von Proteinen im Kulturüberstand und Säureextrakt von *S. equi* reagierten, waren Antikörper im Nasenschleim spezifisch gegen zwei Polypeptide im Säureextrakt, mit Molekulargewichten von 46 und 41 kD gerichtet. Diese Beobachtungen deuteten auf eine Unabhängigkeit der lokalen von der systemischen Immunantwort hin. In einer Studie von HAMLIN et al. (1994) war Schutz vor der Erkrankung mit einem hohen Gehalt an M-Protein-spezifischem Serum IgG und einem schnellen Anstieg von lokalem IgG verbunden.

Bei den Streptococcceninfektionen des Menschen hat sich die lokale, intranasale Impfung mit M-Protein als wirksam in der Verhinderung der Kolonisation homologer M-Typen des Erregers erwiesen (POLLY et al. 1975). Intranasale Immunisierung führte zudem zu einer Reduktion unerkannter Keimträger, die eine wichtige Infektionsquelle für die Übertragung der Infektion darstellen. SRIVASTAVA und BARNUM (1983b) konnten bei Fohlen, die sowohl intramuskulär als auch intranasal mit einem M-Protein-Impfstoff geimpft wurden, höhere lokale Antikörpertiter nachweisen als bei Fohlen, die lediglich eine intramuskuläre Impfung erhielten. Bei 2 von 3 Tieren verhinderte die kombinierte Impfung jedoch nicht die Erkrankung nach experimenteller, intranasaler Infektion.

TIMONEY und GALÁN (1985) untersuchten, ob durch die lokale Verabreichung eines Lebendimpfstoffes im Nasopharynx ein ausreichender Immunschutz aufgebaut wird. Nach zweimaliger intranasaler Verabreichung eines avirulenten *S. equi*-Stammes an 14 Ponies waren diese 4 Wochen später vor experimenteller, intranasaler Infektion mit *S. equi* geschützt. Zwei weitere Ponies, die Kontakt zur Impfgruppe hatten, entwickelten ebenfalls einen Immunschutz gegen *S. equi*. Auch im Mäuseversuch zeigte sich der Impfstamm als schutzvermittelnd. TIMONEY und GALÁN (1985) stellten weiterhin fest, daß die Immunantwort spezifisch gegen *S. equi* gerichtet war und spekulierten, daß das M-Protein von *S. equi* das entscheidende Antigen für die Entwicklung eines lokalen Infektionsschutzes darstellt. WALLACE et al. (1995) führten bei Pferden orale und intraperitoneale Immunisierungen mit abgetöteten *S. equi*-Kulturen durch. Die intraperitoneal geimpften Tiere zeigten eine deutliche lokale und systemische *S. equi*-spezifische Immunreaktion und 2 von 4 auf diese Weise geimpften Tieren waren 4 Wochen nach der Erstimpfung gegenüber einer experimentellen intranasalen Infektion mit virulentem *S. equi* resistent. Die verbleibenden 2 Tiere zeigten einen milden, fieberfreien Verlauf, jedoch mit Abszeßbildung in den Mandibularlymphknoten. Vier oral immunisierte Pferde zeigten trotz ausbleibender humoraler Immunantwort einen gewissen Schutz bei experimenteller Infektion.

2.7.2. Passive Immunität

TODD (1910) nennt zahlreiche Autoren, die im Kampf gegen die Druse passive Immunisierungen mit Seren rekonvaleszenter oder hyperimmunisierter Pferde durchführten. Zur Herstellung von Immunsereen wurden Pferden steigende Dosen von Drusestreptococcen

subkutan verabreicht. Solche Seren erwiesen sich als äußerst erfolgreich sowohl in der Verhinderung als auch in der Therapie der Druse. Als Präventivmaßnahme wurden die Seren insbesondere Fohlen kurz nach der Geburt, beim Absetzen, vor dem Transport zu den Trainingsställen und nach Kontakt zu erkrankten Tieren verabreicht. TODD (1910) empfahl die Anwendung bei Armeepferden zum Zeitpunkt des Ankaufes und beim Transport zu anderen Einheiten. Die Anwendung von Immunsereen als therapeutische Maßnahme führte zu einem kürzeren, milderem, komplikationslosen Verlauf der Druse. Die Dauer des Schutzes nach passiver Immunisierung wurde mit 3-6 Wochen für homologe Seren und etwa 12 Tage für heterologe Seren angegeben. Aufgrund des zeitlich begrenzten Schutzes und hohen Preises der Immunsereen hat sich deren Anwendung im Rahmen der Druse nicht durchsetzen können. Der Versuch einer Simultanimpfung zur Stimulierung einer andauernden Immunität mußte aufgrund schwerer lokaler Reaktionen aufgegeben werden (TODD 1910). PFEIFFER und MÜLLER (1912) berichten, daß die Anwendung von Schutz- und Heilsereen unbefriedigende Ergebnisse zeigte. Es konnte mit Drusesereen kein bemerkenswerter Schutz- oder Heileffekt erzielt werden und die genannten Autoren konstatieren, "daß zur Herbeiführung einer länger andauernden Immunität, die wir hier brauchen, Sera im allgemeinen nicht am Platze sind." Laut RICHTERS (1929) dauert der passive Impfschutz höchstens 2-3 Wochen und versagt selbst bei schwachen Infektionen. Von 14 schutzgeimpften Fohlen erkrankten 12 an Druse. Mit der Überzeugung, daß polyvalente Seren therapeutischen Wert versprechen, immunisierte er Serumpferde mit über 60 verschiedenen *S. equi*-Stämmen. Nach Verabreichung auf diese Weise gewonnener Seren in Kombination mit polyvalenter Methylenblauvakzine im Anfangsstadium der Erkrankung, konnte er einen Heileffekt in Form einer Abschwächung der Krankheitszeichen und einer rascheren Genesung verzeichnen. Simultanimpfung an mehr als 1000 Tieren führte zu einer Senkung der Verlustrate um 50% (RICHTERS 1930).

Antikörper im Kolostrum immuner Muttertiere verleihen Fohlen passive Immunität gegen eine *S. equi*-Infektion. GALÁN et al. (1986) wiesen bei Fohlen bereits kurz nach Kolostrumaufnahme kolostrale Immunglobuline im Serum und auf der Nasen- und Rachenschleimhaut nach. Weiterhin zeigten sie, daß Fohlen in den ersten Lebensmonaten durch Aufnahme von Antikörpern in der Stutenmilch ein passiver, lokaler Schutz an der Eintrittspforte des Erregers vermittelt wird. Das Zustandekommen dieser Schutzwirkung erklärten sie durch die direkte Beschichtung der Mukosa mit Antikörpern bei der Aufnahme von Stutenmilch. Sie stellten fest, daß in Nasengangsspülproben der Fohlen IgA überwog, wohingegen im Serum IgG vorherrschte. Immunglobuline in der Muttermilch zeigten eine wesentlich begrenztere Spezifität als Immunglobuline im Kolostrum und waren hauptsächlich gegen 2 M-Proteinfragmente (41/46 kD) von *S. equi* gerichtet. Antikörper dieser Spezifität sind auch auf der Nasenschleimhaut rekonvaleszenter Pferde zu finden und scheinen eine entscheidende Rolle im Schutz gegen *S. equi*-Infektionen zu spielen (GALÁN und TIMONEY 1985b, TIMONEY und GALÁN 1985).

2.7.3. Zelluläre Immunität

Über die Rolle der zellulären Immunität bei Streptococceninfektionen ist nur wenig bekannt. SRIVASTAVA und BARNUM (1982) führten *in vitro* Stimulationsversuche mit Pferdelymphozyten durch. Die Einwirkung gereinigten *S. equi* M-Proteins führte zu einer dosisabhängigen Blastogenese, die bei Lymphozyten älterer Tiere umfangreicher war als bei Fohlenlymphozyten. Sie führten diesen Unterschied auf vorangegangenen Kontakt älterer Tiere mit *S. equi* oder *S. zooepidemicus* zurück, der zur Bildung sensibilisierter Lymphozyten führte. Beide Streptococcenspezies besitzen aufgrund ihrer engen genetischen Verwandtschaft kreuzreagierende Antigene (TIMONEY 1986), die durch Kontamination des M-Protein-Extraktes eine entsprechende unspezifische Lymphozytenstimulierung erklären würden. Außerdem scheinen selbst gereinigte Säureextrakte von *S. equi* ein dem M-Protein von *S. zooepidemicus* homologes, entsprechend kreuzreagierendes Protein zu enthalten (TIMONEY und TRACHMAN 1985, TIMONEY et al. 1994). SRIVASTAVA und BARNUM (1983b) bestimmten weiterhin den Lymphozyten-Stimulationsindex mit M-Protein geimpfter und anschließend experimentell infizierter Tiere. Dabei konnten sie lediglich bei einer Minderheit der geimpften Fohlen einen kurzfristig erhöhten Index nachweisen, den sie mit einer individuell gesteigerten Reaktion dieser Fohlen auf das M-Protein erklärten. Sie fanden keinen Unterschied im Stimulationsindex der Tiere vor und nach experimenteller Infektion und schlossen daraus, daß keines der Fohlen eine zelluläre Immunität gegen *S. equi* entwickelt hatte.

Eine stimulierende Wirkung des M-Proteins auf Lymphozyten *in vivo* wurde bei Menschen und Meerschweinchen (BEACHY et al. 1969) mittels Intradermaltest nachgewiesen. NARA et al. (1983) fanden bei Pferden eine Korrelation zwischen positivem Hauttest nach intradermaler Verabreichung eines hitzeinaktivierten *S. equi*-Bacterins, hohem Serumantikörpertiter zu *S. equi* und Schutz vor der Erkrankung. Lediglich eines von sechs im Hauttest positiven Tieren war seronegativ und erkrankte nach experimenteller *S. equi*-Infektion. Acht seronegative und im Hauttest negative Pferde erkrankten nach experimenteller Infektion und zeigten nachfolgend Serokonversion und positiven Intradermaltest. In der Haut wurde nach 12 Stunden eine neutrophile Infiltration mit begleitendem Ödem, gefolgt von einer etwa 72 Stunden andauernden mononukleären Zellinfiltration nachgewiesen. Nara et al. vermuteten, daß es sich bei der Frühreaktion um ein Arthusphänomen und bei der Spätreaktion um eine Überempfindlichkeit vom verzögerten Typ handelte. Sie postulierten deshalb, daß sowohl der humoralen als auch der zellvermittelten Immunität eine Rolle im Schutz gegen *S. equi*-Infektionen zukommt.

WALLACE et al. (1995) beobachteten nach experimenteller Infektion oral geimpfter Tiere eine Reduktion der klinischen Krankheitszeichen in Abwesenheit eines meßbaren lokalen oder systemischen *S. equi*-spezifischen Antikörpertiters. Sie vermuteten deshalb, daß zelluläre Immunitätsmechanismen für den milderen Verlauf der Druse bei diesen Tieren verantwortlich sein könnten.

2.7.4. Dauer der Immunität

Zur Dauer der systemischen und lokalen Immunität im Anschluß an eine natürliche oder experimentell erzeugte *S. equi*-Infektion finden sich in der Literatur zahlreiche unterschiedliche Angaben. Von 3000 über 2 Jahre alten Pferden erkrankten innerhalb von 4 Jahren 77% der Tiere einmal, 19% zweimal und 4% dreimal an Druse (TODD 1910). COHRS (1941) berichtet, daß von 642 Pferden 68% einmal, 2% zweimal, 8% dreimal, 1,9% viermal und 0,9% fünfmal an Druse erkrankten. Laut NEES (1994) wurden von 784 stationär behandelten drusekranken Pferden 1,1% (9 Pferde) ein zweites Mal und 0,1% (ein Pferd) ein weiteres, drittes Mal aufgrund einer erneuten Druse vorgestellt. Dabei betrug der Abstand zwischen den Erkrankungen in 60% der Fälle (6 Pferde) weniger als 12 Monate. Diesen Angaben zufolge scheint die Mehrheit der Pferde nach einer Erstinfektion eine gute Immunität zu entwickeln. Reinfektionen verlaufen in der Regel milder (TODD 1910, RICHTERS 1930) und hinterlassen zumeist einen guten Immunschutz (TIMONEY 1993a). RICHTERS (1929) nennt eine Reihe von Autoren, die davon überzeugt sind, daß das einmalige Überstehen der Erkrankung eine absolute Immunität auf Lebenszeit hinterläßt. Andere sehen Ausnahmen von dieser Regel und meinen, daß bei manchen Pferden die Immunität nur einige Jahre besteht und diese daher wiederholt an Druse erkranken können. Auch HOLTERBACH (1909) beobachtete das wiederholte Auftreten der Erkrankung bei ein- und demselben Pferd, in einem Falle sogar innerhalb des gleichen Jahres. RICHTERS (1929) weist darauf hin, daß das Überstehen der Erkrankung durchaus nicht immer Immunität verleiht und Pferde nicht selten wiederholt an Druse erkranken. Drei Monate nach Überstehen der Druse konnte er bei 2 von 7 Fohlen durch experimentelle intranasale Infektion eine zweite, schwere Erkrankung hervorrufen. Eines dieser Fohlen erkrankte nach künstlicher Infektion 6 Monate später nochmals an Druse, dieses Mal jedoch an einer mildereren Form. Auch HAMLEN et al. (1994) gelang es, 2 von 12 Fohlen 6 Monate nach einer Druseerkrankung experimentell zu reinfizieren. Laut BAZELEY (1942a) besteht bei fast jedem Pferd nach überstandener Druse eine lebenslange Immunität. Nachfolgend vermutet BAZELEY (1943) jedoch, daß dieser andauernden Immunität ein wiederholter, zu subklinischer Infektion führender Erregerkontakt zugrunde liegen könnte. MAHAFFEY (1962) und WOOLCOCK (1973) berichten von einer Immunität auf Lebenszeit im Anschluß an die Druse. BRYANS und MOORE (1972) schreiben, daß die meisten Pferde im Anschluß an die Druse gegenüber einer weiteren *S. equi*-Infektion immun sind. Eine Reinfektion tritt ihrer Meinung nach allenfalls Jahre später auf und ist in der Regel durch eine wesentlich raschere Genesung gekennzeichnet. FALLON (1969) und PICHÉ (1984) sprechen von einer mehrjährigen, SRIVASTAVA und BARNUM (1985) von einer mindestens einjährigen, SONEA (1987) und NEES (1994) von einer 6- bis 12-monatigen und LEWIS (1969), BLOOD und RADOSTITS (1989) und TAYLOR (1992) von einer 6-monatigen Immunität nach natürlicher Infektion. Der von manchen Autoren beschriebenen zyklischen Häufung von Druseerkrankungen im Abstand von etwa 5 Jahren (KOGER 1967, NEES 1994) könnte ein Nachlassen der Immunität in der Pferdepopulation zugrunde liegen.

3. Problemstellung

Obwohl bereits vor 50 Jahren bahnbrechende immunologische Erkenntnisse auf dem Gebiet der Druse gewonnen wurden, steht bis zum heutigen Tage kein Impfstoff zur Verfügung, der Pferden einen wirksamen Schutz vor der Erkrankung verleiht. Es ist allgemein anerkannt, daß dem in der Zellwand von *S. equi* lokalisierten M-Protein, in Analogie zum M-Protein der Gruppe A-Streptococci, eine entscheidende Rolle in der Immunität zukommt. Als Grundlage des nach natürlicher Infektion aufgebauten Immunschutzes wurden zunächst gegen das M-Protein gerichtete bakterizide Serumantikörper angesehen (BAZELEY 1943). Auf dieser Kenntnis basierend wurden M-Protein haltige Impfstoffe entwickelt, deren Wirksamkeit sich bald als enttäuschend gering herausstellte. Jüngere Untersuchungen stellten die Rolle der bakteriziden Serumantikörper in Frage und ließen eine lokale Immunantwort als entscheidenden Faktor im Schutz gegen die Erkrankung vermuten (TIMONEY und EGGERS 1985). Über die Grundlage und Dauer dieser lokalen Immunantwort ist bisher wenig bekannt. In der Literatur sind zudem nur wenige lokale intranasale Immunisierungsversuche beschrieben, die zu widersprüchlichen Ergebnissen führten.

Die vorliegende Arbeit soll zu einem besseren Verständnis der durch *S. equi* stimulierten schutzvermittelnden lokalen und systemischen Immunantwort beitragen und umfaßt deshalb folgende Aufgabenstellungen:

- Im Vorversuch:
- 1. Die Erfassung M-Protein-spezifischer lokaler und systemischer Antikörpertiter junger Pferde nach lokaler intranasaler Immunisierung mit einem avirulenten *S. equi*-Stamm.

Im Hauptversuch:

- 2. Die Erfassung M-Protein-spezifischer lokaler und systemischer Antikörpertiter lokal immunisierter und ungeimpfter junger Pferde nach Kontaktinfektion.
- 3. Die Prüfung der Wirksamkeit des nach überstandener Druse aufgebauten Immunschutzes mittels experimenteller intranasaler Inokulation mit einem virulenten *S. equi*-Stamm.
- 4. Die Erhebung epizootiologischer und klinischer Daten, einschließlich der Ausscheidung des Erregers, im Verlauf der Druse.

4. Material und Methoden

4.1. Tiermaterial und Versuchsplan

Für die Versuchsdurchführung stand eine Gruppe von 22 Pferden zur Verfügung (siehe 11.1. Tab. A1). Es handelte sich dabei um 19 Jährlinge - 10 Ponyhengste, 5 gemischtrassige Pferde leichteren Schlages (3 Stuten, 2 Hengste) und 4 Vollblutpferde (3 Stuten, 1 Wallach) - sowie einen zweijährigen und 2 dreijährige Vollblüter (Wallache). Fünfzehn dieser Tiere wuchsen auf der Versuchsfarm der Universität von Kentucky isoliert und ohne Kontaktmöglichkeit zu *S. equi* auf. Bei 7 Pferden handelte es sich um zu Versuchszwecken gespendete Tiere ohne bekannte Vorgeschichte, jedoch mit niedrigem *S. equi*-spezifischem Serumantikörpertiter. Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn entwurmt und gegen Tetanus geimpft. Ein dreijähriges (# 309) und das zweijährige Vollblutpferd (#529) wurden für die spätere experimentelle Auslösung der Druse selektiert. Zwölf der 20 verbliebenen Tiere (s. 11.1. Tab. A1) wurden in einem Vorversuch einer zweifachen, im Abstand von 3 Wochen durchgeführten, intranasalen Impfung mit einem avirulenten *S. equi*-Stamm unterzogen. Viereinhalb Wochen nach der Zweitimpfung wurde die aus 8 Pferden bestehende Kontrollgruppe mit der Impfgruppe gemischt. Eine Woche später, am Tag 0, begann der Hauptversuch, indem 2 experimentell mit *S. equi* infizierte Pferde in die Herde eingebracht wurden. Fünf der aus 20 Pferden bestehenden Kontroll- und Impfgruppe und eines (#529) der experimentell infizierten Pferde wurden im Rahmen des sich anschließenden Druseausbruches aufgrund drusebedingter Komplikationen euthanasiert (s. 11.1. Liste A1). In der 11. Woche wurden dreizehn (s. 11.1. Liste A2) genesene Pferde durch intranasale Inokulation von *S. equi* erneut dem Erreger ausgesetzt. Zur zeitlichen Gliederung des Experiments siehe Abbildung 1.

Die Tiere wurden während des Versuches zusammen in einem Offenstall mit Auslauf gehalten, hatten ad libitum Heu und Wasser zur Verfügung und wurden ein- bis zweimal täglich mit einer Hafer-Pellet-Mischung gefüttert. Wassertröge und Futterreimer wurden von ihnen gemeinsam benutzt.

Abb. 1: Zeittafel

Vorversuch Hauptversuch

Einbringen der

1.Impfung 2.Impfung Infektionsquelle Exp. Inokulation

-10 -8 -6 -4 -2 0 2 4 6 8 10 12 14 28

Mischen der Kontroll- Zeit in Wochen

und Impfgruppe

4.2. Intranasale Impfung

Im Vorversuch erhielten zwölf der Tiere (s. 11.1. Tab. A1) eine intranasale Impfung mit ca. 5×10^8 koloniebildenden Einheiten (KBE) des *S. equi*-Impfstammes "Cornell 709-27" in Todd-Hewitt-Bouillon mit 0,2% Hefeextraktzusatz (Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Die Todd-Hewitt-Bouillon ist eine nährstoffreiche, gepufferte glucosehaltige Lösung (s. 11.2.), die sich bei der Kultivierung hämolysierender Streptococci bewährt hat. Der Glucosegehalt von 0,2% hat sich dabei als optimal für die maximale Synthese von M-Protein erwiesen (SRIVASTAVA et al. 1985). Beim verwendeten Impfstamm handelt es sich um einen durch Nitrosoguanidin- und Transposon-Mutagenese entstandenen avirulenten, kapsellosen *S. equi*-Stamm (TIMONEY und GALÁN 1985). Mit Hilfe eines Zerstäubers (Nasal Atomizer Model #281, Devilbiss Co., Somerset, PA) wurde jedem Tier etwa 1 ml einer unverdünnten 18-Stunden-Kultur in jede Nüster verabreicht. Zur Ermittlung der verabreichten Impfdosis wurde mit der Kultur eine Verdünnungsreihe erstellt und 10 x 25 l einer 10^{-6} - und einer 2×10^{-5} -Verdünnung auf Columbia-Colistin-Nalidixin-Agar (Columbia-CNA, Difco Laboratories, Detroit, MI) mit 6% heparinisiertem Pferdeblutzusatz verbracht. Beim Columbia-CNA handelt es sich um einen Staphylococci/Streptococci-Selektivnährboden auf Columbia-Agar-Basis mit Colistin und Nalidixinsäure als Selektiv-Supplement (s. 11.2.). Nach Inkubation der Agarplatten für einen Tag bei 37° C wurde die Anzahl der KBE ermittelt und nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor die in 1 ml enthaltene Menge an KBE berechnet. Der Erstimpfung folgte nach 3 Wochen eine Nachimpfung gleicher Art und Dosierung.

4.3. Experimentelle Inokulation mit virulentem *S. equi*

Als Infektionsquelle für die Kontaktinfektion der Herde wurden 2 Pferde (#309 und #529) experimentell mit *S. equi* infiziert, indem ihnen $1,5 \times 10^8$ KBE einer 18-Stunden-Kultur von *S. equi* CF22 in Todd-Hewitt-Bouillon mit 0,2% Hefeextrakt-zusatz (THB) intranasal verabreicht wurden. *S. equi* CF22 wurde 1981 bei einem Druseausbruch in New York von einem Abszess des Mandibularlymphknotens eines drusekranken Pferdes isoliert. Die intranasale Verabreichung der Kulturen erfolgte mittels Zerstäuber, wobei jedes Pferd etwa 3,5 ml einer 1:10 in THB verdünnten Kultur erhielt. Beide Tiere zeigten Fieber und Depression nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen und

wurden anschließend in die Herde von 20 Pferden verbracht.

Die intranasale Inokulation von 13 Pferden in der 11. Woche erfolgte auf die gleiche Weise und mit dem gleichen *S.equi*-Stamm und Inokulum wie oben beschrieben.

4.4. Klinische Untersuchungen

Klinische Untersuchungen wurden an allen Tieren vor dem Vorversuch sowie vor und während des Hauptversuches ohne medikamentelle Ruhigstellung in einem Zwangsstand durchgeführt. Die Impfgruppe wurde zusätzlich im Anschluß an die Erst- und Zweitimpfung täglich für eine Woche klinischen Untersuchungen unterzogen. Nachdem die gesamte Herde am Tag 0 dem Kontakt mit *S. equi* ausgesetzt wurde, folgte die Untersuchung aller Tiere zunächst täglich bis zur 4. Woche, dann zweimal wöchentlich bis zur 10. Woche. Weitere Untersuchungen wurden im Anschluß an die experimentelle Inokulation in der 11. Woche durchgeführt und zwar zunächst täglich bis zur 12., dann zweimal wöchentlich bis zur 14. Woche.

Im Rahmen der klinischen Untersuchungen wurde bei jedem Tier das Verhalten, die rektale Körpertemperatur sowie das Auftreten typischer Symptome der Druse ermittelt. Menge und Qualität eines vorhandenen Nasenausflusses, Schwellungsgrad und Abszedierung von Lymphknoten sowie das Auftreten drusebedingter Komplikationen wurden notiert. Es erfolgten keine laryngoskopischen Untersuchungen des Pharynx und der Luftsäcke und die Tiere wurden keiner Therapie unterzogen.

Die Inkubationszeit wurde als Zeit zwischen Beginn des Hauptversuches (Einbringen der Infektionsquelle in die Versuchsgruppe) und dem ersten Auftreten von Fieber ($>38,6^{\circ}\text{C}$) definiert. Als Fieber galt eine rektale Körpertemperatur, die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mehr als $0,5^{\circ}\text{C}$ über dem Gruppenmittelwert vor Versuchsbeginn lag.

4.5. Entnahme und Verarbeitung von Proben

Während des Vorversuches wurden von der Impfgruppe Blutproben und Nasengangsspülproben 3 Tage vor und in einwöchigen Abständen bis zur 6. Woche nach der Erstimpfung genommen.

Im Hauptversuch wurden nach einer Probennahme 4 Tage vor Versuchsbeginn von allen Tieren Blutproben und Nasengangsspülproben zunächst zweimal wöchentlich bis zur zweiten Woche, dann wöchentlich bis zur 8. Woche und schließlich 14-tägig bis zur 10. Woche genommen. Eine zusätzliche Nasengangsspülprobe wurde einen Tag vor der experimentellen intranasalen Inokulation in der 11. Woche genommen. Dieser Inokulation folgten Probennahmen in der 11., 12., 14. und 28. Woche des Hauptversuches. Insgesamt wurde eine Serie von 16 Nasengangsspülproben und 15 Blutproben im Hauptversuch erhalten.

Tupferproben von der Nasenschleimhaut wurden zweimal wöchentlich von der 2. bis zur 7. Woche von 9 Tieren genommen. Abszeßtupferproben sind beim Auftreten von Abszessen genommen worden.

Die Probennahme erfolgte im Zwangsstand, wobei eine medikamentelle Ruhigstellung der Tiere nicht erforderlich war.

Die Blutprobenentnahme erfolgte durch Punktion der Vena jugularis unter Verwendung steriler Einmalkanülen in sterile Glasröhrchen (Vacutainer, Becton Dickinson, Cockeysville, MD). Nach eingetretener Gerinnung wurden die Proben für 10 min ($800\times g$, 25°C) zentrifugiert, die Serumüberstände in sterile Eppendorf-Röhrchen verbracht und bis zur Analyse bei -30°C aufbewahrt.

Tupferproben von der Nasenschleimhaut wurden unter Verwendung steriler Tupfer (Precision Dynamics Corp., San Fernando, CA) gewonnen, die von den Nüstern aus etwa 10 cm tief in den ventralen Nasengang eingeführt wurden. Abszeßtupferproben wurden nach vorheriger Reinigung der Abszeßöffnung mit lauwarmem Wasser durch Einführung eines sterilen Tupfers in die Abszeßhöhle gewonnen. Sämtliche Tupferproben wurden bei 4°C aufbewahrt und am Tag der Entnahme auf Columbia-CNA (s. 11.2.) mit 6% heparinisiertem Pferdeblutzusatz (CNA-Blutagarplatten) ausgestrichen.

Die Durchführung der Nasengangsspülungen erfolgte mit 50 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, s. 11.3.1.) unter Verwendung einer 60ml-Plastikspritze, an die ein 35 cm langer, schmaler (8 mm), flexibler Latexschlauch angeschlossen war, der etwa 12-18 cm tief in den ventralen Nasengang eingeführt wurde. Bei gesenkter Kopfhaltung des Pferdes wurden 50 ml PBS zügig in den Nasengang eingespritzt, die rückkehrende Flüssigkeit in Plastikbehältern aufgefangen und in Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Verarbeitung der Spülproben erfolgte in Anlehnung an die von HAMLEN et al. (1994) beschriebene Methode. Grobe Verunreinigungen in den Proben wurden 15 min bei $1800\times g$ und 25°C abzentrifugiert. Die Volumina der Probenüberstände wurden notiert und 25 ml jeder Probe durch Zugabe von 25 ml gesättigter Ammoniumsulfatlösung, pH 7,6, (s. 11.3.1.) einer Proteinfällung unterzogen. Die Fällung wurde unter sanfter Mischung der Proben für 16-18 Stunden bei Zimmertemperatur durchgeführt und die präzipitierten Proteine durch anschließende Zentrifugation für 30 min bei $14.000\times g$ und 5°C pelletiert. Die Überstände wurden verworfen und die offenen Zentrifugenröhrchen mit der Öffnung nach unten für 2 Tage bei 4°C aufbewahrt, um verbliebene Ammoniumsulfatlösung abfließen bzw. verflüchtigen zu lassen. Anschließend wurden die Proteinpellets in 1,5 ml PBS gelöst, in Eppendorf-Röhrchen verbracht und bei -70°C aufbewahrt.

4.6. Bakteriologische Untersuchungen

Nasen- und Abszeßtupferproben wurden zum Nachweis der Ausscheidung von *S. equi* auf CNA-Blutagarplatten ausgestrichen und für 20 h bei 37° C inkubiert. Da im Anschluß an die akute Phase der Erkrankung die Gefahr der Kontamination der Nasengangspülproben von außen gebannt war, wurden von diesem Zeitpunkt an zudem sämtliche Pellets der Spülproben auf genannten Platten ausgestrichen. Nach anschließender Subkultivierung β -hämolyzierender Kolonien auf CNA-Blutagarplatten (20 h, 37° C) wurden die Reinkulturen einem Zuckerfermentationstest unterzogen. Dazu wurden jeweils 150 μ l sterilisierte, 10 %ige Lactose-, Sorbitol- und Trehaloselösung in Vertiefungen einer sterilen Mikrotiterplatte pipettiert und mit je einer KBE der Reinkultur beimpft. Nach Inkubation der Mikrotiterplatte für 20 h bei 37° C wurde das Ergebnis des Fermentationstestes in Form eines fehlenden oder vorhandenen Farbumschlages von violett nach gelb notiert. *S. equi* wurde anhand der typischen, mucoiden Kolonieform und dem Unvermögen, oben genannte Zucker zu fermentieren, identifiziert und von *S. zooepidemicus* und *S. equisimilis* unterschieden (s. 11.1. Tab. A2).

4.7. Immunologische Untersuchungen

4.7.1. Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

4.7.1.1. Gewinnung und Reinigung von *S. equi* M-Protein

Die Gewinnung und Reinigung von *S. equi* M-Protein wurde von einer Kollegin in unserem Labor auf nachfolgend beschriebene Weise durchgeführt:

Heiße Säureextraktion: Das für den ELISA erforderliche *S. equi* M-Protein wurde nach der von BOSCHWITZ et al. (1991) beschriebenen Methode der heißen Säureextraktion von Zellen einer 18h-Kultur von *S. equi* Lex in 6 Litern THB gewonnen. Bei diesem Stamm handelt es sich um einen vermutlich durch spontane Mutation entstandenen kapsellosen Stamm von *S. equi*, der reich an M-Protein ist. Dieser Stamm wurde 1990 in Lexington von einem Abszeß eines Mandibularlymphknotens eines Pferdes mit Drusesymptomatik isoliert. Nach Zentrifugation der 18h-Kultur für 15 min bei 15.000xg und 5° C wurde der Überstand verworfen, die pelletierten Zellen zweimal mit PBS gewaschen, gewogen (12g) und anschließend in PBS (4ml/g) suspendiert. Unter vorsichtiger, tropfenweiser Zugabe 1-molarer Salzsäure (1M HCl) wurde die Zellsuspension auf einen pH-Wert von 2,5 gebracht und bei 95° C für 10 min extrahiert. Anschließend wurde durch tropfenweise Zugabe 1-molarer Natronlauge (1M NaOH) der pH-Wert auf 7 eingestellt und die Suspension für 15 min bei 15.000xg und 5° C zentrifugiert. Der Überstand (48 ml) wurde zurückbehalten und die Zellen einer erneuten Extraktion gleicher Art unterzogen. Beide Überstände wurden zusammengegeben (96 ml), die Flüssigkeit mittels Vakuumzentrifugation im Konzentrationsapparat (Centrivap Concentrator, Labconco Corp., Kansas City, MO) verdunstet und die Proteine danach in 10 ml Aqua bidest. gelöst.

Agarose-Gel-Elektrophorese: Im Anschluß an die Säureextraktion wurde das 41 kD M-Protein-Fragment von *S. equi* elektrophoretisch in einem Agarose-Gel (Pro Sieve Gel System, FMC Corp., Rockland, ME) von anderen Proteinen des Säureextraktes getrennt. Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde in Anlehnung an die Methode der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von LAEMMLI (1970) im vertikalen System durchgeführt. Nach Entfettung der Glasplatten mit Alkohol wurden diese für 15 min bei 55° C erwärmt und anschließend in den Gelgießstand eingesetzt. Nachfolgend wurde das für 15 min im kochenden Wasserbad verflüssigte 6 %ige Trenngel (Resolving Gel Solution, Pro Sieve) unter Vermeidung der Einlagerung von Luftblasen zwischen die Glasplatten gegossen. Nach Verfestigung des Trenngels (5 min) wurde zur Herstellung einer Proben tasche ein Kamm zwischen die Glasplatten gegeben und das im kochenden Wasserbad (15 min) verflüssigte 1,5 %ige Sammelgel (Stacking Gel Solution, Pro Sieve) auf das Trenngel gegossen. Nach Verfestigung des Sammelgels wurde der Kamm entfernt, die Elektrophoresekammer (SE 400, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) zusammengebaut und mit Tankpuffer (s. 11.3.2.) gefüllt.

Als Standard wurde mit Remazol-Blau gefärbtes Ovalbumin (45 kD) eingesetzt. Zwei Milliliter des konzentrierten, in Aqua dest. gelösten Säureextraktes und 50 l der Standardlösung wurden 1:2 in SDS-haltigem Probenpuffer (s. 11.3.2.) verdünnt, 5 min im Wasserbad gekocht und in die Proben tasche des Stackgels gegeben. Durch den SDS-haltigen Probenpuffer werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt, indem positive Ladungen neutralisiert und die Proteine in Anionen mit konstanter Ladung überführt werden. Die Auflösung von Wasserstoffbrücken durch die SDS-Behandlung und das Kochen bewirken die Entfaltung der Proteine unter weitgehendem Verlust der Sekundär- und Tertiärstruktur. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsfähigkeit im elektrischen Feld erfolgte bei einem konstanten Strom von 8 mA (2103 Power Supply, LKB Instruments Inc., Rockville, MD) für 16h bei 4° C. Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau diente dabei als Markierer der Lauffront.

Die Gewinnung des M-Proteinfragments (41 kD) erfolgte durch dessen vorsichtiges Ausschneiden aus dem Gel unter Orientierung am gefärbten Standard und anschließende Extraktion aus dem Gel (MORGAN et al. 1991). Nach Volumenschätzung des gewonnenen Gels wurde dieses 1:10 in Extraktionspuffer (s. 11.3.2.) verdünnt, bei 70° C vollständig geschmolzen und gründlich mit dem Extraktionspuffer gemischt. Anschließend wurde diese Mischung bis zur Verfestigung auf Eis gebracht und nachfolgend für 2h bei -70° C aufbewahrt. Danach wurde die Mischung zum langsamen Auftauen auf Eis gegeben. Nach vollständigem Auftauen erfolgte eine Zentrifugation für 20 min bei 13000xg und 4° C. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch einen Filter mit einer Porengröße von 0,45 μ m (Millipore Filter Corp., Bedford, MA) gegeben und dadurch weitgehendst von verbliebener Agarose gereinigt. Nach Verdunstung des Überstandes durch Vakuumzentrifugation (Centrivap Concentrator, Labconco Corp.) wurden die Proteine in Aqua bidest. gelöst.

Bestimmung der M-Protein-Konzentration: Die Konzentration des gewonnenen M-Proteinfragments wurde im BCA-Proteinassay (Pierce, Rockford, IL) bestimmt. Dieser Test basiert auf der reduzierenden Wirkung der Proteine auf Cu^{2+} -Ionen (LOWRY et al. 1951) und der anschließenden Bildung eines purpurfarbenen Bicinchonininsäure (BCA)- Cu^+ -Komplexes, dessen Extinktion bei 572 nm gemessen wird. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit bovinem Serumalbumin (Pierce) erzeugten Standardkurve ermittelt.

4.7.1.2. Überprüfung der Reinheit des *S. equi* M-Proteins

Zur Reinheitsüberprüfung wurde das gewonnene *S. equi* M-Protein mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt, im Western-Blot-Verfahren auf eine immobilisierende Membran übertragen und mittels Immunoblotting untersucht.

SDS-PAGE: Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Methode von LAEMMLI (1970) im vertikalen System durchgeführt. Dazu wurden zunächst beide Glasplatten und alle mit dem Gel in Berührung kommenden Teile mit Alkohol entfettet, zusammengebaut und in den Gelgießstand eingesetzt. Anschließend wurde ein 10 %iges Trenngel (30 ml, s. 11.3.3.) bereitet, unter Vermeidung eingeschlossener Luftblasen zwischen die Glasplatten gegossen und mit wassergesättigtem Isobutanol (450 l) überschichtet, um eine vollständige Polymerisation mit Ausbildung einer horizontalen Polymerisationslinie am Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu gewährleisten. Nach abgeschlossener Polymerisation (ca. 30 min bei RT) wurde das Isobutanol abgesaugt, ein Kamm zur Herstellung von Probenaschen zwischen die Glasplatten gegeben und das 5 %ige Sammelgel (10 ml, s. 11.3.3.) auf das Trenngel gegossen. Nach erfolgter Polymerisation des Sammelgels (ca. 10 min bei RT) wurde der Kamm entfernt, die Elektrophoresekammer (SE 400, Hoefer Scientific Instruments) vollständig zusammengebaut und mit Tankpuffer (s. 11.3.3.) gefüllt.

Die M-Protein-Probe wurde in 3 Geltaschen aufgetragen. Als Standard wurde ein mit Remazol-Blau gefärbter (s. 11.3.3.) HMW-Marker (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) neben den Probenspuren eingesetzt. Standard (5 l/Spur) und M-Protein-Probe (10 l, ca. 15 g Protein/Spur) wurden vor dem Auftragen auf das Gel 1:2 in SDS-haltigem Probenpuffer (s. 11.3.3.) verdünnt und für 5 min im Wasserbad aufgekocht.

Nach Auftragen der Proben in die Geltaschen des Sammelgels folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einem konstanten Strom von 30 mA (2103 Power Supply, LKB Instruments Inc.) über einen Zeitraum von 3 Stunden.

Western-Blotting: Im Anschluß an die Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine im Western-Blot-Verfahren (BURNETTE 1981, BLEISIEGEL 1986) elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Transfer-Membran (Nitrobind 0,45 Micron, Micron Separations Inc., Westboro, MA) übertragen. Dazu wurden zunächst die Transfer-Membran und 2 Filterpapiere (Whatman, Maidstone, England) in Transferpuffer (s. 11.3.4.) getränkt und die Membran auf eines der Filterpapiere gegeben. Anschließend wurde das zurechtgeschnittene SDS-Gel unter Vermeidung des Einschlusses von Luftblasen auf die befeuchtete Transfer-Membran gelegt. Als letzte Schicht schloß sich das zweite Filterpapier an. Nach Verbringung in eine Transfer-Kassette erfolgte die Übertragung im mit Transferpuffer gefüllten Transfer-Apparat (TE Series Transphor Electrophoresis Unit + Power Lid TE 50, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA) für 1,5h bei 0,6 Ampere.

Im Anschluß an die Übertragung der Proteine wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsplätze für 20 min in eine Blockierungslösung aus 3% Gelatine in Aqua dest. gelegt und danach zunächst für 5 min mit PBS-Tween 20 (PBST, s. 11.3.4.) und dann für 5 min mit PBS (s. 11.3.4.) gewaschen. Gleichartige Waschvorgänge folgten zwischen den sich anschließenden Inkubationen. Zur Reinheitsüberprüfung wurde die Membran zunächst entlang den Standardspuren in 3 Teile mit jeweils einer M-Protein-Spur und angrenzendem Standard geschnitten. Die Membranteile wurden in separate Blotkammern gegeben und zur Markierung der Proteine für 2h mit unterschiedlichen Antiseren inkubiert. Als Antiseren wurden 1:200 in PBS verdünnte Kaninchenserum mit spezifisch gegen *S. equi* M-Protein (41 kD) bzw. *S. zooepidemicus* W60 recomb. M-Protein (55 kD) gerichteten Antikörpern und 1:50 in PBS verdünntes Serum eines Ponies mit einer von *S. zooepidemicus* 631 verursachten Peritonitis eingesetzt. Nach Inkubation und Waschung wurden die Membranteile in eine gemeinsame Blotkammer verbracht. Die Detektion gebundener Immunglobuline erfolgte durch einstündige Inkubation mit 1:4000 in PBS verdünntem, an das Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Protein G (HRP-Protein G, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA). Protein G ist ein Zellwandbestandteil mancher Streptococci der Lancefieldgruppen C und G, der spezifisch den Fc-Teil von Immunglobulinen der Klasse IgG bindet (BJÖRCK und KRONVALL 1984). Die Anfärbung der markierten Proteine erfolgte durch Inkubation (ca. 3 min) in Chloronaphthol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) enthaltender Substratlösung (s.11.3.4.). Anschließend wurde die Reaktion durch Abgießen der Substratlösung und Zugabe von Wasser gestoppt und die Membranteile wurden getrocknet.

4.7.1.3. ELISA für M-Protein-spezifisches Serum Immunglobulin G (IgG)

Die Bestimmung *S. equi* M-Protein-spezifischer Immunglobuline erfolgte in dem von HAMLIN et al. (1994) beschriebenen ELISA-System mit geringgradiger Modifikation. Vertiefungen (wells) der ELISA-Mikrotiterplatten (96 Well Polystyrene Plates, Corning Costar Corp., Cambridge, MA) wurden zunächst mit 2,5 ng gereinigtem M-Protein in 100 l Beschichtungspuffer (s.11.3.5.) beschichtet und über Nacht bei 37° C in einer feuchten Kammer (FK) inkubiert. Anschließend wurden die ELISA-Platten mit einem

Plattenwaschgerät (Platwasher 260, Cambridge Technology Inc., MA) dreimal mit Waschpuffer (s. 11.3.5.) gewaschen. Um freie Bindungsplätze abzusättigen, wurden die ELISA-Plattenvertiefungen für 2h mit 200 l Blockierungspuffer (s. 11.3.5.) in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend 3x mit Waschpuffer gewaschen.

Um mit *S. zooepidemicus* kreuzreagierende Antikörper zu eliminieren, wurden die 1:20 in PBS verdünnten Serumproben (15 l in 300 l PBS) mit dem gleichen Volumen einer hitzeinaktivierten (30 min bei 56° C) Suspension von *S. zooepidemicus*-Zellen für 30 min bei 37° C, unter wiederholtem gründlichen Mischen, adsorbiert. Die Suspension wurde von einer 18h-Kultur von *S. zooepidemicus* 631 in THB erstellt, indem die Zellen durch Zentrifugation pelletiert, 2x mit PBS gewaschen und anschließend in PBS (10 ml/g) suspendiert wurden. *S. zooepidemicus* 631 stammt aus der Peritonealflüssigkeit eines Ponies, das eine von diesem Erreger verursachte Peritonitis hatte. Nach der Adsorption wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 12000xg) pelletiert und der Überstand für den ELISA verwendet. Adsorbierte und nicht adsorbierte Serumproben eines jeden Pferdes wurden hitzeinaktiviert (30 min bei 56° C) und parallel auf derselben ELISA-Platte in jeweils dreifacher Ausfertigung untersucht. Dazu wurden jeweils 100l/well in einer Verdünnung von 1:40 (nicht adsorbierte Seren) bzw. 1:38 (Endverdünnung adsorbierter Seren) in PBS auf die Platte aufgetragen und für 1h bei 37° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Auf jeder Platte wurde zudem ein positives und ein negatives Kontrollserum (vor und nach Adsorption) in der entsprechenden Verdünnung aufgetragen und mindestens ein Hintergrundwert (100l PBS/well) ermittelt. Das positive Kontrollserum stammte von einem Pferd (#724) nach überstandener Druse und mit einem hohen M-Protein-spezifischen Antikörpertiter, das negative Kontrollserum von einem Pferd (#91) ohne vorangegangenen Kontakt zu *S. equi* und mit einem niedrigen M-Protein-spezifischen Antikörpertiter. Der erneuten dreimaligen Waschung nach Inkubation folgte die Detektion der gebundenen M-Protein-spezifischen Immunglobuline der IgG-Klasse mittels Zugabe von HRP-Protein G (s. 4.7.1.2.) in einer Verdünnung von 1:4000 in PBS (100 l/well). Im Anschluß an die Inkubation (1h, 37° C, FK) und dreimalige Waschung der Platte wurde die Enzym-Substrat-Reaktion unter Verwendung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) als Substrat eingeleitet und durch den Farbumschlag des Indikators o-Phenylendiamin (OPD) von farblos über gelb nach braun sichtbar gemacht (GALLATI und BRODBECK 1982). Dazu wurde unmittelbar vor Einleitung der Reaktion die Substratlösung hergestellt (s. 11.3.5.). Nach Auftragen dieser Lösung auf die Platte (100ml/well) folgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur und im Dunkeln zur Vermeidung von Spontanreaktionen. Anschließend wurde die Enzym-Substrat-Reaktion durch Zugabe von 2 M H₂SO₄ (50 ml/well) unter gleichzeitiger Intensivierung der Farbreaktion gestoppt und die Extinktion der Farblösungen in den mit Serumproben beschickten Vertiefungen gegen diejenige des negativen Kontrollserums (Nullwert) bei einer Wellenlänge von 490 nm im ELISA-Plattenphotometer (EL310 Microplate Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT) gemessen. Zur Standardisierung (HAMLEN et al. 1994) der an 2 aufeinanderfolgenden Tagen im ELISA ermittelten Serum IgG-Werte wurden diese mit der folgenden Formel multipliziert:

$$\frac{\text{Mittelwert des positiven Kontrollserums beider Tage}}{\text{Wert des pos. Kontrollserums am Tag des Testes}}$$

4.7.1.4. ELISA für M-Protein-spezifisches IgG und IgA der Nasengangsspülproben

Zur Bestimmung der *S. equi* M-Protein-spezifischen Immunglobuline in den Nasengangsspülproben wurden wells der ELISA-Mikrotiterplatten mit 25 ng gereinigtem M-Protein in Beschichtungspuffer (s. 11.3.5.) beschichtet. Der anschließende Inkubationsschritt mit nachfolgender Blockierung freier Bindungsplätze erfolgte auf die gleiche Weise wie oben beschrieben. Die nachfolgenden Verdünnungsschritte wurden zur Beseitigung von Hintergrundreaktionen in Blockierungspuffer (s. 11.3.5.) durchgeführt. Die Inkubationen erfolgten für jeweils 1h bei 37° C in einer feuchten Kammer und jedem Inkubationsschritt folgte ein dreimaliges Waschen der ELISA-Platten mit Waschpuffer (s. 11.3.5.). Nasengangsspülproben wurden in einer Verdünnung von 1:10 in dreifacher Ausfertigung aufgetragen (100 l/well). Auf jeder Platte wurde eine positive und eine negative Kontrollprobe und mindestens ein Hintergrundwert (100 l Blockierungspuffer) einbezogen. Bei den Kontrollen handelte es sich um Mischungen von Nasengangsspülproben mit hohem (Positivkontrolle) bzw. niedrigem (Negativkontrolle) M-Protein-spezifischen Immunglobulin-Gehalt. Die Proben stammten von druserekonvaleszenten Pferden (#309, #411, Prince) bzw. von Pferden ohne vorherigen Kontakt zu *S. equi* (#14, #11). Die Detektion von in den Spülproben enthaltenem M-Protein-spezifischen IgG erfolgte mittels 1:4000 verdünntem HRP-Protein G (100 l/well). Die Detektion von gebundenem IgA erforderte einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit 100 l/well eines 1:10 verdünnten Kulturüberstandes mit murinen, monoklonalen, gegen equines IgA gerichteten Antikörpern (BVS-2, Bristol Vet. School, England). Dieser Inkubation folgte die Detektion mittels an Peroxidase gekoppeltem Ziege anti-Maus IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in einer Verdünnung von 1:1000 (100 l/well). Dieser Antikörper ist spezifisch gegen die schweren Ketten (-Ketten) murinen IgGs gerichtet und erkennt daher ausschließlich Mausimmunglobuline der Klasse IgG.

Die Enzym-Substrat-Reaktion und Messung der Platten im ELISA-Plattenphotometer erfolgte auf oben beschriebene Weise, wobei die negative Kontrollprobe als Nullwert herangezogen wurde und für jede Nasengangsspülprobe der Mittelwert der dreifachen Messungen bestimmt wurde. Die Untersuchung der Spülproben mittels ELISA erfolgte an einem Tag.

Einige Nasengangsspülproben wurden zusätzlich in einem ELISA für *S. zooepidemicus* W60 M-Protein-spezifisches IgG und IgA untersucht. Dazu wurden die ELISA-Platten mit 0,05 g *S. zooepidemicus* W60 recomb. M-Protein (TIMONEY et al. 1995) beschichtet. Weitere Schritte entsprachen der oben beschriebenen Methode für *S. equi* M-Protein-spezifisches IgG bzw. IgA.

4.7.1.5. Bestimmung der M-Protein-spezifischen IgA-Aktivität der Nasengangs-spülproben

Zur Bestimmung der M-Protein-spezifischen IgA-Aktivität in den Nasengangs-spülproben wurde zunächst die Gesamtmenge an IgA in der Probe ermittelt und nachfolgend der im ELISA ermittelte Extinktionswert (optische Dichte) derselben Probe für M-Protein-spezifisches IgA in Relation zum aufgetragenen IgA-Gesamtgehalt gesetzt. Die spezifische Aktivität wurde in Anlehnung an VIROLAINEN et al. (1995) in optische Dichte (O.D.)-Einheit pro mg Gesamt-IgA angegeben.

IgA-Konzentration der Nasengangsspülproben: Die Bestimmung der IgA-Gesamtmenge in den Spülproben erfolgte mittels ELISA durch Vergleich der Extinktion der Spülproben mit der Extinktion eines IgA-Standards bekannter Konzentration. Das als Standard verwendete IgA wurde durch Ammoniumsulfatpräzipitation und anschließende Affinitätschromatographie vom Serum eines Pferdes mit einem IgA-produzierenden Myelom (Cornell University, College of Veterinary Medicine, Ithaca, NY) gewonnen. Die Bestimmung der Konzentration des gereinigten IgAs erfolgte im BCA-Proteinassay (Pierce, s. 4.7.1.1.) anhand einer mit equinem IgG (Pierce) erzeugten Standardkurve.

Auf jede ELISA-Platte wurden in jeweils 3 Vertiefungen 0,2 g, 0,1 g, 0,05 g, 0,025 g und 0,0125 g IgA in 100 l Beschichtungspuffer (s. 11.3.5.) gegeben und aus den jeweiligen Extinktionsmittelwerten eine IgA-Standardkurve erzeugt. Nasengangsspülproben wurden in dreifacher Ausfertigung in einer Verdünnung von 1:1500 in Beschichtungspuffer aufgetragen. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C in einer feuchten Kammer erfolgte die Absättigung freier Bindungsplätze mit Blockierungspuffer wie oben beschrieben (s. 4.7.1.3.). Die weiteren Inkubationsschritte mit monoklonalem Maus anti-Pferde IgA und Ziege anti-Maus IgG sowie die anschließende Enzym-Substratreaktion und die Messung der Platten im Photometer entsprachen dem Vorgehen bei der Bestimmung des M-Protein-spezifischen IgAs (s. 4.7.1.4.). Als Nullwert wurde für jede Platte der Mittelwert aus 3 mit PBS beschichteten Vertiefungen herangezogen. Die Bestimmung des IgA-Gehaltes der Nasengangsspülproben erfolgte anhand der IgA-Standardkurve unter anschließender Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und Umrechnung von der konzentrierten Probe auf das Originalvolumen.

Nach Ermittlung der im ELISA für M-Protein-spezifisches IgA aufgetragenen IgA-Gesamtmenge jeder Probe, wurde deren Extinktionswert für M-Protein-spezifisches IgA in Relation zum aufgetragenen Gesamt-IgA gesetzt.

4.7.1.6. Bestimmung der M-Protein-spezifischen IgG-Aktivität der Nasengangs-spülproben

Die M-Protein-spezifische IgG-Aktivität der Nasengangsspülproben wurde entsprechend der für IgA beschriebenen Methode (s. 4.7.1.5.) bestimmt. Dazu wurde zunächst im ELISA die Gesamtmenge an IgG ermittelt, indem Nasengangsspülproben in einer Verdünnung von 1:500 in Beschichtungspuffer aufgetragen wurden. Als Standard wurde auf jeder ELISA-Platte gereinigtes equines IgG (ImmunoPure® Horse IgG Standard, Pierce, Rockford, IL) in Konzentrationen von 0,8 l, 0,4 l, 0,2 l, 0,1 l, 0,05 l und 0,025 l pro well aufgetragen. Die weiteren Inkubationsschritte mit Blockierungspuffer und Protein G, sowie die anschließende Enzym-Substratreaktion und die Messung der Platten im Photometer entsprachen dem Vorgehen bei der Bestimmung des M-Protein-spezifischen IgGs (s. 4.7.1.4.) Nach Bestimmung der IgG-Konzentration der Spülproben anhand der IgG-Standardkurve wurde der im ELISA für M-Protein-spezifisches IgG ermittelte Extinktionswert jeder Probe durch die aufgetragene IgG-Gesamtmenge dividiert und die spezifische Aktivität in optische Dichte (O.D.) pro mg Gesamt-IgG angegeben.

4.7.1.7. ELISA für M-Protein-spezifisches IgM der Nasengangsspülproben

Einige Nasengangsspülproben wurden im ELISA auf *S. equi* M-Protein-spezifisches IgM untersucht. Dieser ELISA entsprach dem in 4.7.1.4. beschriebenen ELISA für IgA mit nachfolgendem modifizierten Detektionssystem. Die Detektion von gebundenem IgM erfolgte mittels 1:500 verdünntem Kaninchen anti-Pferd IgM (Miles Laboratories Inc., nun Bayer Corp., Kankakee, IL) gefolgt von an Peroxidase gekoppeltem Ziege anti-Kaninchen IgG (Zymed Laboratories, Inc., San Francisco, CA) in einer Verdünnung von 1:1000.

4.7.2. Bakterizidie-Test

Serumproben wurden in Anlehnung an den von BOSCHWITZ und TIMONEY (1994) beschriebenen Bakterizidie-Test auf bakterizide Antikörper untersucht. Dazu wurde eine 18h-Kultur von *S. equi* CF22 durch Verdünnung (1:10⁵) in THB auf einen Bakteriengehalt von etwa 4 x 10³ KBE/ml eingestellt und jeweils 20 l (80 KBE) dieser Suspension mit 80 l einer Serumprobe in Eppendorf-Röhrchen für 30 min bei 37° C inkubiert. Dabei erfolgte ein gründliches Mischen der Proben vor, nach 15 min und am Ende der Inkubation. Im Anschluß an diesen Oponisierungsschritt wurden als Quelle für Komplement und neutrophile Granulozyten in jedes Röhrchen 450 l frisches, heparinisierendes (Vacutainer, Becton Dickinson, Cockeysville, MD) Blut eines Pferdes (Chips) mit niedrigem *S. equi* M-Protein-spezifischem Serum-Antikörpertiter gegeben. Als Kontrolle für die Vermehrungsfähigkeit der Bakterien wurde eine Serumprobe mit 450 l Plasma anstelle von Vollblut versehen. In beide der an 2 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführten Versuche wurde zusätzlich ein positives Kontrollserum eines von der Druse genesenen Pferdes (Snowflake) mit hohem bakteriziden Antikörpergehalt und ein negatives Kontrollserum eines Pferdes (#1) vor Erstkontakt zu *S. equi* und mit niedrigem M-Protein-spezifischem Antikörpertiter einbezogen. Die Anzahl der KBE zur Zeit t₀ wurde für 3 Proben bestimmt, die für 3 Stunden auf

Eis aufbewahrt wurden, während die übrigen Proben für 3h bei 37° C unter Rotation inkubiert wurden. Anschließend wurden von jeder Probe 3 Blutagarplatten gegossen, indem jeweils 150 l der Probe mit 15 ml schmelzflüssigem (45° C), 5% heparinisertes Blut enthaltendem Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (Tryptic Soy Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI; s. 11.2.) gemischt wurden. Nach Inkubation der Blutagarplatten für 24h bei 37° C wurde der Mittelwert der KBE für die dreifach angefertigten Platten bestimmt. Der Bakterizidie-Test wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt und der jeweilige KBE-Mittelwert des negativen Kontrollserums am Testtag als maximale Vermehrungsfähigkeit der Bakterien definiert. Anschließend wurde unter Anwendung der folgenden Formel der Prozentsatz der Vermehrungsfähigkeit der Bakterien in den einzelnen Seren kalkuliert:

$$\frac{\text{Mittelwert der KBE der Serumprobe} \times 100}{\text{Mittelwert der KBE des neg. Kontrollserums}}$$

Mittelwert der KBE des neg. Kontrollserums

Einige Seren wurden zusätzlich mit einer Suspension von *S. zooepidemicus* 631 wiederholt adsorbiert und unter Vergleich der adsorbierten mit der nicht adsorbierten Serumprobe in einer Verdünnung von 1:4 in THB einem erneuten Bakterizidie-Test unterzogen. Zusätzlich wurden diese Seren in einer Verdünnung von 1:60 in THB getestet. Für die Adsorption wurden 60 l Serum mit 60 l einer hitzeinaktivierten Suspension von *S. zooepidemicus* 631 (siehe 4.1.7.1.2.) gemischt und unter wiederholtem gründlichen Mischen für 30 min bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und 100 l des Überstandes mit 100 l *S. zooepidemicus*-Suspension erneut für 30 min bei 37° C unter wiederholtem Mischen adsorbiert.

4.7.3. Oponisierungs-Test

Um festzustellen, ob es sich bei der im Bakterizidie-Test ermittelten bakteriziden Wirkung von Seren um eine gesteigerte Phagozytose von *S. equi* durch neutrophile Granulozyten in der Anwesenheit opsonisierender Serumantikörper handelt, wurden Serumproben im Oponisierungs-Test (TIMONEY et al. 1995) auf ihre opsonisierende Wirkung untersucht. Die Separation neutrophiler Granulozyten aus frischem, heparinisiertem Pferdeblut (#517) erfolgte mittels diskontinuierlichem Percoll-Gradienten (PYCOCK et al. 1987). Dazu wurde ein Plastik-Zentrifugenröhrchen mit 2,5 ml 57%-igem Percoll (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma) beschickt und anschließend, unter Verwendung einer 3ml-Spritze und Kanüle, mit 2,5 ml 75%-igem Percoll in HBSS vom Grunde des Röhrchens aus unterschichtet. Nach vorsichtiger Überschichtung des Percoll-Gradienten mit 7 ml heparinisiertem Blut erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 350xg und Raumtemperatur und ohne Abbremsung nach abgeschlossener Zentrifugation. Durch diese Dichtegradienten-Zentrifugation siedelten sich die neutrophilen Granulozyten zwischen den beiden Percoll-Schichten an und konnten nach vorsichtiger Entfernung des überlagerten Plasmas, der Lymphozytenschicht und des 57%-igen Percolls abpipettiert werden. Anschließend wurden die Granulozyten mit 10 ml RPMI-1640-Medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) gewaschen, durch Zentrifugation für 7 min bei 350xg pelletiert, in 6 ml RPMI suspendiert und ihre Konzentration in einer Zellzählkammer ermittelt. Jeweils 80 l (ca. 2-3 x 10⁵ Zellen) dieser Suspension wurden in Vertiefungen einer Zellkulturplatte (24 Well Cell Culture Cluster, Costar, Cambridge, MA) auf dort befindliche sterile Deckgläschen (12 mm, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) gegeben und für 2h bei 37° C und unter 5% CO₂-Spannung inkubiert. Zur Entfernung nicht anheftender neutrophiler Granulozyten wurden die Plattenvertiefungen im Anschluß an die Inkubation mit jeweils 1 ml PBS gewaschen. Eine Mischung bestehend aus 5 l (1-2 x 10⁶ KBE) einer 18h-Kultur von *S. equi* CF22 in THB, 450 l RPMI, 10 l Meerschweinchenserum (Komplementquelle) und 25 l der Serumprobe wurde für 30 min bei 37° C unter Rotation inkubiert und nachfolgend auf die Deckgläschen in den Vertiefungen der Platte pipettiert, welche daraufhin für 1h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen für 10 min in 10%-igem Formalin fixiert, mit Aqua dest. gewaschen, mit Giemsalösung für 10 min gefärbt und anschließend im Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung (Ölimmersion) betrachtet. Serumproben wurden dreifach angesetzt, jeweils 300 Zellen eines Deckgläschens untersucht und der durchschnittliche Prozentsatz an neutrophilen Granulozyten mit phagozytierten Streptococci ermittelt. Ein negatives Kontrollserum eines Pferdes (#8) ohne Kontakt zu *S. equi* und mit niedrigem M-Protein-spezifischem Antikörpertiter, sowie ein positives Kontrollserum eines druserekonvaleszenten Pferdes (Snowflake) mit entsprechend hohem Antikörpertiter wurde in den Test einbezogen.

4.7.4. Statistische Berechnungen

Für epizootiologische und klinische Daten wurde der Median und das arithmetische Mittel errechnet, für immunologische Daten zusätzlich die Standardabweichung und der Standardfehler des Mittelwertes.

Um festzustellen, ob bei den 13 in der 11. Woche mit *S. equi* inokulierten Pferden ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den immunologischen Daten zu Beginn des Hauptversuches und zum Zeitpunkt der experimentellen Inokulation bestand, wurden weitere statistische Tests durchgeführt. Dazu wurden die Daten zunächst mit dem Statistical Analysis Systems (SAS)-Computerprogramm auf Normalverteilung (SAS INSTITUTE INC. 1990a) geprüft. Normalverteilte Daten wurden anschließend im einseitigen t-Test für Paardifferenzen (SAS INSTITUTE INC. 1990b) getestet. Nicht normalverteilte Differenzen wurden im Vorzeichen-Rang-Test von Wilcoxon (SNEDECOR und COCHRAN 1989) einer Signifikanzprüfung unterzogen. Bei den statistischen Prüfungen wurde mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% (Signifikanzniveau =0,05) gearbeitet.

5. Ergebnisse

5.1. Vorversuch

Die an 12 Tieren durchgeführte intranasale Impfung mit *S. equi* "Cornell 709-27" (siehe 4.2.) führte bei einem der Tiere (#3) zu Fieber am 2. und 3. Tag nach der Zweitimpfung. Ein anderes Pferd (Sandy) entwickelte einen Tag vor der Zweitimpfung einen Abszess des linken Mandibularlymphknotens, der sich 6 Tage später nach außen entleerte. Mittels Abszeßtupferprobe gelang der kulturelle Nachweis des Impfstammes im Abszeßleiter.

S. equi M-Protein-spezifische lokale und systemische Antikörpertiter sind der Tabelle A3 im Anhang zu entnehmen. Die Titer-Mediane und -Mittelwerte der Impfgruppe während des Impfversuches liegen deutlich unter dem Mittelwert der entsprechenden Positivkontrolle. Eine lokale Immunantwort konnte bei #411 in Form eines geringgradigen IgA- und bei #10 in Form eines geringgradigen IgG-Anstiegs nachgewiesen werden. Im ELISA für *S. equi* M-Protein-spezifisches Serum IgG traten Hintergrundreaktionen auf, die sich in erhöhten Titern zu Versuchsbeginn äußerten. Lediglich #3 zeigte einen deutlichen Serumtiternanstieg, der auch nach Serumadsorption mit *S. zooepidemicus* 631 bestehen blieb. Der erhöhte IgG-Titer von Pinto in der 6. Woche konnte durch Serumadsorption deutlich verringert werden.

5.2. Hauptversuch

5.2.1. Epizootiologische Daten

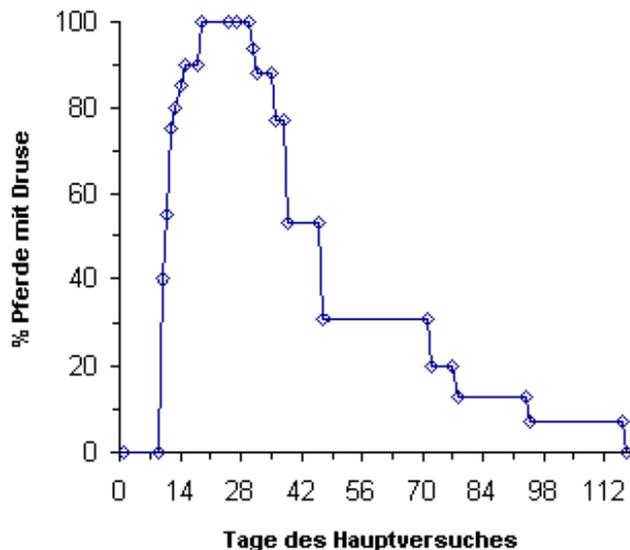
5.2.1.1. Inkubationszeit

Die als Infektionsquelle für den Hauptversuch dienenden experimentell infizierten (s. 4.3.) Pferde (#309 und #529) zeigten Fieber und Depression nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen und wurden dann in die Versuchsgruppe von 20 Tieren verbracht. Sämtliche Tiere der Versuchsgruppe erkrankten daraufhin an Druse, wobei der erste Fall 10 und der letzte Fall 19 Tage nach Einbringen der experimentell infizierten Tiere (#309 und #529) auftrat. Dabei erkrankten Tiere mit anschließend mildem Krankheitsverlauf später als Tiere mit schwerem Krankheitsverlauf. Der Median der Inkubationszeit betrug 11 Tage, der Mittelwert 12 Tage. Siehe hierzu Tabelle 1 und Abbildung 2.

Tab. 1: Inkubationszeit

Inkubationszeit (in Tagen)	Zahl der Pferde (Gesamt 20)
10	8
11	3
12	4
13	1
14	1
15	1
19	2

Abb. 2: Auftreten und Abklingen der Drusefälle



5.2.1.2. Morbidität, Krankheitsverlauf und -dauer

Die Morbidität des beobachteten Druseausbruches betrug 100%, wobei 20% der Tiere (#3, #7, #411, Sandy) einen milden, 55% einen gemäßigten bis schweren Krankheitsverlauf und 25% (#4, #6, #43, #528, #532) Komplikationen zeigten. Tiere mit kompliziertem Krankheitsverlauf wurden euthanasiert.

Ein jedes Pferd galt als von der Druse genesen beim Verschwinden jeglicher Krankheitszeichen, einschließlich der Erregerausscheidung. Die Krankheitsdauer betrug bei den einzelnen Tieren zwischen 12 und 106 Tagen, wobei Tiere mit milder Druse schneller genesen als Tiere mit schwerer Druse. Der Median der Krankheitsdauer betrug 28 Tage, der Mittelwert 40 Tage.

Bei 4 Pferden (20%) wurde ein ausgedehnter Verlauf mit einer Dauer von 61 (#2), 67 (Snowflake), 84 (Lucky) bzw. 106 Tagen (#59) beobachtet (s. Abb. 2). Zwei dieser Pferde (Snowflake, Lucky) entwickelten Fisteln im Anschluß an die Abszedierung eines Mandibularlymphknotens und zwei (#2, #59) schieden den Erreger im Anschluß an die akute Erkrankung über einen längeren Zeitraum aus.

Im Anschluß an die in der 11. Woche durchgeführte experimentelle Inokulation mit *S. equi* zeigte keines der Pferde Krankheitszeichen.

5.2.1.3. Ausscheidung des Erregers

Während des Hauptversuches gelang bei jedem Pferd der Nachweis von *S. equi* mittels Nasengangsspül-, Nasentupfer- oder Abszeßtupferprobe.

In der Gruppe von 9 intensiv auf Erregerausscheidung untersuchten Pferden konnte *S. equi* zwischen dem 7. und 43. Tag des Hauptversuches aus Nasengangsspülproben bzw. Nasentupferproben isoliert werden. Am 7. und 43. Tag konnte der Erreger jeweils nur bei einem Pferd nachgewiesen werden. Ein Maximum wurde am 24. und 28. Tag erreicht, an dem jeweils 6 (67%) der Tiere den Erreger ausschieden, 2 davon in größeren Mengen (siehe Tab. 2). Der maximale Zeitraum zwischen 2 positiven Tupferproben betrug 11 Tage (#3, Pinto).

Tab. 2: *S. equi*-Ausscheidung

Pferd	Tage des Hauptversuches																		
	3	7	10	14	17	21	24	28	31	35	38	43	46	49	52	56	63	71	73
#1	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#7	-	-	-	-	-	++	++	++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#9	-	-	-	-	+++	+	+++	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
#10	-	++	-	-	+	-	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
#411	-	-	-	-	-	-	-	++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prince	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pinto	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sandy	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+ geringgradige Erregerausscheidung

Inhaltsverzeichnis

++ mittelgradige Erregerausscheidung

+++ hochgradige Erregerausscheidung

Bei 8 der 9 beobachteten Pferde gelang der erste Nachweis von *S. equi* aus Nasengangsspülproben bzw. Nasentupferproben zwischen 2 und 9 Tagen nach dem Auftreten von Fieber, mit einem Median von 7 und einem Mittelwert von 6 Tagen. Bei einem Tier (#10) konnte der Erreger bereits 5 Tage vor dem Auftreten von Fieber nachgewiesen werden. Die Dauer der Erregerausscheidung betrug bei den einzelnen Tieren dieser Gruppe zwischen 3 und 28 Tagen mit einem Median und Mittelwert von 14 Tagen. Bei einem dieser Tiere (Sandy) wurde der Erreger im Anschluß an einen milden Krankheitsverlauf noch 6 Tage lang symptomlos ausgeschieden.

In der gesamten Versuchsgruppe konnte *S. equi* bei zwei Pferden noch am 71. (#2) und 116. (#59) Tag des Hauptversuches bzw. 61 und 106 Tage nach dem Auftreten von Fieber nachgewiesen werden, wobei bei Pferd #2 der erste Erregernachweis aus Nasentupferproben erst 39 Tage nach dem Auftreten von Fieber gelang. Pferd #2 schied den Erreger bis 22 Tage, Pferd #59 bis 24 Tage nach dem Verschwinden klinischer Symptome aus. Bei Pferd #2 wurden dabei vor dem letzten Erregernachweis 4 negative Nasentupferproben in einem Zeitraum von 23 Tagen erhalten. Beide Pferde wurden aufgrund der anhaltenden Erregerausscheidung in der 11. Woche von den übrigen Tieren der Versuchsgruppe getrennt und keiner experimentellen Inokulation unterzogen.

Im Anschluß an die experimentelle *S. equi*-Inokulation von 13 Pferden in der 11. Woche des Hauptversuches konnte der Erreger bei keinem dieser Tiere nachgewiesen werden.

5.2.1.4. Tenazität des Erregers

Eine 8 Monate nach dem Druseausbruch stattfindende Wiederbelegung des Stalles mit einer Herde empfänglicher Jährlinge, hatte trotz ausgebliebener seuchenhygienischer Maßnahmen wie z.B. Stalldesinfektion, keinen Druseausbruch zur Folge.

5.2.2. Klinische Daten

5.2.2.1. Inzidenz der verschiedenen Symptome der Druse

Die folgende Tabelle zeigt die Inzidenz der beobachteten und nachfolgend näher beschriebenen Symptome des aufgetretenen Druseausbruches.

Tab. 3: Inzidenz der verschiedenen Drusesymptome

Symptom	Absolute Häufigkeit (Gesamt: 20)	Prozentuale Häufigkeit
Depression	16	80
Fieber (>38,6° C)	20	100
Seromuköser Nasenausfluß	20	100
Eitriger Nasenausfluß	19	95
Geringgradige Lymphknotenschwellung*, **	2	10
Lymphknotenabszeß*	16	80
Komplikationen	5	25

* Bestimmt durch Adspektion von außen; mediale Retropharyngeallymphknoten nicht einbezogen.

** Ohne anschließende Abszedierung.

Inappetenz wurde bei keinem der 20 Tiere beobachtet.

5.2.2.2. Auftreten und Dauer der Symptome

Die folgende Tabelle zeigt den Gruppenmedian und -mittelwert der Dauer der beobachteten Symptome der Druse-Epizootie.

Tab. 4: Auftreten und Dauer der verschiedenen Drusesymptome

Symptom	Median in Tagen (Umfang)	Mittelwert in Tagen
Depression	3 (1-14)	5
Fieber	16 (10-19)	15

Eitriger Nasenausfluß	21	(2-76)	21
Ggr. Lymphknotenschwellung*	8	(4-16)	8
Lymphknotenabszedierung*	7	(2-13)	7
Abszeßentleerung*, **	13	(5-76)	18

* Bestimmt durch Adspektion von außen; mediale Retropharyngeallymphknoten nicht einbezogen.

** Durch die Haut nach außen.

Nachfolgende Abbildung zeigt den Gruppenmedian des Auftretens und Andauerns der verschiedenen Drusesymptome.

Abb. 3: Auftreten und Dauer verschiedener Drusesymptome

0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40

Tage des Hauptversuches

* Abszesse der medialen Retropharyngeallymphknoten nicht einbezogen

5.2.2.3. Depression

Depression wurde bei 16 Tieren beobachtet und dauerte bei den einzelnen Tieren zwischen 1-14 Tagen mit einem Median von 3 und einem Mittelwert von 5 Tagen (s. Tab. 3 und Tab. 4). Vier Pferde mit mildem Krankheitsverlauf (#3, #7, #411, Sandy) zeigten keine Depression.

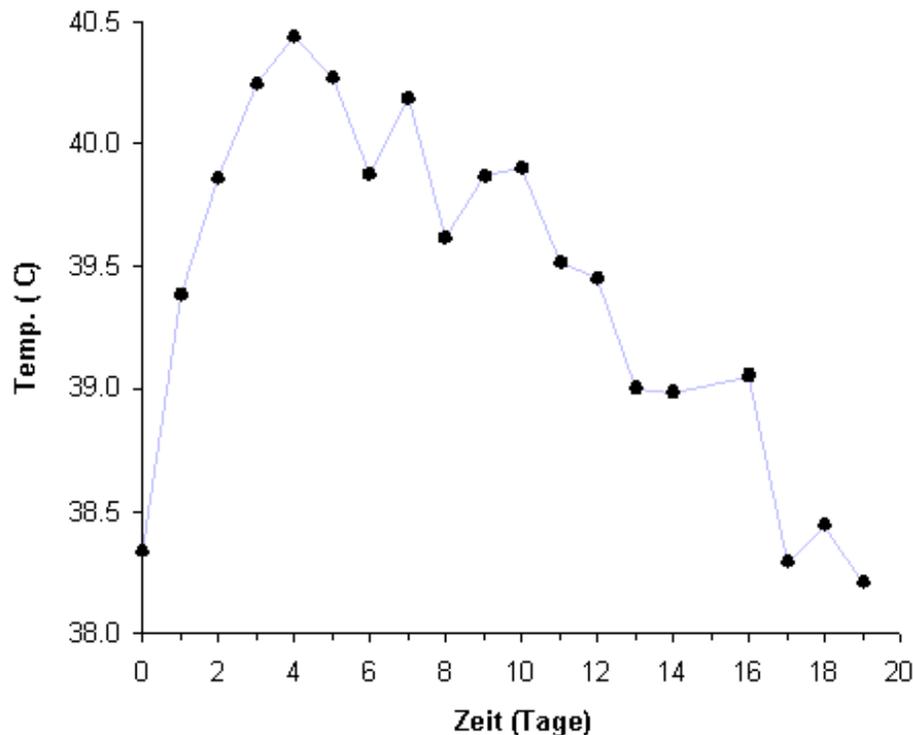
5.2.2.4. Fieber

Sämtliche Tiere entwickelten Fieber während des Druseausbruches, beginnend zwischen dem 10. und 19. Versuchstag (Median: 11. Tag) und mit Maximaltemperaturen zwischen 39,4° C (Sandy) und 41,4° C (#8). Der Gruppenmittelwert der Maximaltemperatur betrug 40,6° C, der Median 40,7° C. Die Maximaltemperatur wurde von den einzelnen Tieren zwischen dem 2. und 10. Fiebertag erreicht, mit einem Mittelwert von 5 und einem Median von 4 Tagen.

Zwei Pferde mit mildem Krankheitsverlauf zeigten über einen Zeitraum von 6 Wochen (#3) bzw. 9 Tagen (#411) intermittierendes Fieber mit einer Maximaltemperatur von 39,6° C. Den 1-3 Tage anhaltenden Fieberphasen folgten dabei 1-2 (#411) bzw. 2-5 (#3) Tage andauernde fieberfreie Phasen (s. 11.1. Tab. A4). Bei den übrigen Tieren dauerte das Fieber für 10-19 Tage an, mit einem Mittelwert von 15 und einem Median von 16 Tagen (s. Tab. 4), wobei bei 4 Tieren (Pinto, Sandy, Snowflake, Lucky) ein fieberfreier Tag 1-3 Tage vor endgültiger Einstellung des Fiebers beobachtet wurde (s. 11.1. Tab. A4). Im Anschluß an die erste Fieberphase entwickelten drei Tiere mit komplizierter Druse (#6, #43, #528) erneut Fieber und wurden daraufhin euthanasiert.

Die folgende Abbildung (Abb.4) zeigt den Verlauf der Fieberkurve unter Verwendung des Gruppenmittelwertes der rektalen Körpertemperatur. Dazu wurden die Temperaturdaten koordiniert, indem der Gruppenmittelwert einen Tag vor dem Auftreten von Fieber (Tag 0) und nachfolgend -mit dem ersten Fiebertag (Tag 1) eines jeden Tieres beginnend- über einen Zeitraum von 19 Tagen ermittelt wurde (s. 11.1. Tab. A4). Die Daten der zwei Pferde mit intermittierendem Fieber (3#, #411) wurden dabei nicht einbezogen.

Abb. 4: Fieberkurve



Die Fieberkurve erreicht mit einem Temperaturmittelwert von 40,4° C am 4. Fieber-tag ein Maximum und fällt danach über 12 Tage allmählich ab. Am 17. Tag ist die Durchschnittstemperatur auf den Ausgangswert zurückgekehrt.

5.2.2.5. Nasenausfluß

Seröser und seromuköser Nasenausfluß wurde bei allen Tieren beobachtet und war von eitrigem Nasenausfluß gefolgt. Lediglich ein Pferd (#3) mit milder Druse zeigte keinen eitrigem Nasenausfluß. Bei den übrigen Tieren begann der eitrigem Nasenausfluß zwischen 4 und 12 Tagen (Mittelwert: 6, Median: 5 Tage) nach dem Auftreten von Fieber und hielt für 2 (Sandy) bis 76 (#59) Tage an, mit einem Mittelwert und Median von 21 Tagen (s. Tab. 4).

5.2.2.6. Befunde der Kopflymphknoten

Bei 2 Tieren (#3, Sandy) konnten äußerlich keinerlei Veränderungen an den Lymphknoten festgestellt werden. Zwei weitere Tiere (#7, #411) zeigten lediglich eine geringgradige Schwellung der Mandibularlymphknoten über einen Zeitraum von 5 Tagen. Die verbleibenden 16 Tiere entwickelten durch Adspektion von außen erkennbare Abszesse der Kopflymphknoten, deren Anbildung zwischen 0 und 4 Tagen (Mittelwert und Median: 2 Tage) nach dem Auftreten von Fieber begann. Bei 14 Tieren (70%) abszedierten die Mandibularlymphknoten (s.Tab.5), wobei bei zehn Tieren ein Abszeß und bei 4 Tieren (#43, #532, Snowflake, Lucky) zwei Abszesse der Mandibularlymphknoten beobachtet wurden. Vier Tiere (20%) zeigten durch Adspektion von außen erkennbare Abszesse der lateralen Retropharyngeal-lymphknoten, 3 davon (#4, #9, Pinto) beidseitig, eines einseitig (#528). Zwei dieser Tiere (#9, #528) hatten zusätzlich Abszesse der Mandibularlymphknoten.

Einseitige Abszesse der Parotideallymphknoten wurden bei 2 Pferden (#528, Snowflake) beobachtet.

Sämtliche Abszesse der Mandibular- und Parotideallymphknoten und ein Abszeß der lateralen Retropharyngeallymphknoten (#9) entleerten sich durch die Haut nach außen. Die Anbildung dieser Abszesse bis zu ihrem Durchbruch nach außen dauerte zwischen 2 und 13 Tagen mit einem Mittelwert und Median von 7 Tagen (s. Tab. 4). Vom Durchbruch bis zur vollständigen Abheilung vergingen im Mittel 18 Tage (Median: 13 Tage). Bei 2 Tieren kam es im Anschluß an die Abszedierung der Mandibularlymphknoten zur Fistelbildung und verzögerten Heilung über 59 (Snowflake) bzw. 76 (Lucky) Tage.

Abszesse der medialen Retropharyngeallymphknoten blieben unberücksichtigt, da eine zur eindeutigen Diagnose erforderliche Endoskopie der Luftsäcke nicht durchgeführt wurde.

5.2.2.7. Lokalisation und Häufigkeit von Abszessen

Die nachfolgende Tabelle zeigt die prozentuale Häufigkeit des Auftretens *S. equi* verursachter Abszesse in verschiedenen Lokalisationen

bezogen auf die gesamte Versuchsgruppe (20 Tiere).

Tab. 5: Lokalisation und Häufigkeit von Abszessen

Lokalisation	Häufigkeit (%)
Mandibularlymphknoten	70
Retropharyngeallymphknoten*	20
Parotideallymphknoten	10
Oberlippe	10
Backe	10
Mesenterium	10
Periproktallymphknoten	5

* Laterale Retropharyngeallymphknoten.

Pferd #3 entwickelte am 32. Tag des Hauptversuches einen walnußgroßen Backenabszeß, der sich 4 Tage später in die Maulhöhle entleerte und nach weiteren 10 Tagen ausgeheilt war. Dieser Abszeß blieb in Tabelle 5 unberücksichtigt, da *S. equi* weder durch Punktion des Abszesses, noch durch Abszeßtupferprobe nach Durchbruch des Abszesses nachgewiesen werden konnte. Weiterhin unberücksichtigt blieben etwaige Erkrankungen der medialen Retropharyngeal-lymphknoten, da kein Laryngoskop zur Spiegelung der Luftsäcke zur Verfügung stand.

5.2.2.8. Komplikationen

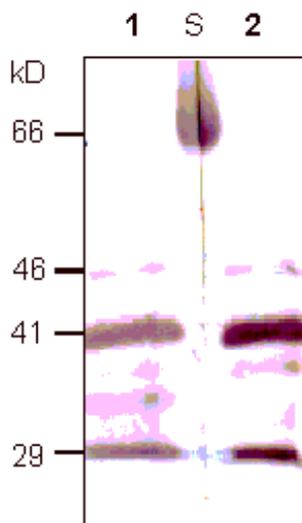
S. equi assoziierte Komplikationen wurden bei 5 Tieren (25%) beobachtet, die daraufhin eingeschläfert werden mußten. Ein Pferd (#4) zeigte mittel- bis hochgradige Atemnot und starke Salivation am 26. Versuchstag. Zwei Pferde (#528, #532) entwickelten in der akuten Krankheitsphase eine Phlegmone im Kopfbereich mit Ödembildung. Bei einem dieser Pferde (#528) und einem weiteren Tier (#6) mit zunehmendem Gewichtsverlust und erneutem Fieber vom 44. Versuchstag an, wurde bei der Obduktion ein Mesenterialabszeß festgestellt. Aus den Abszessen konnte *S. equi* in Reinkultur isoliert werden. Bei Pferd #43 erfolgte die Streuung des Erregers in die Periproktallymphknoten mit nach außen durchbrechendem Abszeß am 44. Versuchstag. Insgesamt zeigten somit 3 Tiere (15%) der Versuchsgruppe das Bild von Drusemetastasen.

5.2.3. Immunologische Daten

5.2.3.1. Reinheit des *S. equi* M-Proteins

Die Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse (s. 4.7.1.2.) des durch heiße Säureextraktion und elektrophoretische Reinigung (s. 4.7.1.1.) gewonnenen *S. equi* M-Proteins.

Abb. 5: Western-Blot



1 = *S. equi* M-Protein inkubiert mit Antiserum gegen *S. zooepidemicus* recomb.

M-Protein (55 kD)

2 = S. equi M-Protein inkubiert mit Antiserum gegen S. equi M-Protein (41 kD)

S = Standard (HMW-Marker)

In Spur 2 ist außer einer deutlichen Anfärbung des S. equi-spezifischen 41 kD-Fragmentes eine weitere deutliche Bande mit einem Molekulargewicht von 29 kD zu sehen. Es handelt sich dabei um ein Bruchstück des 41 kD-Fragmentes (GALÁN und TIMONEY 1987). Zudem zeigt die Probe einen geringen Anteil des S. equi-spezifischen 46 kD-Fragmentes.

Aus Spur 1 kann man ersehen, daß das mit S. zooepidemicus kreuzreagierende 55 kD-Fragment erfolgreich eliminiert wurde. Weiterhin ist eine geringe Reaktion der gegen S. zooepidemicus M-Protein gerichteten Antikörper mit den in der Proteinprobe vorliegenden S. equi-spezifischen M-Protein-Fragmenten zu erkennen. Bei Inkubation mit Antiserum gegen S. zooepidemicus 631 (nicht abgebildet) zeigte sich das gleiche Bild wie in Spur 1.

5.2.3.2. M-Protein-spezifisches Serum IgG

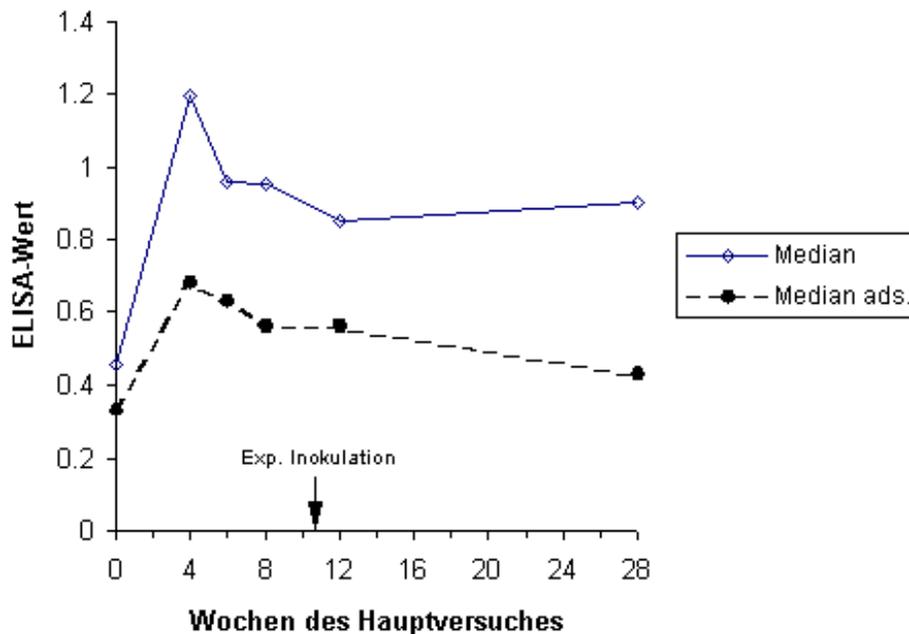
ELISA-Werte für M-Protein-spezifisches Serum IgG wurden zu Versuchsbeginn (Tag 0) und für die 4., 6., 8., 12. und 28. Woche des Hauptversuches ermittelt.

Die Immunreaktion individueller Tiere erwies sich als äußerst heterogen, sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht (s. 11.1. Tab. A5 und Abb. A1-A16). Maximale Serum IgG-Titer wurden von den einzelnen Pferden zwischen der 4. und 8. Woche erreicht. Da die Tiere nicht synchron reagierten, wurde der Median der Gruppe zur Interpretation herangezogen (s. Abb. 6).

S. equi M-Protein-spezifisches Serum IgG stieg nach Beginn des Hauptversuches deutlich an und erreichte ein Maximum in der 4. Woche. Danach sank der Titer allmählich ab und erreichte ein Plateau in der 12. Woche. Der Median in der 28. Woche lag noch deutlich über dem Ausgangswert (Tag 0). Bei den in der 11. Woche experimentell inokulierten Pferden bestand zwischen dem mittleren Serum IgG-Gehalt zu Versuchsbeginn und in der 8. Woche sowohl für adsorbierte, als auch für nicht adsorbierte Serumproben ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,01$).

Durch Serumadsorption mit S. zooepidemicus 631 wurde ein beträchtlicher Anteil der Serumantikörper eliminiert. Der Gruppenmedian nach Adsorption verlief dabei annähernd parallel zum Median vor Adsorption (s. Abb. 6). Das Ausmaß der Titerreduktion durch Adsorption variierte jedoch zwischen verschiedenen Pferden und zwischen verschiedenen Serumproben ein- und desselben Tieres (s. Abb. A1-A16). Das positive Kontrollserum wurde durch Adsorption von einem mittleren ELISA-Wert von 1,39 auf 0,71 reduziert.

Abb. 6: Median der ELISA-Werte für Serum IgG



Median ads. = Median des Serum IgG nach Adsorption mit S. zooepidemicus 631

Zwei Pferde (#9, #528) zeigten extrem hohe ELISA-Werte mit nur geringer Reduktion durch Serumadsorption und Serumverdünnung auf 1:100. Der relativ hohe IgG-Gehalt von Prince zu Versuchsbeginn wurde durch Serumadsorption deutlich verringert. Bei einem Pferd (#3), das im Anschluß an die Impfung einen erhöhten IgG-Titer zeigte, konnte während des Hauptversuches keine Serumreaktion

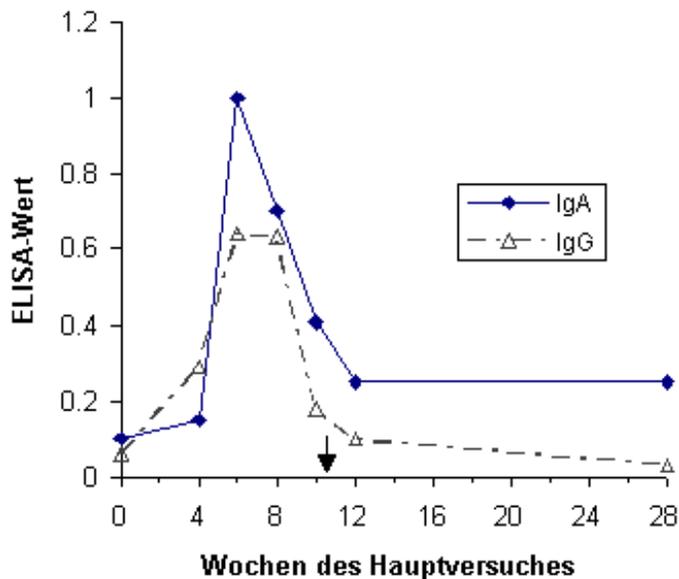
festgestellt werden (s. 11.1. Abb. A3).

Die in der 11. Woche durchgeführte experimentelle Inokulation 13 genesener Pferde hatte keinen erkennbaren Titeranstieg zur Folge.

5.2.3.3. M-Protein-spezifisches IgG und IgA der Nasengangsspülproben

ELISA-Werte für M-Protein-spezifisches IgG und IgA der Nasengangsspülproben wurden zu Versuchsbeginn (Tag 0) und für die 4., 6., 8., 10., 12. und 28. Woche des Hauptversuches ermittelt. Auch die lokale Immunreaktion erwies sich als qualitativ und quantitativ sehr heterogen mit maximalen ELISA-Werten für IgG zwischen der 4. und 8., für IgA zwischen der 6. und 10. Woche (s. 11.1. Tab. A5 und Abb. A19-A33). Die Abbildung 7 zeigt den Gruppenmedian der ELISA-Werte, wobei der Mittelwert der Positivkontrolle für IgG=2,09 und für IgA=1,57 betrug.

Abb. 7: Median der ELISA-Werte für IgG und IgA der Nasengangsspülproben



= Experimentelle intranasale *S. equi*-Inokulation

Der IgG-Gehalt der Nasengangsspülproben stieg nach Versuchsbeginn deutlich an und erreichte ein Maximum in der 6. Woche. Von der 8. zur 10. Woche ist ein steiler Abfall zu vermerken mit nachfolgender Annäherung an den Ausgangswert in der 12. Woche. In der 28. Woche lag der Wert unter dem Ausgangswert.

Der IgA-Gehalt zeigte im Median einen geringgradigen Anstieg in den ersten 4 Wochen mit nachfolgendem steilen Anstieg zwischen der 4. und 6. Woche. Dem Maximum in der 6. Woche folgte ein Absinken des IgA-Gehaltes bis zur 12. Woche, wobei der Wert in der 12. und 28. Woche noch deutlich über dem Ausgangswert lag. Zwischen dem Median des Immunglobulingehaltes zu Versuchsbeginn und in der 10. Woche (½ Woche vor der experimentellen Inokulation) bestand bei den 13 experimentell inokulierten Pferden sowohl für IgA ($p < 0,01$) als auch für IgG ($p < 0,05$) ein statistisch signifikanter Unterschied in Form einer Erhöhung.

Drei Pferde (#1, #3, Pinto) zeigten keinen deutlich erkennbaren lokalen Titeranstieg während des Hauptversuches (s. Abb. A19, A21, und A30) und ein Pferd (#9) zeigte lediglich eine deutliche IgG-Reaktion (s. Abb. A25). Bei Pferd #5 und Sandy wurde nur ein geringgradiger lokaler Titeranstieg beobachtet (s. Abb. A22 und A31). Die Nasengangsspülproben der 4 Pferde (#1, #3, #9, Pinto) ohne deutliche lokale *S. equi* M-Protein-spezifische IgA-Reaktion wurden im ELISA für *S. zooepidemicus* W60 M-Protein-spezifisches IgA untersucht. Alle 4 Pferde zeigten eine geringe bis mittelgradige ($\text{ELISA-Werte bis } 0,57$) *S. zooepidemicus* M-Protein-spezifische IgA-Reaktion.

Erhöhte lokale Antikörpertiter zu Versuchsbeginn wurden bei Pferd #59 für IgG, #411 für IgA und Prince für IgG und IgA gemessen (s. Tab. A5). Diese Nasengangsspülproben wurden daraufhin im ELISA für *S. zooepidemicus* W60 M-Protein-spezifisches IgG bzw. IgA untersucht. Pferd #59 zeigte einen hohen ($\text{ELISA-Wert } 2,09$), Prince einen mittleren ($\text{ELISA-Wert } 0,54$) *S. zooepidemicus* M-Protein-spezifischen IgG-Gehalt. Im ELISA für *S. zooepidemicus* M-Protein-spezifisches IgA wurde bei Prince ein hoher ($1,32$) und bei #411 ein mittlerer ($0,51$) ELISA-Wert festgestellt.

Die experimentelle intranasale Inokulation in der 11. Woche schien keinen Einfluß auf den lokalen IgG- und IgA-Gehalt zu nehmen.

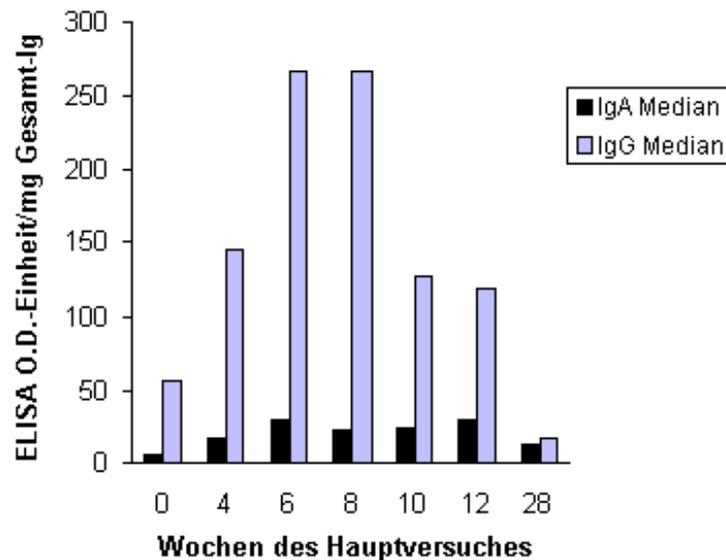
5.2.3.4. Konzentration und M-Protein-spezifische Aktivität des IgG und IgA der Nasengangsspülproben

Der Gesamtgehalt an IgG und IgA in den Nasengangsspülproben zeigte eine große Schwankungsbreite zwischen verschiedenen Tieren und zwischen verschiedenen Proben ein- und desselben Tieres (s. 11.1. Tab. A6 und A7). Der Median der IgA-Konzentration betrug zu unterschiedlichen Zeiten des Hauptversuches zwischen 38 und 143 g/ml, der Median der IgG-Konzentration zwischen 4 und 14 g/ml Nasengangsspülprobe. Höchstkonzentrationen wurden jeweils in der 6. und 8. Woche erreicht.

Der Median der *S. equi* M-Protein-spezifischen IgG-Aktivität lag mit Werten bis zu 267 ELISA O.D.-Einheiten/mg Gesamt-IgG deutlich über der IgA-Aktivität mit Werten bis zu 29 ELISA O.D.-Einheiten/mg Gesamt-IgA (s. Abb. 8 und Tab. A8 und A9).

Abb.8: Median der M-Protein-spezifischen IgG- und IgA-Aktivität der

Nasengangsspülproben



Eine hohe *S. equi* M-Protein-spezifische lokale IgG-Aktivität wurde von der 4. bis zur 12. Woche beobachtet mit einem Maximum in der 6.-8. Woche. Gruppenmedian und -mittelwert verliefen dabei annähernd parallel (s. Abb. A36). Die höchste M-Protein-spezifische IgA-Aktivität lag zwischen der 6. und 12. Woche vor, wobei sich Median und Mittelwert in der 10. Woche deutlich unterschieden (s. Abb. A37). In der 28. Woche lag die IgA-Aktivität noch deutlich über dem Ausgangswert. Pinto und #9 zeigten nur eine geringe, #1, #3 und Snowflake eine mittlere IgA-Aktivität. Bei einigen Tieren mit an Null grenzendem Gesamt-IgA-Gehalt führte die Errechnung der spezifischen Aktivität zu künstlichen Extremwerten, die unberücksichtigt blieben.

In der 10. Woche waren die mittlere spezifische IgA- und IgG-Aktivität der 13 in der 11. Woche mit *S. equi* inokulierten Pferde statistisch deutlich höher als zu Versuchsbeginn ($p < 0,01$ für IgA, $p < 0,05$ für IgG).

5.2.3.5. M-Protein-spezifisches IgM der Nasengangsspülproben

Die Nasengangsspülproben von 4 Pferden (#1, #3, #9, Pinto) mit niedriger *S. equi* M-Protein-spezifischer IgA-Aktivität wurden im ELISA für *S. equi* M-Protein-spezifisches IgM untersucht. Sämtliche Proben zeigten einen nur geringen IgM-Gehalt.

5.2.3.6. Bakterizide Wirkung der Seren

Die bakterizide Wirkung der Seren auf *S. equi* wurde mittels Bakterizidie-Test bei 15 Pferden zu Versuchsbeginn und in der 5., 8., 10. und 28. Woche des Hauptversuches ermittelt und als prozentuale Vermehrungsfähigkeit von *S. equi* im Serum angegeben (s. Tab. 6).

Zu Versuchsbeginn wies die Mehrheit der Pferde eine geringe bis mittlere bakterizide Serumwirkung auf. In der 5. Woche war die Vermehrungsfähigkeit von *S. equi* in den Seren bereits deutlich reduziert. Der Gehalt an bakteriziden Serumantikörpern stieg danach weiter an und erreichte ein Maximum in der 8. bis 10. Woche mit einer Vermehrungsfähigkeit des Erregers im Serum von 0% (Median)

bzw. 1% (Mittelwert). Diese starke Bakterizidie konnte bei den meisten Pferden noch in der 28. Woche nachgewiesen werden. Die bakterizide Serumwirkung verlief bei den einzelnen Tieren nicht parallel mit dem *S. equi* M-Protein-spezifischen Serum IgG-Gehalt.

Tab. 6: Vermehrungsfähigkeit von *S. equi* im Serum (%)

Pferd	Woche des Hauptversuches				
	0.	5.	8.	10.	28.
#1	100	35	22	8	0
#2	42	3	0	0	0
#3	2	0	0	0	0
#5	2	1	0	0	0
#7	2	0	0	0	2
#8	12	0	0	0	0
#9	23	1	0	0	0
#10	2	0	0	0	0
#59	100	14	0	1	0
#411	1	0	0	0	0
Prince	37	10	6	3	6
Pinto	100	24	8	1	15
Sandy	31	3	1	0	1
Snowflake	60	2	0	0	1
Lucky	100	18	1	3	13
Median	31	2	0	0	0
Mittelwert	41	7	3	1	3
S	41	11	6	2	5
SFM	11	3	2	1	1

S=Standardabweichung

SFM=Standardfehler des Mittelwertes

Der bakterizide Serumeffekt der experimentell mit *S. equi* inokulierten Pferde war im Median in der 10. Woche statistisch deutlich höher als zu Versuchsbeginn ($p < 0,01$).

Die Seren einiger Tiere (#3, #5, #7, #10), die eine hohe bakterizide Serumwirkung zu Versuchsbeginn (Woche 0) zeigten, wurden im Opsonierungs-Test untersucht. Dabei konnte lediglich bei Pferd #3 eine hohe opsonisierende Antikörper-Aktivität nachgewiesen werden. Nach Hitzeinaktivierung zeigte dieses Serum eine wesentlich geringere bakterizide Wirkung auf *S. equi*. Durch Verdünnung dieser Serumprobe auf 1:60 im Bakterizidie-Test konnte der bakterizide Effekt geringfügig, durch Adsorption mit *S. zooepidemicus* deutlich reduziert werden, wobei die Vermehrungsfähigkeit des Erregers nach Verdünnung der Serumprobe von 2% auf 9% und nach Serumadsorption mit *S. zooepidemicus* von 2% auf 40% anstieg. Die Adsorption der zu Versuchsende (28. Woche) von diesem Tier gewonnenen Serumprobe führte zu einer von 0% auf 13% erhöhten Vermehrungsfähigkeit von *S. equi*.

Beim Vergleich des Bakterizidie-Tests mit dem Opsonierungs-Test, unter Verwendung von 3 prä- und postexperimentellen Serumpaaren, konnte eine deutliche Korrelation zwischen diesen Tests festgestellt werden. Vier Monate vor Versuchsbeginn gewonnene Serumproben hatten eine geringe bakterizide Wirkung im Bakterizidie-Test und geringe opsonisierende Wirkung (Phagozytose) im Opsonierungs-Test. Serumproben derselben Tiere aus der 14. Woche des Hauptversuches hatten eine deutlich erhöhte bakterizide Wirkung in Form einer gesteigerten Phagozytose des Erregers, bedingt durch die Anwesenheit bakterizider, opsonisierender Antikörper. Siehe dazu Tabelle 7.

Die Ergebnisse an unterschiedlichen Tagen durchgeführter Bakterizidie- und Opsonierungs-Tests zeigten eine große Schwankungsbreite.

Tab. 7: Bakterizidie- und Opsonisierungs-Test im Vergleich

Serumprobe	OPSONISIERUNGS-TEST (% Neutrophile Granulozyten*)		BAKTERIZIDIE-TEST (% Vermehrungsfähigkeit von S. equi)	
	prä-inf.**	post-inf.***	prä-inf.	post-inf.
Pferd #2	1	8	87	0
Pferd #8	1	4	49	0
Prince	1	9	70	0
Pos. Kontrolle	1		100	
Neg. Kontrolle	18		0	

* % Neutrophile Granulozyten mit phagozytierten Streptococcen

** 4 Monate vor Beginn des Hauptversuches

*** 14. Woche des Hauptversuches

6. Diskussion

6.1. Vorversuch

Der Versuch, bei 12 Pferden mittels intranasaler Verabreichung des kapsellosen Impfstammes S. equi "Cornell 709-27" eine aktive, schutzvermittelnde Immunisierung zu bewirken, scheiterte unerwartet. Dieser Impfstamm wurde im Jahre 1985 (TIMONEY und GALÁN 1985) erfolgreich in der lokalen Immunisierung einer Gruppe von Ponies angewendet, welche Impftiter vergleichbar mit Titer druserekonvaleszenter Tiere entwickelten und gegenüber einer experimentellen intranasalen Infektion mit S. equi geschützt waren. Im vorliegenden Experiment erfuhr die Impfgruppe keine ausreichende Immunstimulation und war empfänglich für Druse bei anschließender Kontaktinfektion. Die Ursache des Scheiterns liegt entweder in einem Unterschied der verwendeten Pferdepopulation, in einer Veränderung des Impfstammes während der 9-jährigen Lagerung bei -70° C oder in einem Unterschied im Impfprotokoll. Da es sich bei der vorliegenden Impfgruppe um eine sehr heterogene Population handelt, scheint ein genetischer Unterschied der gesamten Gruppe in Form einer verminderten Empfänglichkeit für den Impfstamm eher unwahrscheinlich. Zudem enthielt die Gruppe einige den 1985 verwendeten Tieren in Alter und Rasse vergleichbare Pferde. Da die Impfgruppe zuvor keinen Kontakt zu S. equi hatte, ist das Vorliegen S. equi-spezifischer, gegen den Impfstamm gerichteter Antikörper auszuschließen. Es wäre allerdings denkbar, daß durch Kontakt zum ubiquitären S. zooepidemicus kreuzreagierende Antikörper vorlagen, die den avirulenten Impfstamm -im Gegensatz zu virulenten S. equi-Stämmen- abzuwehren vermochten.

Eine Veränderung des Impfstammes unter Verlust der Immunisierungsfähigkeit wäre durch den Verlust immunologisch wirksamer Proteine erklärbar. Ein heißer Säureextrakt des Impfstammes zeigte jedoch im Westernblot deutlich die immunologisch reaktiven S. equi-spezifischen M-Proteinfragmente (41/46 kD). In der Humanmedizin, in der in der Regel auf Streptococcen-Lebendimpfstoffe verzichtet wird, hat sich bereits die intranasale Verabreichung von M-Protein als wirksam erwiesen. Die Impfung führt dabei zu einer Verhinderung der Kolonisation homologer M-Typen im Nasopharynx und zur Reduktion unerkannter Keimträger (POLLY et al. 1975). Auch bei Pferden wurde ein lokaler Effekt nach intranasaler Impfung mit M-Protein vermerkt. So führte die zusätzliche intranasale Verabreichung von S. equi M-Protein zu höheren lokalen Antikörpertitern als die alleinige intramuskuläre Verabreichung (SRIVASTAVA und BARNUM 1983b). Weiterhin hat sich auch die lokale Verabreichung von Lebend-Vakzine im Schutz gegen Streptococceninfektionen bewährt. So hat sich bei Schweinen ein avirulenter Impfstamm erfolgreich in der Prophylaxe der durch Streptococcen der Gruppe E verursachten Backenabszeße erwiesen (ENGELBRECHT 1968). Das Ausbleiben einer humoralen Immunreaktion und eines Schutzeffektes nach Verabreichung eines M-Protein-haltigen, vermehrungsfähigen S. equi-Lebendimpfstoffes erscheint daher schwer erklärbar. Es wäre denkbar, daß der von uns verwendete Impfstamm eine verminderte Haftungsfähigkeit oder ein vermindertes Eindringungsvermögen besaß. Das beobachtete Fieber und die deutliche Serumreaktion eines der Tiere (#3), sowie das Auftreten eines Abszesses des Mandibularlymphknotens bei einem weiteren Pferd (Sandy) sprechen allerdings gegen diese Erklärungen.

Das verwendete Impfprotokoll zeigte zwei Unterschiede zu dem von TIMONEY und GALÁN (1985) beschriebenen Protokoll. Zum einen wurde bei der hier beschriebenen Impfung eine geringere Dosis von 5×10^8 CFU (statt 3×10^9 CFU) verwendet und zum andern erfolgte die Nachimpfung bereits nach 3 Wochen anstelle von 4 Wochen. In der Humanmedizin werden Antigendosis sowie Zahl und Zeitpunkt der Nachimpfungen als kritisch in der lokalen Stimulierung einer Immunantwort im Respirationstrakt (SHVARTSMAN und ZYKOV 1976) und im Verdauungstrakt (ANDRÉ et al. 1975) angesehen, wobei die Manipulation dieser Parameter entweder zur Immunität oder zum Ausbleiben einer Immunantwort führt (McDERMOTT et al. 1982). Es könnte sein, daß die Impfdosis im vorliegenden Versuch zu gering war, um eine ausreichende Immunstimulation zu bewirken. In diesem Zusammenhang stellt sich auch

die Frage, an welchem Ort die Antigenaufnahme und -verarbeitung und somit die Immunstimulation primär stattfindet. MAIR et al. (1987) beschreiben ein beim Pferd gut ausgebildetes, diffus verteiltes Nasenschleimhaut-assoziiertes lymphatisches Gewebe (NALT), das aus knötchenförmig angeordneten lymphatischen Aggregaten in der Mukosa des oberen Respirationstraktes besteht und strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu den Peyerschen Platten im Verdauungstrakt (gut-associated lymphatic tissue=GALT) aufweist. Neben dem NALT könnten auch die beim Pferd gut entwickelten Tonsillen (ELIAS 1946), in deren Krypten Antigene sich festfangen und aufgenommen werden, als Induktionsort einer lokalen Immunantwort dienen. Beim Menschen konnte nach intratonsillärer Impfung mit Cholera- und Tetanus-Toxoid spezifisches IgA und IgG in Nasengangspülproben und Serum nachgewiesen werden und es trat ein Boostereffekt bei der Zweitimpfung auf (QUIDING-JÄRBRINK et al. 1995). Auch die intranasale Impfung führte zu einer tonsillären Immunantwort. Die Tonsillen nehmen eine Sonderstellung ein, da sie sowohl Charakteristika mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes als auch peripherer Lymphknoten in Form einer überwiegenden IgG-Produktion besitzen und sie daher als Integrationsort der lokalen und systemischen Immunantwort in Frage kommen (McDERMOTT et al. 1982). Es wäre denkbar, daß im vorliegenden Immunisierungsversuch aufgrund der Verabreichungsform und Impfdosis eine unzureichende Stimulation der Tonsillen vorlag. Da es sich jedoch um einen vermehrungsfähigen Lebendimpfstoff handelt und bei der von TIMONEY und GALÁN (1985) durchgeführten Impfung selbst 2 ungeimpfte Tiere eine Immunisierung durch Kontakt zur Impfgruppe erfuhren, scheint diese Erklärung des Impfmisserfolges eher unwahrscheinlich.

In unserer Impfgruppe befanden sich 4 Tiere (#3, #7, #411, Sandy) die nach Kontaktinfektion 8½ Wochen nach der Erstimpfung zwar erkrankten, jedoch nur einen milden Verlauf der Druse mit geringerem Fieber und ohne sichtbare Abszeßentwicklung zeigten. Bei 2 dieser Tiere wurde im Impfversuch eine Immunreaktion in Form eines deutlichen M-Protein-spezifischen Serum-IgG-Anstiegs (#3) bzw. geringen lokalen IgA-Anstiegs (#411) beobachtet. Die Rolle dieser Immunreaktion in der Vermittlung eines gewissen Schutzes ist jedoch fragwürdig, da zwei weitere, im Impfversuch immunologisch reaktionslose Tiere (#7, Sandy), ebenfalls einen milden Verlauf nach Kontaktinfektion zeigten. Dabei hatte der im Verlauf des Impfversuches auftretende Abszeß bei Sandy keinen lokalen oder systemischen Titeranstieg zur Folge. Eine abgeschwächte Drusesymptomatik trotz fehlenden Impftiters wurde auch von WALLACE et al. (1995) nach oraler Immunisierung von 4 Pferden mit einem formalinaktivierten *S. equi*-Stamm beobachtet, die dieses Phänomen mit einer durch die Impfung bewirkten Stimulation zellulärer Immunitätsmechanismen zu erklären suchten. In unserem Versuch zeigten jedoch 8 geimpfte Tiere einen schweren oder gar komplizierten Krankheitsverlauf nach experimenteller Kontaktinfektion und waren somit weder durch humorale noch zelluläre Immunitätsmechanismen geschützt. Die höhere Widerstandsfähigkeit mit resultierendem milderem Krankheitsverlauf bei 4 unserer geimpften Tiere ist deshalb vermutlich auf individuelle Faktoren zum Beispiel in Form einer gesteigerten Individualresistenz oder Paramunität zurückzuführen.

6.2. Hauptversuch

6.2.1. Epizootiologische Daten

6.2.1.1. Inkubationszeit, Morbidität, Krankheitsverlauf und -dauer

Die bei den experimentell infizierten, als Infektionsquelle dienenden 2 Tieren beobachtete Inkubationszeit von 5 Tagen liegt im Rahmen der in der Literatur beschriebenen Inkubationszeit von 3 bis 6 Tagen nach experimenteller Infektion (NARA et al. 1983, BEECH und SWEENEY 1991). Beim anschließenden Druseausbruch in der Versuchsgruppe betrug die Inkubationszeit bei den einzelnen Tieren zwischen 10 und 19 Tagen. Da der genaue Zeitpunkt der Infektion jedoch unbekannt war und deshalb vom Zeitpunkt des erstmöglichen Erregerkontaktes aus gerechnet wurde, stellt dieser zeitliche Rahmen zweifellos ein Maximum dar. Das Problem der Unkenntnis über den genauen Infektionszeitpunkt bei natürlicher Infektion spiegelt sich auch in der von verschiedenen Autoren unterschiedlich angegebenen Inkubationszeit wider (s. 2.1.2.). So wird die kürzeste Inkubationszeit von einzelnen Autoren mit 2 (WILSON 1988, TAYLOR 1992) bis 5 (KELLER und JAESCHKE 1984), die längste mit 6 (SONEA 1987) bis 14 (TIMONEY 1993a) Tagen angegeben. Die in diesem Experiment festgestellte mittlere Inkubationszeit von 12 Tagen kommt der von SWEENEY et al. (1989) bei einem Druseausbruch auf einem Gestüt beobachteten mittleren Inkubationszeit von 13 Tagen (8 bis 21) nahe. Diese Übereinstimmung läßt sich durch die vergleichbaren Verhältnisse in Form einer Ausbreitung der Erkrankung innerhalb einer Herde durch Kontaktinfektion erklären.

Die beobachtete Morbidität von 100% und Komplikationsrate von 25% ist bei einer Herde junger, empfänglicher Tiere, die zudem vermutlich noch unter Transportstreß und dem Streß des Zusammenbringens standen, nicht erstaunlich (FORD und LOKAI 1980), zumal die Haltungsbedingungen den intensiven Kontakt zwischen Tieren und die Ausbreitung des Erregers erleichterten. Unter vergleichbaren Bedingungen beobachteten HAMLIN et al. (1994) bei Fohlen Komplikationsraten von 32% nach natürlicher und 42% nach experimenteller Infektion. Da im vorliegenden Versuch keinerlei Maßnahmen zur Verhütung der Infektionsausbreitung ergriffen wurden, waren die Tiere einem anhaltend hohen Infektionsdruck ausgesetzt. Dies könnte zu der relativ hohen Komplikationsrate von 25% mit einem Anteil an Mesenterialabszessen von 10% beigetragen haben. Unter vergleichbaren extremen Haltungsbedingungen konnten auch FORD und LOKAI (1980) das Auftreten innerer Abszesse in 10% der Fälle beobachten, wohingegen unter normalen Haltungsbedingungen in weniger als 1% aller Drusefälle mit dem Auftreten von Mesenterialabszessen zu rechnen ist (WILSON 1988, NEES 1994).

Der unterschiedliche Schweregrad der Druse bei den unter identischen Bedingungen gehaltenen Tieren, insbesondere auch den Tieren der Kontrollgruppe, bei denen es sich um einen Erstkontakt zu *S. equi* handelte, spricht für einen Einfluß angeborener oder erworbener

individueller Faktoren auf den Krankheitsverlauf. Als Faktoren kommen dabei zum Beispiel eine erhöhte Individualresistenz oder Paramunität in Frage.

Die Krankheitsdauer schwankte bei den Tieren zwischen 12 und 106 Tagen, mit einem Mittelwert von 40 und einem Median von 28 Tagen. GRATZL (1933) gibt eine Dauer zwischen 3 und 60 Tagen an, mit einem Mittelwert von 24 Tagen und SWEENEY (1987a) eine Dauer zwischen 5 und 77 Tagen mit einem Mittelwert von 23 Tagen. Die von uns beobachtete größere Schwankungsbreite ist unter anderem auf unsere Definition zurückzuführen, nach der 2 Tiere mit unbehandelter Fistelbildung nach Abszedierung und 2 symptomlose Ausscheider als nicht genesen betrachtet wurden. Der Median von 28 Tagen eignet sich daher im vorliegenden Fall besser zur Beurteilung als der deutlich höhere Mittelwert und ist in Übereinstimmung mit Angaben anderer Autoren, die von einer etwa 4-wöchigen Krankheitsdauer bei der Druse ausgehen (MAHAFFEY 1962, GEORGE et al. 1983, SWERCZEK 1984, YELLE 1987).

6.2.1.2. Ausscheidung des Erregers

Die nasale Erregerausscheidung begann bei 8 von 9 intensiv beobachteten Tieren zwischen 2 und 9 Tagen nach dem Auftreten von Fieber. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit dem von TIMONEY (1988a) beschriebenen Phänomen einer Latenzzeit zwischen dem Auftreten erster Krankheitszeichen und der ersten Erregerausscheidung, wobei die von ihm beobachtete Latenzzeit zwischen 4 und 7 Tagen lag. Bei einem Tier (#10), bei dem *S. equi* bereits 5 Tage vor dem Auftreten von Fieber nachgewiesen werden konnte, handelte es sich vermutlich um eine Erregeraufnahme von außen durch Kontaktinfektion und nicht um die beginnende Erregerausscheidung, zumal der Nachweis in der folgenden Woche zweimal mißlang und der Erreger erst 5 Tage nach dem Auftreten von Fieber wieder nachgewiesen werden konnte. Die Dauer der Erregerausscheidung variierte mit 3-28 (Median und Mittelwert: 14) Tagen deutlich bei diesen Tieren, endete jedoch außer bei einem Tier (Sandy) vor dem Verschwinden klinischer Krankheitszeichen. In der Versuchsgruppe von 20 Tieren konnten zwei Pferde mit verlängerter Erregerausscheidung von 61 (#2) und 106 (#59) Tagen nach dem Auftreten von Fieber nachgewiesen werden. Beide Tiere zeigten nach Überstehen der akuten Krankheitsphase zunächst intermittierenden mukopurulenten Nasenausfluß und schieden den Erreger anschließend für 22 (#2) bzw. 24 (#59) Tage symptomlos aus. Aufgrund fehlender laryngoskopischer Untersuchungen konnte nicht beurteilt werden, ob und wie lange sich Eiteransammlungen in den Luftsäcken befanden. Das Auftreten von Ausscheidern bei der Druse wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (REIF et al. 1981, GEORGE et al. 1983, TIMONEY 1988a) mit Ausscheidungsdauern bis zu einem Jahr (WOOD 1993). Drei Tiere (15%) unserer Versuchsgruppe schieden den Erreger bei Abwesenheit klinischer Krankheitszeichen für 6 (Sandy), 22 (#2) bzw. 24 (#59) Tage aus. Ähnliches wurde auch von SWEENEY et al. (1989) beobachtet, die in 19,4% von Drusefällen im Anschluß an die Erkrankung eine symptomlose Ausscheidung des Erregers für 6-26 Tage nachwies. DALGLEISH et al. (1993) wiederum konnten in einer Herde von 19 Ponies keine rekonvaleszenten Ausscheider nachweisen. Das Auftreten rekonvaleszenter Ausscheider scheint ein nicht vorhersehbares Ereignis zu sein, das daher grundsätzlich bei keinem Drusefall auszuschließen ist. Insbesondere längeres symptomloses Ausscheidertum birgt die Gefahr der unerkannten Erregerverbreitung und -einschleppung in andere Bestände mit unter Umständen verheerenden wirtschaftlichen Folgen. Dies betont die Unerläßlichkeit regelmäßiger Nasentupferproben im Rahmen der Druseprophylaxe und zwar sowohl bei drusekranken Pferden im Anschluß an die akute Erkrankung als auch bei jeglichen Neuzugängen eines Bestandes. Für den Nachweis des Erregers haben sich in unserem Versuch Nasentupferproben als relativ zuverlässig und einfach durchführbar erwiesen. Bei den 9 Pferden, von denen zweimal wöchentlich Nasentupferproben genommen wurden, betrug die längste Zeit zwischen 2 positiven Tupferproben 11 Tage (#3, Pinto). Ein Pferd (#2) mit rekonvaleszentem Ausscheidertum zeigte jedoch vor dem letzten Erregernachweis 4 negative Tupferproben über einen Zeitraum von 23 Tagen. Die von SWEENEY et al. (1989) vorgeschlagenen 3 kulturnegativen Tupferproben im Abstand von etwa einer Woche, um ein Pferd frei von *S. equi* zu erklären, scheinen daher zum sicheren Ausschluß des Ausscheidertums nicht auszureichen. Diese Methode würde zwar die Mehrheit an Ausscheidern erfassen, könnte jedoch in Einzelfällen versagen. Zudem ist darauf hinzuweisen, daß der anhaltenden nasalen Erregerausscheidung Eiterseen und Konkremente in den Luftsäcken zugrunde liegen können, die bei ausbleibender Luftsackendoskopie unerkannt bleiben. Die endoskopische Untersuchung der Luftsäcke ist daher auch im Zusammenhang mit Aussagen über anhaltendes Ausscheidertum von großer Bedeutung und für die Diagnose einer ausgeheilten Luftsackdruse unerläßlich.

In der vorliegenden Untersuchung schien eine Korrelation zwischen hohem lokalem M-Protein-spezifischen IgA-Gehalt und dem Unvermögen des Erregernachweises in Nasentupferproben zu bestehen. Es wäre daher denkbar, daß M-Protein-spezifisches IgA von Bedeutung für die Eliminierung des Erregers ist.

6.2.1.3. Tenazität des Erregers

Trotz hochgradiger Kontamination des Offenstalles und Auslaufes mit *S. equi* während der Druse-Epizootie und ausbleibender desinfizierender Maßnahmen im Anschluß an die Durchseuchung, führte eine 8 Monate später stattfindende Wiederbelegung mit einer Herde empfänglicher Jährlinge zu keinem Druseausbruch. Daher ist zu vermuten, daß der Erreger diese Zeitspanne nicht überlebte, obwohl die Überlebensbedingungen durch winterliche Gefriertemperaturen eher günstig waren. Die von REIF (1979) und CLABOUGH (1987) vertretene Meinung, daß der Erreger in Beständen für ein Jahr oder länger überlebensfähig ist und eine persistierende Umweltkontamination darstellt, scheint nach unseren Beobachtungen nicht haltbar. Diese Meinung wird zudem durch das völlige Verschwinden des Erregers aus Pferdeherden und sogar ganzen geographischen Regionen widerlegt (TIMONEY 1988a). BAMBAUER (1934) berichtet, daß nach Erlöschen eines schweren Seuchenganges 28 in diesen Bestand verbrachte Fohlen schlagartig an schwerster

Druse erkrankten. Die genaue Zeitspanne zwischen dem Erlöschen des Seuchenganges und dem Einbringen der Fohlen wird dabei nicht angegeben. Es ist anzunehmen, daß die von JORM (1992) bestimmten 7-9 Wochen der tatsächlichen Überlebensfähigkeit des Erregers in der Umwelt unter entsprechenden Bedingungen nahe kommen.

6.2.2. Klinische Daten

Im Verlauf des Druseausbruches wurden bei den Tieren die vielfach beschriebenen (LÜHRS 1927, KELLER und JAESCHKE 1984, CLABOUGH 1987, BEECH und SWEENEY 1991, AMES 1995) Symptome der Druse in Form von Fieber, Depression, seromukösem und später mukopurulentem Nasenausfluß, sowie Lymphknotenschwellung und -abszedierung beobachtet.

Als Initialsymptom zeigten sämtliche Pferde Fieber ($>38,6^{\circ}\text{C}$), mit Maximal-temperaturen zwischen $39,4^{\circ}\text{C}$ und $41,4^{\circ}\text{C}$. Dabei wiesen 16 (80%) der Tiere eine Temperatur von mehr als 40°C auf. Dies ist in Übereinstimmung mit den Angaben GERBERS (1982), der als Initialsymptom Fieber von 40°C oder höher angibt. Auch NEES (1994) beobachtete bei 218 (98%) von 223 Pferden Temperaturen über $38,5^{\circ}\text{C}$ zu Beginn der Erkrankung, mit einem Maximalwert von $41,8^{\circ}\text{C}$. Sowohl NEES (1994) als auch HANCKE (1931) stellten allerdings nur in 21% der Fälle eine Temperatur von über 40°C fest. Der von uns beobachtete hohe Anteil an Pferden (80%) mit Temperaturen über 40°C ist vermutlich auf den hohen, anhaltenden Infektionsdruck in der Herde zurückzuführen. Zudem könnten das geringe Alter und die hohe Empfänglichkeit der Tiere den schwereren Krankheitsverlauf mit höheren Temperaturen erklären. Die von WIRTH und DIERNHOFER (1950) beschriebene zweigipflige Temperaturkurve zu Beginn der Erkrankung konnte in unserem Versuch nicht nachvollzogen werden. Vielmehr zeigte die Mehrheit der Tiere kontinuierliches Fieber für 10-19 Tage. Bei 3 unserer Pferde zeigte sich im Zusammenhang mit auftretenden Komplikationen ein erneuter Fieberanstieg, nachdem die Temperatur zuvor Normalwerte erreichte. Bereits BAMBAUER (1934) wies darauf hin, daß die regelmäßige Bestimmung der Körpertemperatur zunächst zur frühzeitigen Erkennung der Erkrankung und später für die Prognose unerlässlich ist, wobei er bei unregelmäßigen Kurven zur Vorsicht in der Prognose rät.

Der während des Druseausbruches bei allen 20 Tieren beobachtete Nasenausfluß zeigte in 95% der Fälle eitrige Beschaffenheit. NEES (1994) stellte lediglich bei 66% von Drusefällen Nasenausfluß fest, wobei dieser in 64% der Fälle von eitriger Beschaffenheit war. Dieser Unterschied könnte auf die Extrembedingungen und den schweren Seuchengang in unserer hochempfindlichen Jungtierherde zurückzuführen sein, wohingegen sich unter dem umfangreichen, gemischten Patientengut ($n=727$) von NEES (1994) vermutlich ein größerer Anteil mild erkrankter Tiere befand. Zudem stellten schon FRIEDBERGER und FRÖHNER (1892) fest, daß jüngere Tiere im Gegensatz zu älteren Tieren in der Regel reichlich eitrigem Nasenausfluß zeigen. Auch in einer Studie von HAMLIN et al. (1994) zeigten 92% der nach experimenteller Infektion erkrankten Fohlen eitrigem Nasenausfluß. Der eitrigem Nasenausfluß begann bei den einzelnen Tieren unserer Gruppe zwischen dem 4. und 12. Krankheitstag. Dies ist in annähernder Übereinstimmung mit der Ansicht GRATZLS (1933), daß der eitrigem Nasenausfluß bei der Druse zwischen dem 3. und 14. Tag beginnt.

Durch Adspektion von außen erkennbare Abszesse der Kopflymphknoten zeigten sich bei 16 (80%) der Tiere, wobei bei 14 Tieren (70%) die Mandibularlymphknoten abszedierten. Dies ist in Übereinstimmung mit der Ansicht MAHAFFEYs (1962), daß in fast allen Fällen mit einer akuten Entzündung und anschließenden Abszedierung der Mandibularlymphknoten zu rechnen ist. Über den Anteil an Pferden mit Abszedierung der medialen Retropharyngeallymphknoten konnten von uns keine genauen Angaben gemacht werden, da ein zur eindeutigen Feststellung eines solchen Abszesses notwendiges Endoskop nicht zur Verfügung stand. Der bei 95% der Pferde beobachtete eitrigem Nasenausfluß deutet jedoch auf einen bei diesen Tieren vorliegenden Abszeß der medialen retropharyngealen Lymphknoten mit Entleerung in den Luftsack und anschließendem Eiterabfluß in den Pharynx hin. Dies entspräche den Beobachtungen GRATZLS (1933), der mittels Luftsackspiegelung eine Abszedierung der medialen Retropharyngeallymphknoten in der Mehrheit von Drusefällen feststellte. Auch NEES (1994) beobachtete bei 74% drusekranken Pferden mittels laryngoskopischer Untersuchung der Luftsäcke eine Abszedierung der medialen retropharyngealen Lymphknoten, wobei bei 49% ausschließlich diese betroffen waren. Eine Abszedierung der Mandibularlymphknoten stellte er dahingegen nur bei 38% der Tiere fest. WILSON (1988) wiederum ist der Überzeugung, daß bei der Druse die Mandibularlymphknoten am häufigsten betroffen sind, gibt jedoch nicht an, ob ihm für die Diagnose retropharyngealer Abszesse ein Laryngoskop zur Verfügung stand. Auch SWEENEY et al. (1987a) und HAMLIN et al. (1994) sprechen von einer Abszedierung der Mandibularlymphknoten in der Mehrheit (63% bzw. 58%) von Drusefällen. Die Diskrepanz dieser Beobachtungen könnte auf dem Ausbleiben endoskopischer Untersuchungen der Luftsäcke und der damit verbundenen Möglichkeit des Übersehens eines Retropharyngealabszesses beruhen.

Die Anbildung der von uns festgestellten Abszesse begann im Mittel 2 Tage nach dem ersten Auftreten von Fieber und dauerte im Mittel 7 Tage an, bevor es zum Durchbruch nach außen kam. Dies ist in Übereinstimmung mit Angaben anderer Autoren, daß die Abszesse üblicherweise 1-2 Wochen nach Krankheitsbeginn durchbrechen (BRYANS 1972, GEORGE et al. 1983, TIMONEY 1993, AMES 1995).

6.2.3. Immunologische Daten

Die sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht äußerst heterogene humorale Immunreaktion der Versuchsgruppe im Verlauf der Druse, läßt einen Einfluß ererbter oder erworbener individueller Faktoren auf die Ausprägung der Immunantwort vermuten. Denkbar

wären zum Beispiel Unterschiede in der Peptid-affinität von MHC Klasse II-Molekülen im Oberflächenepithel der Nasenschleimhaut mit entsprechender Auswirkung auf die Antigenerkennung und -verarbeitung, wie von BRANDTZAEG (1992) für bakterielle Infektionen des Atmungsapparates beim Menschen beschrieben. Zudem könnten durch *S. zooepidemicus* stimulierte und mit *S. equi* kreuzreagierende, jedoch nicht schutzvermittelnde, lokale Antikörper zu einer gesteigerten Antigenaufnahme im Nasopharynx führen. Die enge genetische Verwandtschaft von *S. equi* und *S. zooepidemicus* mit einer DNA-Homologie von über 95% (FARROW und COLLINS 1986) und die Existenz von Antigenen mit gemeinsamen Aminosäuresequenzen (TIMONEY et al. 1994) bei diesen Subspezies ist bekannt und erklärt auch die von uns im Western-Blot festgestellte Kreuzreaktion von *S. zooepidemicus* M-Protein(55 kD)-spezifischem Antiserum mit *S. equi* M-Protein (41/46 kD) und die bei manchen Pferden im ELISA festgestellten erhöhten Antikörpertiter zu Versuchsbeginn. Ein geringer Anteil der beobachteten Bandenfärbung im Westernblot dürfte auf das unspezifische Binden von Immunglobulinen durch säureextrahierte *S. equi* M-Proteinfragmente zurückzuführen sein (TIMONEY 1993b). Die antigenetische Ähnlichkeit beider Subspezies erklärt auch den von uns beobachteten beträchtlichen Anteil an mit *S. zooepidemicus* kreuzreagierendem, durch *S. equi* stimuliertem Serum IgG, der durch Serumadsorption mit *S. zooepidemicus* eliminiert wurde. Der Anteil an kreuzreagierenden Antikörpern variierte dabei zwischen verschiedenen Pferden und zwischen verschiedenen Serumproben ein- und desselben Tieres, wobei in der Erholungsphase erstaunlicherweise keine Tendenz zu erhöhter Spezifität festgestellt werden konnte.

Sämtliche 13 Pferde waren 5 Wochen nach überstandener Druse vollkommen resistent gegenüber einer experimentellen intranasalen Infektion mit virulentem *S. equi* und hatten somit im Verlauf der Druse eine äußerst wirksame, schutzvermittelnde Immunität aufgebaut. Zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion zeigten die Tiere einen statistisch bedeutend höheren Gehalt an M-Protein-spezifischem Serum IgG und bakteriziden Serumantikörpern als zu Versuchsbeginn. Auch in einer Studie HAMLINs (1994) korrelierte ein hoher M-Protein-spezifischer Serum IgG-Gehalt mit dem Schutz vor der Erkrankung, wobei der Gehalt an bakteriziden Serumantikörpern allerdings nicht untersucht wurde. Bakterizide Antikörper wurden traditionell als entscheidend für die Immunität bei der Druse angesehen (BAZELEY 1943, ENGELBRECHT 1969, WOOLCOCK 1975c), heute ist ihre Rolle im Schutz gegen die Druse jedoch umstritten (TIMONEY und EGGERS 1985, GALÁN und TIMONEY 1985). So vermitteln bakterizide Antikörper rekonvaleszenter oder geimpfter Pferde Mäusen zwar Schutz vor intraperitonealer *S. equi*-Infektion (BAZELEY 1943), stellen bei geimpften Pferden jedoch keine Garantie für einen Schutz vor natürlicher Infektion dar (TIMONEY und EGGERS 1985). Außerdem beobachteten GALÁN und TIMONEY (1985) bei Pferden etwa 3 Wochen nach der Rekonvaleszenz eine Widerstandsfähigkeit gegenüber der Erkrankung in Abwesenheit hoher bakterizider Antikörpertiter. Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen läßt sich allerdings schließen, daß der zum Zeitpunkt der experimentellen intranasalen *S. equi*-Inokulation bei allen Tieren festgestellte hohe Gehalt an bakteriziden Serumantikörpern eine Rolle beim Schutz gegen Infektion und Erkrankung spielte. Die Ansicht TIMONEYs (1993a), daß es sich bei den bakteriziden Antikörpern um spät in der Rekonvaleszenz auftretende, durch das M-Protein stimulierte Serumantikörper handelt, konnte durch das deutlich spätere Maximum der bakteriziden Wirkung im Vergleich zum Serum IgG bestätigt werden. Ungeklärt in diesem Zusammenhang ist die bei einigen unserer Tiere festgestellte hohe bakterizide Serumwirkung zu Versuchsbeginn, wobei der Opsonierungs-Test nur bei einem Tier (#3), welches zudem einen nur milden Krankheitsverlauf zeigte, eine hohe opsonisierende Antikörperaktivität bestätigte. Die deutliche Reduktion dieser Aktivität nach Hitzeinaktivierung der Probe spricht für ein komplementabhängiges Geschehen, wie es im Falle der Opsonierung des Erregers zu erwarten wäre (BOSCHWITZ und TIMONEY 1994a). Da dieses Tier bei der im Vorversuch durchgeführten Impfung eine *S. equi*-spezifische Serumreaktion zeigte, ist es denkbar, daß es zur Stimulation *S. equi*-spezifischer opsonisierender Antikörper kam, die dem Tier einen gewissen Schutz vermittelten. Da der bakterizide Antikörpergehalt der präexperimentellen im Gegensatz zur postexperimentellen Serumprobe desselben Tieres durch Adsorption mit *S. zooepidemicus* eine deutliche Reduktion erfuhr und das Tier nach Genesung vollkommen geschützt war, ist zudem anzunehmen, daß in den Serumproben bakterizide Antikörper unterschiedlicher Spezifität und Funktion vorlagen. Dies würde auch die bei einigen Tieren festgestellte Diskrepanz zwischen Bakterizidie- und Opsonierungs-Test erklären. So würden Serumantikörper mit einer wachstumshemmenden oder die Kettenbildung fördernden Wirkung im Bakterizidie-, nicht jedoch im Opsonierungs-Test, der ausschließlich ein Maß für den Gehalt an opsonisierenden Antikörpern darstellt, erfaßt werden. Die Bildung solcher unspezifischen, offensichtlich nicht schutzvermittelnden Serumantikörper könnte durch konservierte Zellwand-Antigene grampositiver Bakterien wie zum Beispiel *S. zooepidemicus* stimuliert worden sein. Als Antigen kommt dabei unter anderem Peptidoglykan in Frage, das sich als äußerst immunogen erwiesen hat (VERBRUGH et al. 1980).

In Übereinstimmung mit Angaben von PAHUD und MACH (1972) und GALÁN und TIMONEY (1985b) zeigte sich IgA als dominierende Immunglobulinklasse in den Nasengangsspülproben. Diese Beobachtung ist nicht erstaunlich, zumal sich im oberen Respirationstrakt von Pferden, in Übereinstimmung mit den Gegebenheiten beim Menschen (BRANDTZAEG 1992), wesentlich mehr IgA- als IgG-produzierende Zellen befinden (MAIR et al. 1988). Der IgA-Transport ins Lumen erfolgt dabei durch rezeptorvermittelte Endozytose (BRANDTZAEG 1995), der IgG-Transport vermutlich unspezifisch durch parazelluläre Diffusion oder Endozytose (UNDERDOWN und MESTECKY 1994). Die lokale IgG-Konzentration unserer Tiere betrug weniger als 10% der IgA-Konzentration. Gleiche Mengenverhältnisse wurden auch im Nasenschleim von Pferden (GALÁN und TIMONEY 1985b) und in Nasengangsspülproben beim Menschen (POLLY et al. 1975) beobachtet. Lokales IgA überwog zwar mengenmäßig, zeigte jedoch eine wesentlich geringere M-Protein-spezifische Aktivität als lokales IgG. Die spezifische IgG-Aktivität war dabei etwa 10-fach höher als die IgA-Aktivität. Dieses Phänomen wurde bereits von GALÁN und TIMONEY (1985b) beobachtet und deutet auf eine lokale Synthese des IgGs hin. Als Ort der Synthese sind insbesondere die Tonsillen in Erwägung zu ziehen, die mehr IgG- als IgA-produzierende Zellen enthalten (MATTHEWS und BASU 1982). Im Falle der von manchen Autoren vermuteten Transsudation des IgGs aus dem Plasma durch die entzündete

Schleimhaut (ZEE et al. 1979, WAGNER et al. 1987) wäre eine wesentlich geringere M-Protein-spezifische IgG-Aktivität zu erwarten. Zudem würde mit dem Abklingen der akuten, entzündlichen Veränderungen im Nasopharynx ein drastischer Rückgang des lokalen IgGs festzustellen sein. Bei den meisten unserer Tiere konnte jedoch noch bis zu einigen Wochen nach der Genesung ein erhöhter lokaler IgG-Gehalt mit äußerst hoher M-Protein-spezifischer Aktivität nachgewiesen werden.

Zwischen der systemischen und lokalen Immunantwort konnte keine Synchronie festgestellt werden, was für deren Unabhängigkeit spricht. So erfolgte im Mittel zwar ein gleichzeitiger Anstieg von M-Protein-spezifischem IgG in Serum und Nasengangsspülproben, letzteres sank jedoch bereits in der 10. bis 12. Woche zurück auf den Ausgangswert, wohingegen der Serum IgG-Gehalt zu diesem Zeitpunkt und 4 Monate später noch deutlich erhöht war. Zudem erschienen auch lokales M-Protein-spezifisches IgG und IgA voneinander unabhängig. Letzteres lag bei den meisten Pferden in der 10.-12. Woche noch deutlich über den zu Versuchsbeginn gemessenen Werten. Ähnliches berichten auch HANNANT et al. (1988), welche die spezifische lokale und systemische Immunantwort experimentell mit Influenza infizierter Pferde untersuchten. Dabei stellten sie fest, daß der Anstieg von lokalem IgA deutlich später als der von lokalem IgG auftrat und letzteres im Gegensatz zu Serum IgG bereits 9 Wochen nach der Infektion auf Ausgangswerte zurückgekehrt war.

Der lokale M-Protein-spezifische IgA-Gehalt war bei den meisten unserer Pferde zum Zeitpunkt der intranasalen Verabreichung von virulentem *S. equi* noch deutlich erhöht und könnte bei diesen Tieren daher zum Schutz beigetragen haben. Dies ist insofern nicht erstaunlich, als der durch sekretorisches IgA (sIgA) vermittelten Schleimhaut-Immunität sowohl in der Human- als auch Veterinärmedizin eine wichtige Rolle im Schutz gegen Infektionen des Atmungsapparates zuerkannt wird (McDERMOTT et al. 1982, WILKIE 1982, McGHEE et al. 1992). So korreliert zum Beispiel sowohl beim Menschen (JOHNSON et al. 1985, 1986) als auch beim Pferd (HANNANT et al. 1989) ein hoher lokaler spezifischer IgA-Titer mit dem Schutz vor Influenza. Auch bei Infektionen mit Gruppe A-Streptococccen hat sich lokales IgA als schutzvermittelnd erwiesen. So konnte bei Mäusen nach intranasaler Immunisierung mit hitzegetöteten Gruppe A-Streptococccen ein lokaler Immunschutz in Form von spezifischem IgA im Speichel nachgewiesen werden (BRONZE et al. 1988). Zudem sind Mäuse durch intranasale Verabreichung von humanem M-Protein-spezifischem sIgA gegen experimentelle Infektion mit Gruppe A-Streptococccen geschützt (BESSEN und FISCHETTI 1988). Da vier unserer Tiere (#1, #3, #9, Pinto) keine oder nur eine geringe lokale M-Protein-spezifische IgA-Reaktion im Verlauf der Druse zeigten und dennoch vor anschließender experimenteller Infektion geschützt waren, muß davon ausgegangen werden, daß IgA für den Schutz jedoch nicht essentiell war. Ähnliches wurde auch beim Menschen beobachtet, bei dem die intranasale Verabreichung von Streptococccen-M-Protein zu einer deutlich gesteigerten Widerstandskraft gegenüber Erregerkolonisation im Nasopharynx und Erkrankung, jedoch nur bei einem Teil der Versuchsgruppe zur Bildung von lokalem M-Protein-spezifischem IgA führte (POLLY et al. 1975). Es wäre denkbar, daß die genannten Tiere auf genetischer Grundlage unfähig zur Bildung M-Protein-spezifischer Immunglobuline waren. Es konnte bei ihnen allerdings eine *S. equi* M-Protein-spezifische IgG- und *S. zooepidemicus* M-Protein-spezifische IgA-Reaktion nachgewiesen werden. Die Unfähigkeit, spezifisch gegen das *S. equi* M-Protein gerichtetes IgA zu bilden, ist dennoch nicht auszuschließen. Schließlich sollten auch mögliche Nachweismängel im angewandten ELISA-System nicht außer acht gelassen werden. So könnte es durchaus sein, daß die Bindung des M-Proteins zum Polystyren der ELISA-Platten zur Degradierung konformationeller Epitope führte und gegen diese Epitope gerichtete Antikörper daher nicht nachweisbar waren. Zudem wäre es denkbar, daß neben dem M-Protein weitere immunogene Antigene des Erregers eine Rolle im lokalen Schutz gegen *S. equi* spielen. Gegen diese Antigene gerichtete Antikörper wären im vorliegenden ELISA-System nicht erfaßt worden. Die bei diesen Tieren im Durchschnitt deutlich unter dem Gruppenmittelwert liegende lokale IgA-Konzentration spricht für das Vorliegen eines allgemeinen IgA-Defizits. Eine in diesem Falle zu erwartende Kompensation durch lokales IgM (KILIAN und RUSSELL 1994) konnte allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die Rolle des lokalen M-Protein-spezifischen IgGs im Schutz der rekonvaleszenten Tiere ist unklar, da der lokale IgG-Gehalt zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion bei den meisten Tieren bereits deutlich abgesunken war. In einer Studie von HAMLEN et al. (1994) korrelierte der Schutz vor der Druse bei Fohlen enger mit lokalem IgG als IgA. Die Diskrepanz zwischen diesen und unseren Beobachtungen könnte im unterschiedlichen Alter der Tiere gelegen haben. Zudem wäre es denkbar, daß Schleimhaut-IgG lediglich am Ort der Synthese, vermutlich dem lymphatischen Gewebe der Tonsillen, wirksam ist und ein geringer IgG-Gehalt in den Nasengangsspülproben nicht den IgG-Gehalt in den Krypten der Tonsillen, dem bevorzugten Eintrittsort des Erregers (PFEIFFER und MÜLLER 1912, TIMONEY 1988a) widerspiegelt. Schließlich ist es auch möglich, daß lokales IgG ausschließlich in der akuten und unmittelbar postakuten Phase der Druse gebildet wird und von Bedeutung für die Resolution der Krankheitszeichen und Beseitigung des Erregers nicht jedoch für die Langzeitimmunität ist.

Die statistische Analyse auf dem 5%-Niveau ($\alpha=0,05$) zeigte, daß kurz vor der intranasalen *S. equi*-Inokulation sowohl der Gehalt systemischer, als auch der Gehalt und die Aktivität lokaler M-Protein-spezifischer Immunglobuline im Gruppenmittel bzw. -median bedeutsam höher als zu Versuchsbeginn war. Da zwischen den individuellen Tieren jedoch extreme Differenzen sowohl im zeitlichen Verlauf als auch in der Qualität und Quantität der Immunantwort bestanden, geben die bestimmten Gruppenparameter lediglich Auskunft über Tendenzen in der Gruppe. Aus der eingehenden Studie der humoralen Immunreaktion einzelner Tiere läßt sich schließen, daß es sich bei der im Rahmen einer *S. equi*-Infektion aufgebauten schutzvermittelnden Immunität um einen äußerst komplexen Vorgang handelt. Die meisten unserer Pferde schienen dabei durch eine Kombination von bakteriziden Serumantikörpern und lokalem IgA und/oder IgG geschützt zu sein, wobei jedoch schon das Vorliegen einer dieser Komponenten unter Umständen einen ausreichenden Schutz gewährt haben könnte. Das Ausbleiben eines Boostereffektes zum Zeitpunkt der experimentellen Infektion könnte durch die Anwesenheit ausreichender Mengen lokaler Immunglobuline, insbesondere IgA erklärt werden, welche die Adhäsion und Kolonisation

und somit das Eindringen des Erregers in die Mucosa verhindert haben könnten (WILLIAMS and GIBBONS 1972). Diese Beobachtung spricht zweifellos für das Vorliegen eines äußerst belastbaren Immunschutzes zu diesem Zeitpunkt. Die Dauer dieses soliden Schutzes ist nicht bekannt. Aus jüngeren Untersuchungen läßt sich jedoch schließen, daß die Mehrheit druserekonvaleszenter Pferde eine jahrelange Immunität gegenüber natürlicher Infektion besitzt (TODD 1910, COHRS 1941, NEES 1994). Eine Minderheit von Tieren kann jedoch schon im ersten Jahr erneut an Druse erkranken (RICHTERS 1929, HAMLEN et al. 1994, NEES 1994). Es wäre interessant festzustellen, ob es sich bei dieser Minderheit um Pferde mit lokalem IgA-Defizit handelt, wie von uns bei 4 Tieren beobachtet. Weitergehende Untersuchungen zur Charakterisierung der im Rahmen einer *S. equi*-Infektion stimulierten komplexen immunologischen Vorgänge und zur Erforschung neuer Methoden, diese effektiv zu stimulieren, scheinen unerlässlich für die Entwicklung eines wirksamen Druse-Impfstoffes zu sein.

7. Schlußfolgerungen

- Das Verbringen zweier experimentell mit *S. equi* infizierter, drusekranker Pferde in eine Herde empfänglicher Jungtiere erwies sich als äußerst geeignetes Versuchsmodell für die experimentelle Erzeugung einer Druse-Epizootie in einer Herde. Die resultierende Morbidität betrug 100% bei einer Inkubationszeit von 10-19 Tagen.
- Mit der ersten nasalen Erregerausscheidung ist nach einer Latenzzeit von 2-9 Tagen nach Krankheitsbeginn zu rechnen.
- Die Dauer der Erregerausscheidung zeigte eine große individuelle Schwankungsbreite. Bei einem Tier konnte der Erreger in Nasentupferproben noch 106 Tage nach Krankheitsbeginn nachgewiesen werden. In den meisten Fällen endete die nasale Ausscheidung vor dem Verschwinden klinischer Krankheitszeichen, 15% der Tiere schieden den Erreger jedoch im Anschluß an die Erkrankung für 6-24 Tage symptomlos aus.
- Die Beendigung der Erregerausscheidung korrelierte bei den meisten Tieren mit einem hohen Gehalt an lokalem M-Protein-spezifischen IgA.
- Die durch *S. equi* stimulierten lokalen und systemischen Immunreaktionen zeigten bei den einzelnen Tieren eine große qualitative und quantitative Vielfalt und schienen voneinander unabhängig zu sein.
- Im Verlauf der *S. equi*-Infektion gebildetes M-Protein-spezifisches Serum IgG zeigte eine starke Kreuzreaktion mit *S. zooepidemicus*.
- Das Verhältnis von lokalem IgA zu lokalem IgG betrug etwa 10:1.
- In den Nasengangsspülproben nachgewiesenes IgG zeigte eine etwa 10-fach höhere M-Protein-spezifische Aktivität als IgA und schien einer lokalen Quelle zu entstammen.
- Fünf Wochen nach der Genesung zeigten die Tiere einen extrem belastbaren Immunschutz.
- Der Schutz vor Infektion und Erkrankung nach intranasaler Verabreichung von virulentem *S. equi* ging bei allen Tieren mit einem hohen Gehalt an M-Protein-spezifischem Serum IgG und bakteriziden Serumantikörpern einher. Die meisten Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt zudem einen hohen Gehalt an M-Protein-spezifischem lokalem IgA, wohingegen der lokale IgG-Gehalt bei vielen Pferden bereits auf den Ausgangswert zurückgekehrt war.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die *S. equi* M-Protein-spezifische lokale und systemische humorale Immunantwort junger Pferde nach lokaler Immunisierung mit einem avirulenten *S. equi*-Stamm und im Verlauf einer experimentell erzeugten Druse-Epizootie untersucht, um eine mögliche Korrelation zwischen Antikörpergehalt und Infektions- bzw. Krankheitsschutz aufzudecken. Das Vorhandensein eines rekonvaleszenten Immunschutzes wurde 5 Wochen nach der Genesung durch intranasale Inokulation mit virulentem *S. equi* geprüft. Zusätzlich wurden während des Druseausbruches epizootiologische und klinische Daten gesammelt, um weitergehende Einsicht in die Epizootiologie und Infektionsdynamik der Druse in einer Herde zu gewinnen.

Serum IgG-, Schleimhaut-IgA und -IgG-Gehalte wurden mittels ELISA unter Verwendung elektrophoretisch gereinigter, säureextrahierter *S. equi* M-Protein-fragmente ermittelt. Zur Bestimmung der lokalen M-Protein-spezifischen IgA- und IgG-Aktivität in Nasengangsspülproben wurden die ELISA-Werte in Relation zum Gesamtgehalt an lokalem IgA bzw. IgG gesetzt. Als Maß für die bakterizide Serumwirkung wurde die Überlebensfähigkeit von *S. equi* im Serum nach Opsonisierung und 3-stündiger Inkubation mit equinen neutrophilen Granulozyten ermittelt.

Nach intranasaler Verabreichung eines avirulenten *S. equi*-Stammes an 12 der 20 Pferde konnte keine immunisierende, schutzvermittelnde Wirkung festgestellt werden. Im Anschluß an das Einbringen zweier experimentell infizierter, drusekranker Pferde erkrankte die gesamte Herde von 20 Tieren an Druse unterschiedlichen Schweregrades nach einer mittleren Inkubationszeit von 12 Tagen. Die Pferde wurden keiner Therapie unterzogen. Dreizehn Pferde, die 5 Wochen nach der Genesung einer intranasalen Inokulation mit virulentem *S. equi* unterzogen wurden, waren vollkommen immun und zeigten zu diesem Zeitpunkt eine hohe bakterizide Serumwirkung und einen hohen Gehalt an M-Protein-spezifischem Serum IgG. Bei 9 Pferden wurde zudem ein hoher Gehalt an M-Protein-spezifischem lokalem IgA nachgewiesen, wohingegen lokales IgG bei den meisten Tieren bereits auf Ausgangswerte

zurückgekehrt war. Die intranasale Inokulation mit virulentem *S. equi* führte zu keiner systemischen oder lokalen Boosterreaktion. Dies dürfte auf die Anwesenheit spezifischer, schutzvermittelnder Antikörper zurückzuführen sein, die eine Stimulation des Immunsystems durch *S. equi* verhindert haben könnten. Die systemischen und lokalen Antikörperreaktionen zeigten eine erstaunlich große individuelle Schwankungsbreite sowohl in qualitativer als auch quantitativer Hinsicht. Zudem verliefen sie asynchron, was auf ihre Unabhängigkeit voneinander hindeutet. Ein beträchtlicher Anteil an mit *S. equi* M-Protein reagierendem Serum IgG zeigte eine Kreuzreaktion mit *S. zooepidemicus*. Dies läßt die Existenz gleicher Epitope bei beiden Subspezies vermuten. Die lokale IgA-Konzentration betrug etwa das 10-fache der IgG-Konzentration. In den Nasengangsspülproben nachgewiesenes IgG zeigte eine hohe M-Protein-spezifische Aktivität und schien daher einer lokalen Quelle zu entstammen.

Die nasale Ausscheidung von *S. equi* begann bei 9 intensiv beobachteten Tieren nach einer Latenzzeit von 2-9 Tagen und endete im Mittel nach 14 Tagen. Bei zwei Tieren hielt die Erregerausscheidung bis 61 bzw. 106 Tage nach Krankheitsbeginn an. Beide Tiere zeigten intermittierenden mukopurulenten Nasenausfluß bis etwa 3 Wochen vor dem letzten Erregernachweis. Das Ende der Ausscheidung ging bei den meisten Tieren mit einem hohen Gehalt an lokalem IgA einher.

Eine 8 Monate im Anschluß an die Durchseuchung stattfindende Wiederbelegung des Offenstalles mit einer Herde hochempfindlicher Jährlinge führte trotz ausgebliebener desinfizierender Maßnahmen zu keinem Druseausbruch.

9. Summary

Epizootiological, Clinical and Immunological Features of an Experimentally Induced Strangles Epizootic

In the present study serum and mucosal antibody responses to the M protein of *Streptococcus equi* subsp. *equi* were studied in a group of young horses following intranasal application of an avirulent strain of subsp. *equi* and during a subsequent experimentally induced strangles epizootic in an attempt to identify humoral immune responses that could be correlated with protection. Convalescent protective immunity was verified by intranasal inoculation of virulent subsp. *equi* 5 weeks after recovery. Additionally, epizootiological and clinical data were collected during the strangles epizootic to gain further insight into the epizootiology and dynamics of subsp. *equi* infection within the group.

Serum IgG and mucosal IgA and IgG levels were measured by ELISA with electrophoretically purified acid extracted fragments of the M protein of subsp. *equi*. ELISA values were set in relation to total IgA and IgG antibody to determine M protein specific local IgA and IgG activities in nasal wash samples. Serum bactericidal responses were measured by counts of viable organisms after opsonization and incubation with horse neutrophils for 3 hours.

Intranasal inoculation of 12 horses with an avirulent strain of subsp. *equi* did not elicit protective immune responses. Following commingling exposure to 2 experimentally infected horses all 20 horses (12 inoculated and 8 controls) developed strangles of varying severity with a mean incubation period of 12 days. The horses were not medicated during the epizootic. Thirteen horses challenged by intranasal inoculation 5 weeks after recovery were solidly immune. At this time these horses exhibited strong serum bactericidal activity and high levels of M protein specific serum IgG. Additionally, nine horses showed high levels of M protein specific mucosal IgA at the time of challenge, whereas local IgG had already returned to preinfection values in most horses. Intranasal challenge did not produce a local or systemic booster response, indicating that protective antibodies may have prevented immune stimulation by the antigens presented at this time.

A striking feature of the study was the great qualitative and quantitative heterogeneity of serum and mucosal antibody response among individual horses. Systemic and local antibody responses were not synchronized, suggesting independence of these responses. A substantial portion of M protein reactive serum IgG showed crossreactivity with *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, suggesting extensive sharing of epitopes by the two subspecies. Local IgA concentrations were about 10 times higher than local IgG concentrations. IgG in nasal wash samples exhibited high M protein specific activity, suggesting local synthesis of this antibody.

Nasal shedding of subsp. *equi* as studied intensively in 9 horses started after a latent period of 2-9 days and ceased after a mean of 14 days. Shedding by 2 horses continued for 61 and 106 days after clinical signs were first noticed. Both horses showed intermittent purulent nasal discharge until about 3 weeks before the last isolation of subsp. *equi*. Cessation of shedding was associated in most horses with appearance of high levels of M protein specific local IgA.

Barn repopulation with a highly susceptible group of yearlings 8 months after the strangles epizootic was uneventful, despite the lack of preceding decontamination measures such as barn disinfection.

10. Literaturverzeichnis

AAEP - American Association of Equine Practitioners' Subcommittee on Vaccination Guidelines of the Biologic and Therapeutic Agents Committee (1995):

Guidelines for Vaccination of Horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 426-431

Ames, T.R. (1995):

Infectious conditions of the respiratory system: Strangles

In: Kobluk et al.(Hrsg.): The Horse, Diseases and Clinical Management, 220-222

Verlag Saunders, Philadelphia, London, Toronto

André, C., J.F. Heremans, J.P. Vaerman and C.L. Cambiaso (1975):

A mechanism for the induction of immunological tolerance

J. Exp. Med. 142, 1509-1519

Bambauer, - (1934):

Die Druse des Pferdes

Tierärztliche Rundschau 40, 142-147

Baruchello, L. (1908):

Sur une nouvelle methode de vaccination contre la gourme

Rev. Gen. Med. Vet. XI, 497-509

Bazeley, P.L. (1940):

Studies with equine streptococci. 2. Experimental immunity to Str. equi

Australian Vet. J. 16, 243-259

Bazeley, P.L. (1942a):

Studies with equine streptococci. 4. Cross-immunity to Streptococcus equi

Australian Vet. J. 18, 189-194

Bazeley, P.L. (1942b):

Studies with equine streptococci. 3. Vaccination against strangles

Australian Vet. J. 18, 141-155

Bazeley, P.L. (1943):

Studies with equine streptococci. 5. Some relations between virulence of S. equi and the immune response in the host

Australian Vet. J. 19, 62-85

Bazeley, P.L., and J. Battle (1940):

Studies with equine streptococci. 1. A survey of beta-hemolytic streptococci in equine infections

Australian Vet. J. 16, 140-146

Bazeley, P.L., S. Baldwin, H. Dickson and J.R. Thayer (1949):

The keeping qualities of strangles vaccine

Australian Vet. J. 25, 130-133

Beachy, E.G., H. Alberti and G.H. Stollerman (1969):

Delayed hypersensitivity to purified streptococcal M protein in guinea pigs and in man

J. Immunol. 102, 42-52

Beech, J., and C.R. Sweeney (1991):

Streptococcal Infections

In: J. Beech (Hrsg.), Equine Respiratory Disorders, 181-187

Verlag Lea & Febiger, Philadelphia

Beer, J. (1987):

Infektionskrankheiten der Haustiere, 480-481

Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, New York

Bergsten, G., and S. Persson (1966):

Studies on the ECG in horses with acute strangles

In: J.T. Bryans (Hrsg.), Proceedings of the 1st International Conference on Equine Infectious Diseases, Stresa, Italy, 76-81

Verlag Grayson Foundation, Lexington, Kentucky, USA

Bessen, D., and V.A. Fischetti (1988):

Passive acquired mucosal immunity to group A streptococci by secretory immunoglobulin A

J. Exp. Med. 167, 1945-1950

Björck, L., and G. Kronvall (1984):

Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent

J. Immunol. 133, 969-974

Blood, D.C., and O.M. Radostits (1989):

Veterinary Medicine, 7th edition, 562-565

Verlag Bailliere Tindall, London, England

Bongert, J. (1914):

Die Drüse der Pferde

In: Kolle und Wassermann (Hrsg.), Handbuch der pathogenen Mikroorganismen, 2. Auflage, Band 6, 197-213

Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, New York

Boschwitz, J.S., and J.F. Timoney (1994a):

Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood

Infection and Immunity 62, 3515-3520

Boschwitz, J.S., and J.F. Timoney (1994b):

Characterization of the antiphagocytic activity of equine fibrinogen for *Streptococcus equi* subsp. *equi*

Microbial Pathogenesis, 121-129

Boschwitz, J.S., M.H. Groschup and J.F. Timoney (1991):

A comparison of different methods of extraction of the M-protein from *Streptococcus equi*

Cornell Vet. 81, 25-36

Botta, G.A. (1981):

Surface components in adhesion of group A streptococci to pharyngeal epithelial cells

Curr. Microbiol. 6, 101-104

Brandtzaeg, P. (1992):

Humoral immune response patterns of human mucosae: induction and relation to bacterial respiratory tract infections

J. Infect. Dis. 165, S167-S176

Brandtzaeg, P. (1995):

Molecular and cellular aspects of the secretory immunoglobulin system

APMIS 103, 1-19

Bronze, M.S., D.S. McKinsey, E.H. Beachey and J.B. Dale (1988):

Protective immunity evoked by locally administered group A streptococcal vaccines in mice

J. Immunol. 141, 2767-2770

Bryans, J.T., E.R. Doll and B.P. Shepard (1964):

The etiology of strangles

Cornell Vet. 54, 198-205

Bryans, J.T., and B.O. Moore (1972):

Group C streptococcal infections of the horse

In: L.W. Wannamaker and J.M. Matsen (Hrsg.), Streptococcus and Streptococcal Diseases, 327-338

Verlag Academic Press, New York, London

Bryant, S., K.K. Brown, S. Lewis, R.C. Stewart and R. Parizek (1985):

Protection against strangles with an enzymatic Streptococcus equi extract

Vet. Medicine 80, 58-70

Burnette, W.N. (1981):

"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A

Anal. Biochem. 112, 195-203

Caparon, M.G., D.S. Stephens, A. Olsén and J.R. Scott (1991):

Role of M protein in adherence of group A streptococci

Infection and Immunity 59, 1811-1817

Clabough, D. (1987):

Streptococcus equi infection in the horse: A review of clinical and immunological considerations

Equine Veterinary Science 7, 279-283

Cohrs, P. (1941):

Die Druse des Pferdes im Lichte der neueren Forschung

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 5, 49-52

Courtney, H.S., C. von Hunolstein, J.B. Dale, M.S. Bronze, E.H. Beachey and D.L. Hasty (1992):

Lipoteichoic acid and M protein: dual adhesins of group A streptococci

Microbial Pathogenesis 12, 199-208

D'Alessandry, B., G. Plotkin, B.M. Kluge, M.K. Wittner, E.N. Fox, A. Dorfman and B.A. Waldman (1978):

Protective studies with group A streptococcal M protein vaccine. III. Challenge of volunteers after systemic or intranasal immunization with type 3 or type 12 group A streptococcus

J. Infect. Dis. 138, 712-718

Dorssen, van C.A. (1939):

Over de aetiologie van den goedaardigen Droes

Tijdschr. Diergeneesk. 66, 716-730

Ebert, E. F. (1969):

Some observations on equine strangles

Vet. Med. / Small Anim. Clin. 64, 71-73

Elias, H. (1946):

The tonsils of the horse

Am. J. Vet. Res. 7, 343-349

Ellen, R.P., and R.J. Gibbons (1972):

M protein-associated adherence of Streptococcus pyogenes to epithelial surfaces: prerequisite for virulence

Infection and Immunity 5, 826-830

Engelbrecht, H. (1969):

Vaccination against strangles

J. Am. Vet. Med. Assoc. 155, 425-427

Erickson, E.D., and N.L. Norcross (1975):

The cell surface antigens of Streptococcus equi

Can. J. comp. Med. 39, 110-115

Evers, W.D. (1968):

Effect of furaltadone on strangles in horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. 152, 1394-1398

Fallon, E.H. (1969):

The clinical aspects of streptococcal infections of horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. 155, 413-415

Farrow, J.A., and M.D. Collins (1986):

Taxonomic studies on streptococci of serological groups C, G, and L and possibly related taxa

Syst. Appl. Microbiol. 5, 483-493

Fischetti, V.A. (1989):

Streptococcal M protein: Molecular design and biological behavior

Clin. Microbiol. Rev. 2, 285-314

Fischetti, V.A. (1991):

Streptococcal M Protein

Scientific American 264, 58-65

Fischetti, V.A., K.F. Jones and J.R. Scott (1985):

Size variation of the M protein in group A streptococci

J. Exp. Med. 161, 1384-1401

Floer, W. (1972):

Untersuchungen über die Mikroflora des Luftsackes beim Pferd

Tierärztliche Hochschule Hannover, Vet.-Med. Dissertation

Ford, J., and M. D. Lokai (1980):

Complications of Streptococcus equi infection

Equine Practice 2, 41-44

Friedberger, F., und E. Fröhner (1892):

Die Druse der Pferde

In: Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie der Haustiere, 3. Auflage,

Band 2, 377-390

Verlag Enke, Stuttgart

Galán, J.E., and J.F. Timoney (1985a):

Immune complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of Streptococcus equi

J. Immunol. 135, 3134-3137

Galán, J.E., and J.F. Timoney (1985b):

Mucosal nasopharyngeal immune responses of horses to protein antigens of Streptococcus equi

Infection and Immunity 47, 623-628

Galán, J.E., and J.F. Timoney (1987):

Molecular analysis of the M-protein of Streptococcus equi and cloning and expression of the M-protein gene in Escherichia coli

Infection and Immunity 55, 3181-3187

Galán, J.E., and J.F. Timoney (1988):

Immunologic and genetic comparison of Streptococcus equi isolates from the United States and Europe

J. Clin. Microbiol. 26, 1142-1146

Galán, J.E., J.F. Timoney and F.W. Lengemann (1986):

Passive transfer of mucosal antibody to Streptococcus equi in the foal

Infection and Immunity 54, 202-206

Gallati, H., und H. Brodbeck (1982):

Peroxidase aus Meerrettich: Kinetische Studien und Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und o-Phenylendiamin

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 20, 221-225

George, J.L., J.S. Reif, R.K. Shideler, C.J. Small, R.P. Ellis, S.P. Snyder and

A. E. Mc Chesney (1983):

Identification of carriers of Streptococcus equi in a naturally infected herd

J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 80-84

Gerber, H. (1982):

Streptokokken-Infektionen

In: H.J. Wintzer (Hrsg.), Krankheiten des Pferdes, 51-56

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

Grant, S.T., A. Efstratiou and N. Chanter (1993):

Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical Streptococcus equi

Vet. Record 133, 215-216

Gratzl, E. (1933):

Das endoskopische Bild des kranken Luftsackes mit besonderer Berücksichtigung der sog. retropharyngealen (Luftsacklymphknoten-) Abszesse und ihre Behandlung

Arch. wiss. prakt. Tierhk. 66, 445-484

Gratzl, E., und E. Traub (1942):

Zum Vorkommen von hämolytischen Streptokokken bei den katarrhalisch-entzündlichen Erkrankungen der Luftwege des Pferdes

Arch. wiss. prakt. Tierheilk. 77, 347-377

Greenblatt, J., R.J. Boakle and J.H. Schwab (1978):

Activation of the alternate complement pathway by peptidoglycan from streptococcal cell wall

Infection and Immunity 19, 296-303

Grini, O. (1948):

Studies on Hemolytic Streptococci, with Special Regard to Their Occurrence in Pyogenic Processes in Domestic Animals

A/S Carl Fr. Mortensen, Veterinærmedicinsk Bog- og Instrumenthandel, København

Guirguis, N., D.W. Fraser, R.R. Facklam, A. El Kholy and L.W. Wannamaker (1982):

Type-specific immunity and pharyngeal acquisition of group A streptococcus

Am. J. Epidem. 116, 933-939

Hagan W.A., and D.W. Bruner (1988):

The Genus Streptococcus

In: J.F. Timoney et al. (Hrsg.), Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals, 8. Auflage, 181-196

Verlag Cornell University Press, Ithaca and London

Hamlen, H.J., J.F. Timoney and R.J. Bell (1994):

Epidemiologic and immunologic characteristics of Streptococcus equi infection in foals

J. Am. Vet. Med. Assoc. 204, 768-775

Hancke, - (1931):

Die Druse im Remonteamt Weeskenhof vom Jahre 1892 bis 1930, ihre Bekämpfung und Behandlung

Zeitschrift für Veterinärkunde 43, 113-124

Hannant, D., D.M. Jessett, T. O'Neill, B. Sundqvist and J.A. Mumford (1988):

Nasopharyngeal, tracheobronchial, and systemic immune responses to vaccination and aerosol infection with Equine-2 influenza A virus (H3N8)

In: D.G. Powell (Hrsg.), Proceedings of the 5th International Conference on Equine Infectious Diseases, Lexington, KY, 65-73

Verlag University of Kentucky Press, Lexington

Hannant, D., D.M. Jessett, T. O'Neill and J.A. Mumford (1989):

Antibody isotype responses in the serum and respiratory tract to primary and secondary infections with equine influenza virus (H3N8)

Vet. Microbiol. 19, 293-303

Hofferber, O. (1941):

Blutbild bei Drusemetastasen

Zeitschrift für Veterinärkunde 53, 241-243

Hoffman, A.M., H.R. Staempfli, J.F. Prescott and L. Viel (1991):

Field evaluation of a commercial M-protein vaccine against Streptococcus equi infection in foals

Am. J. Vet. Res., 52, 589-592

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams (1994):

Gram-positive cocci

In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9. Auflage, 527-558

Verlag Williams & Wilkins, Baltimore

Holterbach, - (1909):

Dauer der Immunität nach überstandener Druse

Mitteil. d. Ver. bad. Tierärzte, 131

Horstmann R.D., H.J. Sieverstein, J. Krohloch and V.A. Fischetti (1988):

Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: Selective binding of complement control protein factor H

Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 1657-1661

Johnson, P.R., S. Feldman, J.M. Thompson, J.D. Mahoney and P.F. Wright (1985):

Comparison of long-term systemic and secretory antibody responses in children given live attenuated, or inactivated influenza A vaccine

J. Med. Virol. 17, 325-335

Johnson, P.R., S. Feldman, J.M. Thompson, J.D. Mahoney and P.F. Wright (1986):

Immunity to influenza A virus infection in young children: a comparison of natural infection, live cold-adapted vaccine, and inactivated vaccine

J. Infect. Dis. 154, 121-127

Jones, F.S. (1919):

The streptococci of equines

J. Exp. Med. 30, 159-178

Jorm, L.R. (1992):

Laboratory studies on the survival of streptococcus equi subspecies equi on surfaces

In: W. Plowright et al. (Hrsg.), Proceedings of the 6th International Conference on Equine Infectious Diseases, Cambridge, MA, 39-43

Verlag R&W Publications, Newmarket

Jorm, L.R., D.N. Love and G.D. Bailey (1994):

Genetic structure of populations of α -hemolytic Lancefield group C streptococci from horses and their association with disease
Res. Vet. Science 57, 292-299

Keller, H., und G. Jaeschke (1984):

Klinische und Labordiagnostik bakterieller Infektionen der Atmungsorgane des Pferdes
Prakt. Tierarzt 65, 565-568

Kilian, M., and M.W. Russell (1994):

Function of mucosal immunoglobulins

In: P.L. Ogra et al. (Hrsg.), Handbook of Mucosal Immunology, 127-137

Verlag Academic Press, Orlando, Florida

Kilpper-Bälz, R., and K.H. Schleifer (1984):

Nucleic acid hybridization and cell wall composition studies of pyogenic streptococci
FEMS Microbiology Letters 24, 355-364

Knight, A.P., J.L. Voss, A.E. McChesney and H.G. Bigbee (1975):

Experimentally-induced Streptococcus equi infection in horses with resultant guttural pouch empyema

Vet. Med./ Small Anim. Clin. 70, 1194-1199

Köbe, K. (1939):

Die Druse des Pferdes

In: E. Gildemeister et al. (Hrsg.), Handbuch der Viruskrankheiten, Band 2, 741-742

Verlag Gustav Fischer, Jena

Koger, L.M. (1967):

The equine respiratory disease syndrome in the Pacific Northwest

J. Am. Vet. Med. Assoc. 151, 1611-1614

Laemmli, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature (London) 227, 680-685

Lancefield, R.C. (1933):

A serologic differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci

J. Exp. Med. 57, 571-595

Leemann, W. (1991):

Druse des Pferdes

In: E. Wiesner (Hrsg.), Handlexikon der tierärztlichen Praxis 2

Verlag Gustav Fischer, Jena, Stuttgart, New York

Lewis, P.F. (1969):

Epidemiology of major respiratory diseases of the horse

Australian Vet. J. 45, 231-236

Loewenthal, H. (1938):

The preparation of protective sera against haemolytic streptococci

British J. Exp. Pathol. 19, 143-259

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951):

Protein measurement with the Folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275

Lührs, E. (1927):

Druse der Pferde

In: Stang und Wirth (Hrsg.), Tierheilkunde und Tierzucht, 3. Band, 72-80

Verlag Urban und Schwarzenberg, Berlin und Wien

Mahaffey, L.W. (1962):

Respiratory conditions in horses

Vet. Rec. 74, 1295-1304

Mair, T.S., E.H. Batten, C.R. Stokes and F.J. Bourne (1987):

The histological features of the immune system of the equine respiratory tract

Comp. Path. 97, 575-586

Mair, T.S., C.R. Stokes and F.J. Bourne (1988):

Immunohistochemical study of the local humoral immune system of the equine respiratory mucosa

Res. Vet. Science 45, 160-165

Matthews, J.B., and K.M. Basu (1982):

Oral tonsils: an immunoperoxidase study

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 69, 21-25

McCoy, H.E., C.C. Broder and R. Lottenberg (1991):

Streptokinases produced by pathogenic Group C streptococci demonstrate species-specific plasminogen activation

J. Infect. Dis. 164, 515-521

McDermott, M.R., A.D. Befus and J. Bienenstock (1982):

The structural basis for immunity in the respiratory tract

International Review of Experimental Pathology 23, 47-112

McGhee, J.R., J. Mestecky, M.T. Dertzbaugh, J.H. Eldridge, M. Hirasawa and H. Kiyono (1992):

The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development

Vaccine 10, 75-88

Moore, B.O., and J.T. Bryans (1970):

Type specific antigenicity of group C streptococci from diseases of the horse

In: J.T. Bryans et al. (Hrsg.), Proceedings of the 2nd International Conference on Equine Infectious Diseases, Paris (1969), 231-238

Verlag S. Karger, Basel, München, New York

Morgan, J.H., F.P. Curtis and S. Nochumson (1991):

Protein Recovery from the All-Agarose ProSieve Gel System

Biotechniques 11, 256-261

Mukhtar, M.M., and J.F. Timoney (1988):

Chemotactic response of equine polymorphonuclear leukocytes to *Streptococcus equi*

Res. Vet. Science 45, 225-229

Myhre, E.B., and G. Kronvall (1977):

Heterogeneity of nonimmune immunoglobulin Fc reactivity among Gram-positive cocci: Description of three major types of receptors for human immunoglobulin G

Infection and Immunity 17, 475-482

Nara, P.L., S. Krakowka, T.E. Powers and R.C. Garg (1983):

Experimental *Streptococcus equi* infection in the horse: Correlation with in vivo and in vitro immune responses

Am. J. Vet. Res. 44, 529-534

Nees, A. (1994):

Die Druseerkrankung des Pferdes

Freie Universität Berlin, Vet.-Med. Dissertation

Nowicki, S.T., D. Minning-Wenz, K.H. Johnston and R. Lottenberg (1994):

Characterization of a novel streptokinase produced by *Streptococcus equisimilis* of non-human origin

Thrombosis and Haemostasis 72, 595-603

O'Dea, J.C. (1969):

Comments on vaccination against strangles

J. Am. Vet. Med. Assoc. 155, 427-431

Ogura, K. (1929):

Über den Drusestreptococcus, mit besonderer Berücksichtigung seiner Spezifität

Jour. Jap. Soc. Vet. Sci. 8, 174

Pahud, J.J., and J.P. Mach (1972):

Equine secretory IgA and secretory component

Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 42, 175-186

Pfeiffer, R., und O. Müller (1912):

Ergebnisse der von Geheimrat Prof. Dr. R. Pfeiffer und Prof. Dr. O. Müller aufgenommenen Arbeiten zur Erforschung und Bekämpfung der Druse in Ostpreußen

Berl. Tierärztl. Wochenschr. 50, 929-934

Piché, C. A. (1984):

Clinical observations on an outbreak of strangles

Can. Vet. J. 25, 7-11

Poels, J. (1888):

Die Mikrokokken der Druse der Pferde

Fortschr. d. Med. H6, 4-7

Polly, S., B.H. Waldman, P. High, M.K. Wittner, A. Dorfman and E.N. Fox (1975):

Protective studies with a group A streptococcal M protein vaccine. II. Challenge of volunteers after local immunization in the upper respiratory tract

J. Infect. Dis. 131, 217-224

Prescott, F., S.K. Srivastava, R. deGannes and D.A. Barnum (1982):

A mild form of strangles caused by an atypical *Streptococcus equi*

J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 293-294

Pycock, J.F., W.E. Allen and T.H. Morris (1987):

A rapid procedure for isolation of equine neutrophils

Res. Vet. Sci. 42, 411-412

Quiding-Järbrink, M., G. Granström, I. Nordström, J. Holmgren and C. Czerkinsky (1995):

Induction of compartmentalized B-cell responses in human tonsils

Infection and Immunity 63, 853-857

Raphel, C.F. (1982):

Brain abscess in three horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. 180, 874-877

Reif, J.S. (1979):

Epidemiology of equine infectious respiratory disease

Vet. Clin. of North Am., Large Anim. Pract. 1, 3-15

Reif, J.S., J.L. George and R.K. Shideler (1981):

Recent developments in strangles research: Observations on the carrier state and evaluation of a new vaccine

Proceedings of the 27th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, LA, 33-40

Verlag AAEP, Lexington, KY

Reis, K.J., H.F. Hansen and L. Björck (1986):

Extraction and characterization of IgG Fc receptors from group C and group G streptococci

Molecular Immunology 23, 425-431

Richters, C.E. (1929):

Beiträge zur Erforschung und Bekämpfung der Drüse der Pferde

Zeitschrift für Veterinärkunde 41, 137-169

Richters, C.E. (1930):

Neue Ergebnisse auf dem Gebiet der Erforschung und Bekämpfung der Drüse der Pferde

Berl. Tierärztl. Wochenschr. 42, 793-796

Richters, C.E. (1935):

Das Vorkommen echter Diphtheriebazillen bei der Drüse der Pferde

Berl. Tierärztl. Wochenschr. 47, 401-406

Rigg, D.L., D.W. Ramey and E.L. Reinertson (1985):

Tracheal compression secondary to abscessation of cranial mediastinal lymph nodes in a horse

J. Am. Vet. Med. Assoc. 186, 283-284

Rooney, J.R. (1979):

Sequela to strangles

Mod. Vet. Practice 60, 463-464

Rumbaugh, G.E., B.P. Smith and G.P. Carlson (1978):

Internal abdominal abscesses in the horse: A study of 25 cases

J. Am. Med. Assoc. 172, 304-309

Sand, G., und C.O. Jensen (1888):

Die Aetiologie der Druse

Deutsche Zeitschrift f. Thiermedizin u. vergl. Pathologie Bd. XIII; 437-465

Sarnowski, von, - (1927):

Atypische Drusefälle

Dtsch. tierärztl. Wochenschrift 35, 863-866

SAS Institute Inc. (1990a):

The univariate procedure

In: SAS® Procedures Guide, Version 6, 3. Edition, 617-634

Verlag SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

SAS Institute Inc. (1990b):

The means procedure

In: SAS® Procedures Guide, Version 6, 3. Edition, 365-387

Verlag SAS Institute Inc., Cary, NC, USA

Schütz, J.W. (1888):

Der Streptococcus der Druse der Pferde

Archiv für Wissenschaftl. und Praktische Thierheilkunde Bd. 14; 172-218

Sherman, J.M. (1937):

The streptococci

Bacteriol. Rev. 1, 1-97

Shvartsman, Y.S., and M.P. Zykov (1976):

Secretory anti-influenza immunity

Adv. Immunol. 22, 291-330

Smith, F. (1919):

The Early History of Veterinary Literature and Its British Development, I

Verlag Bailliere, Tindall and Cox, London

Smith, F. (1924):

The Early History of Veterinary Literature and Its British Development, II

Verlag Bailliere, Tindall and Cox, London

Smith, H. (1994):

Reactions to strangles vaccination

Australian Vet. J. 71, 257-258

Snedecor, G.W., and W.G. Cochran (1989):

Signed-rank test

In: Statistical Methods, 8. Edition, 140-142

Verlag Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA

Soleysell, J. de (1664):

Véritable parfait maréchal, qui enseigne à connoistre la bonté et les défauts de chevaux. Cit. 201

Sonea, I.M. (1987):

Strangles

In: N.E. Robinson (Hrsg.), Current Therapy in Equine Medicine 2, 590-592

Verlag Saunders, Philadelphia, London, Toronto

Spanier, J., and J.F. Timoney (1977):

Bacteriophages of Streptococcus equi

J. Gen. Virol. 35, 369-375

Srivastava, S.K., and D.A. Barnum (1981):

The serological response of foals to vaccination against strangles

Can. J. comp. Med. 45, 20-25

Srivastava, S.K., and D.A. Barnum (1982):

Lymphocyte stimulation response in horses against Phytohaemagglutinin and

M protein of Streptococcus equi

Can. J. comp. Med. 46, 51-56

Srivastava, S.K., and D.A. Barnum (1983a):

Adherence of Streptococcus equi to tongue, cheek and nasal epithelial cells of ponies.

Vet. Microbiol. 8, 493-504

Srivastava, S.K., and D.A. Barnum (1983b):

Vaccination of pony foals with M-like protein of Streptococcus equi

Am. J. Vet. Res. 44, 41-45

Srivastava, S.K., and D.A. Barnum (1985):

Studies on the immunogenicity of Streptococcus equi vaccines in foals

Can. J. Comp. Med. 49, 351-356

Srivastava, S.K., D.A. Barnum and J.F. Prescott (1985):

Production and biologic properties of M protein of *Streptococcus equi*

Res. Vet. Sci. 38, 184-188

Sweeney, C.R., C.E. Benson, R.H. Whitlock, D. Meirs, S. Barningham and

S. Whitehead (1987a):

Streptococcus equi Infection in Horses Part I

Continuing Education Article #6

Compend. cont. education practice veter. 9, 689-695

Sweeney, C.R., R.H. Whitlock, D. Meirs, S. Whitehead, S. Barningham (1987b):

Complications associated with *Streptococcus equi* infection on a horse farm

J. Am. Vet. Med. Assoc. 191, 1446-1448

Sweeney, C.R., C.E. Benson, R.H. Whitlock, D. Meirs, S. Whitehead and

S. Barningham (1987c):

Streptococcus equi Infection in Horses Part II

Continuing Education Article #5

Compend. cont. education practice veter. 9, 845-851

Sweeney, C.R., C.E. Benson, R.H. Whitlock, D. Meirs, S. Barningham, S. Whitehead and D. Cohen (1989):

Description of an epizootic and persistence of *Streptococcus equi* infections in horses

J. Am. Vet. Med. Assoc. 194, 1281-1283

Swerczek, T.W. (1979):

Aggravation of strangles, equine clostridial typhlocolitis (Colitis X) and bacterial venereal diseases in the horse by antibacterial drugs

Proceedings of the 25th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Miami Beach, FL 305-311

Verlag AAEP, Lexington, KY

Swerczek, T.W. (1984):

Pathogenesis, treatment, and control of *Streptococcus equi* infection (strangles) in horses

Symposium on trimethoprim/sulfadiazine: clinical applications in equine medicine, Orlando, FL, 26-30

Verlag Veterinary Learning Systems Co., Princeton Junction, NJ

Tauber, J.W., M.J. Polley and J.B. Zabriskie (1976):

Nonspecific complement activation by streptococcal structures, II. Properdin-independent initiation of the alternate pathway

J. Exp. Med. 143, 1352-1366

Taylor, F.G.R. (1992):

Strangles

In: N.E. Robinson (Hrsg.), Current Therapy in Equine Medicine 3, 324-326

Verlag Saunders, Philadelphia, London, Toronto

Timoney, J.F. (1986):

Characteristics of an R antigen common to *Streptococcus equi* and *zooepidemicus*

Cornell Vet. 76, 49-60

Timoney, J.F. (1988a):

Shedding and maintenance of *Streptococcus equi* in typical and atypical strangles

In: D.G. Powell (Hrsg.), Proceedings of the 5th International Conference on Equine Infectious Diseases, Lexington, KY, 28-33

Verlag University of Kentucky Press, Lexington

Timoney, J.F. (1988b):

Protecting against strangles: A contemporary view

Equine Vet. J. 20, 392-396

Timoney, J.F. (1993a):

Strangles

Veterinary Clinics of North America: Equine Practice 9, 365-374

Timoney, J.F. (1993b):

Streptococcus

In: C.L. Gyles and C.O. Thoen. (Hrsg.), Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, 2nd edition, 3-20

Verlag Iowa State University Press, Ames

Timoney, J.F., and D. Eggers (1985):

Serum bactericidal responses to *Streptococcus equi* of horses following infection or vaccination

Equine Vet. J. 17, 306-310

Timoney, J.F., and J.E. Galán (1985):

The protective response of the horse to an avirulent strain of *Streptococcus equi*

In: Y. Kimura et al. (Hrsg.), Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases, 294-295

Verlag Reed Books, Danbury, NY

Timoney, J.F., and M. Mukhtar (1992):

Variability in the M proteins of equine strains of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

In: W. Plowright et al. (Hrsg.), Proceedings of the 6th International Conference on Equine Infectious Diseases, Cambridge, MA, 15-20

Verlag R&W Publications, Newmarket

Timoney, J.F., and M.M. Mukhtar (1993):

The protective M proteins of the equine group C streptococci

Vet. Microbiol. 37, 389-395

Timoney, J.F., and J.E. Trachman (1985):

Immunologically reactive proteins of *Streptococcus equi*

Infection and Immunity 48, 29-34

Timoney, J.F., L. Pesante and C. Ernst (1982):

Hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of *Streptococcus equi*

In: D. Schlessinger (Hrsg.), *Microbiology*, 145-146

American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Timoney, J.F., P.J. Timoney and K.L. Strickland (1984):

Lysogeny and the immunologically reactive proteins of *Streptococcus equi*

Vet. Rec. 115, 148-149

Timoney, J.F., A. Umbach, J.E. Boschwitz and J.A. Walker (1994):

Streptococcus equi subspecies *equi* expresses 2 M-like proteins including a homologue of the variable M-like protective protein of subsp. *zooepidemicus*

In: H. Nakajima et al. (Hrsg.), *Proceedings of the 7th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Tokyo, 189-193

Verlag R&W Publications, Newmarket

Timoney, J.F., J. Walker, M. Zhou and J. Ding (1995):

Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

Infection and Immunity 63, 1440-1445

Todd, A.G. (1910):

Strangles

J. Comp. Pathol. Therapeut. 23, 212-229

Traore, M.Y., P. Valentin-Weigand, G.S. Chatwal and H. Blobel (1991):

Inhibitory effects of fibrinogen on phagocytic killing of streptococcal isolates from humans, cattle and horses

Vet. Microbiol. 28, 295-302

Tylewska, S.K., V.A. Fischetti and R.J. Gibbons (1988):

Binding selectivity of *Streptococcus pyogenes* and M-protein to epithelial cells differs from that of lipoteichoic acid

Curr. Microbiol. 16, 209-216

Underdown, B., and J. Mestecky (1994):

Mucosal immunoglobulins

In: P.L. Ogra et al. (Hrsg.), *Handbook of Mucosal Immunology*, 79-97

Verlag Academic Press, Orlando, Florida

Verbrugh, H.A., W.C. van Dijk, R. Peters, M.E. van Erne, M.R. Daha, P.K. Peterson and J. Verhoef (1980):

Opsonic recognition of staphylococci mediated by cell wall peptidoglycan: antibody-independent activation of human complement and opsonic activity of peptidoglycan antibodies

J. Immunol. 124, 1167-1173

Virolainen, A., J. Jero, H. Käyhty, P. Karma, J. Eskola and M. Leinonen (1995):

Nasopharyngeal antibodies to pneumococcal pneumolysin in children with acute otitis media

Clin. and Diagn. Lab. Immunol. 2, 704-707

Wallace, F.J., J.D. Emery, A.W. Cripps and A.J. Husband (1995):

An assessment of mucosal immunisation in protection against *Streptococcus equi* ('Strangles') infections in horses

Veterinary Immunology and Immunopathology 48, 139-154

Wagner, D.K., M.L. Clements, C.B. Reiner, M. Snyder, D.L. Nelson and

B.R. Murphy (1987):

Analysis of immunoglobulin G antibody responses after administration of live and inactivated influenza A vaccine indicates that nasal wash immunoglobulin G is a transudate from serum

J. Clin. Microbiol. 25, 559-562

Wang, J., and M.W. Stinson (1994):

M protein mediates streptococcal adhesion to Hep-2 cells

Infection and Immunity 62, 442-448

Wilkie, B.N. (1982):

Respiratory tract immune response to microbial pathogens

J. Am. Vet. Med. Assoc. 181, 1074-1079

Williams, R. C., and R.J. Gibbons (1972):

Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: A mechanism of antigen disposal

Science 177, 697-699

Wilson, W.D. (1988)

Streptococcus equi infections (strangles) in horses

Equine Practice 10, 12-25

Wirth, D., und K. Diernhofer (1950):

Druse des Pferdes

In: Lehrbuch der inneren Krankheiten der Haustiere einschließlich der Hautkrankheiten sowie der klinischen Seuchenlehre, 2. Auflage, 992-1000

Verlag Enke, Stuttgart

Wood, J.L.N., K. Dunn and N. Chanter (1993):

Persistent infection with Streptococcus equi and the epidemiology of strangles

Vet. Record 133, 375

Woolcock, J.B. (1974):

Purification and antigenicity of an M-like protein of Streptococcus equi

Infection and Immunity 10, 116-122

Woolcock, J.B. (1975a):

Epidemiology of equine streptococci

Res. Vet. Sci. 18, 113-114

Woolcock, J.B. (1975b):

Studies in atypical Streptococcus equi

Res. Vet. Sci. 19, 115-119

Woolcock, J.B. (1975c):

Immunity to Streptococcus equi

Australian Vet. J. 51, 554-559

Yelle, M.T. (1987):

Clinical aspects of Streptococcus equi infection

Equine Vet. Journal 19, 158-162

Zee, Y.C., J.W. Osebold and W.M. Dotson (1979):

Antibody responses and interferon titers in the respiratory tracts of mice after aerosolized exposure to influenza virus

Infection and Immunity 25, 202-207

Zeller, R. (1976):

Altes und Neues über die Drüse des Pferdes

Prakt. Tierarzt 58, 44-45

11. Anhang

11.1. Tabellen, Listen und Abbildungen

Tab. A1: Tiermaterial

ID	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gruppe
# 3	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 4	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 6	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 7	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 8	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 10	Pony	Hengst	1	Impfgruppe
# 43*	Vollblutpferd	Stute	1	Impfgruppe
# 411*	Vollblutpferd	Wallach	3	Impfgruppe
# 532*	Vollblutpferd	Wallach	1	Impfgruppe
Pinto	Kreuzung	Hengst	1	Impfgruppe
Sandy	Kreuzung	Stute	1	Impfgruppe
Snowflake	Kreuzung	Stute	1	Impfgruppe
# 1	Pony	Hengst	1	Kontrollgruppe
# 2	Pony	Hengst	1	Kontrollgruppe
# 5	Pony	Hengst	1	Kontrollgruppe
# 9	Pony	Hengst	1	Kontrollgruppe
# 59*	Vollblutpferd	Stute	1	Kontrollgruppe
# 528*	Vollblutpferd	Stute	1	Kontrollgruppe

Prince	Kreuzung	Hengst	1	Kontrollgruppe
Lucky	Kreuzung	Hengst	1	Kontrollgruppe
# 309*	Vollblutpferd	Wallach	3	Exp. Infektion
# 529*	Vollblutpferd	Wallach	2	Exp. Infektion

* = gespendete Tiere

Tab. A2: Zuckerfermentationsreaktion

Organismus	Lactose	Sorbitol	Trehalose
S. equi	-	-	-
S. zooepidemicus	+	+	-
S. equisimilis	+/-	-	+

Tab. A3: S. equi M-Protein spezifische lokale und systemische Antikörpertiter der Impfgruppe im Vorversuch

Schleimhaut IgA													Mittelwert der Positivkontrolle: 1.28				
Woche	#3	#4	#6	#7	#8	#10	#43	#411	#532	Pinto	Sandy	Snow.	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0.03	0	0.01	0.01	0.04	0.06	0.10	0.05	0.19	0	0	0.07	12	0.04	0.05	0.06	0.02
2	0	0.06	0.08	0.11	0.15	0.20	0.11	0.48	0	0.05	0	0.02	12	0.07	0.11	0.13	0.04
4	0.17	0.03	0.22	0.17	0.08	0.29	0.24	0.44	0.18	0.05	0.04	0.06	12	0.17	0.16	0.12	0.04
6	0.03	0.04	0.10	0.09	0.01	0.12	0.04	0.52	0.06	0.06	0.08	0.03	12	0.06	0.10	0.14	0.04
Schleimhaut IgG													Mittelwert der Positivkontrolle: 1.73				
Woche	#3	#4	#6	#7	#8	#10	#43	#411	#532	Pinto	Sandy	Snow.	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0.15	0	0.07	0.02	0.09	0.27	0	0.01	0.05	0	0.02	0.03	12	0.03	0.06	0.08	0.02
2	0.17	0.06	0.17	0.10	0.19	0.22	0.09	0.03	0.04	0.06	0	0	12	0.08	0.09	0.08	0.02
4	0.33	0.04	0.12	0.21	0.08	0.27	0	0.12	0.12	0	0.09	0	12	0.11	0.12	0.11	0.03
6	0.05	0.09	0.06	0.11	0.02	0.34	0	0.14	0.01	0.06	0.11	0	12	0.06	0.08	0.09	0.03
Serum IgG (* nach Adsorption mit S. zooepidemicus)													Mittelwert der Positivkontrolle: 1.84 (*1.49)				
Woche	#3	#3*	#4	#4*	#6	#6*	#7	#7*	#8	#8*	#10	#10*	#43	#43*	#411	#411*	#532
0	0.73	0.48	0.29	0.35	0.59	0.59	0.59	0.30	0.38	0	0.72	0.77	0.23	0.11	0.44	0.16	1.20
2	0.70	0.54	0.23	0.25	0.49	0.49	0.63	0.40	0.57	0.46	0.79	0.47	0.02	0.06	0.75	0.24	0.69
4	1.52	1.38	0.32	0.18	0.50	0.49	0.45	0.43	0.36	-	0.92	0.48	0.12	0.24	0.87	0	0.67
6	1.63	1.48	0.30	0.17	0.47	0.70	0.96	0.77	0.48	0.53	0.95	0.59	0.57	0.34	0.88	0.62	0.81
Woche	#532*	Pinto	Pinto*	Sandy	Sandy*	Snow.	Snow.*	N	Median	Mittelw.	S	SFM	Median*	Mittelw.*	S*	SFM*	
0	0.76	0.51	0.57	0.05	0.16	0.43	0.17	12	0.48	0.51	0.29	0.08	0.33	0.37	0.26	0.08	
2	0.66	0.62	0.61	0.05	0.22	0.23	0.05	12	0.60	0.48	0.28	0.08	0.43	0.37	0.20	0.06	
4	0.60	0.53	0.49	0.32	0.16	0	0.02	12	0.48	0.55	0.41	0.12	0.43	0.41	0.38	0.04	
6	0.93	1.25	0.70	0.43	0.20	0.04	0.10	12	0.69	0.73	0.44	0.13	0.61	0.59	0.38	0.11	

N=Umfang der Gruppe Mittelw.=Mittelwert S=Standardabweichung SFM=Standardfehler des Mittelwertes

Tab. A4: Temperaturdaten (° C)

Tag	#1	#2	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow	Lucky	N	Mittel	Median	#3*	#411*
0	38.2	38.3	38.2	38.5	38.4	38.3	38.3	38.4	38.2	38.6	38.4	38.5	38.3	38.3	38.2	38.4	38.1	38.3	18	38.3	38.3	38.6	38.3
1	38.9	38.9	40.1	39.9	39.3	39.3	39.5	38.7	40.6	38.9	38.7	39.8	38.8	39.6	39.0	39.2	40.0	39.6	18	39.4	39.3	38.9	38.8

Inhaltsverzeichnis

2	39.7	38.8	40.2	40.0	40.3	39.7	40.3	39.4	40.9	39.8	39.2	40.7	39.6	40.6	38.7	39.1	40.3	40.2	18	39.9	39.9	38.8	39.1
3	39.8	40.3	40.2	40.4	40.6	40.4	41.2	40.6	40.2	40.3	40.4	40.6	40.3	40.2	39.0	38.9	40.7	40.4	18	40.3	40.4	38.0	38.6
4	40.9	40.6		40.8	40.7	39.7	40.9	40.8		41.0	40.7	40.4	40.6	40.6	38.5	39.4	40.7	40.7	16	40.4	40.7	38.4	38.2
5	40.3	40.7	40.6			40.1	40.8		40.4	40.6	40.9	40.3	40.6		38.2	39.3	40.3	40.7	14	40.3	40.5	38.4	39.1
6			38.9	40.4	40.2	40.4		40.6						40.3	39.4	38.8			8	39.9	40.3	38.6	39.4
7	40.6	40.4	41.3			40.2	40.8		40.8	40.5	40.9	38.3	39.4		40.0	39.1	39.6	40.7	14	40.2	40.5	38.7	39.6
8				40.7		40.0		38.8						39.6	39.8	38.8			6	39.6	39.7	38.8	38.5
9	40.3	40.4		40.9	39.9	39.8	40.5				40.7	38.7	39.4		39.8	38.9	39.2	39.8	13	39.9	39.8	38.3	39.6
10			40.7	39.2		39.6	41.4		40.4	40.7					38.7	38.5			8	39.9	40.0	38.6	38.3
11	40.9			39.1	38.7	39.4	39.6	40.6						39.3	39.3	38.7			9	39.5	39.3	39.0	38.1
12	39.6	40.1	40.1			40.0	40.2		38.6	39.2	39.4	39.4	39.0		39.3	38.9	38.9	39.6	14	39.5	39.4	38.4	38.1
13	39.7			38.3	38.9	38.7		39.4				39.6		38.7	39.7	38.0			9	39.0	38.9	38.3	37.3
14	39.5	39.3	40.7			38.3	40.1		38.0	39.1	39.1	38.3	38.5		39.3		38.3	38.3	13	39.0	39.1	38.4	
16	39.0	38.6	39.9		38.3	37.9	40.2				39.0	39.1	38.8		39.9		38.9	39.0	12	39.1	39.0	38.4	
17			38.7			38.4			38.1	38.3					38.3	37.9			6	38.3	38.3	39.6	38.0
18				37.9		38.0		38.8						37.9	39.6				5	38.4	38.0	38.9	
19	38.2	38.3			38.7		37.2				37.7	38.6	37.8		38.5		38.7	38.3	10	38.2	38.3	38.6	

N=Datenumfang

* nicht in Median einbezogen

Individuelle Maximaltemperatur

Tab. A5: S. equi M-Protein-spezifische lokale und systemische Antikörpertiter im Hauptversuch

Schleimhaut IgA																	Mittelwert der Positivkontrolle: 1.25								
Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow.	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0.12	0.08	0.05	0.10	0.24	0.12	0.21	0.01	0.02	0.08	0.08	0.13	0.31	0.07	0.15	0.39	0.01	0.03	0.09	0.10	20	0.10	0.12	0.10	0.02
4	0.09	0.13	0.01		0	0.61	1.32	0.43	0.11	0.18	0.06	0.21	0.72	0.17		0.34	0	0.11	0.09	0.29	18	0.15	0.27	0.33	0.08
6	0.23	0.15	0.29		0.28	1.78	1.53	2.07	0.34	1.85	2.12	1.41	2.14			1.00	0.10	0.07	0.42	1.06	17	1.00	0.99	0.80	0.19
8	0.24	0.06	0.06		0.50		1.03	1.56	0.10	1.98		0.41	1.84			0.94	0.08	0.71	0.70	1.15	15	0.70	0.76	0.65	0.17
10	0.10	1.77	0.01		0.41		0.55	0.74	0.05	1.90		0.38	1.23			0.88	0.03	0.38	0.22	1.16	15	0.41	0.65	0.62	0.16
12	0.03	0.64	0.07		0.22		0.39	0.92	0.02	0.93		0.25	1.14			0.71	0.04	0.22	0.09	0.91	15	0.25	0.44	0.40	0.10
28	0.04	0.27	0.04		0.20		0.30	0.48	0	0.23		0.58				0.52	0.09	0.28	0.01	0.51	14	0.25	0.25	0.20	0.05

Schleimhaut IgG																	Mittelwert der Positivkontrolle: 2.09								
Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow.	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0.01	0.05	0.16	0	0	0.06	0.12	0.05	0.14	0.04	0	0.71	0.07	0.09	0.09	0.37	0.06	0.04	0	0.02	20	0.06	0.10	0.17	0.04
4	0.25	0.12	0.05		0	0.47	2.19	0.30	1.28	0.11	1.70	0.84	2.06	0.55		0.10	0	0.33	0.05	0.28	18	0.29	0.59	0.72	0.17
6	0.40	0.60	0.12		0.31	1.33	1.18	0.80	0.55	0.64	0.83	1.38	0.99			0.75	0.40	0.16	0.71	0.34	17	0.64	0.68	0.38	0.09
8	0.24	0.22	0.06		0.74		0.77	0.85	1.28	1.21		0.72	0.60			0.63	0.50	0.13	1.87	0.45	15	0.63	0.68	0.48	0.13
10	0.05	0.04	0.03		0.04		0.97	0.18	0.11	0.52		0.44	0.20			0.34	0.08	0.07	0.38	0.27	15	0.18	0.25	0.26	0.07
12	0.01	0	0.01		0.03		0.30	0.14	0.01	0.20		0.15	0.25			0.46	0.10	0.06	0.08	0.24	15	0.10	0.14	0.13	0.03
28	0.03	0	0		0		0.07	0.03	0	0.06		0.21				0.33	0	0.02	0.01	0.08	14	0.03	0.06	0.10	0.03

Serum IgG (* nach Adsorption mit S. zooepidemicus)																	Mittelwert der Positivkontrolle: 1.39 (*0.71)								
Woche	#1	#1*	#2	#2*	#3	#3*	#4	#4*	#5	#5*	#6	#6*	#7	#7*	#8	#8*	#9	#9*	#10	#10*	#43	#43*	#59	#59*	#411
0	0.47	0.42	0.42	0.31	0.73	0.66	0.37	0.10	0.19	0.17	0.47	0.59	0.49	0.40	0.32	0.26	1.45	1.01	0.66	0.36	0.21	0.07	0.44	0.32	0.28
4	1.25	1.25	0.67	0.60	0.8	0.45	1.17	0.77	0.61	0.26	1.41	1.93	1.06	1.04	1.29	1.09	1.53	1.29	1.11	0.70	0.80	0.29	1.22	0.52	0.98
6	0.82	0.73	0.80	0.64	0.68	0.52			0.52	0.27	1.60	1.73	1.29	0.85	1.07	0.89	2.40	2.20	1.18	0.63	0.84	0.60	1.66	0.87	0.87
8	0.78	0.58	0.70	0.60	0.78	0.46			0.57	0.31	1.65	2.05	0.96	0.73	0.94	0.71	2.40	2.20	1.28	0.48			1.67	0.66	0.78
12	0.49	0.67	1.00	0.76	0.79	0.56			0.44	0.36			0.68	0.65	0.91	0.70	2.40	1.55	0.69	0.43			1.72	0.89	0.85
28	1.20	1.15	1.21	0.98	0.84	0.49			0.59	0.52			0.51	0.34	0.73	0.39	1.46	1.25	0.96	0.45			1.55	0.61	

Woche	#411*	#528	#528*	#532	#532*	Prince	Prince*	Pinto	Pinto*	Sandy	Sandy*	Snow.	Snow.*	Lucky	Lucky*	N	Median	Mittelw.	S	SFM	Median*	Mittelw.*	S*	SFM*
0	0.28	1.39	0.95	0.49	0.39	0.91	0.34	0.49	0.43	0.35	0.02	0.45	0.03	0.40	0	20	0.46	0.55	0.34	0.08	0.33	0.36	0.28	0.06
4	0.40	2.91	1.19	2.13	1.35	1.66	0.76	1.01	0.55	1.38	0.63	1.28	0.65	1.12	0.48	20	1.20	1.27	0.52	0.12	0.68	0.81	0.43	0.1
6	0.26					1.74	1.21	0.92	0.60	0.47	0.27	1.26	0.56	0.96	0.55	17	0.96	1.12	0.50	0.12	0.63	0.79	0.51	0.12
8	0.52					1.72	0.89	0.98	0.49	0.42	0.23	1.22	0.54	0.77	0.36	16	0.95	1.1	0.52	0.13	0.56	0.74	0.57	0.14
12	0.29					1.38	0.53	0.65	0.64	0.45	0.18	1.03	0.35	0.88	0.34	15	0.85	0.96	0.53	0.14	0.56	0.59	0.33	0.09

N=Umfang der Gruppe Mittelw.=Mittelwert S=Standardabweichung SFM=Standardfehler des Mittelwertes

Tab. A6: IgA-Konzentration der Nasengangsspülproben (g/ml)

Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	14	45	32	131	14	113	243	67	121	112	55	83	108	47	152	257	41	105	27	182	20	94	97	70	16
4	32	32	23		15	126	121	128	140	46	63	212	137	80		45	8	127	23	92	18	72	81	57	14
6	121	78	74		174	125	182	132	143	184	122	162	360			187	60	109	176	221	17	143	154	69	17
8	71	23	27		173		125	155	68	290		94	380			245	82	51	216	255	15	125	150	107	28
10	55	22	20		40		133	71	86	196		95	162			293	45	109	135	163	15	95	108	75	19
12	22	10	14		26		133	22	33	99		29	155			145	38	77	49	175	15	38	68	58	15
28	17	23	15		58		259	44	52	110		310				398	41	203	33	238	14	55	129	128	34

N=Umfang der Gruppe
 S=Standardabweichung
 SFM=Standardfehler des Mittelwertes

Tab. A7: IgG-Konzentration der Nasengangsspülproben (g/ml)

Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0	3	8	14	3	8	12	7	11	8	4	23	4	9	7	9	5	5	5	11	20	7	8	5	1
4	9	4	4		3	14	42	13	0	5	39	22	41	14		7	0	16	4	14	18	11	14	14	3
6	20	17	6		13	18	19	13	0	14	12	17	14			18	7	4	9	14	17	14	13	6	1
8	14	7	4		18		17	14	24	18		12	14			20	8	4	17	14	15	14	14	6	2
10	5	0	0		6		21	0	5	14		11	7			12	4	6	8	14	15	6	7	6	2
12	5	0	0		5		14	2	2	7		3	1			12	2	4	5	11	15	4	5	4	1
28	0	0	0		3		11	7	5	5		9				11	4	7	4	9	14	5	5	4	1

N=Umfang der Gruppe
 S=Standardabweichung
 SFM=Standardfehler des Mittelwertes

Tab. A8: M-Protein-spezifische lokale IgA-Aktivität (ELISA O.D.-Einheit/mg Gesamt-IgA)

Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	[50]	11	9	5	[104]	6	5	1	1	4	9	9	17	9	6	9	1	2	20	3	18	6	7	5	0.01
4	17	24	3		0	29	66	20	5	23	6	8	32	13		45	0	5	24	19	18	18	19	17	0.01
6	11	11	24		10	85	50	94	14	60	104	49	36			32	10	4	14	29	17	29	37	32	0.01
8	20	16	13		17		49	60	9	41		26	29			23	6	83	19	27	15	23	29	21	0.01
10	11	492	3		62		25	62	3	58		24	46			18	4	21	10	43	15	24	59	122	0.03
12	8	[1070]	29		50		18	256	4	56		52	44			29	6	17	16	31	14	29	44	63	0.07
28	14	69	15		21		7	65	0	13		11				8	13	8	1	13	14	13	18	21	0.00

N=Umfang der Gruppe
 S=Standardabweichung
 SFM=Standardfehler des Mittelwertes
 [] = Unberücksichtigte Extremwerte aufgrund extrem geringen IgA-Gesamtgehaltes

Tab. A9: M-Protein-spezifische lokale IgG-Aktivität (ELISA O.D.-Einheit/mg Gesamt-IgG)

Woche	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#43	#59	#411	#528	#532	Prince	Pinto	Sandy	Snow	Lucky	N	Median	Mittelw.	S	SFM
0	0	100	123	0	0	46	60	45	80	31	0	187	111	60	82	247	80	53	0	11	20	57	66	66	0.01
4	167	190	79		0	209	313	143	0	147	262	233	305	229		91	0	127	79	124	18	145	150	98	0.01
6	123	218	120		148	443	369	381	0	267	415	502	440			250	364	254	473	151	17	267	289	148	0.01
8	107	200	95		247		280	354	320	403		360	267			191	385	206	645	188	15	267	283	138	0.01
10	67	0	0		40		277	0	147	231		238	182			170	127	70	304	113	15	127	131	102	0.03
12	13	0	0		40		133	560	40	182		300	[3125]			230	400	95	107	130	14	119	159	165	0.07
28	0	0	0		0		40	27	0	80		140				178	0	18	16	53	14	17	39	57	0.00

N=Umfang der Gruppe
 S=Standardabweichung
 SFM=Standardfehler des Mittelwertes
 [] = Unberücksichtigter Extremwert aufgrund extrem geringen IgG-Gesamtgehaltes

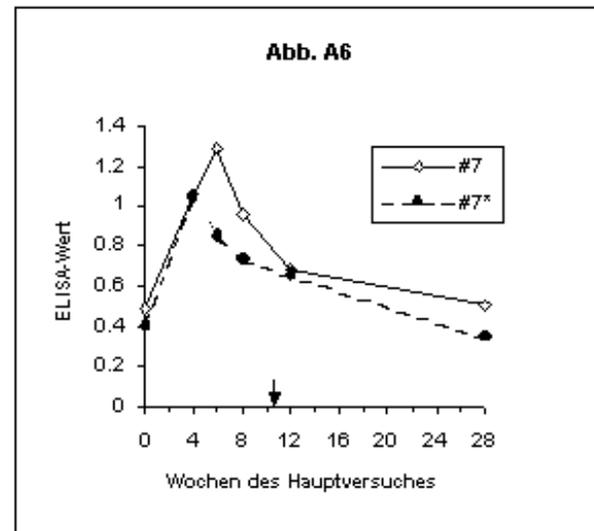
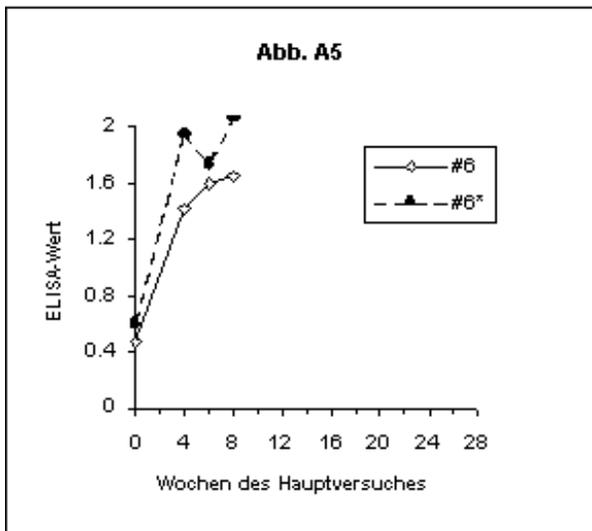
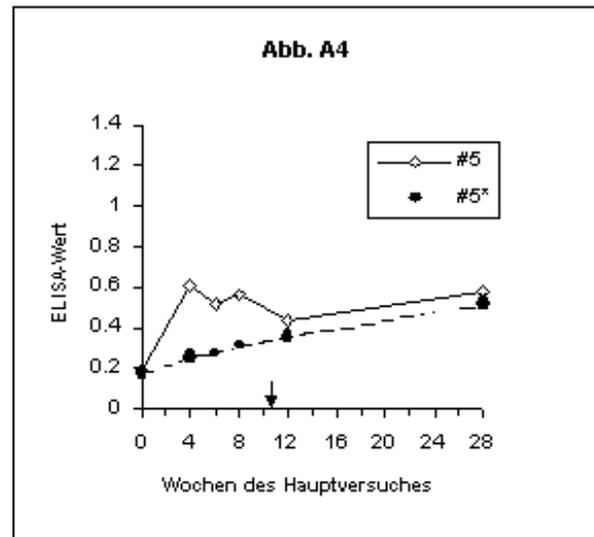
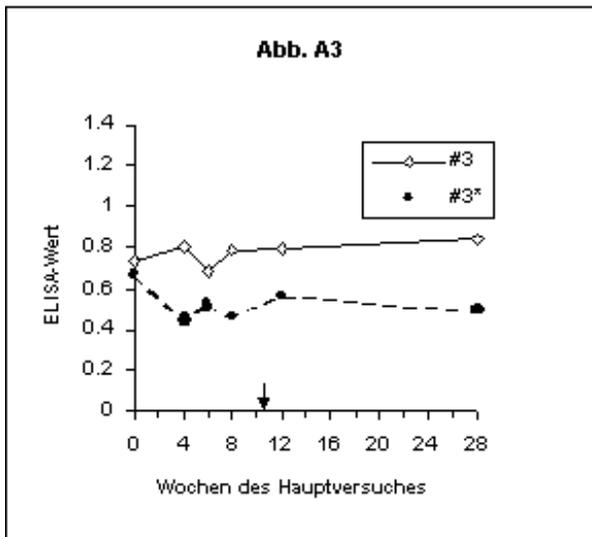
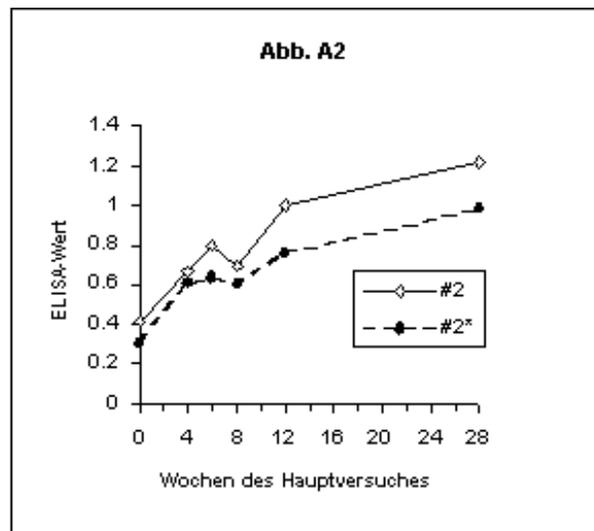
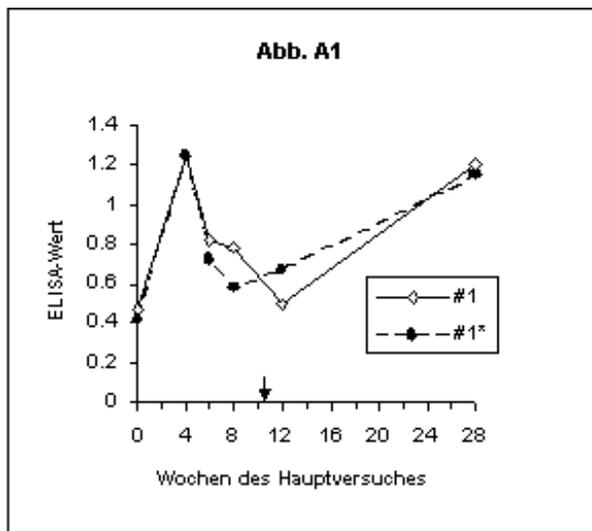
Liste A1: Aufgrund drusebedingter Komplikationen euthanasierte Pferde

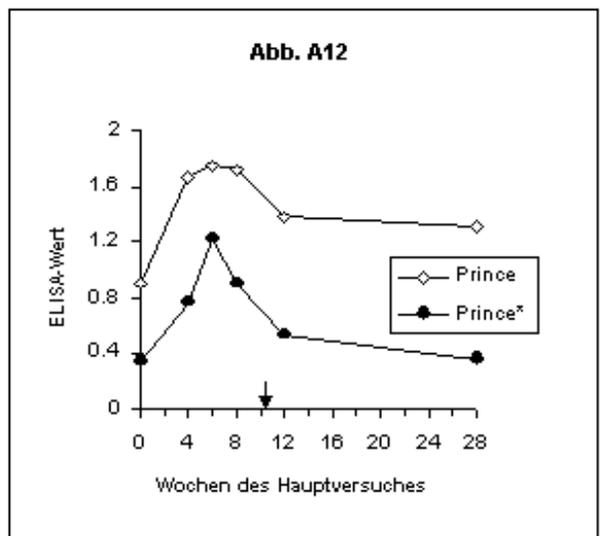
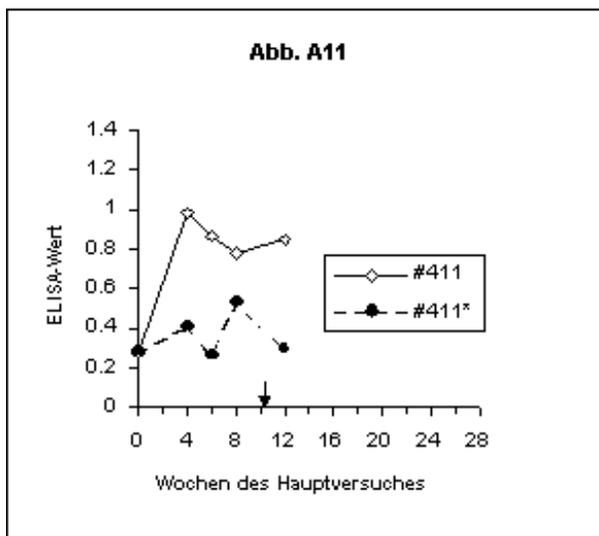
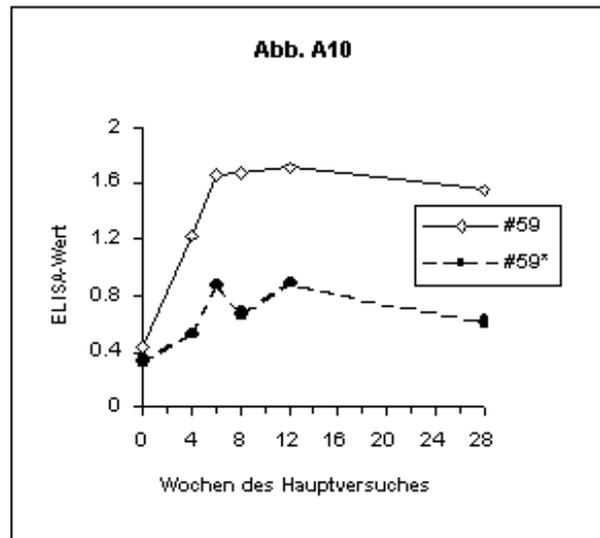
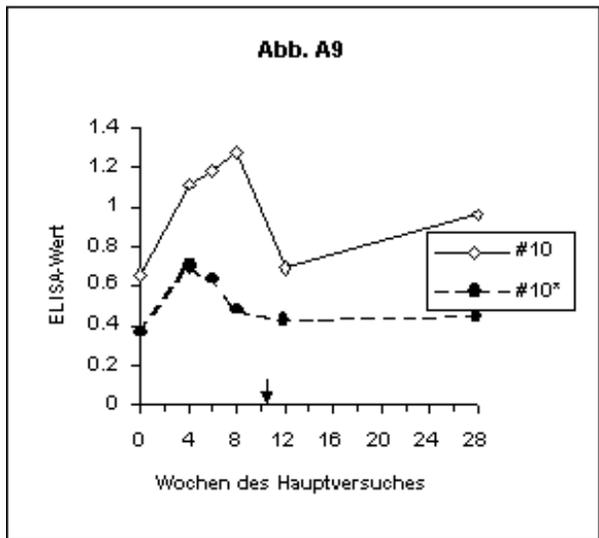
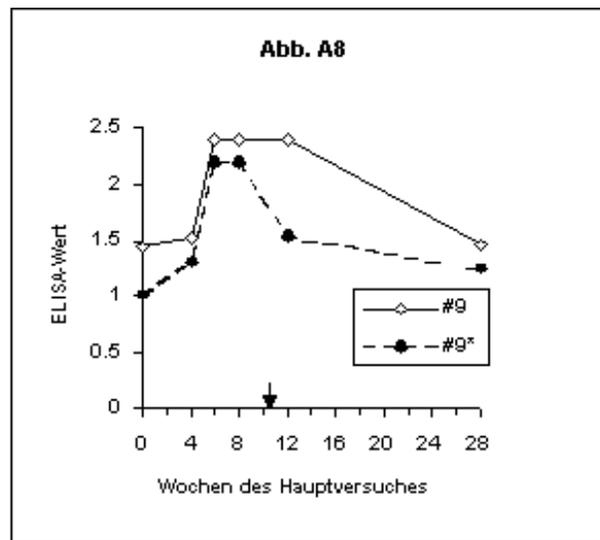
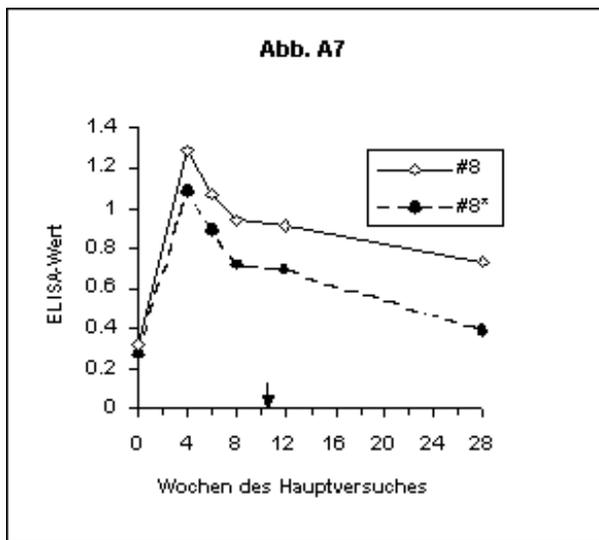
- # 6
- # 43
- # 532
- # 528
- # 529

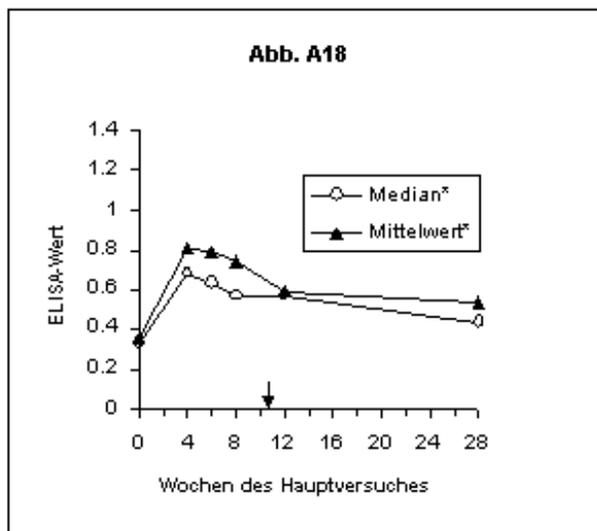
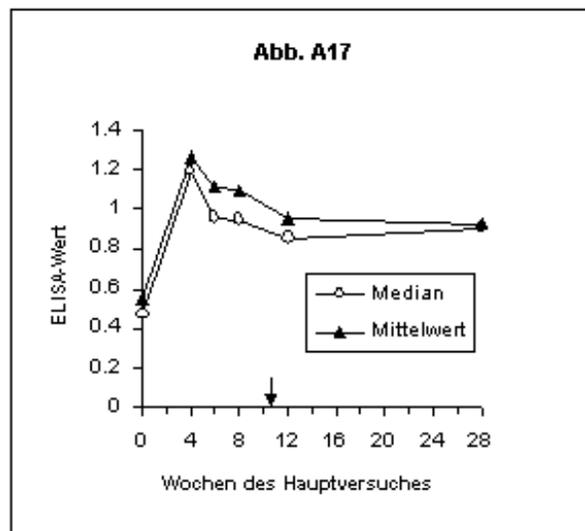
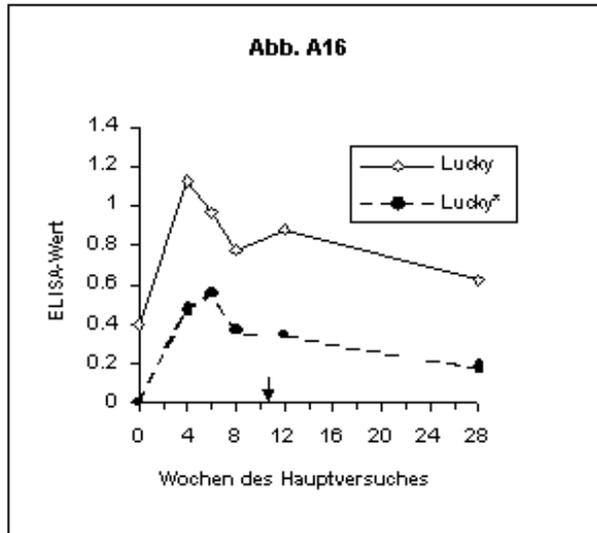
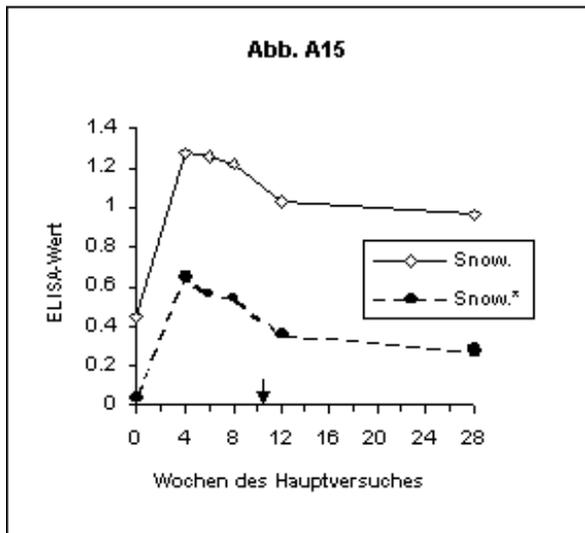
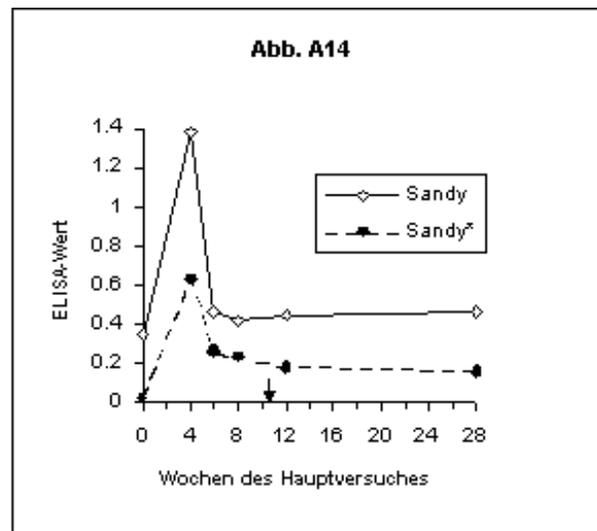
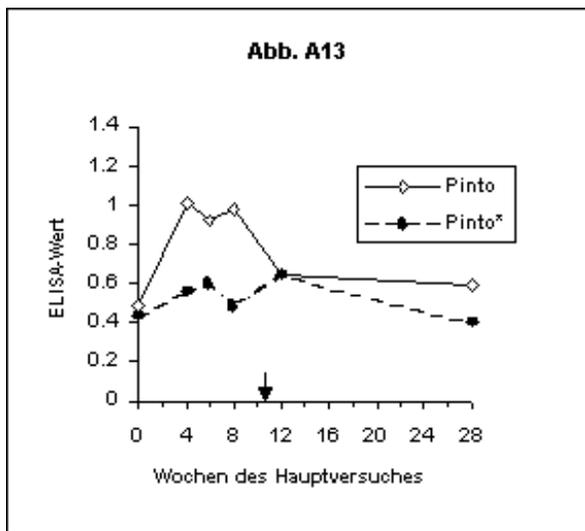
Liste A2: In der 11. Woche inokulierte Pferde

- # 1
- # 3
- # 5
- # 7
- # 8
- # 9
- # 10
- # 411
- Prince
- Pinto
- Sandy
- Snowflake
- Lucky

Abb. A1-A18: S. equi M-Protein-spezifisches Serum IgG (*nach Adsorption) der Versuchsgruppe im Hauptversuch







= Experimentelle intranasale *S. equi*-Inokulation

Der Maßstab der y-Achse orientiert sich am Mittelwert der Positivkontrolle (1,39) mit Ausnahme der Abb. 5, 8, 10 und 12 mit extrem hohen ELISA-Werten.

Abb. A19-A35: *S. equi* M-Protein-spezifisches lokales IgG und IgA der Versuchsgruppe im Hauptversuch

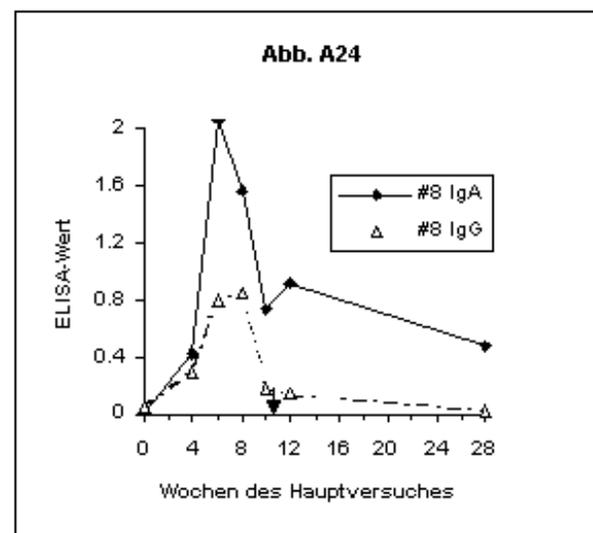
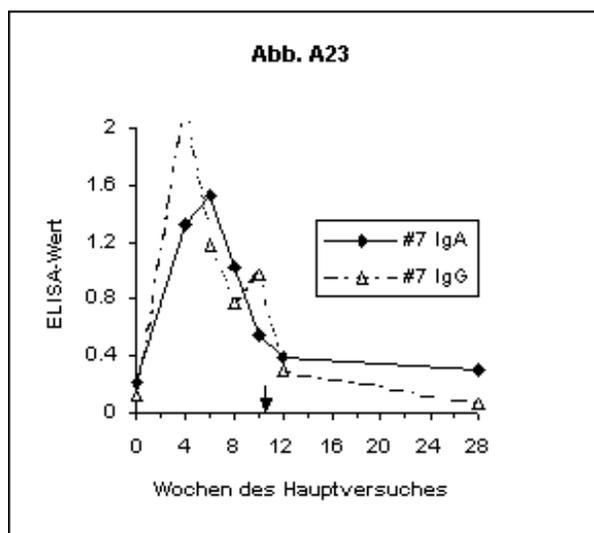
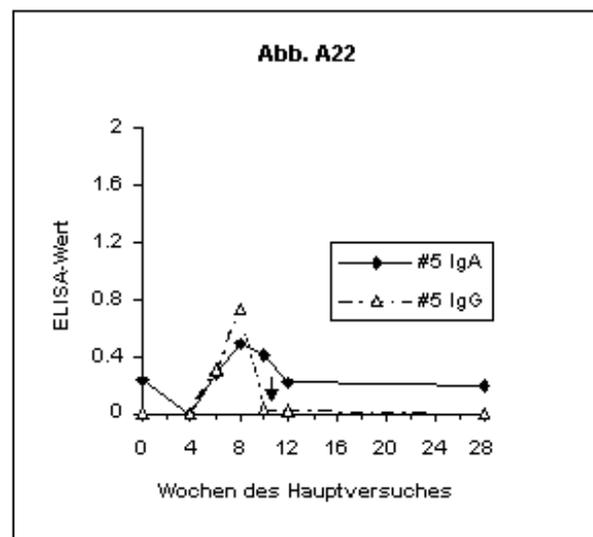
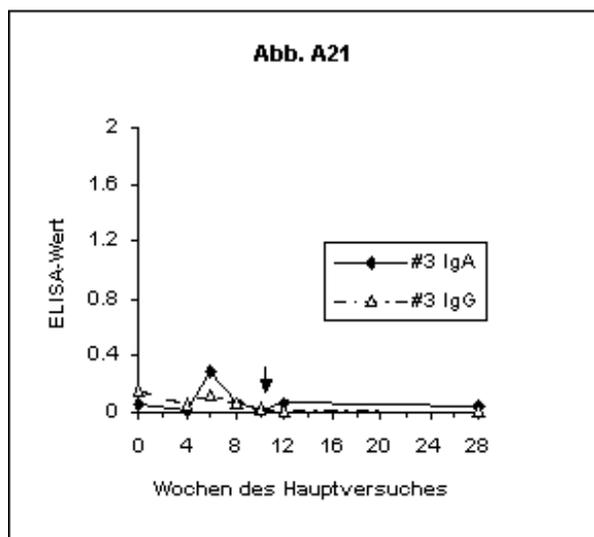
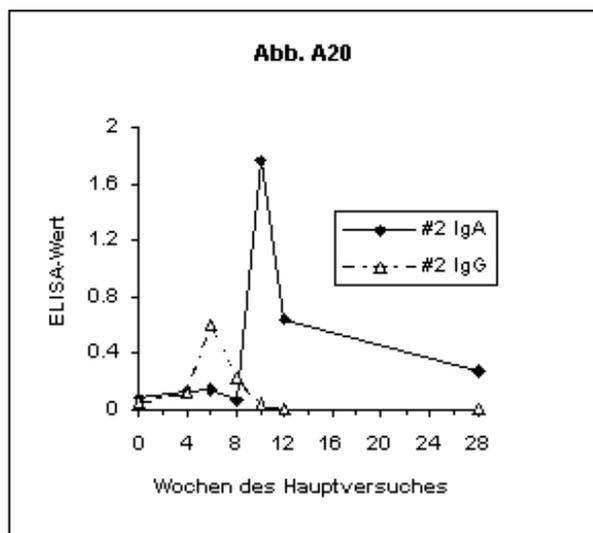
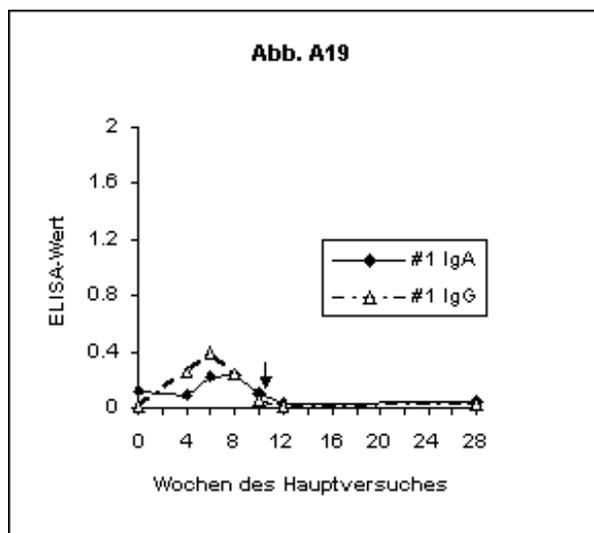


Abb. A25

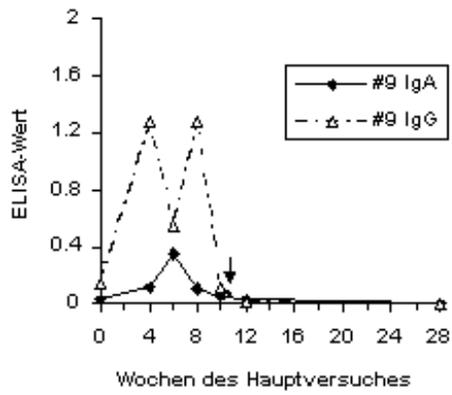


Abb. A26

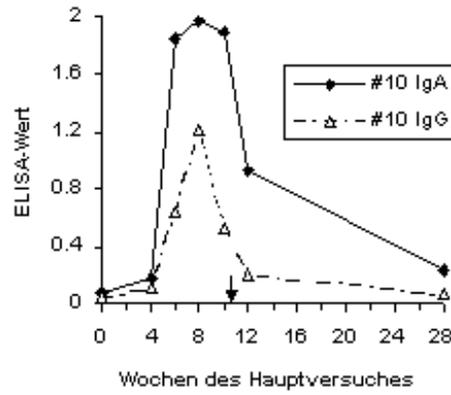


Abb. A27

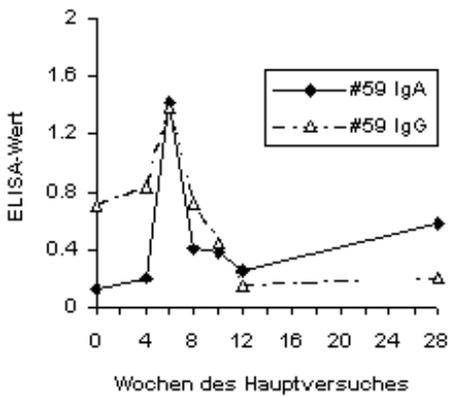


Abb. A28

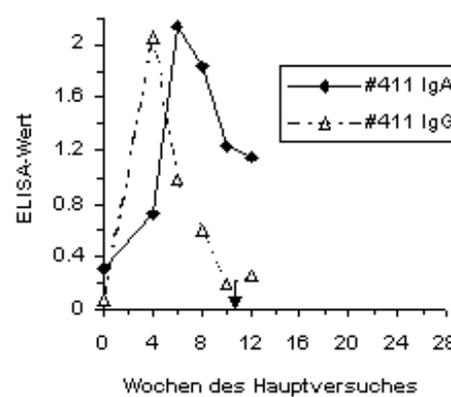


Abb. A29

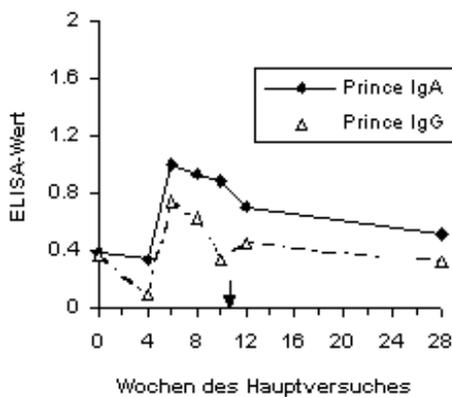
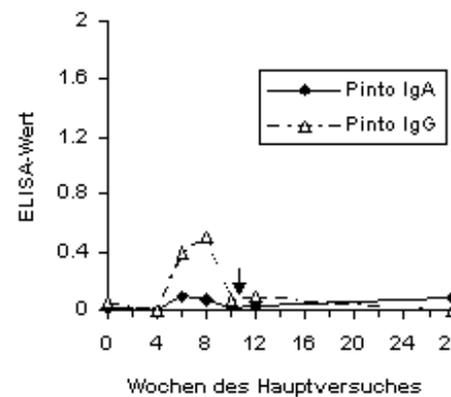
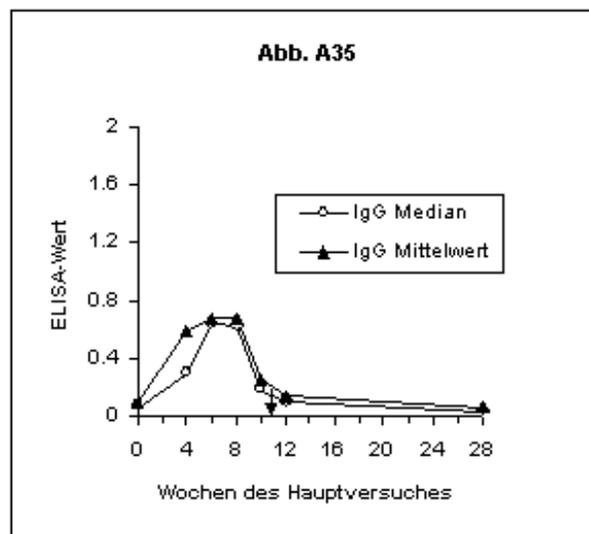
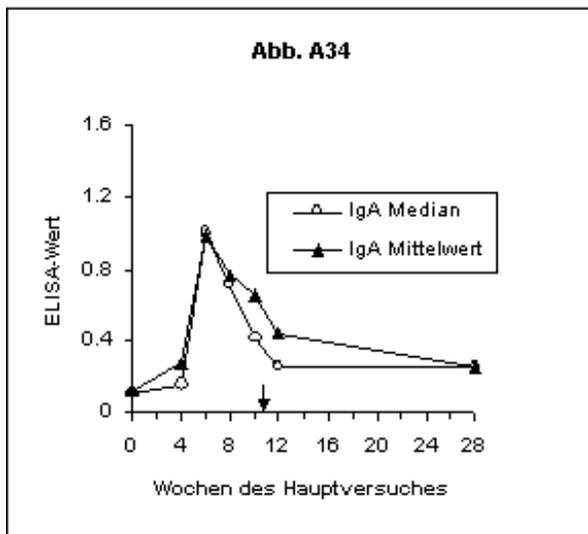
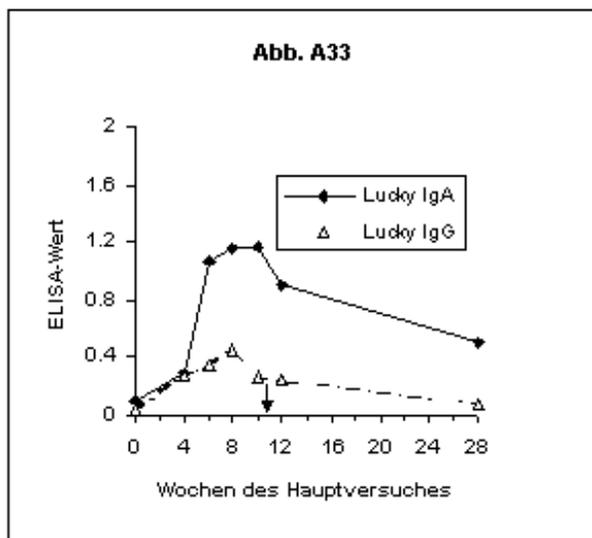
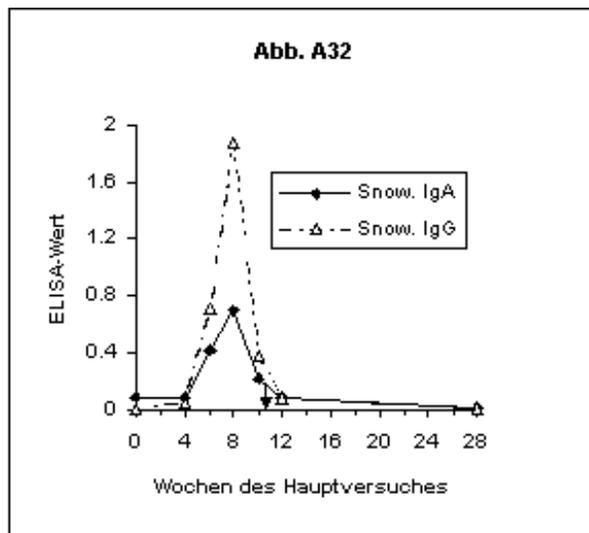
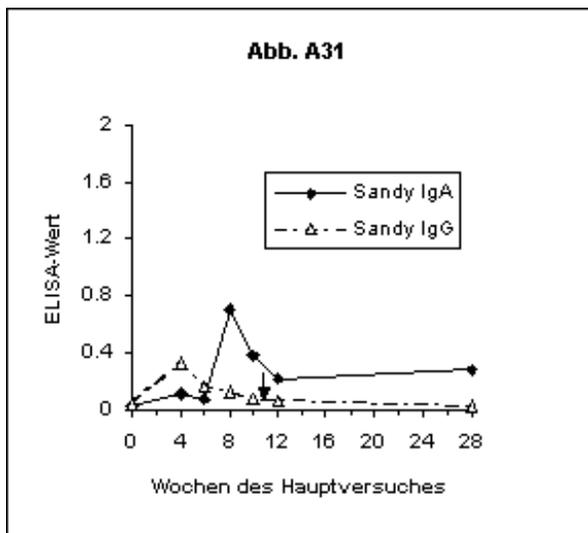


Abb. A30





= Experimentelle intranasale S. equi-Inokulation

Mittelwert der Positivkontrolle für IgA=1,25, für IgG=2,09.

Abb. 36: IgG-Aktivität in den Nasengangsspülproben

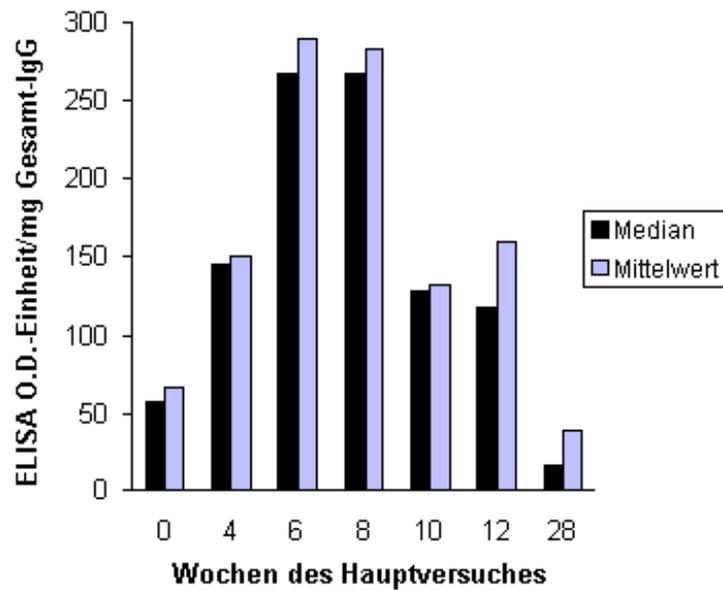
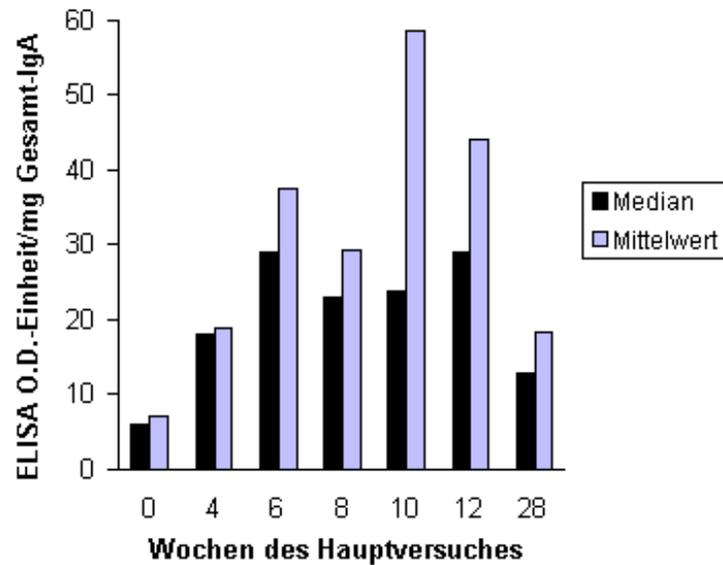


Abb. 37: IgA-Aktivität in den Nasengangsspülproben



11.2. Nährböden

Todd-Hewitt-Bouillon

Typische Zusammensetzung (g/l)

Fleischinfusion (aus 450g fettfreiem

Hackfleisch) 10,0

Caseinpepton 20,0

Glucose 2,0

Natriumbicarbonat 2,0

Natriumchlorid 2,0

Dinatriumhydrogenphosphat 0,4

pH $7,8 \pm 0,2$

Columbia-CNA-Selektivnährboden

Columbia-Agar-Basis

Typische Zusammensetzung (g/l)

Spezialpepton 23,0

Stärke 1,0

Natriumchlorid 5,0

Agar 10,0

pH $7,3 \pm 0,2$

Staphylococcen/Streptococcen-Selektiv-Supplement

Nalidixinsäure 7,5 mg

Colistin 5,0 mg

für 500ml Nährboden.

Caseinpepton-Sojamehlpepton-Agar (CASO-Agar)

Typische Zusammensetzung (g/l)

Pepton aus Casein (Trypton) 15,0

Pepton aus Sojamehl 5,0

Natriumchlorid 5,0

Agar-Agar 15,0

pH $7,3 \pm 0,1$

11.3. Lösungen und Puffer

11.3.1. Entnahme und Verarbeitung von Nasengangsspülproben

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2

3,89 g Na_2HPO_4

1,50 g NaH_2PO_4

29,60 g NaCl

ad 4 Liter Aqua bidest.

100% gesättigte Ammoniumsulfatlösung, pH 7,6

770 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ad 1 Liter Aqua bidest.

Mit 5 M HCl auf pH 7,6 einstellen.

11.3.2. Agarose-Gel-Elektrophorese

Tankpuffer (4x konzentriert), pH 8,5

Inhaltsverzeichnis

24,0 g Tris

115,2g Glycin

8,0 g SDS

ad 2 Liter Aqua bidest.

Probenpuffer (2x konzentriert), pH 6,8

2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

4,0 ml 10% SDS

2,0 ml Glycerin

1,0 mg Bromphenolblau

ad 10 ml Aqua bidest.

Extraktionspuffer, pH 8,0

7.88 g Tris-HCl

0.37 g EDTA

ad Liter Aqua bidest.

11.3.3. SDS-PAGE

10 %iges Trenngel (30 ml)

11,90 ml H₂O

10,00 ml **30% AA/BA** (29,2% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid)

7,50 ml **Trenngelpuffer** (1,5 M Tris, pH 8,8)

0,30 ml 10% SDS (Natrium-Dodecylsulfat)

0,30 ml 10% APS (Ammoniumpersulfat)

0.012 ml TEMED (Tetramethylethylendiamin)

30% Acrylamid/Bisacrylamid

146 g Acrylamid

4 g Bisacrylamid

ad 500 ml Aqua bidest.

Trenngelpuffer, pH 8,8

= 1,5 M Tris, pH 8,8

73,5 g Tris

22,5 g Tris-HCl

ad 500 ml Aqua bidest.

5 %iges Sammelgel (10ml)

6,80 ml H₂O

Inhaltsverzeichnis

1,70 ml 30% AA/BA

1,25 ml **Sammelgelpuffer** (0,5 M Tris, pH 6,8)

0,10 ml 10% SDS

0,10 ml 10% APS

0.01 ml TEMED

Sammelgelpuffer,

= 0,5 M Tris, pH 6,8

1,45 g Tris

37,80 g Tris-HCl

ad 500 ml Aqua bidest.

Tankpuffer (4x konzentriert), pH 8,5

s. 11.3.2.

Probenpuffer (2x konzentriert), pH 6,8

s. 11.3.2.

Remazolblau-gefärbter HMW-Marker

3 mg High Molecular Weight Standard Mixture (Sigma)

300 l 0.15 M NaCl

75 l 1 M Na₂HPO₄

75 l 1 %ige Remazolblau-Lösung in 10% SDS

11.3.4. Western-Blotting

Transferpuffer (25x konzentriert), pH 6,5

47,54 g NaH₂PO₄

22,14 g Na₂HPO₄

ad 1 Liter Aqua bidest.

0,05% PBS-Tween 20 (PBST), pH 7,2

2,0 l PBS (s. 11.3.1.)

1,0 ml Tween 20 (Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat)

Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7,2

(s. 11.3.1.)

Substratlösung

5 ml Methanol

5 mg 4-Chloro-1-Naphthol

25 ml PBS

30 l H₂O₂

11.3.5. ELISA

Beschichtungspuffer

= **0,06 M Carbonatpuffer, pH 9,2**

0,27 g Na₂CO₃

2,27 g NaHCO₃

ad 500 ml Aqua bidest.

Waschpuffer

= **0,05% PBST, pH 7,2**

(siehe 11.3.4.)

Blockierungspuffer

= **2% fettfreies Trockenmilchpulver in PBST**

2,0 g fettfreies Trockenmilchpulver

100 ml 0,05% PBST (s.11.3.4.)

Substratlösung

5 mg OPD

40 l 1 M HCl

10 l 30% H₂O₂

in 10 ml **Phosphat-Citrat-Puffer (pH 5)**

Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5,0

25,7 ml 0,2 M Na₂HPO₄

24,3 ml 0,1 M Zitronensäure

ad 100 ml Aqua bidest.

Lebenslauf

Name: Beatrice Theresia Nesch

Geburtsdatum: 27. Mai 1966

Geburtsort: Kingston, New York, USA

Eltern: Anton Nesch und Ingeborg Nesch, geb. Koch

1972-1976: Grundschule, Böblingen

1976-1985: Otto-Hahn-Gymnasium, Böblingen

1985-1987: Ausbildung zur Tierarzhelferin, Kleintierklinik Dr. C. J. Essig, Sindelfingen

1987-1993: Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

29. April 1993: Approbation als Tierärztin

Seit Sept. 1993: Arbeit an der Dissertation am Gluck Equine Research Center, Lexington, Kentucky, USA, bei Herrn Prof. Dr. J. F. Timoney

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. J. F. Timoney für die freundliche Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die fachliche Beratung und die Unterstützung dieser Dissertation bedanken.

Den Herren Proff. Dr. H. Keller und Dr. S. Grund danke ich für ihre Einsatzbereitschaft und ihre freundliche und konstruktive Kritik.

Mein Dank gilt weiterhin Frau K. Shepherd, die für das Wohlbefinden der Tiere sorgte und uns eine große Hilfe bei den Probennahmen war.

Herrn L. Ennis und seinen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Unterstützung und hervorragende Kooperation während des praktischen Teiles dieser Arbeit.

Frau L. Yu sei ganz herzlich für die Reinigung und Bereitstellung des S. equi M-Proteins gedankt.

Frau G. Hale danke ich für die große Hilfe bei der Literatursuche und Frau S. Leak für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Allen Mitarbeitern am Gluck Equine Research Center danke ich für die freundliche Aufnahme, vielseitige Unterstützung und gute Atmosphäre.

Zum Schluß möchte ich der Keeneland Association für die finanzielle Unterstützung des Forschungsprojektes danken.