

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego  
w Warszawie  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

lek. wet. Alicja Rakowska

„Postać płucna i pozapłucna  
rodokokozy źrebiąt  
w wybranych ośrodkach hodowlanych  
w obrazie klinicznym  
i ultrasonograficznym”

“Pulmonary and extrapulmonary rhodococcosis in foal  
in selected studs  
based on a clinical and ultrasonographic examination”

Praca doktorska  
Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem  
promotora dr hab. Lucjana Witkowskiego, prof. SGGW  
i promotora pomocniczego dr Andrzeja Bereznowskiego  
z Samodzielnego Zakładu Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej,  
Instytutu Medycyny Weterynaryjnej,  
Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2024



### Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data.....11.09.2024

Podpis promotora pracy.....L.Wiśniewski.....

### Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (Dz. U. Nr 90 poz. 631 z późn. zm.)

Oświadczam, że przedstawiona praca nie była wcześniej podstawą procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

Oświadczam, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną. Przyjmuję do wiadomości, że praca doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data.....11.09.2024

Podpis autora pracy.....Miła Polak.....



Badania zostały przeprowadzone dzięki wsparciu finansowemu pochodzącemu z dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Decyzja nr 9506/E-385/R/2018), dotacji Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (Decyzja nr 16/491568/SPUB/SP/2021) i Systemowi Wsparcia Finansowego dla Naukowców i Zespołów Badawczych Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie (Projekt nr S00134/2020).

Badania zostały przeprowadzone zgodnie z dyrektywą 2010/63/UE w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych oraz ustawą z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz.U. 2015 poz. 266).



*Pragnę serdecznie podziękować wszystkim bliskim mi osobom, które nieustajaco  
wspieraly powstanie tej pracy.*

*Dziękuję prof. dr hab. Jarosławowi Kabię za umożliwienie mi podjęcia się tego zadania,  
oraz całemu zespołowi Samodzielnego Zakładu Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
za wszelką współpracę, otwartość i życzliwość,  
a szczególnie prof. dr hab. Michałowi Czopowiczowi za nieocenioną pomoc merytoryczną.*

*Dziękuję również wszystkim pozostałym współautorom publikacji.*



## **Streszczenie**

### ***„Postać płucna i pozapłucna rodokokozy źrebiąt w wybranych ośrodkach hodowlanych w obrazie klinicznym i ultrasonograficznym”***

*Rhodococcus equi* jest szeroko rozpowszechnionym, oportunistycznym patogenem występującym w środowisku i organizmach wielu zwierząt, odpowiedzialnym głównie za poważne problemy zdrowotne u źrebiąt w wieku przedodsadzeniowym. Wywoływana przez niego rodokokoza jest obecna endemicznie w niektórych stadninach i zwykle klinicznie objawia się gorączką i dusznością, wskazującą na zapalenie płuc. Najczęściej choroba występuje jednak w formie podklinicznej, a niekiedy zdarzają się również jej postaci związane z innymi układami, tzw. pozapłucne. Diagnostyka terenowa opiera się obecnie na badaniu klinicznym i ultrasonograficznym płuc, a zalecane leczenie obejmuje tylko jedną uznaną kombinację leków przeciwbakteryjnych – połączenie makrolidu z ryfampicyną. Wciąż brakuje metod prewencji środowiskowej i skutecznej profilaktyki tej choroby.

Badania epidemiologiczne, przeprowadzone w Polsce centralno-wschodniej wykazały, że u 26% badanych źrebiąt występowały objawy oddechowe typowe dla płucnej formy rodokokozy, a u 70% wykryto w badaniu ultrasonograficznym zmiany w płucach. Pojawienie się i rozwój zmian, uwidocznionych podczas ultrasonografii płuc, było ściśle związane z wiekiem. Średnica ropnia przekraczająca 15 mm w badaniu ultrasonograficznym, zwiększona ilość płynu w jamie opłucnej i zapalne pogrubienie opłucnej były istotnie związane z występowaniem objawów klinicznych sugerujących postać płucną rodokokozy.

Rozpoznanie postaci pozapłucnej rodokokozy jest bardziej skomplikowane, często wiąże się z gorszym rokowaniem i zwykle potwierdzane jest w badaniu pośmiertnym. Czynniki predysponujące źrebięta do wystąpienia tej formy choroby nie są znane, a przebieg choroby może się znacznie różnić u poszczególnych osobników. Z tego powodu, w pracy doktorskiej opisano wybrane przypadki rodokokozy o nietypowym przebiegu.

Słowa kluczowe: *Rhodococcus equi*, zapalenie płuc, choroby źrebiąt, ultrasonografia płuc



## **Summary**

### ***“Pulmonary and extrapulmonary rhodococcosis in foal in selected studs based on a clinical and ultrasonographic examination ”***

*Rhodococcus equi* is a widespread, opportunistic environmental and mammal commensal pathogen, responsible mainly for major health concerns in pre-weaned foals. Rhodococcosis occurs endemically on some farms and usually manifests with fever and dyspnoea indicating pneumonia. Nevertheless, a subclinical course of the disease is the most common one and on the occasion, extrapulmonary disorders also occur. Field diagnosis is currently based on clinical examination and lung ultrasound (LUS) and recommended treatment compounds only one acknowledged combination of antimicrobials – macrolides with rifampicin. An environmental management strategy or effective prophylaxis method is still lacking.

The epidemiological study from central-eastern Poland showed that 26% of foals were affected with respiratory signs highly suggestive of pulmonary rhodococcosis, and 70% of the foals had subclinical abnormalities detected on LUS. The appearance and development of abnormalities detected during lung ultrasound were age-related. An abscess diameter exceeding 15 mm in LUS, an excessive amount of pleural fluid and signs of pleural inflammation were significantly linked with the occurrence of clinical signs suggestive of pulmonary rhodococcosis.

The diagnosis of an extrapulmonary form of the disease is more complicated, often connected with a worse prognosis and usually confirmed through necropsy. The factors predisposing foals to such disorders are unknown, and the course of the disease may vary significantly hence the decision to analyse and describe the most unusual cases.

Keywords: *Rhodococcus equi*, pneumonia, foals' diseases, lung ultrasound



## **Spis treści**

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską .....	15
<b>I. WSTĘP .....</b>	<b>16</b>
Chorobotwórczość <i>Rhodococcus equi</i> .....	17
Epidemiologia rodokokozy .....	18
Objawy kliniczne .....	19
Diagnostyka.....	20
Złoty standard .....	20
Diagnostyka kliniczna .....	21
Diagnostyka obrazowa .....	21
Interpretacja wyników badań ultrasonograficznych .....	22
Diagnostyka patomorfologiczna.....	23
Diagnostyka mikrobiologiczna .....	23
Wskaźniki hematologiczne .....	25
Leczenie.....	26
Mechanizmy odporności i immunoprofilaktyka .....	29
Immunizacja czynna.....	30
Immunizacja bierna.....	31
Podsumowanie.....	32
Piśmiennictwo .....	33
<b>II. CELE PRACY .....</b>	<b>43</b>
<b>III. OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ .....</b>	<b>44</b>
Omówienie ograniczeń związanych z terenowym charakterem badań.....	54
<b>IV. WNIOSKI .....</b>	<b>56</b>
Publikacje stanowiące rozprawę doktorską.....	58
Oświadczenie współautorów .....	98



## **Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską**

- 1) **Rakowska A**, Cywińska A, Witkowski L. Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. *Animals* (Basel). 2020 Oct 18;10(10):1910. doi: 10.3390/ani10101910.

(IF<sub>2020</sub>=2,75, punkty MNiSW<sub>2020</sub>= 100)

- 2) **Rakowska A**, Czopowicz M, Bereznowski A, Witkowski L. Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis. *Sci Rep.* 2023 Nov 8;13(1):19401. doi: 10.1038/s41598-023-46833-2.

(IF<sub>2023</sub>=4,997, punkty MNiSW<sub>2023</sub>= 140)

- 3) **Rakowska A**, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, Cywińska A, Żychska M, Witkowski L. Less Typical Courses of *Rhodococcus equi* Infections in Foals. *Vet Sci.* 2022 Oct 31;9(11):605. doi: 10.3390/vetsci9110605.

(IF<sub>2022</sub>=2,41, punkty MNiSW<sub>2022</sub>= 20)

Kopie powyższych publikacji wraz z oświadczeniami współautorów znajdują się w załączniu.

**Sumaryczny IF wynosi 10,157.**

**Sumaryczna punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego wynosi 260.**



## I. WSTĘP

Wywoływane przez *Rhodococcus equi* ropno-ziarniniakowe zapalenie płuc, znane jako rodokokoza, uznawane jest za jedną z głównych przyczyn upadków lub eutanazji źrebiąt do momentu ich odsadzenia (Giguère i wsp., 2011; Giguère & Cohen, 2018). Corocznie generuje to ogromne koszty związane z prewencją, diagnostyką, leczeniem oraz stratami hodowlanymi (Ainsworth i wsp., 1998). *R. equi* to saprofityczna bakteria, powszechnie występująca na całym świecie, zwłaszcza w glebie oraz przewodzie pokarmowym i kale zwierząt roślinożernych i wszystkożernych, zarówno hodowlanych jak i dzikich (Cohen i wsp., 2008; Hines, 2014; Prescott, 1991; Takai, 1997; Vázquez-Boland i wsp., 2013). Jest ona oportunistycznym, wewnętrzkomórkowym patogenem o potencjale zoonotycznym, lecz poza niewielkim odsetkiem osób z istotnie upośledzoną odpornością, nie stanowi poważnego problemu u ludzi (Lin i wsp., 2019; Prescott, 1991), stanowi natomiast nieustający problemem w ośrodkach hodowli koni, zwłaszcza tam, gdzie choroba występuje endemicznie (Giguère i wsp., 2011; Giguère & Prescott, 1997; Hines, 2014). Pomimo wieloletnich badań w wiodących ośrodkach uniwersyteckich, zajmujących się medycyną weterynaryjną, nie opracowano dotychczas skutecznych metod zapobiegania i leczenia rodokokozy.

### **Chorobotwórczość *Rhodococcus equi***

Za cechy chorobotwórczości *R. equi* uznaje się zdolność do wnikania, przeżycia i wewnętrzkomórkowej replikacji w makrofagach, szczególnie płucnych, i ich późniejszej degradacji, co makroskopowo najczęściej przejawia się ropno-ziarniniakowym zapaleniem płuc (Coulson i wsp., 2015; Hondalus & Mosser, 1994; Lührmann i wsp., 2004). Zdolność ta wynika z obecności odpowiadających za zdolność plazmidów, zawierających tzw. wyspy patogeniczności (ang. pathogenicity island, PAI), kodujących białka powierzchniowe, warunkujące wewnętrzkomórkowy charakter bakterii (Coulson i wsp., 2015). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, zdolność *R. equi* w stosunku do koni związana jest przede wszystkim z obecnością na plazmidzie specyficznego gatunkowo genu - *vapA*, kodującego odpowiadające mu białko VapA (ang. virulence associated protein A), związane ze zdolnością (Giguère, Hondalus, i wsp., 1999; Martens i wsp., 2000). Co więcej, częściowo za zdolność wydają się również odpowiadać niektóre geny w chromosomach, jakkolwiek badania na ten temat są jeszcze skąpe (Ren & Prescott, 2004; Vázquez-Boland i wsp., 2013; Witkowski i wsp., 2017). Rozwinięcie i sprawdzenie powyższej hipotezy umożliwiłoby bardziej precyzyjne ustalenie zależności regulujących współdziałanie zdolności *R. equi*, opartej o plazmid oraz chromosomalnej.

Genetyczna podatność niektórych koni na zachorowanie, mogąca częściowo tłumaczyć doniesienia o większym nasileniu problemu w niektórych liniach lub ośrodkach hodowlanych, również wydaje się prawdopodobna. Do tej pory nie udało się jednak jednoznacznie wskazać genów, które mogą mieć związek z częstszym występowaniem rodokokozy w konkretnych liniach lub rodzinach (Mcqueen i wsp., 2015).

### **Epidemiologia rodokokozy**

*R. equi* jest składnikiem mikrobioty przewodu pokarmowego zwierząt roślinożernych, w tym koni (Buntain i wsp., 2010), z czego wynika powszechność występowania bakterii w środowisku ich bytowania oraz wysokie ryzyko ekspozycji. Co więcej, koprofagia jest typowym sposobem nabywania prawidłowej mikrobioty jelitowej u zwierząt roślinożernych, a więc pierwszy kontakt źrebięcia z tym patogenem następuje bardzo wcześnie i jest nieunikniony, nawet w wypadku odizolowania klaczy w wysokiej ciąży w osobnej, higienicznej stajni porodowej. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy, do zakażenia, najprawdopodobniej drogą wziewną, dochodzi nawet w pierwszych godzinach życia, natomiast rozwój zmian w płucach oraz ewentualnych objawów klinicznych trwa zwykle od kilkunastu dni (Wada i wsp., 1997) do kilku tygodni (Cohen i wsp., 2013; Coleman i wsp., 2019; Giguère & Prescott, 1997; Horowitz i wsp., 2001). Czynniki warunkujące rozwój i formę choroby wciąż nie zostały precyzyjnie określone.

Występowanie rodokokozy, choć ogólnie powszechnie, charakteryzuje się dużą zmiennością sezonową (Chaffin i wsp., 2003; Coleman i wsp., 2019; Muscatello i wsp., 2006), zarówno pod względem liczby, jak i przebiegu zachorowań. Pomimo wielu logicznych hipotez dotyczących wpływu utrzymania koni na wystąpienie choroby, dotychczas nie udało się uzyskać spójnych i powtarzalnych wyników badań środowiskowych, a na ich podstawie ustalić konkretnych wytycznych higienicznych (Cohen i wsp., 2005; Giguère i wsp., 2011). Od wielu lat prowadzono badania nad wpływem środowiska przebywania źrebiąt (padok i/lub stajnia) (Muscatello i wsp., 2010) i zagęszczenia koni, utożsamiony ze wzrostem koncentracji bakterii w powietrzu (Chaffin i wsp., 2003; Cohen i wsp., 2005, 2008; Muscatello i wsp., 2006), czy stosowania wapna (próba podniesienia pH) lub kompostowania obornika końskiego (próba podniesienia temperatury) (Hébert i wsp., 2010; Huber, Giguère, Berghaus, i wsp., 2018) w celu zmniejszenia koncentracji patogenu w środowisku. Co ciekawe, według niektórych danych obecność i koncentracja zjadliwych szczepów *R. equi* w podłożu niekoniecznie przekłada się bezpośrednio na wystąpienie choroby, liczbę chorych osobników czy przebieg zachorowań (Cohen i wsp., 2008; Martens i wsp., 2000; Muscatello i wsp., 2006). U źrebiąt, wraz z wydychanym powietrzem, obserwowano wydalanie zbliżonych ilości

zjadliwych szczepów bakterii przez osobniki klinicznie chore oraz zdrowe (Muscatello i wsp., 2009). W tym samym badaniu, aż 86% zdrowych klinicznie źrebiąt, bez zmian podklinicznych w płucach, wydalało zjadliwe szczepy *R.equi* z wydychanym powietrzem, natomiast w grupie źrebiąt wykazującej kliniczne objawy rodokokozy procent ten był o wiele niższy (65%). Inne badanie wykazało natomiast istotny wzrost wydalania zjadliwych szczepów wraz z kałem zarówno przez chore źrebięta, jak i ich matki, po eksperymentalnym zakażeniu przeprowadzonym w pierwszych 3 tygodniach życia źrebiąt (Huber, Giguère, Berghaus, i wsp., 2018). Klacze, których źrebięta ulegały późniejszemu zakażeniu, nie wydalały natomiast większych ilości zjadliwych szczepów bakterii w czasie porodu i pierwszego tygodnia życia źrebiąt, co można byłoby uznawać za potencjalną przyczynę zakażenia (Grimm i wsp., 2007).

Pojedyncze doniesienia wskazują na pewne powiązanie między zachorowalnością a miesiącem urodzenia źrebięcia i dotyczą zwiększonej koncentracja zjadliwych szczepów *R.equi* w podłożu (Takai i wsp., 1986) oraz w płynie tchawiczo-oskrzelowym (Takai i wsp., 2022). Obserwacje te pochodzą jednak z Japonii, gdzie dużą popularnością cieszą się wyścigi konne i hodowla koni pełnej krwi, które w związku ze specyfiką sezonu wyścigowego przychodzą na świat głównie wcześniejszą wiosną, w celu maksymalnego wyrównania wzrostu i tym samym szans na początku kariery. Podobne obserwacje, również związane ze specyfiką hodowli koni pełnej krwi pochodzą z Australii (Muscatello i wsp., 2006), natomiast zależności tych nie potwierdzają prace z USA, skupiające się na koniach rasy American Quarter Horse (AQH) (Coleman i wsp., 2019). Związek pomiędzy porą roku, wzrostem temperatur i zapaleniem oraz liczbą źrebiąt wykazujących objawy kliniczne wciąż nie jest jasny, ale stanowi obowiązujące wyjaśnienie licznych zachorowań w wielu praktykach terenowych, pomimo istnienia dowodów naukowych tłumaczących tę zbieżność kumulację wyzrebień oraz długim okresem inkubacji (Horowitz i wsp., 2001; Muscatello, 2012a; Muscatello i wsp., 2006).

### **Objawy kliniczne**

Do najczęściej obserwowanych objawów klinicznych rodokokozy należy gorączka, apatia, przyspieszenie oddechów, duszność i osłabienie apetytu. Patologiczne szmery oddechowe, kaszel oraz wypływy z noszdrzy, spowolnienie przyrostów i wyniszczenie występują rzadziej (Giguère & Prescott, 1997). Choroba może mieć przebieg ostry, który często kończy się śmiercią w ciągu kilkunastu do kilkudziesięciu godzin od wystąpienia objawów klinicznych, lub przewlekły, mogący trwać nawet kilka do kilkunastu tygodni. Dotychczas, najwięcej badań dotyczących występowania choroby pochodzi z dużych ośrodków hodowlanych w USA, w których choroba występuje endemicznie. Objawy pojawiają się tam u 10-20% źrebiąt z ośrodków, natomiast w przypadku

monitoringu radiologicznego zmiany w płucach dotyczą zwykle ok. 30-60% osobników badanych (Giguère i wsp., 2011; Huber, Gressler, i wsp., 2018; Venner i wsp., 2012, 2013).

Poza zapaleniem płuc, zmiany mogą dotyczyć także innych układów (ang. extrapulmonary disorders, EPD) (Le Corre i wsp., 2021; Reuss i wsp., 2009). Najczęściej obserwowane są objawy związane z przewodem pokarmowym. tj. biegunka lub objawy morzyskowe (Reuss i wsp., 2011). Rzadziej obserwowane są objawy zapalenia stawów i kości (Morresey i wsp., 2011), zmiany dotyczące struktur oka (Tarancón i wsp., 2019), ropnie podskórne oraz ropnie węzłów chłonnych (Giguère & Prescott, 1997). Pomimo ogólnej świadomości występowania atypowego przebiegu rodokokozy, szczegółowe opisy objawów klinicznych i patomorfologicznych wciąż pozostają nieliczne. Ponadto ustalenie częstości występowania tej formy choroby pozostaje wyzwaniem, gdyż jest ona zdecydowanie trudniejsza do zdiagnozowania i z dużym prawdopodobieństwem może być częściowo pomijana w statystykach, zwłaszcza pochodzących z ośrodków, w których nie prowadzi się rutynowo diagnostyki sekcyjnej padłych źrebiąt (Reuss i wsp., 2009). Objawy wykraczające poza typowe dla zapalenia płuc, wiążące są również ze zdecydowanie gorszym rokowaniem (Cohen, 2014; Giguère i wsp., 2011; Reuss i wsp., 2009; Venner i wsp., 2012).

## Diagnostyka

### Złoty standard

Opracowane dwie dekady temu rekomendacje *American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM)*, ze względu na brak nowszej alternatywy, wciąż są uznawane za złoty standard w diagnostyce rodokokozy źrebiąt.

Podstawą rozpoznania choroby jest wykrycie w badaniu mikrobiologicznym zjadliwego w stosunku do koni szczepu bakterii w materiale z dolnych dróg oddechowych (popłuczyn tchawiczo-oskrzelowych) metodą hodowlaną i/lub molekularną (PCR): A) u źrebiąt wykazujących objawy kliniczne ze strony dolnych dróg oddechowych, B) u źrebiąt z bakteryjnym zapaleniem dróg oddechowych w obrazie cytologicznym, lub C) z potwierdzonym diagnostyką obrazową zapaleniem płuc i oskrzeli (Giguère i wsp., 2011).

Obecnie, hodowla mikrobiologiczna lub molekularne potwierdzenie zakażenia straciły na znaczeniu w związku z powszechnym występowaniem zmian ropnych w płucach u źrebiąt, a hodowla mikrobiologiczna *R. equi* służy przede wszystkim określeniu lekooporności danego szczepu (Higgins & Huber, 2023).

## **Diagnostyka kliniczna**

W ostatnich dekadach wielokrotnie analizowano i udoskonalano wiele różnych metod diagnozowania rodokokozy. Pomimo wprowadzania nowych technologii i narzędzi, nadal nieodzowne pozostaje regularne badanie kliniczne. Jedną z najstarszych i najprostszych metod diagnostycznych jest cykliczny pomiar temperatury wewnętrznej ciała, prowadzony u źrebiąt w wieku przedodsadzeniowym w wielu ośrodkach hodowlanych. Badanie to, choć nieswoiste, stanowi doskonałe narzędzie do monitorowania stanu źrebiąt w pierwszych miesiącach życia, nie tylko w zakresie wystąpienia rodokokozy. Niestety, wyniki pomiaru temperatury wewnętrznej czy tępna wymagają interpretacji podpartej odpowiednim doświadczeniem klinicznym, gdyż parametry fizjologiczne osobników młodocianych są szczególnie podatne na wpływ warunków środowiskowych (np. wysoka temperatura otoczenia), jak i na wysiłek fizyczny, czy stres związany z unieruchomieniem źrebięcia do badania (Huber, Giguère, Berghaus, i wsp., 2018).

Kolejnym sposobem kontroli stanu zdrowia źrebiąt jest osłuchiwanie klatki piersiowej w celu wykrycia ewentualnych szmerów oddechowych, wskazujących na rozwijające się zapalenie płuc. Jakkolwiek przydatne i zasadne jest stosowanie osłuchiwanego, w wielu przypadkach zmiany szmerów oddechowych są już związane z wystąpieniem zaawansowanej, klinicznej postaci choroby i równoznaczne z bardzo poważnymi zmianami wewnętrz klatki piersiowej. Niejednokrotnie zdarzają się źrebięta chore podklinicznie, posiadające duże zmiany ropne w płucach, zdiagnozowane metodami obrazowymi, nie odbiegające w badaniu klinicznym od źrebiąt zdrowych (Giguère & Prescott, 1997). Użycie dodatkowych metod diagnostycznych, w tym obrazowych lub laboratoryjnych, zdecydowanie zwiększa trafność rozpoznania, ale ze względu na specyfikę tej choroby i wysokie ryzyko zachorowania źrebiąt w ośrodkach endemicznych, już samo badanie kliniczne może okazać się niezwykle istotne.

## **Diagnostyka obrazowa**

Przy podejrzeniu zapalenia płuc, wynikającym z uważnej obserwacji oraz badania klinicznego, do niedawna zalecane było badanie radiograficzne klatki piersiowej. Pomimo uznanej skuteczności wykrywania zmian patologicznych dolnych dróg oddechowych (Bedenice, Heuwieser, Brawer, i wsp., 2003; Bedenice, Heuwieser, Solano, i wsp., 2003; Giguère & Roberts, 2012), badanie to zostało obecnie wyparte przez badanie ultrasonograficzne, ze względu na łatwość i szybkość wykonania oraz możliwość regularnego jego powtarzania (McCracken, 2015; McCracken & Slovis, 2009; Ramirez i wsp., 2004; Venner i wsp., 2007). Badanie to cechuje się bardzo wysoką czułością diagnostyczną, dochodzącą według niektórych autorów nawet do 95% (Huber, Giguère, Berghaus,

i wsp., 2018). Niewątpliwym atutem ultrasonografii jest jej powszechna dostępność w praktyce hipiatrycznej, niezależnie od ścieżki specjalizacji oraz fakt, że podstawowe badanie można przeprowadzić za pomocą dowolnej sondy, a jego interpretacja jest stosunkowo prosta. Największą wadę tej metody diagnostycznej stanowi brak penetracji fal ultradźwiękowych w głąb powietrznej tkanki płucnej, jednak w przypadku typowych dla rodokokozy zmian umiejscowionych peryferyjne, na obrzeżach płatów płuc, nie powoduje to istotnego zmniejszenia trafności badania (McCracken & Slovis, 2009; Ramirez i wsp., 2004). Ponadto badanie ultrasonograficzne płuc może ujawnić zmiany niewidoczne w obrazie rentgenowskim, w tym nawet te o średnicy ok. 1 mm (Ramirez i wsp., 2004). Ultrasonografia może być również pomocna w wykrywaniu zmian zlokalizowanych poza układem oddechowym (ang. Extrapulmonary Disorders, EPD), w tym ropni w jamie brzusznej czy zagałkowych, których zobrazowanie niestety zwykle pogarsza rokowania pacjenta (Reuss, 2021; Reuss i wsp., 2011; Ruocco i wsp., 2020).

### **Interpretacja wyników badań ultrasonograficznych**

W badaniu ultrasonograficznym opłucna powinna stanowić cienką, jednolitą i wyraźnie hiperechogeniczną linię, poniżej której znajdują się tylko jej wielokrotne powtórzenia, stanowiąc artefakty wynikające z odbicia fali ultradźwiękowej przez powietrze, tzw. linie A. Poszerzona lub rozmyta linia opłucnej świadczy o rozwijającym się procesie chorobowym. Możliwe jest również zaobserwowanie niewielkich zmian ogniskowych, wynikających np. z napływu komórek zapalnych i obecności płynu w postaci tzw. linii B (Ramirez i wsp., 2004). Ich obecność wskazuje na proces patologiczny, toczący się w obszarze podopłucnowym, ale nie jest swoista dla rodokokozy. Obraz ultrasonograficzny, związany z obecnością mnogich linii B, jest najbardziej charakterystyczny dla śródmiąższowego zapalenia płuc, które zwykle wynika z zakażenia innymi niż *Rhodococcus* rodzajami bakterii (Punsmann i wsp., 2021). Większe zmiany ogniskowe zwykle obrazowane są jako drobne, hipoechogeniczne, owalne twory znajdujące się bezpośrednio pod linią opłucnej. Płyn w jamie opłucnej jest możliwy do zaobserwowania bezpośrednio pomiędzy dwoma listkami opłucnej, zwykle jako hipoechogeniczna linia, świadcząca o obecności wysięku. Ropnie widoczne są zwykle jako wyraźnie ograniczone, hipoechogeniczne zmiany o zróżnicowanym kształcie i średnicy. W wyniku procesu zapalnego może dochodzić także do powstawania punktowych, nieuformowanych zmian zapalnych i zwłóknieniowych, w których tkanka płuc wręcz przypomina w obrazie ultrasonograficznym tkankę wątroby (Ramirez i wsp., 2004).

### **Diagnostyka patomorfologiczna**

W przypadku choroby o dużej śmiertelności, jaką jest rodokokoza, diagnostyka sekcyjna wciąż jest nieodzowną metodą jej ostatecznego potwierdzenia. Pozwala ona na pełną weryfikację rozpoznania, zarówno obrazu uzyskanego w badaniu ultrasonograficznym, jak i pobranie materiału do hodowli mikrobiologicznej, uwzględniającej wykonanie antybiogramu. W badaniu sekcyjnym w płucach stwierdza się typowe, otorbione zmiany ropne, najczęściej zlokalizowane podopłucnowo (Ramirez i wsp., 2004), zwłaszcza w płatach doczaszkowych (Venner i wsp., 2014). Zmiany mogą występować pojedynczo lub być bardzo liczne, a ich wielkość może być bardzo zróżnicowana. Zazwyczaj ropnie mają od kilku mm do kilkunastu cm średnicy. W bardziej zaawansowanych przypadkach, stwierdzane są często cechy obrzęku płuc oraz zwiększoną ilość płynu w jamie opłucnej. Należy zaznaczyć, że diagnostyka sekcyjna wciąż jest zdecydowanie najbardziej skuteczną metodą rozpoznawania tzw. „zmian pozapłucnych”, zlokalizowanych poza układem oddechowym (Reuss, 2016; Reuss i wsp., 2009). Zapalenie błony śluzowej i ropnie śródściennie jelit, jak i węzłów chłonnych krezkowych, są często nieuchwytnie w badaniu ultrasonograficznym ze względu na jednaczesne zgazowanie żołądka i jelit (Reuss i wsp., 2009). Czynnik etiologiczny ropni zagałkowych czy septycznego zapalenia stawów jest często możliwy do stwierdzenia dopiero po pobraniu materiału sekcyjnego – wymazu z ropnia lub wycinka błony maziowej ze zmienionego stawu, który częściej daje obiektywny wynik niż materiał pobrany w trakcie punkcji stawu, niejednokrotnie dającej wynik fałszywie ujemny (Reuss i wsp., 2009, Giguère i wsp., 2011; Reuss i wsp., 2009).

### **Diagnostyka mikrobiologiczna**

Pomimo wątpliwości dotyczących tej metody, za złoty standard potwierdzający zakażenie *R. equi* wciąż uznaje się dodatni wynik badania PCR i/lub hodowli mikrobiologicznej próbek aspiratu z dolnych dróg oddechowych (ang. tracheo-bronchial aspirate, TBA) (Giguère i wsp., 2011). Zdecydowaną zaletą przeprowadzenia badania mikrobiologicznego jest możliwość oceny lekooporności wyizolowanych szczepów. Dane dotyczące skuteczności potwierdzenia zakażenia *R. equi*, w tym zakażenia mieszanego, znacznie różnią się w zależności od publikacji. W niektórych doniesieniach obecność zakażenia *R. equi*, w tym zakażenia mieszanego, udało się potwierdzić w zaledwie ok. 42% przypadków żrebiąt wykazujących objawy ze strony układu oddechowego. Sama efektywność hodowli mikrobiologicznej na podstawie materiału z TBA oceniona została na podstawie wcześniejszych danych literaturowych w powyższym doświadczeniu na 86% w odniesieniu do materiału sekcyjnego, co stanowi stosunkowo satysfakcjonujący wynik (Leclere i wsp., 2011). W innej publikacji, dodatni wynik hodowli mikrobiologicznej uzyskano w 64% próbek

z TBA w stosunku do próbek pobranych sekcyjnie od tych samych źrebiąt oraz analogicznie dodatni wynik w 64% badań materiału z TBA pobranego od źrebiąt ze zmianami w płucach potwierdzonymi radiologicznie (Hillidge, 1987). W kolejnych badaniach, zaledwie 20% źrebiąt ze stwierdzonymi za pomocą ultrasonografii zmianami w płucach oraz objawami zapalenia płuc miało dodatni wynik hodowli mikrobiologicznej (Arnold-Lehna i wsp., 2019). Ten sam zespół, w swojej innej pracy, odwołał się do 39-54% dodatnich wyników hodowli mikrobiologicznej materiału z TBA od źrebiąt wykazujących objawy zapalenia płuc w trakcie monitoringu ultrasonograficznego, pochodzących z wcześniejszych badań (Wetzig i wsp., 2019). Powyższa praca zawiera również informację o 100% dodatnich wyników hodowli mikrobiologicznej z materiału sekcyjnego od źrebiąt padłych z podobnymi objawami. Niemniej, znane są również doniesienia, w których hodowla materiału z TBA była w 100% zgodna z wynikami hodowli materiału pobranego sekcyjnie (Lavoie i wsp., 1994).

Niestety, badanie uznawane za złoty standard w przypadku potwierdzenia zakażenia *R. equi* nie sprawdza się w przypadku monitorowania stanu źrebiąt przed wystąpieniem objawów ani do kontroli samoistnego ustępowania ropni czy postępów leczenia. Zwykle wprowadzenie endoskopu lub zgłębnika nosowo-żołądkowego w celu pobrania materiału jest stosunkowo stresogenne dla źrebięcia, oraz wymaga dużego zaangażowania ze strony pracowników stajni lub zastosowania leków uspokajających, których podanie, szczególnie wielokrotne, nie jest obojętne dla młodego organizmu ani bezpieczne, zwłaszcza w przypadkach osobników z wyraźnymi objawami ze strony układu oddechowego. Ponadto, wyniki tego badania również mogą być mylące, ponieważ możliwe jest wystąpienie zarówno wyników fałszywie dodatnich, związanych głównie z wysokim ryzykiem zanieczyszczenia środowiskowego, jak i fałszywie ujemnych, powodowanych niewielką liczbą bakterii w płynie oskrzelowym, co wynika m.in. z wewnętrzkomórkowym charakterem patogenu. Prostszą wersją pozyskania materiału wydawałyby się wymazy z jamy nosowej lub odbytnicy, ale żadne badania nie wykazały ich przydatności diagnostycznej (Giguère i wsp., 2011; Huber, Giguère, Berghaus, i wsp., 2018). Wirulentne szczepy bakterii były wykrywane w powietrzu wydychanym przez zdrowe źrebięta (Muscatello i wsp., 2009), a sama bakteria może być wyhodowana z popłuczyn tchawiczo-oskrzelowych pobranych od zdrowych klinicznie źrebiąt, co potwierdzono w 35% przypadków (Ardans i wsp., 1987), a niekiedy i dorosłych koni (Gressler i wsp., 2018).

Poza *R. equi*, najczęściej wykrywane w próbkach TBA rodzaje bakterii to *Streptococcus* spp. (52% zakażeń mieszanych, 83% zakażeń w których nie wykryto obecności *R. equi*) i *Actinobacillus* (odpowiednio 32% i 59%); oba uznawane za czynniki powszechnie powodujące

stany zapalne dolnych dróg oddechowych u koni, a zwłaszcza źrebiąt, a także *Escherichia* (po 20%), bakterie z grupy beztlenowców (odpowiednio 19% i 11%) i *Pasteurella* (odpowiednio 19% i 5%) (Leclere i wsp., 2011). Jako czynnik etiologiczny zapalenia płuc wykrywane były także bakterie z rodzajów *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* i *Bordetella* (Leclere i wsp., 2011). Wyniki te wskazują na fakt, że w znacznej części przypadków domniemanej rodokokozy, zapalenie płuc może mieć charakter polietiologiczny lub, niekiedy, być wywołane przez inne czynniki zakaźne. Powinno to zachęcać do weryfikacji leczenia, a zwłaszcza antybiotykoterapii, szczególnie, że nawet 45% rodzajów bakterii wyizolowanych w przypadkach polietiologicznych zapaleń płuc może być oporna na chemioterapeutyki przeciwbakteryjne standardowo stosowane w leczeniu rodokokozy. Potwierdza to istotność prowadzenia hodowli mikrobiologicznej i wykonywania antybiogramu oraz, być może, częściowo tłumaczy niepowodzenia części terapii terenowych (Leclere i wsp., 2011). Z drugiej strony, rodzaj i sposób pobrania materiału do badań mikrobiologicznych nie wyklucza również kontaminacji środowiskowej oraz uzyskania wyników fałszywie dodatnich. Pomimo występowania przypadków zakażeń mieszanych wśród źrebiąt z dodatnim wynikiem badania mikrobiologicznego w kierunku *R. equi* (65% wg Leclere i wsp., 2011), autorzy nie wiążą ich wystąpienia z potencjalnym pogorszeniem obrazu klinicznego lub rokowania. Bardzo istotną w praktyce obserwacją niektórych lekarzy hipiatrów jest również fakt, że wraz z wiekiem źrebięcia spada prawdopodobieństwo potwierdzenia u niego zakażenia *R. equi*, a rośnie prawdopodobieństwo wystąpienia zapalenia płuc na innym tle, zwłaszcza *Streptococcus* spp. (Leclere i wsp., 2011; Ramirez i wsp., 2004).

### **Wskaźniki hematologiczne**

Ostatnią z grup testów diagnostycznych i służących do monitorowania choroby stanowią badania hematologiczne. W dotychczasowych badaniach uwzględniane były głównie parametry stosowane rutynowo do określania stanu zapalnego u dorosłych koni (Crisman i wsp., 2008; Westerman i wsp., 2015; Zabrecky i wsp., 2015) lub u noworodków innych gatunków zwierząt i ludzi (Cantey & Lee, 2021; Eschborn & Weitkamp, 2019; Tan i wsp., 2019). Niestety, do tej pory nie udało się wskazać testów, których wyniki wyróżniałyby rodokokozę na tle innych chorób. Zakażenie bakteryjne typowo związane jest z przejściową leukocytozą, natomiast nie udało się precyzyjnie określić powiązania jej nasilenia, czasu pojawiienia się oraz utrzymania we krwi źrebiąt z momentem wystąpienia, intensywnością czy długością trwania objawów klinicznych (Coleman i wsp., 2019; Giguère i wsp., 2003; Martens i wsp., 2002). Pomimo zadowalającej czułości w wykrywaniu stanu zapalnego w organizmie źrebięcia, leukocytoza jest objawem na tyle nieswoistym, że nie została uznana za cechę różnicującą chore źrebięta w powszechniej praktyce terenowej. Podobnie, niewielkie

znaczenie diagnostyczne mają zmiany stężeń białek ostrej fazy (ang. Acute Phase Proteins, APPs), których nazwa wynika ze znacznego i szybkiego pojawienia się lub wzrostu ich stężenia w ostrej fazie zapalenia, w tym wynikającej z zakażenia czy urazu. W badaniach dotyczących diagnostyki rodokokozy znalazły się pomiary stężeń m.in. fibrynogenu, haptoglobiny (Hp), prokalcytoniny oraz surowiczego amyloidu A (ang. Serum Amyloid A, SAA) (Barton i wsp., 2016; Cohen i wsp., 2010; Giguère i wsp., 2016; McCracken, 2015; Passamonti i wsp., 2015; Westerman i wsp., 2015). Nadzieje wiązano zwłaszcza z SAA, który jest głównym białkiem ostrej fazy u koni. U zdrowych osobników SAA zwykle jest niewykrywalny, ale w ostrej fazie zapalenia jego stężenie znaczaco wzrasta. Niestety, parametr nie został uznany za użyteczny, gdyż jego stężenia u źrebiąt z rodokokozą były bardzo zróżnicowane, od niewykrywalnych do wysokich. Fibrynogen z kolei jest wykrywany u wszystkich zdrowych koni i nie określono stężenia wskazującego na zapalenie płuc (Giguère i wsp., 2016; Leclerc i wsp., 2011; Passamonti i wsp., 2015).

## Leczenie

Jedną z głównych przyczyn strat ekonomicznych w przypadku stadnin, w których rodokokoza występuje endemicznie, jest rodzaj i długość trwania leczenia. Wewnętrzkomórkowy charakter patogenu oraz tendencja do tworzenia otorbionych ropni powoduje znaczne zawężenie możliwości wyboru skutecznych chemioterapeutyków. Od wielu lat, w leczeniu rodokokozy rekomendowane jest zastosowanie ryfampicyny oraz antybiotyków z grupy makrolidów (Giguère i wsp., 2004; Hillidge, 1987; Venner i wsp., 2007, 2009). Początkowo stosowana kombinacja preparatów zawierała dostępną ówcześnie erytromycynę (Hillidge, 1987; Sweeney i wsp., 1987), od której obecnie odchodzi się ze względu na jej mniej stabilną strukturę chemiczną, gorszą biodostępność, niższą koncentrację w tkankach (Suarez-Mier i wsp., 2007) oraz działania niepożądane (Gustafsson i wsp., 1997; Stratton-Phelps i wsp., 2000). Dziś, w terapii rodokokozy, wykorzystuje się głównie klarytromycynę lub azytromycynę (podawane doustnie), albo tulatromycynę (w postaci iniekcji domiesniowych). Skuteczność tej ostatniej wydaje się satysfakcjonująca przynajmniej w przypadku leczenia średniozaawansowanych zmian, a jej zastosowanie jest bardzo wygodne ze względu na jednokrotne podawanie w tygodniowych odstępach (Rutenberg i wsp., 2017; Venner i wsp., 2007). Niekorzystnym efektem stosowania makrolidów iniecyjnych jest jednak stosunkowo częste tworzenie się odczynów w miejscu podania leku (Venner i wsp., 2007).

Niestety, w przypadku tulatromycyny, jej stężenie w płucach maleje w wyniku zastosowania rekomendowanej kombinacji z ryfampicyną (Venner i wsp., 2010), jednak nie jest to wykluczone

również w przypadku innych antybiotyków z tej grupy. Istnieją doniesienia sugerujące porównywalnie zadawalające efekty leczenia antybiotykiem z grupy makrolidów jako monoterapii, jak i jego połączeniem z ryfampicyną (Giguère i wsp., 2011), lecz rozwiązanie to uważane jest za sprzyjające rozwojowi antybiotykoodporności (Muscatello, 2012b). Z powyższego względu rekomendowana pozostaje kombinacja dwóch antybiotyków w celu zredukowania przyrostu liczby przypadków lekooporności (Erol i wsp., 2021).

Do tej pory nie udało się ustalić alternatywnego, skutecznego schematu leczenia w sytuacji wystąpienia lekooporności na powyższe terapeutyczne (Vázquez-Boland i wsp., 2013). W badaniach rozważano m.in. zastosowanie makrolidów w połączeniu z doksycykliną, głównie ze względu na wprowadzone w niektórych krajach ograniczenia w podawaniu ryfampicyny, wynikające z jej wykorzystania w leczeniu gruźlicy u ludzi. Sprawdzana do tej pory kombinacja azytromycyny z doksycykliną okazała się mieć zbliżoną skuteczność w porównaniu z ryfampicyną, jednakże mogło to wynikać ze średniego zaawansowania zmian i objawów uwzględnianych w badaniu żrebiąt. Należy również wziąć pod uwagę, że u 73% żrebiąt z grupy kontrolnej, u których w tym badaniu nie stosowano antybiotykoterapii, w obrazie ultrasonograficznym stwierdzono samoistne ustępowanie ropni (Wetzig i wsp., 2019).

Kolejną alternatywą, braną pod rozwagę, było wykorzystanie gentamicyny, w tym gentamicyny liposomalnej. Wykazuje ona bardzo obiecujące działanie *in vitro*, skuteczniejsze niż powszechnie stosowane leki, a wynikające z wysokiej zdolności do penetracji makrofagów płucnych. Wykazuje ona jednak typowe dla gentamicyny działanie nefrotoksyczne, które pojawia się już w pierwszych dniach jej stosowania, podobnie jak w przypadku jej standardowej formuły. Biorąc pod uwagę, iż rekomendowany czas trwania leczenia w przypadku rodokokozy wynosi min. 3 – 4 tygodnie, jej zastosowanie obecnie nie jest możliwe, zwłaszcza że charakterystyczne dla tej choroby objawy (gorączka, biegunka czy brak apetytu), jak też częsta konieczność zastosowania niesteroidowych leków przeciwwzapalnych (NLPZ), mogą nasilać jej działanie nefrotoksyczne. Z drugiej jednak strony, jej wykorzystanie w przyszłości nie jest wykluczone, gdyż koncentracja gentamicyny w płynie oskrzelowo-pęcherzykowym utrzymuje się powyżej MIC dłużej niż 48 h, a więc odpowiednia modyfikacja dawki i częstotliwości podania może okazać się jednocześnie skuteczna i bezpieczna. Niewykluczone jest też opracowanie innej drogi podania tego antybiotyku, np. w nebulizacji, co również może znaczco ograniczyć jej toksyczność (Cohen i wsp., 2016).

Niezwyczajnym problemem, dotyczącym skutecznego leczenia rodokokozy, jest precyzyjne ustalenie momentu rozpoczęcia leczenia antybiotykowego oraz optymalny czas jego trwania. Wprowadzenie rutynowego monitoringu ultrasonograficznego znaczco ułatwiło i przyspieszyło diagnostykę, zwłaszcza terenową. Niestety, w niektórych ośrodkach hodowlanych,

wykrycie zmian w płucach źrebiąt szybko stało się podstawą do wprowadzania tzw. antybiotykoterapii profilaktycznej, przed wystąpieniem jakichkolwiek objawów klinicznych, czyli u zwierząt z podklinicznym przebiegiem choroby (McCracken & Slovis, 2009; Venner i wsp., 2007, 2009, 2012, 2013). O ile działania takie wg niektórych autorów przyczyniły się do znacznej lub nawet całkowitej redukcji upadków wśród źrebiąt, w przypadku specyfiki przebiegu rodokokozy okazały się być one, jeśli nie błędem, to przynajmniej lekkomyślnością w wykorzystaniu leków przeciwbakteryjnych, znacząco zwiększaając ryzyko narastania lekooporności (Burton i wsp., 2013; Cauchard i wsp., 2013; Giguère i wsp., 2011). Narastająca oporność bakterii jest problemem szczególnie szeroko opisywanym w Stanach Zjednoczonych, które również jako jedne z pierwszych wprowadziły leczenie antybiotykowe przypadków podklinicznych na masową skalę (Huber, Giguère, Slovis, i wsp., 2018). Kolejnym narastającym zagrożeniem stało się również izolowanie wieloopornych szczepów *R. equi* (Vázquez-Boland i wsp., 2024).

Zgodnie z danymi epidemiologicznymi, pomimo wystąpienia zmian płucnych u większości źrebiąt w predysponowanym wieku, znaczna część z nich nigdy nie wykazuje objawów klinicznych choroby, a zmiany ustępują u nich w sposób samoistny (Cauchard i wsp., 2013; Giguère i wsp., 2011; Venner i wsp., 2012, 2013). Nie zachodzi więc bezwzględna konieczność stosowania antybiotykoterapii u wszystkich źrebiąt z uchwytnymi zmianami ultrasonograficznymi, zwłaszcza, że ich podanie obarczone jest istotnym ryzykiem wystąpienia działań niepożądanych. Skutkiem ubocznym rozpoczęcia u źrebiąt terapii antybiotykami z grupy makrolidów najczęściej bywa biegunka o różnym stopniu nasilenia. Leki z tej grupy są całkowicie wykluczone ze stosowania u koni dorosłych, ze względu na możliwość wywoływania ciężkich przypadków dysbiozy jelitowej i zapaleń okreżnicy (Gustafsson i wsp., 1997). Niestety, w związku z powyższym, mogą one stanowić niekiedy poważny czynnik ryzyka dla klaczy (Cohen, 2021). Ze względu na doustną drogę podania i możliwość kontaminacji boksu, wynikającej najczęściej z gorzkiego smaku i wyplucia przez źrebię pewnej ilości terapeutuku, przypadkowe spożycie go przez klacz nie jest wykluczone. Innym, na szczęście rzadkim, działaniem niepożądanym zastosowania leków z tej samej grupy, są ciężkie, niekiedy nawet śmiertelne przypadki hipertermii wywołanej anhydrozą u leczonych źrebiąt (Patterson Rosa i wsp., 2021; Stieler i wsp., 2016). Nieuzasadnione lub przedwczesne rozpoczęcie antybiotykoterapii wiąże się z również z nasilaniem rozwoju lekooporności wśród bakterii. W niektórych stanach USA lekooporne szczepy bakterii izolowane są już w 75% ośrodków hodowlanych, a oporność na antybiotyki makrolidowe wzrosła tam o 15% w ciągu 10 lat (Huber, Giguère, Slovis, i wsp., 2018).

Ze względu na rosnącą świadomość dotyczącą problemu antybiotykooporności bakterii, odchodzi się od podawania antybiotyków przed wystąpieniem objawów klinicznych rodokokozy (Higgins & Huber, 2023) lub przynajmniej weryfikacji kryteriów wstępnych, związanych z liczbą lub średnicą ropni. Od kilkunastu lat, rekomendacja leczenia opierała się o nowo wprowadzone kryteria ultrasonograficzne. Pierwszy wskaźnik - Slovis score - zakładał rozpoczęcie antybiotykoterapii w przypadku odnalezienia w badaniu ultrasonograficznym ropnia o określonej średnicy (Cohen i wsp., 2015; McCracken & Slovis, 2009). Drugi z wprowadzonych wskaźników - TMD (ang. Total Maximal Diameter), sugerował wprowadzenie terapii w przypadkach, gdy łączna średnica rozpoznanych ropni przewyższała konkretną wartość graniczną (Madrigal i wsp., 2016). Wartości graniczne, określające rekomendowany moment rozpoczęcia leczenia, w przypadku obu tych wskaźników były już wielokrotnie zwiększone. Zasadność tego postępowania, a więc zbliżoną efektywność leczenia przy zaostrzeniu kryteriów wprowadzenia antybiotykoterapii, mającą na uwadze ograniczenie rozwoju lekooporności, została już opisana. W jednym z badań, prowadzonych na dużej populacji źrebiąt przez uznanego i doświadczonego zespół, zaostrzenie kryteriów wprowadzenia antybiotykoterapii nie tylko nie ograniczyło jej skuteczności, ale również obniżyło dodatkowo prawdopodobieństwo nawrotu choroby (Arnold-Lehna i wsp., 2019). Ponadto, źrebięta poddane leczeniu nie zdrowiały istotnie szybciej niż te z grupy kontrolnej, pomimo uprzedniej argumentacji, że wcześniejsze wprowadzenie antybiotykoterapii pozwala skrócić czas jej trwania, a więc i ograniczyć koszty (Arnold- Lehna i wsp., 2019; Venner i wsp., 2012). Odnotowano również przypadki całkowitego samoistnego ustąpienia podklinicznych zmian o łącznej średnicy zmian nawet do 20 cm (Arnold-Lehna, Venner, Berghaus, Berghaus i Giguère, 2019).

### **Mechanizmy odporności i immunoprofilaktyka**

Odporność humoralna jest uznawana za kluczowy mechanizm odpowiedzi immunologicznej w przebiegu rodokokozy (Vázquez-Boland i wsp., 2013). Dorosłe konie wykazują odporność na zakażenie *R. equi*, reagując na nie wzrostem miana przeciwciał klasy IgG oraz eliminacją bakterii z dolnych dróg oddechowych, zanim dojdzie do pojawienia się jakichkolwiek objawów klinicznych (Lopez i wsp., 2002). Nowonarodzone źrebięta, w związku ze specyfiką budowy łożyska kosmówkowo-nabłonkowego, nabijają przeciwciała matczynie dopiero w momencie pobrania pierwszej porcji siary, której jakość, objętość i szybkość pobrania w dużym stopniu warunkuje zdolność przeżycia okresu okołoporodowego i związanych z nim zakażeń, w tym posocznicy noworodków (McGuire i wsp., 1977). Niestety, modulacja i rozwój odporności u źrebiąt wciąż jest stosunkowo słabo poznana, a zauważalny wzrost miana przeciwciał we krwi osobników zakażonych *R. equi* nie przekłada się na wystarczającą skuteczność mechanizmów humoralnych.

w odpowiedzi na zakażenie (Lopez i wsp., 2002). W odpowiedź ochronną mogą być zaangażowane również mechanizmy komórkowe, znaczaco różniące się u źrebiąt i dorosłych koni. Różnice te dotyczą przede wszystkim liczby i fenotypów limfocytów T oraz produkcji niektórych cytokin, zwłaszcza IFN- $\gamma$ , pełniącego kluczową rolę w zwalczaniu patogenów wewnętrzkomórkowych (Dawson i wsp., 2010; Giguère, Wilkie, i wsp., 1999).

### **Immunizacja czynna**

Wprowadzenie wysoce skutecznej immunoprofilaktyki, która wydawałaby się w przypadku tak skomplikowanego problemu idealnym rozwiązaniem, pozostaje jednak jak do tej pory w sferze planów i badań. Wszystkie dotychczasowe próby szczepienia źrebiąt okazały się nieskuteczne, co może częściowo wiązać się z obecnością przeciwciał matczynych, chroniących źrebię zwykle aż do okresu odsadzenia i interferujących z wykształceniem własnej odporności poszczepionej (Van Oirschot i wsp., 1991). Skuteczność szczepień kłaczy w okresie ciąży również nie została jednoznacznie potwierdzona w literaturze i szczepienia te nie są komercyjnie dostępne. Niektórzy autorzy prac zaprzeczają skuteczności takich szczepień (Martens i wsp., 1991; Prescott i wsp., 1997), choć w niektórych miejscach stosowane są autoszczepionki uzyskiwane z lokalnych szczepów *R.equi*, z satysfakcjonującymi wynikami (Cauchard i wsp., 2004).

Przedmiotem nowszych badań było opracowanie szczepionki zawierającej bakterie inaktywowane za pomocą promieniowania (Electron Beam Inactivated Vaccine) (Bordin i wsp., 2014). Pomysł wydawał się być obiecujący ze względu na potencjalnie większą możliwość immunostymulacji, wynikającą z mniejszego uszkodzenia białek ściany komórkowej podczas inaktywacji bakterii, względem typowo przygotowywanej szczepionki, inaktywującej bakterię za pomocą formaliny lub wysokiej temperatury. Ponadto rozwiązanie to wydaje się być dużo bezpieczniejsze z uwagi na mniejsze drażnienie tkanek niż po iniekcji materiału inaktywowanego formaliną. Niestety, wyniki wstępnych prób klinicznych nie przyniosły spektakularnych rezultatów, a szczepionka nie zapobiegała rozwojowi zmian w płucach ani objawów klinicznych. Nie odnotowano również istotnych zmian w parametrach odpowiedzi immunologicznej u badanych źrebiąt (Rocha i wsp., 2016).

Kolejnym rozwiązaniem, rozważanym w ostatnich latach było wykorzystanie N-poli-acetylo-glukozaminy (Cohen i wsp., 2021), antygenu powierzchniowego charakterystycznego dla wielu bakterii wewnętrzkomórkowych, w tym również *R. equi*. Wstępne badania okazały się bardzo obiecujące, ponieważ około 90% źrebiąt pochodzących od zaszczepionych matek nie wykazało objawów klinicznych po zakażeniu doświadczalnym, podczas gdy u zbliżonego procentu źrebiąt

z grupy kontrolnej (w której matki nie zostały poddane szczepieniu) rozwinięły się objawy. W tym samym badaniu ocenie poddane zostały również efekty szczepienia żrebiąt, jednak po raz kolejny okazały się nieskuteczne. Pomimo nadziei, wiążących z efektywnością powyższego szczepienia, jego niewątpliwą wadę stanowi fakt, że żrebięta poddane badaniu otrzymały immunogenną dawkę bakterii dopiero około 4-go tygodnia życia, a nie w jego pierwszych dniach, kiedy według większości badaczy najprawdopodobniej dochodzi do zakażenia, nie tylko *R. equi*, ale i wieloma innymi patogenami, w tym bakteriami powodującymi podobnie problematyczne posocznice noworodków (Cywes-Bentley i wsp., 2018; Horowitz i wsp., 2001; Sanz i wsp., 2013).

### **Immunizacja bierna**

Najszerzej rozpowszechnionym w Stanach Zjednoczonych rodzajem profilaktyki jest podawanie osocza hiperimmunizowanego (Hiperimmune Plasma, HIP) (Chaffin i wsp., 1991). Preparat jest komercyjnie dostępny na amerykańskim rynku pod nazwą „rhodoplazma”, jest jednak stosunkowo drogi, a według niektórych doniesień jego skład nie jest wystarczająco wystandaryzowany, z czego prawdopodobnie wynikają bardzo zróżnicowane opinie dotyczące jego skuteczności (Dawson i wsp., 2010; Erganis i wsp., 2014; Giguère i wsp., 2011; Sanz i wsp., 2014, 2016). Preparat uzyskuje się szczepiąc dorosłe konie, tzw. dawców, przeciwko *R. equi* i pobierając od nich osocze, zawierające przede wszystkim przeciwciała, ale również wiele innych składników, w tym białka i cytokiny, nieobecne lub obecne tylko w niewielkich ilościach w siarze. Różnorodność szczepów bakterii i ich zmienna immunogenność mogą istotnie wpływać na ocenę efektywności tego typu immunizacji, podobnie jak sposób podania, jakość przygotowanego produktu oraz status immunologiczny konia - dawcy. Poważną wadę i ograniczenie w zastosowaniu osocza hiperimmunizowanego stanowi również konieczność jego dożylnego podania, co znacząco ogranicza jego przydatność w praktyce terenowej, ze względu na konieczność podawania w powolnym wlewie oraz ryzyko wystąpienia reakcji niepożądanych, w tym również wstrząsu (Vázquez-Boland i wsp., 2013). Niemniej, część autorów wskazuje na redukcję zaawansowania objawów klinicznych oraz śmiertelności po jego zastosowaniu (Erganis i wsp., 2014; Sanz i wsp., 2016). Co więcej, podanie HIP ogranicza również wydalanie *R. equi* z kałem, a więc i jego koncentrację w podłożu i powietrzu, co może zmniejszać ryzyko zakażeń między żrebiętami (Sanz i wsp., 2019). Ustalono również, że podanie większej objętości HIP w pierwszym okresie życia (1L vs 2L) może zwiększać skuteczność tej metody w redukcji przypadków klinicznych oraz upadków na tle *R. equi* (Coleman i wsp., 2019; Kahn i wsp., 2019). Z drugiej strony, podanie HIP 7 dni po eksperymentalnym zakażeniu żrebiąt okazało się nieskuteczne, co potwierdza jego profilaktyczne, ale nie lecznicze właściwości (Chaffin i wsp., 1991).

## **Podsumowanie**

Pomimo powszechności występowania rodokokozy, coraz głębszej znajomości rozwoju i działania mechanizmów odporności u koni, a zwłaszcza u żrebiąt, oraz wielu badań mających na celu znalezienie skutecznych i dostępnych finansowo opcji radzenia sobie z tym problemem, wciąż wiele aspektów pozostaje niewyjaśnionych. Czynniki ryzyka wystąpienia choroby oraz powody, dla których istnieją znaczne różnice w występowaniu klinicznej formy choroby pomiędzy ośrodkami, a także pomiędzy sezonami hodowlanym w jednym ośrodku nie zostały dotychczas ustalone. Niewątpliwymi osiągnięciami ostatnich lat są poprawa skuteczności i dostępności metod diagnostycznych, obiecujące wstępne wyniki testów preparatów immunoprofilaktycznych oraz znaczna redukcja śmiertelności żrebiąt, niemniej skuteczna profilaktyka oraz satysfakcjonujące metody terapii wciąż stanowią cel badań w wielu ośrodkach naukowych. Rodokokoza pozostaje jednym z głównych problemów zdrowotnych i ekonomicznych w ośrodkach hodowli koni, co wydaje się być wystarczającą motywacją do podejmowania nowych wyzwań badawczych.

## Piśmiennictwo:

1. Ainsworth, D. M., Eicker, S. W., Yeagar, A. E., Sweeney, C. R., Viel, L., Tesarowski, D., Lavoie, J. P., Hoffman, A., Paradis, M. R., Reed, S. M., Erb, H. N., Davidow, E., & Nalevanko, M. (1998). Associations between physical examination, laboratory, and radiographic findings and outcome and subsequent racing performance of foals with *Rhodococcus equi* infection: 115 cases (1984-1992). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 213(4), 510–515.
2. Ardans, A. A., Sharon K. Hietala, Michael S Spensley, & Sansome, A. (1987). Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals. *Medicine*.
3. Arnold-Lehna, D., Venner, M., Berghaus, L. J., Berghaus, R., & Giguère, S. (2019). Changing policy to treat foals with *Rhodococcus equi* pneumonia in the later course of disease decreases antimicrobial usage without increasing mortality rate. *Equine Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/evj.13219>
4. Barton, A. K., Rieger, M., Teschner, D., & Gehlen, H. (2016). Procalcitonin—A Useful Biomarker for Pneumonia Associated with *Rhodococcus equi*? *Modern Research in Inflammation*, 05(02), 13–19. <https://doi.org/10.4236/mri.2016.52002>
5. Bedenice, D., Heuwieser, W., Brawer, R., Solano, M., Rand, W., & Paradis, M. R. (2003). File # 12em Clinical and Prognostic Significance of Radiographic Pattern, Distribution, and Severity of Thoracic Radiographic Changes in Neonatal Foals. In *J Vet Intern Med* (Vol. 17).
6. Bedenice, D., Heuwieser, W., Solano, M., Rand, W., & Paradis, M. R. (2003). File # 13em Risk Factors and Prognostic Variables for Survival of Foals with Radiographic Evidence of Pulmonary Disease. In *J Vet Intern Med* (Vol. 17).
7. Bordin, A. I., Pillai, S. D., Brake, C., Bagley, K. B., Bourquin, J. R., Coleman, M., Oliveira, F. N., Mwangi, W., McMurray, D. N., Love, C. C., Felippe, M. J. B., & Cohen, N. D. (2014). Immunogenicity of an electron beam inactivated *Rhodococcus equi* vaccine in neonatal foals. *PLoS ONE*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105367>
8. Buntain, S., Carter, C., Kuskie, K., Smith, J., Stepusin, R., Chaffin, M. K., Takai, S., & Cohen, N. (2010). Frequency of *Rhodococcus equi* in Feces of Mares in Central Kentucky. *Journal of Equine Veterinary Science*, 30(4), 191–195. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2010.02.005>
9. Burton, A. J., Giguère, S., Sturgill, T. L., Berghaus, L. J., Slovis, N. M., Whitman, J. L., Levering, C., Kuskie, K. R., & Cohen, N. D. (2013). Macrolide- and rifampin-resistant *rhodococcus equi* on a horse breeding farm, Kentucky, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 19(2), 282–285. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121210>
10. Cantey, J. B., & Lee, J. H. (2021). Biomarkers for the Diagnosis of Neonatal Sepsis. *Clinics in Perinatology*, 48(2), 215–227. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2021.03.012>
11. Cauchard, J., Sevin, C., Ballet, J.-J., & Taouji, S. (2004). Foal IgG and opsonizing anti- *Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary Microbiology*, 104(1–2), 73–81. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.006>
12. Cauchard, S., Giguère, S., Venner, M., Muscatello, G., Cauchard, J., Cohen, N. D., Haas, A., Hines, S. A., Hondalus, M. K., Horohov, D. W., Meijer, W. G., Prescott, J. F., & Vázquez- Boland, J. (2013).

- Rhodococcus equi research 2008-2012: Report of the Fifth International Havemeyer Workshop. In *Equine Veterinary Journal* (Vol. 45, Issue 5, pp. 523–526). <https://doi.org/10.1111/evj.12103>
13. Chaffin, M. K., Cohen, N. D., & Martens, R. J. (2003). Evaluation of equine breeding farm management and preventative health practices as risk factors for development of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(4), 476–485. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.476>
  14. Chaffin, M. K., Martens, R. J., Martens, J. G., & Fiske, R. A. (1991). Therapeutic effects of immune plasma in foals with Rhodococcus equi pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 23(S12), 23–29. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1991.tb04753.x>
  15. Cohen, N. D. (2014). Rhodococcus equi Foal Pneumonia. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 30(3), 609–622. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2014.08.010>
  16. Cohen, N. D., Carter, C. N., Scott, H. M., Chaffin, M. K., Smith, J. L., Grimm, M. B., Kuskie, K. R., Takai, S., & Martens, R. J. (2008). Association of soil concentrations of Rhodococcus equi and incidence of pneumonia attributable to Rhodococcus equi in foals on farms in central Kentucky. *American Journal of Veterinary Research*, 69(3), 385–395. <https://doi.org/10.2460/ajvr.69.3.385>
  17. Cohen, N. D., Chaffin, M. K., Kuskie, K. R., Syndergaard, M. K., Blodgett, G. P., & Takai, S. (2013). Association of perinatal exposure to airborne Rhodococcus equi with risk of pneumonia caused by R equi in foals. *American Journal of Veterinary Research*, 74(1), 102–109. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.1.102>
  18. Cohen, N. D., Chaffin, M. K., Vandenplas, M. L., Edwards, R. F., Nevill, M., Moore, J. N., & Martens, R. J. (2010). Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of Rhodococcus equi pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 37(3), 212–216. <https://doi.org/10.2746/0425164054530704>
  19. Cohen, N. D., Giguère, S., Burton, A. J., Rocha, J. N., Berghaus, L. J., Brake, C. N., Bordin, A. I., & Coleman, M. C. (2016). Use of Liposomal Gentamicin for Treatment of 5 Foals with Experimentally Induced Rhodococcus equi Pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(1), 322–325. <https://doi.org/10.1111/jvim.13810>
  20. Cohen, N. D., Kahn, S. K., Cywes-Bentley, C., Ramirez-Cortez, S., Schuckert, A. E., Vinacur, M., Bordin, A. I., & Pier, G. B. (2021). Serum Antibody Activity against Poly-N- Acetyl Glucosamine (PNAG), but Not PNAG Vaccination Status, Is Associated with Protecting Newborn Foals against Intrabronchial Infection with Rhodococcus equi. <https://doi.org/10.1128/Spectrum>
  21. Cohen, N. D., O'Conor, M. S., Chaffin, M. K., & Martens, R. J. (2005). Farm characteristics and management practices associated with development of Rhodococcus equi pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 404–413. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.404>
  22. Cohen, N. D., Slovis, N. M., Giguère, S., Baker, S., Chaffin, M. K., & Bernstein, L. R. (2015). Gallium Maltoilate as an Alternative to Macrolides for Treatment of Presumed Rhodococcus equi Pneumonia in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(3), 932–939. <https://doi.org/10.1111/jvim.12595>
  23. Coleman, M. C., Blodgett, G. P., Behevino, K. E., Ivanek, R., Cummings, K. J., Carter, G. K., & Cohen, N. D. (2019). Foal-Level Risk Factors Associated With Development of Rhodococcus equi Pneumonia

- at a Quarter Horse Breeding Farm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 72, 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.10.023>
24. Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A. A., Miranda-CasoLuengo, R., Wang, X., Oliver, J., Willingham-Lane, J. M., Meijer, W. G., & Hondalus, M. K. (2015). Transcriptome reprogramming by plasmid-encoded transcriptional regulators is required for host niche adaption of a macrophage pathogen. *Infection and Immunity*, 83(8), 3137–3145. <https://doi.org/10.1128/IAI.00230-15>
25. Crisman, M. V., Kent Scarratt, W., & Zimmerman, K. L. (2008). Blood Proteins and Inflammation in the Horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 24(2), 285–297. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2008.03.004>
26. Cywes-Bentley, C., Rocha, J. N., Bordin, A. I., Vinacur, M., Rehman, S., Zaidi, T. S., Meyer, M., Anthony, S., Lambert, M., Vlock, D. R., Giguère, S., Cohen, N. D., & Pier, G. B. (2018). Antibody to Poly-N-acetyl glucosamine provides protection against intracellular pathogens: Mechanism of action and validation in horse foals challenged with *Rhodococcus equi*. *PLoS Pathogens*, 14(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007160>
27. Dawson, T. R. M. Y., Horohov, D. W., Meijer, W. G., & Muscatello, G. (2010). Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 135, Issues 1–2, pp. 1–11). <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.12.004>
28. Erganis, O., Sayin, Z., Hadimli, H. H., Sakmanoglu, A., Pinarkara, Y., Ozdemir, O., & Maden, M. (2014). The effectiveness of anti- *R. equi* hyperimmune plasma against *R. equi* challenge in thoroughbred Arabian foals of mares vaccinated with *R. equi* vaccine. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/480732>
29. Erol, E., Shaffer, C. L., & Lubbers, B. V. (2021). Synergistic combinations of clarithromycin with doxycycline or minocycline reduce the emergence of antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Equine Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/evj.13508>
30. Eschborn, S., & Weitkamp, J.-H. (2019). Procalcitonin versus C-reactive protein: review of kinetics and performance for diagnosis of neonatal sepsis. *Journal of Perinatology*, 39(7), 893–903. <https://doi.org/10.1038/s41372-019-0363-4>
31. Giguère, S., Berghaus, L. J., & Miller, C. D. (2016). Clinical Assessment of a Point-of-Care Serum Amyloid A Assay in Foals with Bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(4), 1338–1343. <https://doi.org/10.1111/jvim.13978>
32. Giguère, S., & Cohen, N. D. (2018). Controversies in therapy of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 30, Issue 6, pp. 336–341). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/eve.12870>
33. Giguère, S., Cohen, N. D., Keith Chaffin, M., Hines, S. A., Hondalus, M. K., Prescott, J. F., & Slovis, N. M. (2011). *Rhodococcus equi*: Clinical Manifestations, Virulence, and Immunity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1221–1230. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00804.x>
34. Giguère, S., Cohen, N. D., Keith Chaffin, M., Slovis, N. M., Hondalus, M. K., Hines, S. A., & Prescott, J. F. (2011). Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6), 1209–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2011.00835.x>

35. Giguère, S., Hernandez, J., Gaskin, J., Miller, C., & Bowman, J. L. (2003). Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222(6), 775–781. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.775>
36. Giguère, S., Hondalus, M. K., Yager, J. A., Darrah, P., Mosser, D. M., & Prescott, J. F. (1999). Role of the 85-Kilobase Plasmid and Plasmid-Encoded Virulence-Associated Protein A in Intracellular Survival and Virulence of *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 67(7), 3548–3557. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.7.3548-3557.1999>
37. Giguère, S., Jacks, S., Roberts, G. D., Hernandez, J., Long, M. T., & Ellis, C. (2004). Retrospective Comparison of Azithromycin, Clarithromycin, and Erythromycin for the Treatment of Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 18(4), 568–573. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2004.tb02587.x>
38. Giguère, S., & Prescott, J. F. (1997). Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, 56(3–4), 313–334. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00099-0)
39. Giguère, S., & Roberts, G. D. (2012). Association between radiographic pattern and outcome in foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 53(6), 601–604. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2012.01964.x>
40. Giguère, S., Wilkie, B. N., & Prescott, J. F. (1999). Modulation of Cytokine Response of Pneumonic Foals by Virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 67(10), 5041–5047. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.10.5041-5047.1999>
41. Gessler, L. T., Machado, G., da Silveira, B. P., Cohen, N. D., Corbellini, L. G., Leotti, V. B., Diehl, G. N., dos Santos, L. C., & de Vargas, A. C. (2018). Prevalence of *Rhodococcus equi* from the nasal cavity of 1010 apparently healthy horses. *Equine Veterinary Journal*, 50(5), 667–671. <https://doi.org/10.1111/evj.12804>
42. Grimm, M. B., Cohen, N. D., Slovis, N. M., Mundy, G. D., Harrington, J. R., Libal, M. C., Takai, S., & Martens, R. J. (2007). Evaluation of fecal samples from mares as a source of *Rhodococcus equi* for their foals by use of quantitative bacteriologic culture and colony immunoblot analyses. *American Journal of Veterinary Research*, 68(1), 63–71. <https://doi.org/10.2460/ajvr.68.1.63>
43. Gustafsson, A., Bäverud, V., Gunnarsson, A., Rantzien, M. H., Lindholm, A., & Franklin, A. (1997). The association of erythromycin ethylsuccinate with acute colitis in horses in Sweden. *Equine Veterinary Journal*, 29(4), 314–318. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1997.tb03129.x>
44. Hébert, L., Cauchard, J., Doligez, P., Quitard, L., Laugier, C., & Petry, S. (2010). Viability of *Rhodococcus equi* and *Parascaris equorum* Eggs Exposed to High Temperatures. *Current Microbiology*, 60(1), 38–41. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9497-5>
45. Higgins, C., & Huber, L. (2023). *Rhodococcus Equi*: Challenges to Treat Infections and to Mitigate Antimicrobial Resistance. *Journal of Equine Veterinary Science*, 127, 104845. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104845>
46. Hillidge, C. J. (1987). Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Microbiology*, 14(3), 337–342. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(87\)90121-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(87)90121-0)

47. Hines, M. T. (2014). *31 Rhodococcus equi* (2nd ed., p. 294). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00031-2>
48. Hondalus, M. K., & Mosser, D. M. (1994). Survival and Replication of *Rhodococcus equi* in Macrophages. In *INFECTION AND IMMUNITY*.
49. Horowitz, M. L., Cohen, N. D., Takai, S., Becu, T., Chaffin, M. K., Chu, K. K., Magdesian, K. G., & Martens, R. J. (2001). Application of Sartwell's Model (Lognormal Distribution of Incubation Periods) to Age at Onset and Age at Death of Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia as Evidence of Perinatal Infection. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(3), 171–175. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2001.tb02307.x>
50. Huber, L., Giguère, S., Berghaus, L. J., Hanafi, A., & Ryan, C. (2018). Fecal shedding of *Rhodococcus equi* in mares and foals after experimental infection of foals and effect of composting on concentrations of *R. equi* in contaminated bedding. *Veterinary Microbiology*, 223, 42–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.07.017>
51. Huber, L., Giguère, S., Slovis, N. M., Carter, C. N., Barr, B. S., Cohen, N. D., Elam, J., Erol, E., Locke, S. J., Phillips, E. D., & Smith, J. L. (2018). Emergence of Resistance to Macrolides and Rifampin in Clinical Isolates of *Rhodococcus equi* from Foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01714-18>
52. Huber, L., Gressler, L. T., Sanz, M. G., Garbade, P., Vargas, Á., & Silveira, B. P. (2018). Monitoring Foals by Thoracic Ultrasonography, Bacterial Culture, and PCR: Diagnostic of *Rhodococcus equi* Subclinical Pneumonia in South of Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, 60, 104-108.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2017.08.017>
53. Kahn, S. K., Blodgett, G. P., Canaday, N. M., Behevino, K. E., Rocha, J. N., Bordin, A. I., & Cohen, N. D. (2019). Transfusion With 2 L of Hyperimmune Plasma is Superior to Transfusion of 1 L or Less for Protecting Foals Against Subclinical Pneumonia Attributed to *Rhodococcus equi*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 79, 54–58. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.05.015>
54. Lavoie, J. P., Fiset, L., & Laverty, S. (1994). Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. *Equine Veterinary Journal*, 26(5), 348–352. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1994.tb04401.x>
55. Le Corre, S., Janes, J., & Slovis, N. M. (2021). Multiple extra-pulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in a 2-month-old foal. *Equine Veterinary Education*, 33(8), 396. <https://doi.org/10.1111/eve.13279>
56. Leclerc, M., Magdesian, K. G., Kass, P. H., Pusterla, N., & Rhodes, D. M. (2011). Comparison of the clinical, microbiological, radiological and haematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria. *Veterinary Journal*, 187(1), 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.10.025>
57. Lin, W. V., Kruse, R. L., Yang, K., & Musher, D. M. (2019). Diagnosis and management of pulmonary infection due to *Rhodococcus equi*. In *Clinical Microbiology and Infection* (Vol. 25, Issue 3, pp. 310–315). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.033>
58. Lopez, A. M., Hines, M. T., Palmer, G. H., Alperin, D. C., & Hines, S. A. (2002). Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1270–1276. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1270-1276.2002>

59. Lührmann, A., Mauder, N., Sydor, T., Fernandez-Mora, E., Schulze-Luehrmann, J., Takai, S., & Haas, A. (2004). Necrotic Death of *Rhodococcus equi* - Infected Macrophages Is Regulated by Virulence-Associated Plasmids. *Infection and Immunity*, 72(2), 853–862. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.2.853-862.2004>
60. Madrigal, R. G., Shaw, S. D., Witkowski, L. A., Sisson, B. E., Blodgett, G. P., Chaffin, M. K., & Cohen, N. D. (2016). Use of Serial Quantitative PCR of the *vapA* Gene of *Rhodococcus equi* in Feces for Early Detection of *R. equi* Pneumonia in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30(2), 664–670. <https://doi.org/10.1111/jvim.13828>
61. Martens, R. J., Cohen, N. D., Chaffin, M. K., Takai, S., Doherty, C. L., Angulo, A. B., & Edwards, R. F. (2002). Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(6), 825–833. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.221.825>
62. Martens, R. J., Martens, J. G., & Fiske, R. A. (1991). Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 23(S12), 19–22. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3306.1991.tb04752.x>
63. Martens, R. J., Takai, S., Cohen, N. D., Chaffin, M. K., Liu, H., Sakurai, K., Sugimoto, H., & Lingsweiler, S. W. (2000). Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(2), 220–225. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.220>
64. McCracken, J. L. (2015). Screening for *Rhodococcus equi* Pneumonia. In *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine* (pp. 737–740). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4555-5.00176-X>
65. McCracken, J. L., & Slovis, N. M. (2009). Use of Thoracic Ultrasound for the Prevention of *Rhodococcus equi* Pneumonia on Endemic Farms. In *AAEP PROCEEDINGS* (Vol. 55).
66. McGuire, T. C., Crawford, T. B., Hallowell, A. L., & Macomber, L. E. (1977). Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(11), 1302–1304.
67. McQueen, C. M., Dindot, S. V., Foster, M. J., & Cohen, N. D. (2015). Genetic Susceptibility to *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(6), 1648–1659. <https://doi.org/10.1111/jvim.13616>
68. Morresey, P. R., Garrett, K. S., & Carter, D. (2011). *Rhodococcus equi* occipital bone osteomyelitis, septic arthritis and meningitis in a neurological foal. *Equine Veterinary Education*, 23(8), 398–402. <https://doi.org/10.1111/j.2042-3292.2010.00119.x>
69. Muscatello, G. (2012a). *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal – Part 1: Pathogenesis and epidemiology. *The Veterinary Journal*, 192(1), 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.014>
70. Muscatello, G. (2012b). *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal – Part 2: Diagnostics, treatment and disease management. *The Veterinary Journal*, 192(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.08.009>
71. Muscatello, G., Anderson, G. A., Gilkerson, J. R., & Browning, G. F. (2006). Associations between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the Epidemiology of *R. equi* Pneumonia on Australian Thoroughbred Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 6152–6160. <https://doi.org/10.1128/AEM.00495-06>

72. Muscatello, G., Gerbaud, S., Kennedy, C., Gilkerson, J. R., Buckley, T., Klay, M., Leadon, D. P., & Browning, G. F. (2010). Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. *Equine Veterinary Journal*, 38(3), 263–265. <https://doi.org/10.2746/042516406776866480>
73. Muscatello, G., Gilkerson, J. R., & Browning, G. F. (2009). Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(3), 734–737. <https://doi.org/10.1128/JCM.01395-08>
74. Noah Cohen, B. D. (2021). *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals: An Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. In *American Association of Equine Practitioners*.
75. Passamonti, F., Vardi, D. M., Stefanetti, V., Marenzoni, M. L., Prato, S., Cévese, P., Coletti, M., Pepe, M., Casagrande Proietti, P., & Olea-Popelka, F. (2015). *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: An assessment of the early diagnostic value of serum amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice. *Veterinary Journal*, 203(2), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.08.033>
76. Patterson Rosa, L., Mallicote, M. F., MacKay, R. J., & Brooks, S. A. (2021). Ion Channel and Ubiquitin Differential Expression during Erythromycin-Induced Anhidrosis in Foals. *Animals*, 11(12), 3379. <https://doi.org/10.3390/ani11123379>
77. Prescott, J. F. (1991). *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 20–34. <https://doi.org/10.1128/CMR.4.1.20>
78. Prescott, J. F., Nicholson, V. M., Patterson, M. C., Zandona Meleiro, M. C., Caterino de Araujo, A., Yager, J. A., & Holmes, M. A. (1997). Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against *R. equi* pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, 58(4), 356–359.
79. Punsmann, S., Hellige, M., Hoppe, J., Freise, F., & Venner, M. (2021). Diagnostic imaging in acute interstitial pneumonia in foals: High variability of interpretation of chest radiographs and good conformity between ultrasonographic and post-mortem findings. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 62(4). <https://doi.org/10.1111/vru.12972>
80. Ramirez, S., Lester, G. D., & Roberts, G. R. (2004). Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 45(2), 172–176. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2004.04028.x>
81. Ren, J., & Prescott, J. F. (2004). The effect of mutation on *Rhodococcus equi* virulence plasmid gene expression and mouse virulence. *Veterinary Microbiology*, 103(3–4), 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.08.005>
82. Reuss, S. M. (2016). Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infections. In *Equine Veterinary Education* (Vol. 28, Issue 4, pp. 193–195). Equine Veterinary Journal Ltd. <https://doi.org/10.1111/eve.12513>
83. Reuss, S. M. (2021). *Rhodococcus equi*, extrapulmonary disorders and lack of response to therapy. *Equine Veterinary Education*. <https://doi.org/10.1111/eve.13583>
84. Reuss, S. M., Chaffin, M. K., & Cohen, N. D. (2009). Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in foals: 150 cases (1987–2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(7), 855–863. <https://doi.org/10.2460/javma.235.7.855>

85. Reuss, S. M., Chaffin, M. K., Schmitz, D. G., & Norman, T. E. (2011). Sonographic characteristics of intraabdominal abscessation and lymphadenopathy attributable to *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52(4), 462–465. <https://doi.org/10.1111/j.1740-8261.2011.01804.x>
86. Rocha, J. N., Cohen, N. D., Bordin, A. I., Brake, C. N., Giguère, S., Coleman, M. C., Alaniz, R. C., Lawhon, S. D., Mwangi, W., & Pillai, S. D. (2016). Oral Administration of Electron- Beam Inactivated *Rhodococcus equi* Failed to Protect Foals against Intrabronchial Infection with Live, Virulent *R. equi*. *PLoS ONE*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148111>
87. Ruocco, N. A., Luedke, L. K., Fortier, L. A., Ducharme, N. G., & Reesink, H. L. (2020). *Rhodococcus equi* Joint Sepsis and Osteomyelitis Is Associated With a Grave Prognosis in Foals. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00503>
88. Rutenberg, D., Venner, M., & Giguère, S. (2017). Efficacy of Tulathromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(3), 901–906. <https://doi.org/10.1111/jvim.14717>
89. Sanz, M. G., Bradway, D. S., Horohov, D. W., & Baszler, T. V. (2019). *Rhodococcus equi* - specific hyperimmune plasma administration decreases faecal shedding of pathogenic *R. equi* in foals. *Veterinary Record*, 185(1), 19–19. <https://doi.org/10.1136/vr.105327>
90. Sanz, M. G., Loynachan, A., & Horohov, D. W. (2016). *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomised experimental challenge of neonatal foals. *Veterinary Record*, 178(11), 261–261. <https://doi.org/10.1136/vr.103095>
91. Sanz, M. G., Oliveira, A. F., Page, A., & Horohov, D. W. (2014). Administration of commercial *Rhodococcus equi* specific hyperimmune plasma results in variable amounts of IgG against pathogenic bacteria in foals. *Veterinary Record*, 175(19), 485–485. <https://doi.org/10.1136/vr.102594>
92. Sanz, M., Loynachan, A., Sun, L., Oliveira, A., Breheny, P., & Horohov, D. W. (2013). The effect of bacterial dose and foal age at challenge on *Rhodococcus equi* infection. *Veterinary Microbiology*, 167(3–4), 623–631. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.09.018>
93. Stieler, A. L., Sanchez, L. C., Mallicote, M. F., Martabano, B. B., Burrow, J. A., & MacKay, R. J. (2016). Macrolide-induced hyperthermia in foals: Role of impaired sweat responses. *Equine Veterinary Journal*, 48(5), 590–594. <https://doi.org/10.1111/evj.12481>
94. Stratton-Phelps, M., Wilson, W. D., & Gardner, I. A. (2000). Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986–1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(1), 68–73. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.68>
95. Suarez-Mier, G., Giguère, S., & Lee, E. A. (2007). Pulmonary disposition of erythromycin, azithromycin, and clarithromycin in foals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 30(2), 109–115. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2007.00833.x>
96. Sweeney, C. R., Sweeney, R. W., & Divers, T. J. (1987). *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: Response to antimicrobial therapy. *Veterinary Microbiology*, 14(3), 329–336. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(87\)90120-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(87)90120-9)
97. Takai, S. (1997). Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. *Veterinary Microbiology*, 56(3–4), 167–176. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00085-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00085-0)

98. Takai, S., Narita, K., Ando, K., & Tsubaki, S. (1986). Ecology of *Rhodococcus* (*corynebacterium*) equi in soil on a horse-breeding farm. *Veterinary Microbiology*, 12(2), 169–177. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(86\)90078-7](https://doi.org/10.1016/0378-1135(86)90078-7)
99. Takai, S., Yoda, A., Sasaki, Y., Kakuda, T., Suzuki, Y., & Oikawa, M. (2022). Birth month associated with tracheal colonization of *Rhodococcus* equi in newborn foals on horse- breeding farms with sporadic rhodococcosis in Japan. *Veterinary Microbiology*, 267. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109373>
100. Tan, M., Lu, Y., Jiang, H., & Zhang, L. (2019). The diagnostic accuracy of procalcitonin and C-reactive protein for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4), 5852–5859. <https://doi.org/10.1002/jcb.27870>
101. Tarancón, I., Leiva, M., Jose-Cunilleras, E., Ríos, J., & Peña, T. (2019). Ophthalmologic findings associated with *Rhodococcus* equi bronchopneumonia in foals. *Veterinary Ophthalmology*, 22(5), 660–665. <https://doi.org/10.1111/vop.12637>
102. Van Oirschot, J. T., Bruin, G., de Boer-Luytze, E., & Smolders, G. (1991). Maternal Antibodies against Equine Influenza Virus in Foals and their Interference with Vaccination. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 38(1–10), 391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1991.tb00887.x>
103. Vázquez-Boland, J. A., Giguère, S., Hapeshi, A., MacArthur, I., Anastasi, E., & Valero- Rello, A. (2013). *Rhodococcus* equi: The many facets of a pathogenic actinomycete. In *Veterinary Microbiology* (Vol. 167, Issues 1–2, pp. 9–33). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.06.016>
104. Vázquez-Boland, J., Val-Calvo, J., & Scortti, M. (2024). Update on emerging multidrug- resistant *Rhodococcus* equi. *Veterinary Record*, 194(6). <https://doi.org/10.1002/vetr.4071>
105. Venner, M., Astheimer, K., Lämmer, M., & Giguère, S. (2013). Efficacy of Mass Antimicrobial Treatment of Foals with Subclinical Pulmonary Abscesses Associated with *Rhodococcus* equi. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1), 171–176. <https://doi.org/10.1111/jvim.12030>
106. Venner, M., Kerth, R., & Klug, E. (2007). Evaluation of tulathromycin in the treatment of pulmonary abscesses in foals. *The Veterinary Journal*, 174(2), 418–421. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.08.016>
107. Venner, M., Peters, J., Höhensteiger, N., Schock, B., Bornhorst, A., Grube, M., Adam, U., Scheuch, E., Weitschies, W., Rosskopf, D., Kroemer, H. K., & Siegmund, W. (2010). Concentration of the macrolide antibiotic tulathromycin in broncho-alveolar cells is influenced by comedication of rifampicin in foals. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381(2), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s00210-009-0481-1>
108. Venner, M., Reinhold, B., Beyerbach, M., & Feige, K. (2009). Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. *The Veterinary Journal*, 179(2), 301–303. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.10.002>
109. Venner, M., Rödiger, A., Laemmer, M., & Giguère, S. (2012). Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus* equi. *Veterinary Journal*, 192(3), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.07.004>
110. Venner, M., Walther, S. M., Münzer, B., & Stadler, P. (2014). Diagnostic of pulmonary abscesses in foals-Comparison of sonographic and radiographic examination. In *Pferdeheilkunde* (Vol. 30, Issue 5).

111. Wada, R., Kamada, M., Anzai, T., Nakanishi, A., Kanemaru, T., Takai, S., & Tsubaki, S. (1997). Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. *Veterinary Microbiology*, 56(3–4), 301–312. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00098-9)
112. Westerman, T. L., Tornquist, S. J., Foster, C. M., & Poulsen, K. P. (2015). Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *American Journal of Veterinary Research*, 76(10), 882–888. <https://doi.org/10.2460/ajvr.76.10.882>
113. Wetzig, M., Venner, M., & Giguère, S. (2019). Efficacy of the combination of doxycycline and azithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia. *Equine Veterinary Journal*. <https://doi.org/10.1111/evj.13211>
114. Witkowski, L., Rzewuska, M., Takai, S., Chrobak-Chmiel, D., Kizerwetter-Świda, M., Feret, M., Gawryś, M., Witkowski, M., & Kita, J. (2017). Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horses in Poland: PVapA characteristics and plasmid new variant, 85-kb type V. *BMC Veterinary Research*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12917-017-0954-2>
115. Zabrecky, K. A., Slovis, N. M., Constable, P. D., & Taylor, S. D. (2015). Plasma C- Reactive Protein and Haptoglobin Concentrations in Critically Ill Neonatal Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(2), 673–677. <https://doi.org/10.1111/jvim.12568>

## **II. CELE PRACY**

1. Oszacowanie częstości występowania klinicznej i podklinicznej formy rodokokozy u źrebiąt w wieku przedodsadzeniowym, w wybranych ośrodkach hodowli koni w Polsce centralno-wschodniej na podstawie badania klinicznego i ultrasonograficznego.
2. Określenie częstości występowania zmian wskazujących na rodokokozę w badaniu ultrasonograficznym płuc u źrebiąt w różnym wieku.
3. Ocena związku pomiędzy występowaniem wybranych zmian w badaniu ultrasonograficznym płuc a rozwojem klinicznej formy rodokokozy.
4. Opis obrazu klinicznego postaci pozapłucnej rodokokozy.



### **III. OMÓWIENIE PRZEPROWADZONYCH BADAŃ**

Poniżej przedstawione zostały problematyka, materiały i metody, wyniki oraz podsumowania, zawarte w publikacjach składających się na niniejszą dysertację doktorską.

Pierwszy artykuł stanowi pracę przeglądową dotyczącą aktualnej wiedzy na temat chorobotwórczości, przebiegu, zapobiegania i leczenia zakażeń wywoływanych przez *R. equi* u żrebiąt w wieku przedodsadzeniowym. W kontekście tych danych zaplanowano badania dotyczące występowania, diagnostyki i leczenia rodokokozy w Polsce.

Badania doświadczalne oraz opisy przypadków klinicznych w pozostałych dwóch publikacjach, pochodzą od 192 żrebiąt z czterech stadnin, należących do Skarbu Państwa i specjalizujących się w hodowli koni oraz jednego prywatnego ośrodka hodowlanego. Trzy osobniki nie zostały uwzględnione w statystyce ze względu na błędy w dokumentacji, a kolejne cztery zostały odrzucone w trakcie opracowania statystycznego ze względu na brak badania USG w okresie pierwszych 4 miesięcy życia. Dane zbierane były przez trzy kolejne sezony wyżrebień w latach 2019-2021. Stadniny biorące udział w doświadczeniu zajmowały się hodowlą koni czystej krwi arabskiej (oo; stadniny A, D), koni małopolskich (m; stadniny A, B) oraz koni pełnej krwi angielskiej (xx; stadniny C, E). Kooperacja z powyższymi ośrodkami opierała się na umowie o współpracy podpisanej z uczelnią (A, B, C) lub na zasadzie konsultacji specjalistycznej (D, E). W stadninach B, C, D, E w sezonie rodziło się ok. 15-30 żrebiąt, a w stadninie A ok. 100 żrebiąt. Dane dotyczące wstępniego materiału badawczego uwzględnionego w artykule badawczym zawiera tabela 1.

Wszystkie zwierzęta były utrzymywane w stajniach, z możliwością wychodzenia na padok wraz z matkami, a w przypadku większej liczby osobników (A) w grupach podzielonych ze względu na zbliżony wiek żrebiąt. W dwóch stadninach żrebięta od pewnego wieku utrzymywane były na biegalniach (A, B). Żrebięta wykazujące objawy kliniczne choroby, zwłaszcza duszność czy podwyższoną temperaturę, oraz wymagające leczenia pozostawały z matkami w boksach. We wszystkich stadninach prowadzone były szczepienia matek przeciwko grypie koni (ang. Equine Influenza Virus) i tężcowi oraz szczepienia przeciwko zakażeniom herpeswirusem koni (ang. Equine Herpes Virus, EHV) typu 1 i 4, a także regularne odrobaczanie zarówno matek, jak i żrebiąt.

Zgodnie z przeprowadzonym wywiadem epidemiologicznym, w czterech stadninach biorących udział w doświadczeniu, rodokokoza od dekad stanowiła okresowo bardzo istotny problem, a jej przypadki niejednokrotnie potwierdzane były u żrebiąt za pomocą badania mikrobiologicznego materiału pochodzącego z pobrania płynu tchawiczo-oskrzelowego (TBA) lub

badania anatomiczno-patologicznego. Zgodnie ze swoją specyfiką, choroba na przestrzeni lat występowała z różną intensywnością, prowadząc niekiedy do utraty znaczącej liczby żrebiąt w danym roczniku.

Identyfikacja mikrobiologiczna czynnika etiologicznego polegała na badaniu materiału klinicznego obejmującego popłuczyny, wymazy i/lub wycinki z tkanek objętych zmianami i przeprowadzana była w Zakładzie Mikrobiologii Katedry Nauk Przedklinicznych, Instytutu Medycyny Weterynaryjnej, Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Status epidemiologiczny rodokokozy w piątej stadninie nie był dotychczas potwierdzony.

Tab. 1 Wstępny materiał badawczy, uwzględniony w oryginalnych artykułach stanowiły wyniki badania 189 żrebiąt – 90 ogierków (47.6%) and 99 klaczek (52.4%) z 5 stadnin:

Stadnina	Liczba żrebiąt objętych badaniem n(%)	Płeć [n(%)]		Rasa [n(%)]		
		ogierki	klaczki	oo	xx	m
A	69 (36.5)	38 (55.1)	31 (44.9)	62 (89.9)	0	7 (10.1)
B	57 (30.2)	25 (43.9)	32 (56.1)	0	0	57 (100)
C	25 (13.2)	9 (36.0)	16 (64.0)	0	25 (100)	0
D	24 (12.7)	9 (37.5)	15 (62.5)	24 (100)	0	0
E	14 (7.4)	9 (64.3)	5 (35.7)	0	14 (100)	0
Razem	189	90	99	86	39	64

Dokumentacja kliniczna założona na potrzeby niniejszych prac pochodzi od żrebiąt w wieku od ok. 2 do 16 tygodni, badanych cyklicznie co 2 tygadnie. Okres monitorowania był przedłużany w wypadkach, w których żrebie po ukończeniu 12 tygodni nadal wykazywało kliniczne objawy rodokokozy. W 23% przypadków cykl badań został zaburzony ze względu na upadek, eutanazję lub zmianę miejsca pobytu żrebięcia wraz z matką. Dane statystyczne dotyczące wykonywanych badań klinicznych i ultrasonograficznych przedstawione zostały w tabeli 2. W okresie monitorowania żrebięta były poddawane badaniu klinicznemu obejmującemu ocenę następujących parametrów: temperatura wewnętrzna ciała, stan błon śluzowych, czas kapilarowy, wielkość i konsystencja węzłów chłonnych żuchwowych, liczba uderzeń serca na minutę oraz prawidłowość oddychania. Klatkę piersiową każdorazowo obustronnie osłuchiwano za pomocą fonendoskopu. Po dokonaniu oceny klinicznej żrebięta poddawano badaniu ultrasonograficznemu klatki piersiowej. Było ono wykonywane każdorazowo przez tego samego lekarza weterynarza, za pomocą aparatu Dramiński 4Vet Slim z sondą liniową 8-10 MHz i polegało ono na skanowaniu kolejnych przestrzeni międzyżebrowych, zaczynając doogonowo, od 17. przestrzeni i poruszając się doczaszkowo, do około 4.-5. przestrzeni międzyżebrowej. Ostatnia przestrzeń dostępna do badania zależała od wieku,

budowy i stopnia umięśnienia danego żrebięcia. W badaniu ultrasonograficznym ocenie podlegał wygląd opłucnej, obecność i liczba tzw. linii B, obecność i liczba zorganizowanych zmian ogniskowych (ropni) oraz obecność zwiększonej ilości płynu w jamie opłucnej.

Tab. 2 Łączna liczba wykonanych badań klinicznych i ultrasonograficznych, powtarzanych w ok. 2 tygodniowych odstępach:

Liczba badań wykonanych u pojedynczego żrebięcia	Liczba żrebiąt	Udział badań wykonanych u pojedynczego żrebięcia (%)	Iloczyn liczby wykonanych badań i liczby zbadanych żrebiąt
1	24	12,7	24
2	16	8,5	32
3	14	7,4	42
4	20	10,6	80
5	43	22,8	215
6	47	24,9	282
7	19	10,1	133
8	5	2,6	40
10	1	0,5	10
	<b>189</b>	<b>100</b>	<b>858</b>

W trakcie prac terenowych wyniki badań klinicznych i ultrasonograficznych zapisywane były w protokołach, a następnie wprowadzane do zbiorczej tabeli wyników w programie Microsoft Excel. Rezultaty bieżących badań przekazywane były opiekunom zwierząt i wspólnie z lekarzem weterynarii opiekującym się daną stadniną ustalany lub modyfikowany był plan leczenia.

## **Omówienie aktualnych trendów w badaniach nad rozpoznawaniem i zwalczaniem rodokokozy koni – artykuł przeglądowy**

Celem niniejszej pracy było podsumowanie opublikowanych w ciągu ostatniej dekady wyników badań nad rodokokozą żrebiąt i płynących z nich wniosków. Artykuł przygotowywano skupiając się na przeglądzie aktualnej literatury, dotyczącej chorobotwórczości, przebiegu choroby, metod leczenia i zapobiegania zakażeniom *R. equi* oraz przypadkom zapalenia płuc żrebiąt i badaniom ultrasonograficznym płuc u tychże.

Praca rozpoczyna się przedstawieniem molekularnych i komórkowych mechanizmów związanych z zakażeniem *R. equi*, oraz proponowanych czynników genetycznych i środowiskowych, które mogą wpływać na podatność na zachorowanie lub odporność żrebiąt. *R. equi* jest szeroko rozpowszechniony w glebie i odchodach większości zwierząt, w tym koni, a żrebięta są narażone na kontakt z bakterią już od pierwszych dni życia. Metody umożliwiające wskazanie żrebiąt, których dotyczyć będzie kliniczna postać rodokokozy, w dalszym ciągu nie zostały opracowane. Pojawiły się natomiast szersze opisy przebiegu samego zakażenia, w tym postaci pozapłucnej (ang. Extrapulmonary Disorders, EPD), oraz dane epidemiologiczne, dotyczące powszechnego występowania podklinicznej formy choroby.

Artykuł opisuje szerokie spektrum metod diagnostycznych rodokokozy u żrebiąt, takich jak badanie kliniczne, hodowla mikrobiologiczna, serologia, metody biologii molekularnej (PCR), diagnostyka obrazowa oraz hematologiczna, podkreślając znaczenie wczesnej i celnej diagnozy dla pomyślnego wyniku terapii oraz konieczność kontynuowania prac w tym zakresie. Z większą szczegółowością przedstawione są metody stanowiące tzw. „złoty standard” oraz nowości diagnostyczne, jak wykorzystanie ultrasonografii klatki piersiowej, czy oznaczania białek ostrej fazy (ang. acute phase proteins, APP). Następnie, przedstawione zostały badania dotyczące skuteczności i bezpieczeństwa aktualnie rekomendowanych oraz potencjalnych środków przeciwdrobnoustrojowych w leczeniu rodokokozy, z uwzględnieniem narastającego problemu, jakim w ostatnich latach jest nasilanie i rozprzestrzenianie się lekooporności na antybiotyki wśród szczepów *R. equi*. Podkreślona jest również konieczność weryfikacji schematu leczenia w związku z powszechnością występowania zmian podklinicznych.

Kolejną część pracy stanowi analiza strategii i wyzwań, związanych z zapobieganiem lub ograniczaniem występowania rodokokozy u żrebiąt. Wiele badań koncentruje się na roli środowiska, higieny oraz bioasekuracji w redukcji nasilenia występowania bakterii, a tym samym potencjalnego zmniejszenia ryzyka zakażenia. Bardzo istotne są również doniesienia dotyczące rozwoju metod

skutecznej, bezpiecznej i ogólnie dostępnej immunoprofilaktyki, w tym wykorzystania osocza hiperimmunizowanego znanego jako „rhodoplazma” oraz poszukiwania nowoczesnych metod aktywnej immunizacji kłaczy źrebnich.

Podsumowanie artykułu podkreśla istniejące ograniczenia w dotychczasowych badaniach nad zakażeniami *R. equi*, obecne pomimo pozostawania od wielu lat jednym z głównych wyzwań zdrowotnych w hodowli koni na całym świecie. Przedstawia również niezwykle istotne znaczenie prowadzenia dalszych badań, w celu ustalenia czynników predysponujących do wystąpienia klinicznej formy choroby, efektywnych praktyk środowiskowych, skutecznej immunoprofilaktyki oraz dopracowywania rekomendacji i schematu leczenia antybiotykowego w celu zmniejszenia zachorowalności, kosztów ekonomicznych i śmiertelności z powodu rodokokozy.

Szczegółowe informacje dotyczące powyższej pracy znajdują się w artykule:

**Rakowska A, Cywińska A, Witkowski L.** Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococciosis. *Animals* (Basel). 2020 Oct 18;10(10):1910. doi: 10.3390/ani10101910

**Ocena zależności między zmianami w płucach na podstawie badania ultrasonograficznego  
płuc a objawami klinicznymi ze strony układu oddechowego u źrebiąt z podejrzeniem  
rodokokozy płucnej – artykuł badawczy**

W powyższej pracy zawarte są wyniki obserwacji i badań klinicznych oraz ultrasonograficznych źrebiąt pochodzących z 5 ośrodków w sezonach 2019-2021. W badaniu uwzględniono 185 osobników, należących do trzech ras: czystej krwi arabskiej (85), małopolskiej (63) oraz pełnej krwi angielskiej (37). Źrebięta monitorowane były w wieku od ok. 2 tygodni do ok. 4 miesięcy lub do zakończenia ich leczenia. Praca miała na celu opisanie wyglądu i progresji charakterystycznych dla rodokokozy zmian płucnych w pierwszych miesiącach życia na podstawie badania ultrasonograficznego oraz ocenę związku między obecnością i nasileniem widocznych w badaniu obrazowym zmian patologicznych a występowaniem objawów klinicznych ze strony układu oddechowego u źrebiąt ze stadnin, w których zakażenia *R. equi* występują endemicznie.

Do oceny związku pomiędzy wybranymi objawami klinicznymi a obecnością zmian ultrasonograficznych w płucach sugerujących zakażenie *R. equi* wykorzystano mieszany model liniowy (ang. mixed linear model, MLM). Zgodne z wcześniejszymi obserwacjami stwierdzono, że rodokokoza zazwyczaj objawia się głównie gorączką (u ok. 15% źrebiąt) i zmianami osłuchowymi (u 20%). Łącznie, symptomy ze strony układu oddechowego zaobserwowano u ok. 26% źrebiąt, natomiast zmiany patologiczne w obrazie ultrasonograficznym dotyczyły ok. 70% osobników. U ok. 62% źrebiąt wykryte zostały zmiany ropne w płucach, charakterystyczne dla zakażenia *R. equi*. Występowanie zmian w badaniu ultrasonograficznym było istotnie pozytywnie powiązane z wiekiem źrebiąt, a ich szczyt występowania przypadał na 7-8 tydzień życia, kiedy dotyczyły one ok. 46% źrebiąt. Po ukończeniu przez zwierzęta 2-go miesiąca życia, objawy podkliniczne stopniowo ustępowały, z dużym prawdopodobieństwem również pod wpływem leczenia, stabilizując się na poziomie ok. 25% w wieku 4 miesięcy.

Wykrycie zmian podklinicznych okazało się zwiększać prawdopodobieństwo wystąpienia klinicznej formy choroby. Osobniki, u których wykryto minimum 1 ropień o średnicy przekraczającej 15 mm oraz zwiększoną ilość płynu w jamie opłucnej lub zapalne pogrubienie opłucnej, z dużym prawdopodobieństwem wykazywały objawy ze strony układu oddechowego ( $P < 0,001$ ). Na podstawie wywiadu, badań klinicznych i obrazowych oraz po indywidualnym rozważeniu każdego przypadku, do leczenia antybiotykami zostało zakwalifikowanych 29% źrebiąt. W leczeniu stosowano rekomendowane do tego celu ryfampicynę p.o. oraz antybiotyki makrolidowe: klarytromycynę p.o. lub tulatromycynę i.m. Upadkowość wynosiła ok. 5%,

a każdy przypadek był potwierdzany sekcyjnie i badaniem mikrobiologicznym. Izolowane od padłych źrebiąt szczepy *R. equi* nie wykazywały oporności na standardowo rekomendowane do leczenia antybiotyki.

Częstość występowania klinicznych objawów rodokokozy u źrebiąt w pierwszych miesiącach życia w wybranych ośrodkach w Polsce oszacowano na ok. 25%, co jest zbliżone do wyników uzyskiwanych wcześniej w innych krajach. Najpowszechniejszą zmianą dostępną w badaniu ultrasonograficznym płuc były ropnie, najczęściej obserwowane u źrebiąt w wieku ok. 2 miesiące. Wnioski te uzupełniają wiedzę na temat obrazu klinicznego i radiologicznego choroby, niemniej konieczne jest prowadzenie dalszych badań dotyczących skutecznego monitoringu oraz leczenia.

Szczegółowe informacje dotyczące powyższej pracy znajdują się w artykule:

**Rakowska A, Czopowicz M, Bereznowski A, Witkowski L.** Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococciosis. *Sci Rep.* 2023 Nov 8;13(1):19401. doi: 10.1038/s41598-023-46833-2

## **Nietypowy przebieg zakażeń *Rhodococcus equi* u źrebiąt – artykuł badawczy – opis przypadków klinicznych**

W artykule przedstawione zostały opisy pięciu przypadków podejrzenia zakażenia *R. equi* u źrebiąt, przebiegające w sposób atypowy, wykraczający poza klasyczne dla tej choroby ropno-ziarniniakowe zapalenie płuc. Ta forma rodokokozy, określana jako pozapłucna (ang. extrapulmonary disorders, EPD), jest stosunkowo rzadko szczegółowo opisywana, choć stanowi istotny problem w hodowli i od dawna wiązana jest z pogorszeniem rokowań. Przypadki wykorzystane w tej pracy stanowią wybór 5 mało typowych historii chorób z puli 192 źrebiąt i obserwowane były w trakcie badań dotyczących rodokokozy w sezonach wyźrebień 2019-2021. Nadmienione w artykule źrebięta pochodziły z 2 stadnin, w których rodokokoza występuje endemicznie.

Pierwszy przypadek dotyczył potencjalnego udziału przewlekłego zakażenia *R. equi* w zaawansowanym przebiegu rodokokozy i jej postaci pozapłucnej u źrebięcia, urodzonego jako wcześniak i utraconego jako roczniak. Zwierzę zachorowało klinicznie w wieku 5 tygodni i leczone było przez kolejnych 10 tygodni. Leczenie nie przyniosło oczekiwanych wyników. Obserwowano progresję średnicy ropni, nawracającą gorączkę oraz zapalenie błony naczyniowej oka lewego i ropień zagałkowy, który doprowadził do jednostronnej utraty wzroku i zaniku gałki ocznej. Kondycja źrebięcia długo odbiegała od oczekiwanej, niemniej leczenie zostało zakończone ok. 4-go miesiąca życia, ze względu na stabilizację stanu ogólnego. Rok później, jako roczniak, koń zgłoszony został do weryfikacji i badania stanu zdrowia po sezonie pastwiskowym, ze względu na zły stan ogólny. Niedługo potem koń padł, a materiał pobrany w trakcie sekcji potwierdził przewlekłe zakażenie *R. equi*.

Kolejne dwa przypadki dotyczą tak zwanych „zmian pozapłucnych” i hipotezy dziedzicznego niedoboru odporności w linii matek hodowlanych z jednej ze stadnin. Źrebięta od matek z tej samej rodziny żeńskiej (matki i córki), w tym samym roku zachorowały na kliniczną postać rodokokozy oraz padły lub zostały poddane eutanazji ze względu na zaawansowanie zmian pozapłucnych, dotyczących układu pokarmowego, kości oraz połączeń kości. Materiał pobrany sekcyjnie w obu przypadkach potwierdził zakażenie *R. equi*. Ze względu na podobne problemy odnotowywane w tej rodzinie w przeszłości, zaproponowane zostały wstępne badania dodatkowe, które wskazywały na dziedziczne problemu, związanego z niedoborem odporności humoralnej.

Czwarty przypadek podejrzenia zakażenia *R. equi* związany był z mniej typową lokalizacją ropnia płucnego oraz podejrzeniem nieuchwytnych w badaniu ultrasonograficznym zmian

w układzie pokarmowym, podejrzewanych na podstawie obrazu klinicznego, a zwłaszcza apatii, zahamowania wzrostu i utrzymujących się biegunki. Źrebię pozytywnie zareagowało na leczenie i dalsza diagnostyka, w tym potwierdzenie mikrobiologiczne, nie było prowadzone.

Ostatni opis dotyczył przypadku wskazującego na hipertermię na tle anhydrozy, wywołanej antybiotykami z grupy makrolidów, stosowanymi w związku z kolejnym podejrzeniem zaawansowanej postaci płucnej zakażenia *R. equi*. Pomimo świadomości działań niepożądanych tych leków, brak alternatyw w terapii rodokokozy i zaawansowany stan kliniczny źrebięcia sugerował konieczność ich zastosowania. Wnikliwa obserwacja pacjenta umożliwiła jednak wczesną identyfikację problemu oraz utrzymanie wymaganej antybiotykoterapii i skuteczne leczenie źrebięcia.

Praca koncentrowała się na praktycznym - klinicznym i ultrasonograficznym wkładzie w diagnostykę i monitorowanie choroby w warunkach terenowych oraz opisie rzadkich i interesujących przypadków, wertych uzupełnienia w doniesieniach naukowych.

Szczegółowe informacje dotyczące powyższej pracy znajdują się w artykule:

**Rakowska A, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, Cywińska A, Żychska M, Witkowski L.** Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. *Vet Sci.* 2022 Oct 31;9(11):605.  
doi: 10.3390/vetsci9110605

## **Omówienie ograniczeń związanych z terenowym charakterem badań**

Terenowy charakter pracy sprawia, że jej wyniki można uznać za wysoce reprezentatywne dla rzeczywistego obrazu klinicznego rodokokozy w monitorowanych stadninach. Nakłada on jednak również pewne ograniczenia.

Jednym z najistotniejszych czynników utrudniających prowadzenie pracy był zróżnicowany i niewiodący wpływ osoby wykonującej badanie ultrasonograficzne na decyzje dotyczące leczenia źrebiąt w poszczególnych stadninach. Z całą pewnością, większa dostępność i częstotliwość badania ultrasonograficznego oraz specjalistycznych konsultacji mogłyby poprawić współpracę i mieć pozytywny wpływ na skuteczność leczenia. Niestety, zwiększenie dostępności monitoringu lub możliwość przeprowadzania interwencyjnego badania była ograniczona znacznymi odległościami dzielącymi poszczególne ośrodki hodowlane. Z kolei zwiększenie liczby osób wykonujących badania ultrasonograficzne redukuje jego odtwarzalność, gdyż procedury diagnostyczne takie jak osłuchiwanie lub interpretacja badań obrazowych zawsze są do pewnego stopnia subiektywne.

Kolejnym istotnym aspektem badania było wykorzystanie chętnych do współpracy endemicznych stadnin. Pozwoliło to na obserwację naturalnie występujących zakażeń na dużej grupie zwierząt, ale również spowodowało pewne trudności organizacyjne, jak choćby rotację pracowników, sprzedaż i zakup koni, w tym matek i/lub źrebiąt, w trakcie trwania badania, oraz ograniczenia ekonomiczne dotyczące decyzji diagnostycznych i terapeutycznych. Kolejnym istotnym utrudnieniem był zróżnicowany udział poszczególnych stadnin w projekcie. Ograniczenia te udaje się eliminować tworząc grupy monitorowanych zwierząt podlegające bezpośrednio pod jednostki badawcze, wymaga to jednak często dużo większych nakładów finansowych oraz zwykle nie pozwala na obserwację naturalnych zakażeń, które, jak w przypadku zakażeń powodowanych przez *R. equi* potrafią być bardzo zróżnicowane pod względem sezonu, specyfiki ośrodka i lokalnych praktyk profilaktycznych oraz zoohigienicznych. Dodatkowo, stworzeniu takich grup badawczych często towarzyszy również więcej procedur warunkujących etyczność badań, gdyż zwierzęta zwykle przebywają wtedy w specjalnie przygotowanych warunkach, a nie w naturalnym środowisku i zwykle podlegają zakażeniu doświadczalnemu.

Pewne zastrzeżenia dotyczące pracy z całą pewnością budzi również brak każdorazowego potwierdzenia czynnika etiologicznego za pomocą hodowli mikrobiologicznej. Takie podejście wynika w dużej mierze z odchodzenia od ustalonego wiele lat temu przez *ACVIM* złotego standardu diagnostycznego, ze względu na potencjalne wyniki fałszywe, znaczne ryzyko związane z pobieraniem materiału z dolnych dróg oddechowych w warunkach terenowych oraz zdecydowany wzrost kosztów

diagnostyki i leczenia pojedynczego źrebięcia, opisywane we wstępie pracy. Z drugiej jednak strony, wszystkie przypadki w trakcie trwania monitoringu, w których możliwe było wykonanie hodowli mikrobiologicznej, potwierdziły zakażenie *R. equi*.

Analiza statystyczna wyników również miała swoje ograniczenia wynikające z terenowego charakteru pracy. Jednym z głównych był niewątpliwski wpływ wprowadzenia antybiotykoterapii na czas utrzymywania się zmian ultrasonograficznych w płucach u leczonych źrebiąt w stosunku do źrebiąt, u których występowały zmiany podkliniczne i nie było podstaw do rozpoczęcia leczenia. Co więcej, kombinacje leków również były modyfikowane w trakcie trwania terapii na podstawie obrazu klinicznego danego źrebięcia oraz występujących objawów niepożądanych, co uniemożliwia ewentualne porównanie skuteczności poszczególnych preparatów. Niemniej, badanie było w stanie wykazać typowy czas pojawienia się zmian ultrasonograficznych, zarówno w postaci klinicznej, jak i podklinicznej u źrebiąt z wybranych stadnin.

Z pewnością wykorzystanie innych narzędzi diagnostycznych również podniosłoby wartość pracy. Badanie radiologiczne klatki piersiowej, przynajmniej raz w trakcie monitorowania konkretnego źrebięcia, umożliwiły bardzo konkretne porównanie dwóch rodzajów technik obrazowych. Niestety, duże zróżnicowanie w dostępności i jakości sprzętu w poszczególnych stadninach oraz bardzo wysoki koszt zakupu aparatu uniemożliwiły przeprowadzenia takiego porównania.

Przypadki rodokokozy pozapłucnej, opisane w ostatniej pracy stanowią bardzo niewielki procent puli przebadanych źrebiąt i niestety, również nie wszystkie zostały potwierdzone badaniem mikrobiologicznym. Na ich podstawie trudno jest więc wysnuć bardziej ogólne wnioski poza rzadkością ich występowania oraz przysparzanymi przez nie trudnościami diagnostycznymi. Z całą pewnością jednak badanie sekcyjne padłych źrebiąt stanowi nieocenione źródło wiedzy na temat problemów zdrowotnych w danej stadninie.

Szczegółowa dyskusja dotycząca wyników pochodzących z poszczególnych prac znajduje się w odpowiadających artykułach.



#### **IV. WNIOSKI**

1. W ośrodkach hodowlanych, w których choroba występuje endemicznie, objawy kliniczne rodokokozy obserwuje się u 25% źrebiąt, a objawy podkliniczne u około 70% źrebiąt w wieku przedodsadzeniowym. Wartości te są zbliżone do opisywanych dotychczas danych literaturowych.
2. Najczęściej występującymi w płucach zmianami, wykrywalnymi w badaniu ultrasonograficznym u źrebiąt w wieku przedodsadzeniowym są kolejno: ropnie, linie B oraz pogrubienie opłucnej i obecność zwiększonej ilości płynu w jamie opłucnej.
3. Stwierdzenie u źrebięcia w badaniu ultrasonograficznym ropnia o średnicy 15 mm lub większej jest powiązane z istotnym zwiększeniem prawdopodobieństwa wystąpienia objawów klinicznych rodokokozy w pierwszych miesiącach życia.
4. W okresie prowadzenia badań, wśród monitorowanych źrebiąt, stwierdzane były pojedyncze przypadki rodokokozy pozapłucnej, ze zmianami w postaci ropni zlokalizowanych najczęściej w przewodzie pokarmowym. Postać ta stanowi duże wyzwanie diagnostyczne w warunkach terenowych ze względu na zróżnicowany przebieg choroby i brak opracowanych rutynowych schematów jej rozpoznawania.



**Publikacje stanowiące rozprawę doktorską**



Review

# Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococciosis

**Alicja Rakowska** <sup>1,\*</sup>, **Anna Cywinska** <sup>2</sup> and **Lucjan Witkowski** <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Department of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa, Poland; lucjan\_witkowski@sggw.edu.pl  
<sup>2</sup> Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, Nowoursynowska 1, 02-787 Warszawa, Poland; anna\_cywinska@sggw.edu.pl  
\* Correspondence: alicja.rakowska@wp.pl

Received: 19 September 2020; Accepted: 14 October 2020; Published: 18 October 2020



**Simple Summary:** Pneumonia caused by soil bacteria *Rhodococcus equi* occurs in the foals of most horse breeds all over the world, posing a significant challenge for veterinary practitioners. For this reason, many researchers constantly try to find new solutions for successful prevention and management of the disease, but it still remains poorly controlled. This paper presents some promising ideas published during the last decade. Several strategies mentioned below have already been introduced to clinical practice like a variety of immune stimulators, but many others are still under academic considerations. The compilation of these materials may help to understand the complexity of the problem and show the directions for effective practice in the future.

**Abstract:** The aim of this review was to summarize studies on equine rhodococciosis over the last decade. For many years *Rhodococcus equi* has remained one of the major health challenges in the equine breeding industry worldwide. Recently, many novel approaches and ideas have been described and some of them were initially implemented into the clinical practice. This study reviews a variety of new information about neonatal susceptibility, clinical appearance, considered and applied diagnostic procedures and treatment alternatives, factors limiting accurate prognosis, ideas regarding environmental management and prophylaxis considerations. Although multiple research were conducted, the main problems such as high morbidity and mortality, a lack of reliable prevention strategies and treatment limitations are still unresolved and require further scientific effort.

**Keywords:** *Rhodococcus equi*; rhodococciosis; foals' pneumonia

## 1. Introduction

Rhodococciosis is one of the major causes of health problems in foals before weaning. Its etiological agent, a well-known, ubiquitous, opportunistic, intracellular soil saprophyte, *Rhodococcus equi*, may be responsible for severe pyogranulomatous bronchopneumonia often leading to deaths of affected foals. Morbidity rates may exceed 40% [1,2] on some farms, but the problem remains strictly endemic and as such in other places it may never occur. Relevant costs of the disease include the high expenses of prevention, antimicrobial treatment and management of the patients but are also suspected to lower probability of successful performance in adulthood [1,3] and finally a loss of foals [4]. Rhodococcal pneumonia presents a clinical and scientific challenge and many aspects still remain unclear. This study is focused on current trends and recently reported solutions aimed to improve the management of equine rhodococciosis.

## 2. Pathogenesis and Virulence

Up to now the virulence of *Rhodococcus equi* is believed to be related mainly with 90 kb virulence associated plasmid (VAP), which contains pathogenicity islands (PAIs) considered responsible for its pathogenic potential [5]. Environmental strains of *Rhodococcus* often do not contain Vaps unlike most of those obtained from clinical patients [6,7]. Among 20 different proteins encoded on PAIs, 6 determine the virulence of a certain strain. Only one of those proteins, virulence associated protein A (*VapA*) for many years has been known as connected with intracellular survival in equine lung alveolar macrophages and subsequent development of clinical pneumonia [8,9]. What has been recently discovered is that there are actually three genes encoding proteins required for intracellular survival and growth, hence implicating death of phagocytic cells. Whereas *vapA* had been confirmed to play a central role in rhodococcal virulence, another two genes, *virR* and *virS*, have been revealed to modify chromosomal transcriptome and allow for intracellular parasitism [5].

## 3. Susceptibility

According to epidemiological data, clinical signs occur in 10–20% of foals in endemic farms in the US [10] but ultrasound evidence of pulmonary lesions have been reported to vary between 30 and 60% [4]. Currently, it is mostly accepted that the foals become infected in the very first moments of life, probably days or even hours due to the presence of *R. equi* in soil, manure and in the airborne dust, which is easily inhaled and can cause infection [6,11,12]. This hypothesis was partially confirmed by one of the clinical studies, where the doses and time of highest susceptibility were checked. The results have shown that neonatal foals were the most susceptible for rhodococcal infection and much more likely to develop clinical evidence of pneumonia even after lower doses of bacteria. Older foals, 3 or 6 weeks of age, were already less susceptible and often did not progress to clinical signs after the same low doses of bacteria [13]. These results revised a partially inadequate approach in many previous studies, where older foals, in their 3rd or 4th week of life, were challenged with high doses of bacteria. This experimental protocol resulted in acute and a very severe form of pneumonia, not common in field conditions after natural exposure, where subclinical or chronic pneumonia with many spontaneous regressions predominate. The aforementioned studies confirmed that *R. equi* infection is strictly age and dose dependent. Susceptibility is the highest in neonates and decreases with age, but high doses of bacteria cause the severe, rapidly progressing form of pneumonia and usually subsequent euthanasia, even in older foals [13]. Pulmonary abnormalities were detectable in all challenged animals. Foals that received lower doses ( $10^2$  cfu or  $10^3$  cfu) developed mostly well-defined hypoechoic lesions whereas those challenged with higher doses ( $10^4$  cfu to  $10^6$  cfu) usually presented large areas of consolidated lungs. All lesions seemed to decrease in size over time. Survival probability peaked significantly for foals challenged later in life (3–6 weeks) or for those infected with lower doses [13]. Although foals between 3 weeks and 8 months of age are 14 times more likely to be infected with *R. equi* than any other bacteria [14], mixed bacterial infections are frequent but not yet linked with worse prognosis [15]. Neither genetic factors [16] nor microbiome and fecal metagenome traits have been confirmed to increase susceptibility [17].

## 4. Clinical Signs

Clinically, rhodococcal pneumonia is a form of lower respiratory tract infection. The most common presentation in foals includes fever, cough, increased respiratory rate and heart rate and abnormal tracheal and lung sounds on auscultation. Nasal discharge may occur in some cases. Progression of pneumonia is insidious and pulmonary lesions may already become quite extensive before the clinical signs appear. On rare occasions, the disease may occur as a peracute form, when previously healthy foals develop respiratory distress, sudden in onset and progressing rapidly to death within less than 48 h. Foals may also manifest extrapulmonary signs of infection with *R. equi*. These manifestations usually include diarrhea, colic and weight loss. Since extrapulmonary pathologies are usually linked

with higher mortality rate [18,19], an early diagnosis is beneficial and should be recommended to improve reliability of the prognosis and treatment possibilities [19,20]. Other extrapulmonary signs are less common and include aseptic and septic inflammations in the joints and abscessations in the eyes [19] or other tissues [18,21,22]. Unfortunately, the disease is quite frequently confirmed at necropsy. Post mortem examination usually reveals pyogranulomatous pneumonia and abscessation of other tissues in the case of the extrapulmonary form, which may refer to as much as 76% of lost foals, which underwent necropsy according to one paper [18]. In acute cases, foamy exudate in trachea and bronchi is observed indicating severe pulmonary oedema.

## 5. Diagnosis

Rhodococcal pneumonia is usually confirmed by the isolation of virulent type of bacteria from tracheobronchial aspirate (TBA) obtained from a foal presenting clinical signs or positive PCR test and detection of radiographic or ultrasonographic signs of pneumonia [23]. Previously, many methods were recommended for diagnosis, including X-rays [1,24–26] or white blood cell count (WBC count) [14,27], however most of them are currently considered ineffective or too labor demanding.

At present, ultrasound is found the easiest and most common for both diagnosis and monitoring of the disease [1,2,28–30]. Among the advantages of ultrasound, the safety for the personnel, short time of testing and data interpretation and availability to screen the animals regularly without causing major stress or health risk should be listed. What is more, this method is more sensitive for the assessment of peripheral lung masses or lesions located in the areas superimposed over any other soft tissues, which are hard to assess radiologically. Ultrasound examination was also mentioned to be suspected of greater usefulness in assessing pleural effusion or lymphadenopathy [1]. On the other hand, not all of the lesions are located superficially so some of them may not be recognized with this technique. The most common ultrasound findings in thorax screening are comet tails, reflecting any fluid or cellular infiltration on the pleura. When they are limited in number and occur ventrally, they are considered clinically irrelevant, however an increased amount mid or cranially located comet tails should be interpreted as pulmonary inflammatory disease [31]. On ultrasonographic examination, abscesses are well-defined hypoechoic nodules, variable in size, whereas consolidated lungs are ill-defined, hypoechoic regions sometimes with visible vessels and/or bronchi [13]. Ultrasound is performed successfully by using any transducer 5–7.5 MHz that fits in between the ribs and wetting the ribcage with alcohol, which makes it available to be performed by the vast majority of field veterinarians. Clipping is usually not necessary. In healthy patients only the pleura can be visualized due to the reflection of ultrasounds by normally aerated lung parenchyma. Pleura is a thin, highly hyperechoic line that looks like it multiplicated due to air reflection, called the reverberation artifact. Lung parenchyma can only be visualized through an acoustic window when fluid or cellular accumulation occurs just below the pleura. The echogenicity of the lesions depends on the presence of cells, fluid or type of nodule and presence of the capsule [32]. One of the field research programs revealed that over 95% of foals without any clinical signs, from the farm with endemic rhodococcosis developed lesions detected on the ultrasound, including pulmonary abscessation or consolidation, diagnosed within the examination period (3–16 weeks of age). Similarly to the challenge with *R. equi* mentioned above, abscesses' size decreased with time. Changes were detected predominantly in the 5th and the 7th week of age [2].

The method generally accepted as golden standard in antemortem diagnosis of *R. equi* is to confirm the presence of bacteria in TBA. However, in one paper 36% of foals positive for post-mortem culture and the same percentage of those positive for radiological or ultrasonographic lesions were negative in the PCR test from TBA [33]. Another paper has reported that *R. equi* was cultured only from up to 54% of the foals presenting ultrasonographical signs of pneumonia, checked during the clinical trials. Nevertheless, in the same trial the presence of *R. equi* was confirmed in all 24 lost foals with ultrasonographic lesions [30]. Possibly some foals can be positive in TBA samples due to subclinical infection or inhalation of the pathogen that does not result in any clinical abnormalities [4].

Moreover, TBA sampling has some significant limitations. The procedure is expensive, invasive and requires attendance of stable staff to handle the animals. Foals usually need sedation during the endoscopic examinations, which creates additional risk and cost for the owner and so that it should not be recommended for multiple use as regular monitoring of the disease [2]. The risk may also be unacceptable for the foals with severe respiratory distress. In addition, microbiological culture takes more than 3 days in total to confirm the presence of the pathogen, which is unacceptably long in severe and often acute disease. On the other hand, TBA culture is much more popular in clinics, where the probability of rhodococcal infection is relatively lower than on endemic farms and a well-equipped laboratory is fully available [14].

Basic parameters routinely used in the diagnosis of equine respiratory diseases are of limited importance in rhodococcosis. One of the recent papers analyzed the results of basic tests performed in the foals presenting respiratory signs during hospitalization [14]. The following parameters were taken into consideration: radiological picture, the presence of bacteria in TBA, temperature, abnormalities in the respiratory rate, pulse, hematocrit, log of WBC and neutrophil counts, number of band neutrophils, monocytes, lymphocytes, eosinophils, total protein, globulins and fibrinogen concentrations. Only four of them: WBC count above 20,000 cells/uL, plasma fibrinogen concentration above 700 mg/dL, Gram + coccobacilli in TBA and radiological evidence of pulmonary abscessation were found suggestive but yet not definitive for rhodococcosis, so they cannot be considered as a single diagnostic tool [14].

Even if some parameters, like acute phase proteins (APPs) concentrations are elevated in most clinically affected foals [13], they do not seem clinically relevant. Fibrinogen is one of the major APPs in horses. Its concentration, although non-specific, is frequently measured as an additional and easily available parameter and is suspected to peak more quickly or highly during development of pneumonia in foals than in most of the other conditions, but still it is neither sensitive nor specific enough [14]. Its concentration is considered to be significantly different between healthy and subclinically affected foals during weekly testing. However, due to the lack of standardized physiological values for foals and a low number of animals analyzed up to now, the method requires further studies [34]. As an alternative, serum amyloid A, also belonging to major APPs in horses, has been proposed. It has been suspected to be more sensitive due to its minimal or undetected concentration in healthy animals and high (more than 100 times) peak in inflammatory conditions [34]. Unfortunately, one paper has shown that clinically healthy foals had elevated levels of SAA without any clinical signs while nearly 30% of foals with bacterial bronchopneumonia had normal SAA levels during the test [35], and others found no significant differences between affected and healthy foals [34,36].

Nasal and fecal swabs are widely considered invalid [4,37], however one paper reported that 54.5% of foals presenting subclinical pulmonary findings were positive for *Rhodococcus equi* vapA in either nasal or fecal swabs or both [2]. What is more, the virulent type of bacteria was identified during the occurrence of ultrasonographic changes or even before them. Up to date there are also no blood tests specific to detect rhodococcal pneumonia. Serology tests have been acclaimed as not useful [14,38]. Trials with five different serological assays have shown low sensitivity in the case of a low cut off point and low specificity when the cut-off point was increased [38].

## 6. Treatment

The most important problems in treating *Rhodococcus equi* infections are the limited number of effective antimicrobial drugs (Table 1) and an increasing resistance. Generally, the number of antibiotic groups used in equine medicine is very restricted and antimicrobial resistance has grown significantly over the last decades [39–41]. Recommendations for treatment strategy were settled a few decades ago but prior to the 2000s reports on resistance were very rare [42]. A similar problem refers to the treatment of equine rhodococcosis and human tuberculosis, also alike due to its intracellular character [11]. There are very few newly discovered antibiotics in the last decades and new substances from the same group are much more likely to be ineffective due to cross-resistance [30]. When it comes to other antimicrobial groups, less frequently used in horses, most of them produce serious adverse reactions, especially in

foals like aminoglycosides (nephrotoxic), fluoroquinolones (arthropathy) or most of tetracyclines (bone deformities) [39]. At last, some drugs for which *Rhodococcus* is generally susceptible (e.g., imipenem and vancomycin [39]) belong to substances that are or should be or may be restricted only for human clinical use [43].

**Table 1.** Antibiotics recommended in equine rhodococcosis.

Active Substance	Dose	Duration of Recommended Treatment	Reference
Rifampicin Erythromycin	5 mg/kg PO 2/daily 25 mg/kg 3/daily	4–9 weeks	[33]
Rifampicin Clarithromycin	5 mg/kg PO 2/daily 7.5 mg/kg 2/daily	3–12 weeks	[4]
Rifampicin Azithromycin	10 mg/kg PO daily 10 mg/kg PO daily	6 weeks	[29]
Doxycycline in monotherapy	10 mg/kg PO 2/day	6 weeks	[44]
Doxycycline Azithromycin	10 mg/kg PO 2/day 5 mg/kg PO daily	6 weeks	[30]
Tulathromycin in monotherapy	2.5 mg/kg IM 1/week	6 weeks	[45]
Gamithromycin in monotherapy	6 mg/kg IM 1/week	6 weeks	[46]

The combination of a macrolide with rifampicin remains the recommended therapy for foals with clinical signs of infection caused by *R. equi* for about 40 years. However, the most recent papers suggest that combining rifampicin with some macrolides like clarithromycin or one of the newest, semi-synthetic macrolide tulathromycin can allow for lowering the effective concentration of rifampicin's in bronchoalveolar cells [40,44,47]. There are also papers suggesting that the use of macrolide as the only antimicrobial treatment (azithromycin or gamithromycin) may be at least equally effective as a standard combination of antibiotics [4,46]. Nevertheless, this approach is suspected to create more risk of increased antimicrobial resistance than combination with rifampicin [48]. Progress in rhodococcosis therapy for many years has been limited only to the implementation of new macrolides. There were no data that could indicate the preferred antimicrobial agent or agents for foals infected with isolates resistant to macrolides or rifampicin. Recently, a combination of doxycycline and azithromycin has been evaluated as equally effective to the standard combination for the cases with mild or moderate pneumonia [30]. Doxycycline is wildly used in veterinary pulmonary issues and in bronchoalveoli it can reach Minimal Inhibitory Concentration for 90% of microorganisms ( $MIC_{90}$ ) for most bacteria responsible for bronchopneumonia in foals. At last, doxycycline combinations seem to have less adverse effects such as diarrhea than rifampicin [30]. Another alternative recently checked for antirhodococcal potential in foals was liposomal gentamicin, which exceeds  $MIC_{90}$  for *Rhodococcus* in bronchoalveolar fluid for over 48 h. Its main disadvantage is a wildly described nephrotoxicity, which considerably shortens the time of safe use. However, long antimicrobial activity in the affected tissues may be a key to modify the administration protocol and its effective use in the future [49].

Other promising results refer to gallium maltololate, a semi metal that mimics ferric iron and can inactivate some iron-dependent enzyme reactions in some bacteria, including *Rhodococcus*, which seems equally effective as a standard antimicrobial therapy for the subclinical form of pneumonia. Unfortunately, this prevention strategy is not commercially available yet [50]. Treatment is generally prolonged, expensive and, what is the worst, sometimes ineffective. Furthermore, the macrolides recommended for *R. equi* infections can cause life-threatening hyperthermia and diarrhea in foals and

fatal colitis in mares. Despite many attempts, solid recommendations for the appropriate moment of implementation of antimicrobial treatment are also unknown. Currently there are two methods for the evaluation of lesions: the Slovis score is based on the maximal diameter of the largest lesion [50,51] and the total maximal diameter (TMD) is based on the total diameter of all detected lesions [37]. However, the cut off point for both scores is also not settled and usually used on the basis of individual clinical experience and changes significantly over time [29]. Surprisingly, in the last decade, it has been shown that in the foals with clinical signs and abscess score (based on the total lesions' diameter) lower than 11 cm (2013–2015) or even 15 cm (2016) the treatment may not be necessary (Table 2). What is more, a lack of treatment in these cases did not increase mortality rates in the corresponding year [29], but a percentage of foals treated with antimicrobials decreased significantly from 81.9% in 2008–2011 to 50.9% in 2012–2016 [29]. Similarly, failures of treatments and recurrences of pulmonary abscess decreased over the mentioned periods. In other studies, one farm was able to decrease antimicrobial use for nearly 80% without increasing mortality rates [45,46].

**Table 2.** Changes in size of the lesion recommended for treatment over time.

Size of the Lesion	Year	Reference
≥10 mm *	2004	[51]
≥21 mm *	2005	[51]
≥80 mm ^	2012	[29]
≥100 mm ^	2014	[29]

\*—according to the Slovis score; ^—according to the total maximal diameter (TMD).

Early detection of subclinical findings and temporary implementation of an antimicrobial treatment to these foals seemed a valuable method to prevent clinical onset and mortality due to *Rhodococcus* pneumonia. The prophylaxis with macrolides was reported over a decade ago [52]. However, decades of widespread overuse of antibiotics in control and prevention programs implemented at breeding farms created another problem—increasing resistance to macrolides and rifampicin in equine *R. equi* isolates. Many authors have suggested that when ultrasound screening became more popular, the use of antimicrobial preventive treatment increased at many farms, which may contribute to significant increase of antimicrobial resistance during the last twenty years [53,54]. It should be highlighted that in most of the cases spontaneous regression of the lesions occurs without any treatment [4,28,29,44] and may refer even to all foals affected subclinically [2,30,44]. A recent epidemiological study identified that 76% of isolates from the tested farms were resistant to either one or both antimicrobials [42] and showed an alarming increase of nearly 15% during the last 10 years [53]. On the other hand, most of the papers mentioned decrease in the mortality rates due to antimicrobial treatment. It is also not clear if the resistance occurs only on endemic farms or results from increased use of rifampicin and macrolides in human medicine. Regardless of the cause, widespread dissemination of resistance genes in the environment where many other pathogenic bacteria exist is a concern for both animal and human health [53]. Additionally, in one study only 55% of coexisting bacteria were susceptible to erythromycin and/or rifampicin. It creates additional risk of stimulating bacterial resistance in species other than *Rhodococcus*, especially considering the fact that about 65% of the infections reported in this paper were of mixed origin [14]. On the other hand, some research did not find an association between mixed bacteria infection and the severity of radiographic findings [1].

## 7. Prognosis

The prognosis seems to depend partially on the severity of the clinical signs. Some authors reported that survival rate increased from 20% before use of the combined treatment to about 80% currently [18,33]. Generally, a successful treatment is estimated for 60–70% [15,51,55]. There is

also one record claiming nearly 100% success when both ultrasound screening and antimicrobial prophylaxis for foals with pulmonary changes were used [56]. Unfortunately, there are no methods to distinguish between the foals that require treatment and spontaneous regressors yet. During radiological evaluation, the presence and number of cavitary lesions and nodules claimed to be helpful in distinguishing survivors and non-survivors [1].

## 8. Environmental Management

Several factors positively correlating with increased bacteria concentration in inhaled air have been suspected to influence the morbidity rates, e.g., density of mares and foals, higher mean temperatures, less soil moisture, reduced grass height or late foaling season. A previously suspected theory that rhodococcosis is more popular or even restricted to areas with warmer climate was generally proven to be wrong [34,47]. In another paper, a correlation between the month of birth and probability of developing subclinical lesions has been explained by environmental reasons [57]. Some practitioners consider lime as a limiting factor due to prolonged influence on maintaining higher soil pH, whereas *Rhodococcus* prefers a more acidic environment [47].

Another interesting hypothesis claims a correlation between dietary management and the severity of some bacterial infections. Preliminary studies revealed that high protein and high carbohydrate diet may lead to development or exacerbation of clinical signs in one of the most popular equine bacterial diseases—strangles [58]. A more recent paper describes the relation between an excessive diet and its influence on the production of cell wall polysaccharides, which are one of the major pathogenicity factors in many bacteria, including *Streptococcus*, *Pasteurella* and *Clostridium* but also *Rhodococcus* [59]. Since the equine gastrointestinal tract and gut microbiota effectively uses food very high in fiber, an overnutritious diet may trigger intestinal dysbiosis and eventually diminish natural immunity [59]. This finding may bring partial explanation of a wide variety of clinical manifestations among different studs and breeding seasons. Unfortunately, no environmental management practice has been reported as effective enough to be strongly recommended for the control of the disease yet [4].

On the other hand, some papers indicate a higher risk of rhodococcal pneumonia in foals exposed to higher air concentrations of pathogens in their first two weeks of life [12]. Moreover, in older foal concentrations of fecal shedding seems higher, which in turn may affect airborne concentrations, posing a significant risk for the younger ones [47]. Another study has shown that after the intratracheal challenge, 3–4 week old foals developed clinical symptoms and *R. equi* shedding increased in both the foals and their mothers, regardless of the dose of inoculation. These results have proven a significant role of infected foals but also their dams in increasing the airborne concentration of *Rhodococcus* in the environment, which may have yet an undetected effect on the prevalence of the disease. What is more, the same study confirmed a significant decrease of bacteria number in equine manure after standard composting for 7 days, which can also be taken into consideration as a future recommendation for environmental practices [60].

## 9. Inhibitory Compounds

The newest techniques of genome sequencing may help to turn antirhodococcal strategies into a new direction. The recent studies have revealed the genes responsible for secondary metabolites, which may not occur in standard laboratory conditions but have strong inhibitory effects on most of the *Rhodococcus* strains tested up to date. Based on the molecular mass the molecular composition was postulated to be C<sub>52</sub>H<sub>78</sub>O<sub>13</sub>. What is more *R. equi* seemed to be particularly sensitive for these newly discovered molecules. Surprisingly, this new substance was detected when selected isolates of soil *Rhodococcus* were grown in the temperatures below 22 °C. Thus, it may pose at least a partial explanation for some field observations regarding a higher prevalence of rhodococcal infections during warmer months or in warmer climates, when inhibitory molecules are not produced. These novel metabolites may be the key to the future environmental management of *Rhodococcus* but require further attention and research [61].

## 10. Prevention Strategies

According to clinical data, there is no prevention strategy effective enough against rhodococcosis, although many methods have been considered [41,52,56,62]. Due to the structure of equine placenta, foals are born immunologically naive and need to gain a maternal antibody via colostrum [63]. Thus, the quality of colostrum, its amount and time of first suckling are absolutely essential for a neonates' immunity. Prevention of rhodococcal pneumonia can be partially obtained by administration of hyperimmune plasma (HIP), which is a standard procedure in many breeding farms in US [4,57]. It is believed to reduce the severity of pneumonia in foals after the experimental challenge or natural exposure, but it creates some risk due to intravenous administration and it seems not to be fully effective in prevention of developing clinical signs in general. The efficacy of HIP administration is still controversial, as it has not been proven as 100% effective [4]. Commercially available plasma in the US is quite expensive and its quality is not standardized due to individual differences of donor horses and diversity of *Rhodococcus equi* strains in particular areas. Even if general IgG concentrations were similar, specific anti-VapA ones varied among samples [64]. Some of the latest papers also indicated that the effectiveness of this strategy might be dose-dependent, because 2 L of HIP was more beneficial than administration of 1 L or less of the same product [57]. What is more, when two methods: vaccination of mares and administration of HIP were used, clinical sings in the foals occurred later, were less severe and mortality rate was lower [65]. As it has been previously confirmed, clinical signs of pneumonia in foals can be associated with significantly higher fecal shedding of *Rhodococcus equi*. Administration of hyperimmune plasma has become a recommended solution despite its poorly understood mechanisms of action, because it decreased the severity of the clinical signs of pneumonia, but also seemed to decrease the overall risk by lowering the level of shedding by affected foals [64].

Vaccinations against *R. equi* are wildly awaited and often considered a form of prophylaxis. Unfortunately, despite many trials none of them was claimed effective enough to become commercially available [65]. Up to now there are no vaccinations available neither for mares nor for the foals [62]. In some countries different types of autogenous vaccines are used [66]. Many different methods have been used for mares and foals immunization thus far and some of them provided even encouraging results during preliminary study on a small research group. A promising method of inactivation of *Rhodococcus* using an electron beam in the foal vaccine has been recently proposed. The eBeam inactivation allows the maintenance of the outer cell wall integrity crucial in promoting the immune response [62,67]. Unfortunately, there were neither significant improvement in regard to the severity and durability of the infection nor desirable changes in both systemic and mucosal immune responses [37]. However, immunization of mares with the eBeam vaccine seems worthy to consider in the future.

Another recent study concerned a vaccine based on highly conserved microbial surface polysaccharide, which is expressed on some intracellular pathogens including *Rhodococcus*. To promote the cell mediated response, which was suspected to be protective in foals, the researchers tried to vaccinate mares against poly-N-acetyl glucosamine (PNAG). Most foals from vaccinated dams did not develop clinical signs of the disease whereas unvaccinated dams gave birth to foals, which the majority developed pneumonia after being challenged with *Rhodococcus equi* in the 4th week of life. Foals from vaccinated mares presenting clinical signs had also shorter and less severe clinical onset and smaller and fewer ultrasonographic lesions. The major weakness of this study design was challenging foals at 25th–28th days of age, which is too late to mimic the naturally occurring infection [68]. What is more, foals challenged after administration of hyperimmune plasma from mares vaccinated against PNAG that would mimic colostral antibody transfer presented similar results and seemed to be more resistant to the disease and also did not present clinical sings whereas the control group of foals that received normal plasma developed signs of pneumonia.

## 11. Conclusions

*Rhodococcus equi* infection in foals is a very well known and widely described problem, but there is still a lot of significant information missing. Hence, new ideas are still welcome and carefully

examined as a potential key factor responsible for proper solutions. Since the majority of current recommendations are not completely satisfying in the field, further research is extremely necessary. Considerations regarding risk factors and predispositions, immunoprophylaxis, especially effective vaccinations or immunostimulants like HIP and, at last, methods of successful management and treatment are likely to be the main scientific goals for the future.

**Funding:** This study received no external funding.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Giguère, S.; Roberts, G.D. Association between Radiographic Pattern and Outcome in Foals with Pneumonia Caused by *Rhodococcus Equi*. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2012**, *53*, 601–604. [[CrossRef](#)]
2. Huber, L.; Gressler, L.T.; Sanz, M.G.; Garbade, P.; Vargas, Á.; Silveira, B.P. Monitoring Foals by Thoracic Ultrasonography, Bacterial Culture, and PCR: Diagnostic of *Rhodococcus Equi* Subclinical Pneumonia in South of Brazil. *J. Equine Vet. Sci.* **2018**, *60*, 104–108.e1. [[CrossRef](#)]
3. Treloar, S.K.; Dhand, N.K.; Muscatello, G. Rhodococcus Equi Pneumonia and Future Racing Performance of the Thoroughbred. *J. Equine Vet. Sci.* **2012**, *32*, S16–S17. [[CrossRef](#)]
4. Giguère, S.; Cohen, N.D.; Keith Chaffin, M.; Slovis, N.M.; Hondalus, M.K.; Hines, S.A.; Prescott, J.F. Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus Equi* in Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 1209–1220. [[CrossRef](#)]
5. Coulson, G.B.; Miranda-CasoLuengo, A.A.; Miranda-CasoLuengo, R.; Wang, X.; Oliver, J.; Willingham-Lane, J.M.; Meijer, W.G.; Hondalus, M.K. Transcriptome Reprogramming by Plasmid-Encoded Transcriptional Regulators Is Required for Host Niche Adaption of a Macrophage Pathogen. *Infect. Immun.* **2015**, *83*, 3137–3145. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Cohen, N.D.; Carter, C.N.; Scott, H.M.; Chaffin, M.K.; Smith, J.L.; Grimm, M.B.; Kuskie, K.R.; Takai, S.; Martens, R.J. Association of Soil Concentrations of *Rhodococcus Equi* and Incidence of Pneumonia Attributable to *Rhodococcus Equi* in Foals on Farms in Central Kentucky. *Am. J. Vet. Res.* **2008**, *69*, 385–395. [[CrossRef](#)]
7. Witkowski, L. Treatment and prevention of *Rhodococcus equi* in foals. *Vet. Rec.* **2019**, *185*, 16–18. [[CrossRef](#)]
8. Hondalus, M.K.; Mosser, D.M. Survival and Replication of *Rhodococcus equi* in Macrophages. *Infect. Immun.* **1994**, *62*, 4167–4175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rofe, A.P.; Davis, L.J.; Whittingham, J.L.; Latimer-Bowman, E.C.; Wilkinson, A.J.; Pryor, P.R. The Rhodococcus Equi Virulence Protein VapA Disrupts Endolysosome Function and Stimulates Lysosome Biogenesis. *Microbiol. Open* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
10. Chaffin, M.K.; Cohen, N.D.; Martens, R.J. Evaluation of Equine Breeding Farm Management and Preventative Health Practices as Risk Factors for Development of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2003**, *222*, 476–485. [[CrossRef](#)]
11. Vázquez-Boland, J.A.; Giguère, S.; Hapeshi, A.; MacArthur, I.; Anastasi, E.; Valero-Rello, A. Rhodococcus Equi: The Many Facets of a Pathogenic Actinomycete. *Vet. Microbiol.* **2013**, *167*, 9–33. [[CrossRef](#)]
12. Cohen, N.D.; Chaffin, M.K.; Kuskie, K.R.; Syndergaard, M.K.; Blodgett, G.P.; Takai, S. Association of Perinatal Exposure to Airborne *Rhodococcus equi* with Risk of Pneumonia Caused by *R. Equi* in Foals. *Am. J. Vet. Res.* **2013**, *74*, 102–109. [[CrossRef](#)]
13. Sanz, M.; Loynachan, A.; Sun, L.; Oliveira, A.; Breheny, P.; Horohov, D.W. The Effect of Bacterial Dose and Foal Age at Challenge on *Rhodococcus equi* Infection. *Vet. Microbiol.* **2013**, *167*, 623–631. [[CrossRef](#)]
14. Leclerc, M.; Magdesian, K.G.; Kass, P.H.; Pusterla, N.; Rhodes, D.M. Comparison of the Clinical, Microbiological, Radiological and Haematological Features of Foals with Pneumonia Caused by Rhodococcus Equi and Other Bacteria. *Vet. J.* **2011**, *187*, 109–112. [[CrossRef](#)]
15. Giguère, S.; Jordan, L.M.I.; Glass, K.; Cohen, N.D. Relationship of Mixed Bacterial Infection to Prognosis in Foals with Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi*. *J. Vet. Intern. Med.* **2012**, *26*, 1443–1448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Mcqueen, C.M.; Dindot, S.V.; Foster, M.J.; Cohen, N.D. Genetic Susceptibility to *Rhodococcus equi*. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 1648–1659. [[CrossRef](#)]

17. Whitfield-Cargile, C.M.; Cohen, N.D.; Suchodolski, J.; Chaffin, M.K.; McQueen, C.M.; Arnold, C.E.; Dowd, S.E.; Blodgett, G.P. Composition and Diversity of the Fecal Microbiome and Inferred Fecal Metagenome Does Not Predict Subsequent Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *PLoS ONE* **2015**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Reuss, S.M.; Chaffin, M.K.; Cohen, N.D. Extrapulmonary Disorders Associated with *Rhodococcus Equi* Infection in Foals: 150 Cases (1987–2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *235*, 855–863. [[CrossRef](#)]
19. Tarancón, I.; Leiva, M.; Jose-Cunilleras, E.; Ríos, J.; Peña, T. Ophthalmologic Findings Associated with *Rhodococcus equi* Bronchopneumonia in Foals. *Vet. Ophthalmol.* **2019**, *22*, 660–665. [[CrossRef](#)]
20. Reuss, S.M.; Chaffin, M.K.; Schmitz, D.G.; Norman, T.E. Sonographic Characteristics of Intraabdominal Abscessation and Lymphadenopathy Attributable to *Rhodococcus equi* Infections in Foals. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2011**, *52*, 462–465. [[CrossRef](#)]
21. Reuss, S.M. Extrapulmonary Disorders Associated with *Rhodococcus equi* Infections. *Equine Vet. Educ.* **2016**, *28*, 193–195. [[CrossRef](#)]
22. Morresey, P.R.; Garrett, K.S.; Carter, D. *Rhodococcus equi* Occipital Bone Osteomyelitis, Septic Arthritis and Meningitis in a Neurological Foal. **2011**, *23*, 398–402. [[CrossRef](#)]
23. Hines, M.T. *Rhodococcus equi* in Equine Infectious Diseases, 2nd ed.; Sellon, D.C., Long, M.T., Eds.; Elsevier: St. Louis, MO, USA, 2014; p. 294. ISBN 978-1-4557-0891-8.
24. Giguère, S.; Prescott, J.F. Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention of *Rhodococcus equi* Infections in Foals. *Vet. Microbiol.* **1997**, *56*, 313–334. [[CrossRef](#)]
25. Bedenice, D.; Heuwieser, W.; Brawer, R.; Solano, M.; Rand, W.; Paradis, M.R. Clinical and Prognostic Significance of Radiographic Pattern, Distribution, and Severity of Thoracic Radiographic Changes in Neonatal Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2003**, *17*, 876–886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Bedenice, D.; Heuwieser, W.; Solano, M.; Rand, W.; Paradis, M.R. Risk Factors and Prognostic Variables for Survival of Foals with Radiographic Evidence of Pulmonary Disease. *J. Vet. Intern. Med.* **2003**, *17*, 868–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Giguère, S.; Hernandez, J.; Gaskin, J.; Miller, C.; Bowman, J.L. Evaluation of White Blood Cell Concentration, Plasma Fibrinogen Concentration, and an Agar Gel Immunodiffusion Test for Early Identification of Foals with *Rhodococcus Equi* Pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2003**, *222*, 775–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Giguère, S.; Cohen, N.D. Controversies in Therapy of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *Equine Vet. Educ.* **2018**, *30*, 336–341. [[CrossRef](#)]
29. Arnold-Lehna, D.; Venner, M.; Berghaus, L.J.; Berghaus, R.; Giguère, S. Changing Policy to Treat Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia in the Later Course of Disease Decreases Antimicrobial Usage without Increasing Mortality Rate. *Equine Vet. J.* **2019**. [[CrossRef](#)]
30. Wetzig, M.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of the Combination of Doxycycline and Azithromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *Equine Vet. J.* **2019**. [[CrossRef](#)]
31. Rantanen, N.W. *Evaluation of the Respiratory System. Equine Diagnostic Ultrasonography*; Williams Wilkins: Baltimore, MD, USA, 1998.
32. Ramirez, S.; Lester, G.D.; Roberts, G.R. Diagnostic Contribution of Thoracic Ultrasonography in 17 Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2004**, *45*, 172–176. [[CrossRef](#)]
33. Hillidge, C.J. Use of Erythromycin-Rifampin Combination in Treatment of *Rhodococcus equi* Pneumonia. *Vet. Microbiol.* **1987**, *14*, 337–342. [[CrossRef](#)]
34. Passamonti, F.; Vardi, D.M.; Stefanetti, V.; Marenzoni, M.L.; Prato, S.; Cévese, P.; Coletti, M.; Pepe, M.; Casagrande Proietti, P.; Olea-Popelka, F. *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals: An Assessment of the Early Diagnostic Value of Serum Amyloid A and Plasma Fibrinogen Concentrations in Equine Clinical Practice. *Vet. J.* **2015**, *203*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Giguère, S.; Berghaus, L.J.; Miller, C.D. Clinical Assessment of a Point-of-Care Serum Amyloid A Assay in Foals with Bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 1338–1343. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Cohen, N.D.; Chaffin, M.K.; Vandenplas, M.L.; Edwards, R.F.; Nevill, M.; Moore, J.N.; Martens, R.J. Study of Serum Amyloid A Concentrations as a Means of Achieving Early Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia. *Equine Vet. J.* **2010**, *37*, 212–216. [[CrossRef](#)]
37. Madrigal, R.G.; Shaw, S.D.; Witkowski, L.A.; Sisson, B.E.; Blodgett, G.P.; Chaffin, M.K.; Cohen, N.D. Use of Serial Quantitative PCR of the VapA Gene of *Rhodococcus equi* in Feces for Early Detection of R. Equi Pneumonia in Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 664–670. [[CrossRef](#)]

38. Giguère, S.; Hernandez, J.; Gaskin, J.; Prescott, J.F.; Takai, S.; Miller, C. Performance of Five Serological Assays for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2003**, *10*, 241–245. [CrossRef] [PubMed]
39. Giguère, S.; Berghaus, L.J.; Willingham-Lane, J.M. Antimicrobial Resistance in *Rhodococcus Equi*. *Microbiol. Spectr.* **2017**. [CrossRef]
40. Mercer, M.A.; Davis, J.L. Clinical Insights: Antimicrobials in an Age of Resistance. *Equine Vet. J.* **2019**, *51*, 711–713. [CrossRef]
41. Witkowski, L.; Rzewuska, M.; Taikai, S.; Chrobak-Chmiel, D.; Kizerwetter-Świda, M.; Feret, M.; Gawryś, M.; Witkowski, M.; Kita, J. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horses in Poland: pVapA characteristics and plasmid new variant, 85-kb type V. *BMC Vet. Res.* **2017**, *13*, 35. [CrossRef]
42. Huber, L.; Giguère, S.; Cohen, N.D.; Slovis, N.M.; Hanafi, A.; Schuckert, A.; Berghaus, L.; Greiter, M.; Hart, K.A. Prevalence and Risk Factors Associated with Emergence of *Rhodococcus equi* Resistance to Macrolides and Rifampicin in Horse-Breeding Farms in Kentucky, USA. *Vet. Microbiol.* **2019**, *235*, 243–247. [CrossRef]
43. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine-6th Revision 2018 Ranking of Medically Important Antimicrobials for Risk Management of Antimicrobial Resistance Due to Non-Human Use. Available online: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/312266/9789241515528-eng.pdf?ua=1>. (accessed on 18 October 2020).
44. Venner, M.; Astheimer, K.; Lämmer, M.; Giguère, S. Efficacy of Mass Antimicrobial Treatment of Foals with Subclinical Pulmonary Abscesses Associated with *Rhodococcus equi*. *J. Vet. Intern. Med.* **2013**, *27*, 171–176. [CrossRef]
45. Rutenberg, D.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of Tulathromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2017**, *31*, 901–906. [CrossRef]
46. Hildebrand, F.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of Gamithromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 333–338. [CrossRef]
47. Cauchard, S.; Giguère, S.; Venner, M.; Muscatello, G.; Cauchard, J.; Cohen, N.D.; Haas, A.; Hines, S.A.; Hondalus, M.K.; Horohov, D.W.; et al. *Rhodococcus equi* Research 2008–2012: Report of the Fifth International Havemeyer Workshop. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 523–526. [CrossRef]
48. Berghaus, L.J.; Giguère, S.; Guldbech, K. Mutant Prevention Concentration and Mutant Selection Window for 10 Antimicrobial Agents against *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* **2013**, *166*, 670–675. [CrossRef] [PubMed]
49. Cohen, N.D.; Giguère, S.; Burton, A.J.; Rocha, J.N.; Berghaus, L.J.; Brake, C.N.; Bordin, A.I.; Coleman, M.C. Use of Liposomal Gentamicin for Treatment of 5 Foals with Experimentally Induced *Rhodococcus equi* Pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 322–325. [CrossRef] [PubMed]
50. Cohen, N.D.; Slovis, N.M.; Giguère, S.; Baker, S.; Chaffin, M.K.; Bernstein, L.R. Gallium Maltolate as an Alternative to Macrolides for Treatment of Presumed *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 932–939. [CrossRef] [PubMed]
51. McCracken, J.L.; Slovis, N.M.; Acvim, D. Use of Thoracic Ultrasound for the Prevention of *Rhodococcus equi* Pneumonia on Endemic Farms. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **2009**, *55*, 38–44.
52. Chaffin, M.K.; Cohen, N.D.; Martens, R.J. Chemoprophylactic Effects of Azithromycin against *Rhodococcus equi*-Induced Pneumonia among Foals at Equine Breeding Farms with Endemic Infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2008**, *232*, 1035–1047. [CrossRef]
53. Huber, L.; Giguère, S.; Slovis, N.M.; Carter, C.N.; Barr, B.S.; Cohen, N.D.; Elam, J.; Erol, E.; Locke, S.J.; Phillips, E.D.; et al. Emergence of Resistance to Macrolides and Rifampin in Clinical Isolates of *Rhodococcus Equi* from Foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *63*. [CrossRef]
54. Burton, A.J.; Giguère, S.; Sturgill, T.L.; Berghaus, L.J.; Slovis, N.M.; Whitman, J.L.; Levering, C.; Kuskie, K.R.; Cohen, N.D. Macrolide- and Rifampin-Resistant *Rhodococcus equi* on a Horse Breeding Farm, Kentucky, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 282–285. [CrossRef]
55. Giguère, S.; Jacks, S.; Roberts, G.D.; Hernandez, J.; Long, M.T.; Ellis, C. Retrospective Comparison of Azithromycin, Clarithromycin, and Erythromycin for the Treatment of Foals with *Rhodococcus Equi* Pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2004**, *18*, 568–573. [CrossRef]
56. Venner, M.; Reinhold, B.; Beyerbach, M.; Feige, K. Efficacy of Azithromycin in Preventing Pulmonary Abscesses in Foals. *Vet. J.* **2009**, *179*, 301–303. [CrossRef] [PubMed]

57. Kahn, S.K.; Blodgett, G.P.; Canaday, N.M.; Bevevino, K.E.; Rocha, J.N.; Bordin, A.I.; Cohen, N.D. Transfusion With 2 L of Hyperimmune Plasma Is Superior to Transfusion of 1 L or Less for Protecting Foals Against Subclinical Pneumonia Attributed to *Rhodococcus equi*. *J. Equine Vet. Sci.* **2019**, *79*, 54–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Swerczek, T.W. Pathogenesis, Treatment, and Control of Streptococcus Equi Infection (Strangles) in Horses. In Proceedings of the First Annual Eastern States Veterinary Conference, Orland, FL, USA, 18 January 1984.
59. Walter Swerczek, T. Exacerbation of Streptococcus Equi (Strangles) by Overly Nutritious Diets in Horses: A Model for Infectious Bacterial Diseases of Horses and Other Livestock. *Anim. Vet. Sci.* **2019**, *7*, 18. [[CrossRef](#)]
60. Huber, L.; Giguère, S.; Berghaus, L.J.; Hanafi, A.; Ryan, C. Fecal Shedding of *Rhodococcus equi* in Mares and Foals after Experimental Infection of Foals and Effect of Composting on Concentrations of R. Equi in Contaminated Bedding. *Vet. Microbiol.* **2018**, *223*, 42–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Ward, A.L.; Reddyvari, P.; Borisova, R.; Shilabin, A.G.; Lampson, B.C. An Inhibitory Compound Produced by a Soil Isolate of Rhodococcus Has Strong Activity against the Veterinary Pathogen R. EQUI. *PLoS ONE* **2018**, *13*. [[CrossRef](#)]
62. Rocha, J.N.; Cohen, N.D.; Bordin, A.I.; Brake, C.N.; Giguère, S.; Coleman, M.C.; Alaniz, R.C.; Lawhon, S.D.; Mwangi, W.; Pillai, S.D. Oral Administration of Electron-Beam Inactivated *Rhodococcus equi* Failed to Protect Foals against Intrabronchial Infection with Live, Virulent R. Equi. *PLoS ONE* **2016**, *11*. [[CrossRef](#)]
63. Perkins, G.A.; Wagner, B. The Development of Equine Immunity: Current Knowledge on Immunology in the Young Horse. *Equine Vet. J.* **2015**, *47*, 267–274. [[CrossRef](#)]
64. Sanz, M.G.; Loynachan, A.; Horohov, D.W. *Rhodococcus equi* Hyperimmune Plasma Decreases Pneumonia Severity after a Randomised Experimental Challenge of Neonatal Foals. *Vet. Rec.* **2016**, *178*, 261. [[CrossRef](#)]
65. Erganis, O.; Sayin, Z.; Hadimli, H.H.; Sakmanoglu, A.; Pinarkara, Y.; Ozdemir, O.; Maden, M. The Effectiveness of Anti- R. Equi Hyperimmune Plasma against R. Equi Challenge in Thoroughbred Arabian Foals of Mares Vaccinated with R. Equi Vaccine. *Sci. World J.* **2014**, *2014*. [[CrossRef](#)]
66. Witkowski, L.; Kaba, J.; Rzewuska, M.; Nowicki, M.; Szaluu-Jordanow, O.; Kita, J. Development of ELISA Test for Determination of the Level of Antibodies against *Rhodococcus equi* in Equine Serum and Colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2012**, *149*, 280–285. [[CrossRef](#)]
67. Bordin, A.I.; Pillai, S.D.; Brake, C.; Bagley, K.B.; Bourquin, J.R.; Coleman, M.; Oliveira, F.N.; Mwangi, W.; McMurray, D.N.; Love, C.C.; et al. Immunogenicity of an Electron Beam Inactivated *Rhodococcus equi* Vaccine in Neonatal Foals. *PLoS ONE* **2014**, *9*. [[CrossRef](#)]
68. Cywes-Bentley, C.; Rocha, J.N.; Bordin, A.I.; Vinacur, M.; Rehman, S.; Zaidi, T.S.; Meyer, M.; Anthony, S.; Lambert, M.; Vlock, D.R.; et al. Antibody to Poly-N-Acetyl Glucosamine Provides Protection against Intracellular Pathogens: Mechanism of Action and Validation in Horse Foals Challenged with *Rhodococcus equi*. *PLoS Pathog.* **2018**, *14*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



OPEN

## Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis

Alicja Rakowska<sup>✉</sup>, Michał Czopowicz, Andrzej Bereznowski & Lucjan Witkowski

*Rhodococcus equi* is a widely recognized bacterium responsible for pneumonia in preweaned foals. On endemic farms, foals with a subclinical course of the disease usually outnumber those presenting clinical signs. The disease is typically chronic and mainly manifests as fever and dyspnoea. Currently, field diagnosis is often based on lung ultrasound (LUS); however, both diagnostic and therapeutic approaches vary among practitioners and considerably change over time. This longitudinal, prospective study was designed to describe the appearance and progression of rhodococcal pulmonary lesions during the first months of life based on LUS and to evaluate the relationship between the presence and severity of rhodococcal pulmonary lesions and the occurrence of respiratory clinical signs in foals from farms with endemic *R. equi* infections. Nearly 26% of foals demonstrated respiratory signs highly suggestive of pulmonary rhodococcosis, and approximately 70% of the foals had abnormalities detected on LUS without concurrent clinical signs. The appearance and development of LUS abnormalities were age-related. An abscess diameter exceeding 15 mm in LUS and other pleural lesions were significantly linked with the occurrence of clinical signs suggestive of pulmonary rhodococcosis ( $P < 0.001$ ) and may be considered predictive factors of rhodococcal pneumonia in foals.

*Rhodococcus equi* is an opportunistic, ubiquitous, intracellular, gram-positive pathogen responsible for pyogranulomatous pneumonia in preweaned foals<sup>1,2</sup>. The disease mostly occurs sporadically; however, some breeding farms suffer from endemic rhodococcosis, possibly due to favourable environmental and management conditions<sup>1,2</sup>. The main clinical signs are fever, lethargy and decreased appetite, ill-thrift, intermittent cough, and respiratory distress. Rhodococcal pneumonia usually takes a chronic, rarely subacute or acute course, with a large proportion of subclinical cases<sup>3–5</sup>.

The increasing popularity of lung ultrasound (LUS) screening of foals before weaning has improved the ability to identify foals with subclinical pulmonary rhodococcosis in equine practice. The highest prevalence of LUS abnormalities was estimated at 92% and described in 2010 in one of the German breeding farms<sup>3</sup> and 95% in southern Brazil<sup>4</sup>; however, the relationship between LUS abnormalities and the risk of developing clinical pneumonia has not been established. To date, most of the clinical studies on *R. equi* infection in foals are focused on establishing diagnostic criteria for treatment implementation<sup>6</sup>. Two scores were proposed to evaluate the severity of LUS abnormalities and recommend therapy: total maximal diameter (TMD) based on the total diameter of all detected lesions<sup>6,7</sup> and the Slovis score based on the maximal diameter of the largest detected lesion<sup>5</sup>. Recommendations for therapy considering both scores have changed significantly over the past decade. Nevertheless, in many countries, the most common practice in field settings remains to start treatment at the onset of clinical signs<sup>8–10</sup>.

Epidemiological data regarding rhodococcosis are still limited and are mainly restricted to a few studies from large equine breeding farms. In studies from Texas, 17% of foals were diagnosed as clinically affected, 63% as subclinical cases, and 20% as unaffected<sup>5</sup>. In a very recent paper including 5 farms over 3 breeding seasons in North America, the cumulative incidence of clinical rhodococcosis was estimated at 5%<sup>11</sup>. In another study, 27% of foals on a large American Quarter Horse farm in Texas were diagnosed with rhodococcal pneumonia,

Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences–SGGW, Nowoursynowska 159C, 02-776 Warsaw, Poland. <sup>✉</sup>email: alicja\_rakowska@sggw.edu.pl

with a mortality rate of 4%<sup>8</sup>. The previous epidemiological data from 12 stud farms in central and eastern Poland estimated the clinical prevalence at 5–10% and the mortality rate at 3–7%<sup>12</sup>. Considerable seasonal variations and very divergent morbidity and mortality in endemic farms are observed.

Our study was designed to (i) investigate the progression of rhodococcal pulmonary lesions in foals during the first 4 months of life, (ii) evaluate the relationship between the appearance and presence of rhodococcal pulmonary lesions in LUS examination and the occurrence of respiratory clinical signs, and (iii) evaluate the diagnostic potential of clinical signs in pulmonary rhodococcosis.

## Materials and methods

### Study population

The study was carried out during 3 breeding seasons from 2019 to 2021, and foals born on 5 Polish farms (A to E, 4 national studs and one private horse farm) were enrolled. Two farms (A and B) participated in the study for the entire period: foals from one were enrolled during two breeding seasons (C in 2019 and 2020), and foals from two were enrolled during one breeding season (D in 2020 and E in 2021). Four farms (A–D) were considered endemic based on the history of multiple *R. equi* infections confirmed either by postmortem sampling (mostly) or bronchoalveolar lavage sampling and positive microbiological cultures during over a decade of cooperation with the university \*(since 2002). The endemic status of the fifth farm has not yet been confirmed.

The study population included 185 foals, 87 colts (47.0%) and 98 fillies (53.0%), of 3 breeds—85 Pure Arabians (45.9%), 63 Polish Anglo-Arabians (34.1%), and 37 Thoroughbreds (20.0%). The sex distribution did not differ between farms ( $P = 0.245$ ). Four farms included only one breed of horses, and one farm consisted of 2 breeds: Pure Arabians and Polish Anglo-Arabians (Table 1). The study population was considered representative of the Polish population of foals aged up to 4 months kept in studs affected by pulmonary rhodococcosis.

Three farms (A–C) participated in a voluntary screening program established by the Department of Veterinary Epidemiology and Economics (Institute of Veterinary Medicine, SGGW, Poland) with the objective of improving and promoting noninvasive and widely available field identification of foals affected by clinical or subclinical pulmonary rhodococcosis based on clinical and LUS examination. All the participating farms practised internal parasite control and followed vaccination protocols against infections with equine influenza virus and equine herpesvirus type 1 and 4 in pregnant mares.

### Screening schedule and procedures

The foals were examined approximately every two weeks between the 2nd week and 4th month of life. In total, 797 examinations were performed; however, the number of examinations each foal underwent varied considerably, with 107 foals (57.9%) examined 5 to 7 times, 35 foals (18.9%) examined 3 or 4 times, and 43 foals (23.2%) examined only once or twice (Table S1). The number of examinations of individual foals varied due to practical problems with cooperation between the stable personnel, stable attending veterinarian, stable manager, and veterinarian skilled in LUS. The median (interquartile range [IQR]) age at the first examination was 29 (23 to 47) days, with a range from 12 to 111 days. The detailed number of foals examined at each age is presented in Table S2.

Each screening procedure was performed by the same veterinarian and comprised three elements: (i) clinical history including expected foaling date, duration of gestation, observed or assisted parturition, and foal illness during the first week of life; (ii) physical examination including rectal temperature, the appearance of the mucous membranes and capillary refill time, palpation of the submandibular lymph nodes, heart rate, respiratory rate, general respiratory pattern, and thoracic auscultation; and (iii) LUS examination.

Based on our clinical experience, foals were suspected of *R. equi* pneumonia if they demonstrated at least one of the following clinical signs (henceforth referred to as respiratory clinical signs): (i) fever > 39.5 °C provided that other apparent potential causes of fever were ruled out; (ii) dyspnoea defined as a respiratory rate > 30 breaths per minute accompanied by a noticeable increase in the respiratory effort; and (iii) marked murmurs or crackles on thoracic auscultation<sup>13</sup>. The decision to include fever as a diagnostic criterion for *R. equi* pneumonia was based on the endemic status of the farms and previously documented association of pyrexia with *R. equi* pneumonia in foals at a certain age<sup>7,11,14</sup>.

LUS examination was performed using a portable ultrasound scanner (4Vet Slim, Dramiński, Gietrzwałd, Poland) with a linear 8–10 MHz transducer (Dramiński, Gietrzwałd, Poland), the type of transducer most suited to the evaluation of pleura and superficial pulmonary lesions<sup>14</sup>.

Stud	Number of foals (% from the study population)	Number (%) of colts	Number (%) of foals of a certain breed			Epidemiological status of the stud
			Pure Arabians (oo)	Thoroughbreds (xx)	Polish Anglo-Arabians	
A	67 (36.2)	36 (54)	61 (91)	0	6 (9)	Endemic
B	57 (30.8)	25 (44)	0	0	57 (100)	Endemic
C	25 (13.5)	9 (36)	0	25 (100)	0	Endemic
D	24 (13.0)	9 (38)	24 (100)	0	0	Endemic
E	12 (6.5)	8 (67)	0	12 (100)	0	Unknown
Total	185	87 (47.0)	85 (46.0)	37 (20.0)	63 (34.0)	

**Table 1.** Characteristics of foals in the study population.

During the examination, foals were restrained by stable personnel. No sedation was used; however, examination of some foals needed using a twitch. Hair was not clipped, and the chest was drenched with alcohol. Each intercostal space was examined dorsoventrally, and the transducer was moved forward from the 17th intercostal space to the area of the musculus triceps brachii (approximately the 5–6th intercostal space). Three types of LUS abnormalities were defined, observed and analysed as follows: first, multiple B-lines, defined as hyperechoic, vertical artefacts originating from horizontal pleural line, visible simultaneously on the screen and are hard to count due to their considerable number and the dynamic type of ultrasonographic visualization; second, the presence of irregular or thickened lining of the pleural surface and/or free pleural fluid (referred to as other pleural lesions); third, the presence, number, and diameter of suspected lung abscesses were defined as focal hypoechoic areas of consolidation within the lung. If multiple abscesses were present, the maximum diameter of the largest abscess was used in further analyses.

### Treatment of foals suspected of clinical *R. equi* pneumonia

During our study, antimicrobial therapy was implemented based on the individual veterinarian's decision (ours or the attending veterinarian of the stud) given the presence of respiratory clinical signs at the moment of examination (or in a few preceding days as reported by foals' caretakers), the presence of LUS abnormalities and endemic status of the stud. In total, 53/185 foals (28.7%) were treated based on the aforementioned criteria: 15/67 (22.4%) in Stable A, 28/57 (49.1%) in stable B, 2/25 (8.0%) in stable C, 6/24 (25.0%) in stable D, and 2/12 (16.7%) in stable E. Recommended antimicrobial treatment during the study included the combination of rifampicin (5 mg/kg p.o. BID) and clarithromycin (7.5 mg/kg p.o. BID) or tulathromycin (2.5 mg/kg i.m. weekly)<sup>13,15,16</sup>. The duration of a particular treatment depended on the clinical presentation and presence of LUS findings; however, the duration was never shorter than 5 weeks.

### *R. equi* isolation

Clinical specimens taken from diseased or dead foals were submitted to bacteriological examination in the Microbiological Diagnostic Laboratory, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Samples were cultured on Columbia Agar supplemented with 5% sheep blood (Graso, Poland) and selectively modified CAZ-NB medium incubated for 48 h at 37 °C in aerobic conditions<sup>17</sup>. *R. equi* isolates were recognized based on their growth and cell morphology as well as biochemical characteristics using the API Coryne test (bioMérieux, France). To confirm the isolate identification, the CAMP test with *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was performed. Additionally, the presence of two *R. equi* genes, *choE* and *vapA*, was determined by PCR as previously described<sup>17</sup>. Antimicrobial susceptibility testing for *R. equi* isolates was performed according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>18</sup>. None of the *R. equi* strains isolated from the foals that died during our study were found to be resistant to the recommended drugs.

### Statistical methods

Categorical variables are presented as counts and percentages and were compared between groups using the maximum likelihood G-test. The age-related prevalence was calculated as a ratio between the number of foals affected by a given condition at a particular age (defined as 2-week age classes: 1–2 weeks, 3–4 weeks, etc.) and the total number of foals examined at this age. The 95% confidence intervals (CI 95%) for percentages were calculated using Wilson's score method<sup>19</sup>. Numerical variables were assessed with respect to the normality of distribution using histograms and the Shapiro–Wilk W test. As normality of distribution was violated in most cases, numerical data were summarized using the median, interquartile range (IQR), and range and compared between groups using the Mann–Whitney U test.

The relationship between the presence of various LUS abnormalities (the explanatory variables) and the occurrence of clinical signs suggestive of rhodococcal pneumonia (the outcome variable) was evaluated using the mixed-effect binary logistic regression model according to the following formula:

$$P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(B_0 + B_{age} \times X_{age} + B_b \times X_b + B_{PL} \times X_{PL} + B_{LA} \times X_{LA} + B_S \times X_S + B_{BL} \times X_{BL} + F + S + D)}}$$

where  $P(Y = 1)$  is the probability of the occurrence of respiratory clinical signs and  $B_0$  is an intercept. Three variables were fitted as random effects and forced into the model: the foal ( $F$ ) to control for the various number of times the same foal was examined (paired data), the stud ( $S$ ) to control for the environmental conditions in the stud from which a foal came, and the year ( $D$ ) to control for different microclimatic conditions in subsequent years<sup>20</sup>. Six variables were fitted as fixed effects: the age at which a foal was examined ( $X_{age}$ ), which was expressed as 2-week intervals and forced into the model to control for the dependent nature of data associated with the longitudinal design of this study; the breed ( $X_b$ ; binary variable: Pure Arabians or Polish Anglo-Arabians vs. Thoroughbred<sup>21</sup>) to control the potential breed-related susceptibility to rhodococcosis; the presence of other pleural lesions ( $X_{PL}$ , binary variable: absent vs. present), the number of lung abscesses ( $X_{LA}$ , binary variable: none vs.  $\geq 1$ ), the maximum diameter of the largest lung abscess ( $X_S$ , binary variable: < 15 mm vs.  $\geq 15$  mm), and the occurrence of multiple B-lines ( $X_{BL}$ , binary variable: absent vs. present). The variables corresponding to the LUS abnormalities were included first individually (univariable analysis) and then *en bloc* and eliminated from the model according to the backwards stepwise procedure (multivariable analysis).

The relationship between the presence of various clinical signs (the explanatory variables) and the presence of lung abscesses in LUS, considered as a basis for the presumptive diagnosis of rhodococcal pneumonia (the outcome variable), was evaluated using the mixed-effect binary logistic regression model according to the following formula:

$$P(Y = 1) = \frac{1}{1 + e^{-(B_0 + B_{\text{age}} \times X_{\text{age}} + B_b \times X_b + B_{BT} \times X_{BT} + B_{HR} \times X_{HR} + B_{MM} \times X_{MM} + B_{LN} \times X_{LN} + B_D \times X_D + B_A \times X_A + F + S + D)}}$$

where  $P(Y = 1)$  was the probability of the occurrence of lung abscess in LUS and  $B_0$  was an intercept. The above three variables (foal ( $F$ ), stud ( $S$ ), and year ( $D$ )) were fitted as random effects, while the age at which a foal was examined ( $X_{\text{age}}$ ) and breed ( $X_b$ ) were fitted as fixed effects. These 5 variables were forced into the model. The following six variables corresponding to clinical signs were fitted as fixed effects, entered into the model, and eliminated according to the backwards stepwise procedure (multivariable analysis): body temperature ( $X_{BT}$ , numerical variable), heart rate per minute ( $X_{HR}$ , numerical variable), mucous membranes ( $X_{MM}$ ; 3-class nominal variable: pink and moist vs. pale vs. congested), lymph nodes ( $X_{LN}$ ; 3-class nominal variable: normal vs. unilaterally enlarged vs. bilaterally enlarged), dyspnoea ( $X_D$ ; binary variable: absent vs. present), and thoracic auscultation ( $X_A$ ; 3-class ordinal variable: normal vs. mild murmurs and crackles vs. marked murmurs and crackles).

The relationships between variables were described using crude odds ratios (ORs) in the univariable analysis and adjusted ORs ( $OR_{\text{adj}}$ ) in the multivariable analysis. The cutoff values for numerical variables (the number of abscesses and the size of the largest abscess) were determined using area under the receiver operating characteristic curve (AUROC) analysis based on maximizing Youden's index ( $J$ ). For the optimal cutoff value, diagnostic sensitivity (Se) and specificity (Sp) as well as positive (LR+) and negative (LR-) likelihood ratios were calculated. The significance level ( $\alpha$ ) was set at 0.05, and all statistical tests were two-tailed. Data were analysed in TIBCO Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA) and IBM SPSS Statistics 28.0 (IBM Corporation, Armonk, NY).

### Ethics

The study was carried out following the standards recommended by The Act of the Polish Parliament of 15 January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes (Journal of Laws 2015, item 266). According to Polish legal regulations (The Act of the Polish Parliament of 15 January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes, Journal of Laws 2015, item 266), no formal ethics consent was required for this study except for the informed consent for participation in the study, which was obtained from the person responsible for each of the studs.

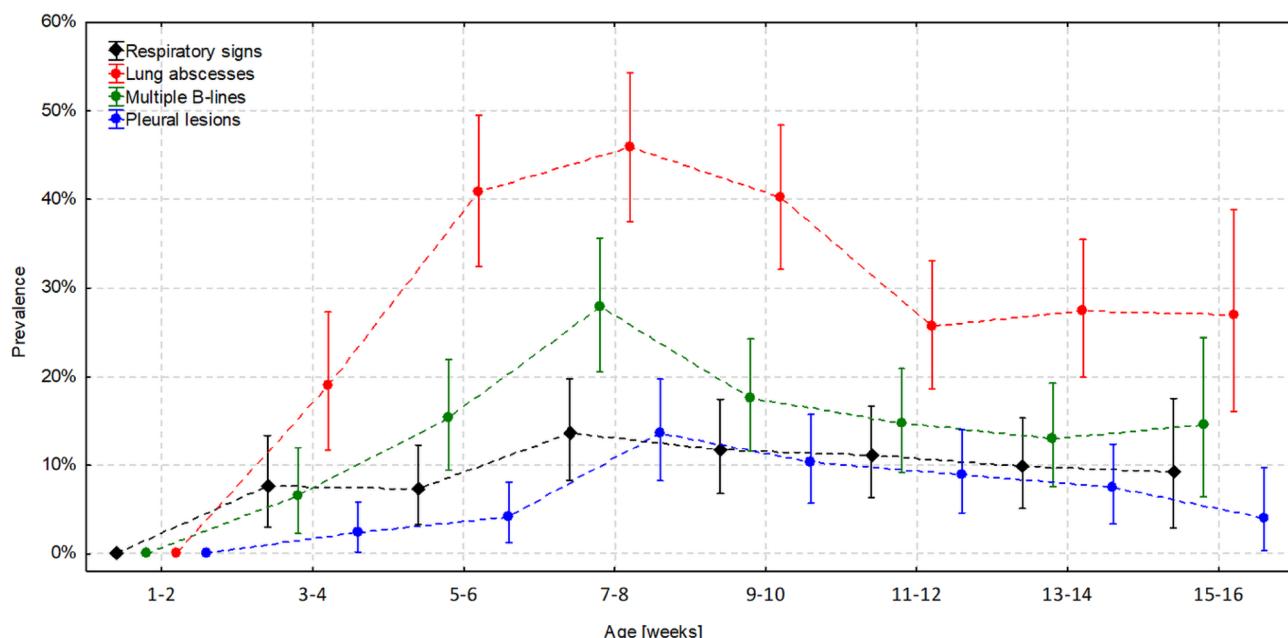
### Informed consent

All of the representatives responsible for animals involved in the study were informed in advance about the intended publication of the collected results.

## Results

### Occurrence of respiratory clinical signs and LUS abnormalities in foals

Respiratory clinical signs were observed in 48/185 foals—25.9% (CI 95% 20.2–32.7). Marked murmurs or crackles on auscultation were the most frequent findings (20.0%, CI 95% 14.9–26.3%; 37/185 foals), followed by fever (14.6%, CI 95% 10.2–20.4%; 27/185 foals) and dyspnoea (3.8%, CI 95% 1.8–7.6%; 7/185 foals). Respiratory clinical signs were observed in a significantly higher percentage of foals in stud B (51%) than in the remaining 4 studs, in which 12% to 20% showed respiratory signs ( $P < 0.001$ ) (Fig. 1). Body temperature ranged from 36.9



**Figure 1.** Age-related occurrence (with 95% confidence intervals) of respiratory clinical signs and lung ultrasound (LUS) abnormalities in foals.

to 41.5 °C, with a median (IQR) of 38.3 °C (38.1–38.6 °C). The heart rate ranged from 48 to 168 bpm, with a median (IQR) of 80 (72–92) bpm. Enlargement of lymph nodes was observed in 84/185 foals (45.4%; CI 95% 38.4–52.6%), of which 50 foals had bilateral lymph node enlargement.

LUS abnormalities were observed in 130/185 foals (70.3%; CI 95% 63.3–76.4%). Lung abscesses were found significantly more often (61.6%, CI 95% 54.4–68.3%; 114/185 foals) than multiple B-lines (40.5%, CI 95% 33.7–47.7%; 75/185 foals) and other pleural lesions (20.5%, CI 95% 15.3–26.9%; 38/185 foals). In total, B-lines were observed in 174/185 foals (94.1%, CI 95% 89.7–96.6%). An increased amount of pleural fluid was detected only in 7 foals (3.8%, CI 95% 1.8–7.6%). The percentage of foals with LUS abnormalities did not differ significantly between studs ( $P=0.248$ ), and in all studs, LUS abnormalities were observed significantly more often than respiratory signs (Fig. S1).

The number of lung abscesses detected in a foal during a single LUS examination ranged from 1 to 14, with a median (IQR) of 2 (1–3). The maximum diameter of the largest lung abscess found in a foal ranged from 2 to >50 mm, with a median (IQR) of 20 (10–34) mm.

### **Development of rhodococcal pulmonary lesions in foals during the first 4 months of life**

The age-related prevalence of respiratory signs ranged from 6 to 13% and did not change significantly in the study period ( $P=0.659$ ). In contrast, the prevalence of lung abscesses ( $P<0.001$ ), multiple B-lines ( $P=0.004$ ), and other pleural lesions ( $P=0.048$ ) was significantly associated with age (Fig. 1). The number of these abnormalities increased significantly in the first weeks of life and peaked at the age of 7–8 weeks. At this age, the occurrence of lung abscesses was 45.8% (CI 95% 37.5–54.3%), which was significantly higher than that of multiple B-lines (27.5%, CI 95% 20.6–35.7%) and other pleural lesions (13.0%, CI 95% 8.3–19.8%). After this timepoint, the prevalence of LUS abnormalities decreased gradually and stabilized in the 4<sup>th</sup> month of life at 25%, 12–14%, and 7–8%, respectively. The percentage of foals with lung abscesses was 2.4-fold (11–12 weeks old) to 6.3-fold (5–6 weeks old) higher than that of foals demonstrating respiratory signs. Detailed data on age-related prevalence are presented in Table S3.

### **Relationship between the appearance and progression of LUS abnormalities and the occurrence of respiratory clinical signs**

Controlled for the random effect of the foal, the stud, and the year in which the foal was born and the fixed effect of the breed and age at the time of examination, the occurrence of respiratory signs was significantly associated with the presence of lung abscesses (OR 6.10, CI 95% 3.43–10.9;  $P<0.001$ ), other pleural lesions (OR 8.14, CI 95% 3.89–17.1;  $P<0.001$ ), and multiple B-lines (OR 3.03, CI 95% 1.68–5.46;  $P<0.001$ ) in the univariable analysis.

Compared to foals without lung abscesses, the prevalence of respiratory signs was significantly higher in 7- to 8-week-old foals with lung abscesses and remained significantly elevated until 15–16 weeks of age (Fig. 2a). Two numerical characteristics of lung abscesses were significantly positively linked with the occurrence of respiratory signs: the number of abscesses (OR 1.52, CI 95% 1.33–1.74;  $P<0.001$ ) and the maximum diameter of the largest lung abscess (OR 1.07, CI 95% 1.06–1.09;  $P<0.001$ ). Based on the AUROC analysis, the optimal cutoff value for the discrimination between foals with and without respiratory signs was ≥ 1 lung abscess (AUROC 75.2%, CI 95% 68.8–81.5%) and maximum diameter of the largest lung abscess of ≥ 15 mm (AUROC 78.3%, CI 95% 71.7–84.8%).

Compared to foals without B-lines or with only a few B-lines (which we usually call 3–5 B-lines visible on the screen) during the LUS, the prevalence of respiratory signs was significantly higher in foals with multiple B-lines at the age of 7–8 weeks ( $P=0.012$ ) and 9–10 weeks ( $P=0.012$ ) (Fig. 2b).

Compared to foals without other pleural lesions, the prevalence of respiratory signs started to be significantly higher in foals with other pleural lesions at the age of 7–8 weeks and remained significantly elevated until the foals turned 13–14 weeks old (Fig. 2c).

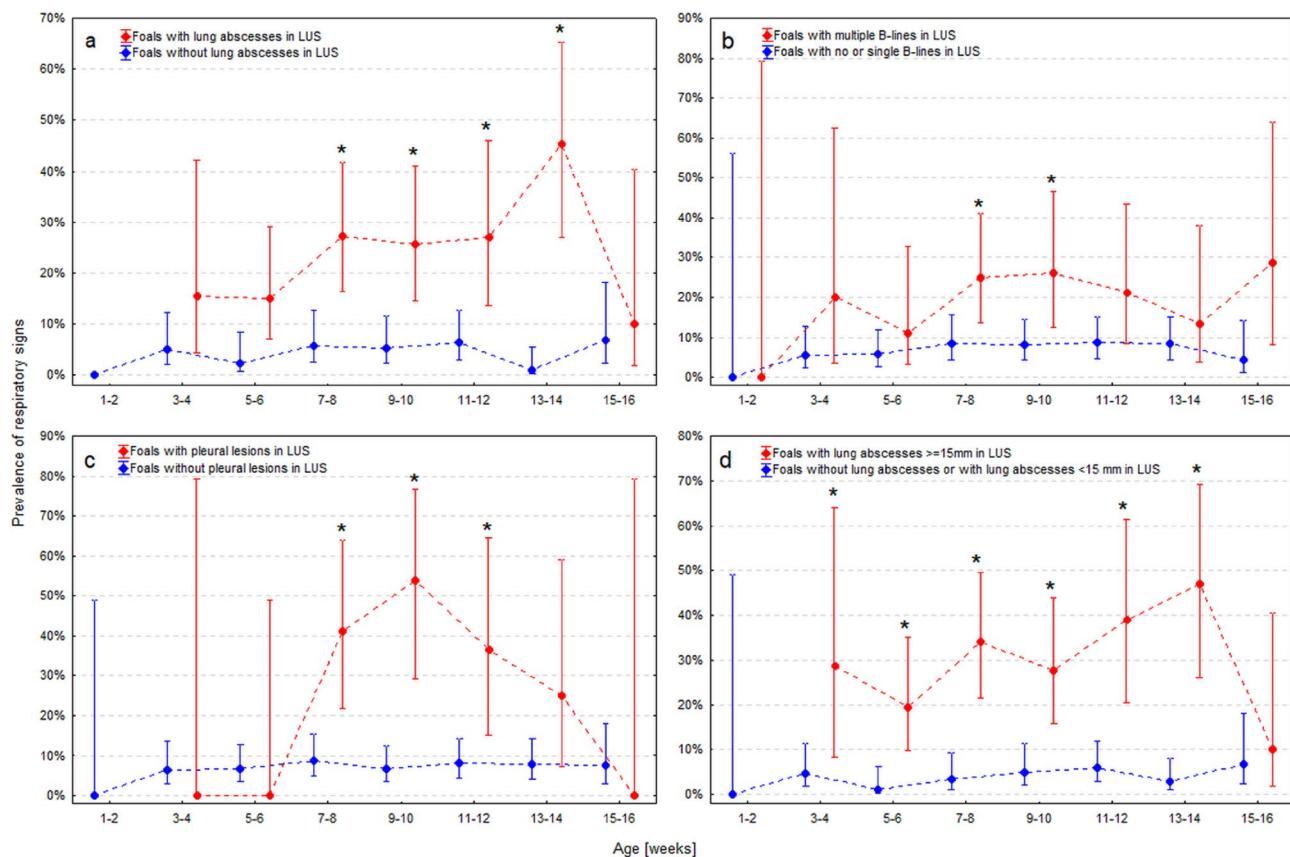
From the multivariable analysis, we identified two LUS abnormalities significantly and independently linked with the occurrence of respiratory signs—the presence of lung abscess of maximum diameter ≥ 15 mm and the presence of other pleural lesions (Table 2). The presence of at least 1 lung abscess (irrespective of its maximum diameter) and the presence of multiple B-lines turned out to be insignificant in the multivariable analysis. Lung abscesses with a maximum diameter ≥ 15 mm were found in 42/185 foals (22.7%; CI 95% 17.3–29.3%). The age-related prevalence of respiratory signs was significantly higher in foals with lung abscesses of maximum diameter ≥ 15 mm at the age of 3–4 weeks. The age-related prevalence of respiratory signs decreased to a level similar to foals without lung abscesses or with lung abscesses of diameter < 15 mm at the age of 15–16 months (Fig. 2d).

### **Diagnostic potential of clinical signs in pulmonary rhodococcosis**

Two clinical signs were significantly positively linked to the presence of lung abscesses: body temperature ( $P<0.001$ ) and the presence and severity of murmurs and crackles in lung auscultation ( $P<0.001$ ) (Table 3). The AUROC of body temperature was 60.9% (CI 95% 56.5–65.2%), and the optimal cutoff value was ≥ 38.6 °C. At this cutoff value, body temperature had a diagnostic sensitivity (Se) of 38.9% (CI 95% 33.2–45.0) and a diagnostic specificity (Sp) of 79.6% (CI 95% 76.0–82.8%) in predicting the presence of lung abscesses. The presence of mild or marked murmurs and crackles also had low Se (30.9%; CI 95% 25.6–36.8%) but high Sp (89.2%; CI 95% 86.2–91.5%). The positive likelihood ratio (LR+) of mild murmurs was 1.78 (CI 95% 0.70–4.55), while the LR+ of marked murmurs was 7.43 (CI 95% 4.83–11.4). Generally, clinical signs lack sufficient sensitivity to allow for an accurate diagnosis of pulmonary rhodococcosis.

### **Mortality risk**

Of 185 foals enrolled in our study, 9 died (5 females, 4 males), yielding a crude mortality of 4.9% (CI 95% 2.6–9.0%). Three foals died unexpectedly with no apparent signs of pneumonia 24 h before death. Additionally,



**Figure 2.** (a–d) Age-related prevalence of respiratory clinical signs (with 95% confidence intervals) in foals with and without: lung abscesses (a), multiple B-lines (b), other pleural lesions (c), and lung abscesses  $\geq 15$  mm in the lung ultrasound (LUS) examination. Asterisks (\*) indicate difference in the prevalence of respiratory clinical signs between foals with and without abnormalities detected on LUS at the same age ( $P < 0.05$ ).

LUS findings during the last examination in these three foals did not indicate an increased risk of death (mild or multiple B-lines detected). Lung consolidations but no abscesses  $> 10$  mm were discovered during these three necropsies. Nevertheless, the bacterial cultures collected from the lungs of all 9 foals lost during necropsies were *R. equi* positive. The remaining 6 foals that were lost had dyspnoea, and rectal body temperature was persistently elevated above  $39.5^{\circ}\text{C}$ . In 5 of them, lung abscesses increased in size over time, despite the implemented treatment. They had at least one abscess visible on LUS with a maximum diameter  $> 15$  mm and other pleural lesions prior to death. The number of abscesses varied during the monitoring period; however, fusion of the nearest abscesses and multifocal, diffuse pulmonary lesion development seemed common in the most severe cases.

The 3 foals that died unexpectedly had no apparent reasons for sudden death discovered during necropsies. All 3 foals had the last screening examination performed over one week prior to death. Our hypothesis of the most likely cause of death in these cases was acute septicemia due to *R. equi* or a mixed infection (bacterial or viral).

The foals that died belonged to 3 studs; however, 7 foals belonged to the same stud (B). Nonsurvivors were born by 7 mares; two mares in stud B delivered 2 foals that died: one mare in 2019 and 2020 and another mare in 2020 and 2021. The relationship between the month of birth and nonsurvival was significant ( $p = 0.006$ ): 5/9 (56%) foals that died were born in April (Table S4). However, due to the low number of nonsurvivors and clustering of deaths in only 1 of 5 studs no further conclusions should be made.

## Discussion

Although *R. equi* infection in foals has been considered a serious and widespread problem on endemic farms for decades, data on the field occurrence of rhodococcosis are often incomplete or apply to only one breeding season or a single breeding farm. Our study shows that respiratory clinical signs were observed in over 25% of the foals, whereas approximately 70% of the foals between the 2nd week and 4th month of age developed LUS abnormalities. Respiratory clinical signs were observed significantly (from 2 to 3 to even 6–8 times) more often in foals with LUS abnormalities, including lung abscesses, multiple B-lines, and other pleural lesions. These findings are comparable to those described in Texas<sup>5</sup> despite different environment and preventive strategies routinely used on breeding farms. Moreover, the age of the first appearance of LUS abnormalities and clinical signs in our study correspond to previously published data, in which a significant decline in rhodococcal colostral antibody levels was observed after the third week of life<sup>22</sup>. To some extent, this finding is in line with earlier studies showing a correlation between the depletion of maternal antibodies and the occurrence of respiratory signs suggestive of rhodococcal pneumonia<sup>23,24</sup>. The peak of LUS abnormalities was observed in 7–8 weeks of

Variable	Regression coefficient (standard error)	Model statistic	P-value	Adjusted odds ratio (95% confidence intervals)
Fixed effects				
Intercept	-3.76 (0.64)	-	-	-
Age at examination	-	-	0.497	-
Breed				
Pure Arabian or Polish Anglo-Arabian	Reference category			
Thoroughbred	0.04 (0.79)	0.06	0.957	1.04 (0.22–4.89)
Maximum diameter of the largest lung abscess				
< 15 mm	Reference category	-	-	-
≥ 15 mm	1.96 (0.30)	6.51	< 0.001	7.12 (3.94–12.9)
Other pleural lesions				
None	Reference category	-	-	-
Present	1.69 (0.40)	4.29	< 0.001	5.44 (2.51–11.8)
Variables removed in the backward stepwise elimination				
Number of lung abscesses				
None	Reference category	-	-	-
≥ 1	0.52 (0.51)	1.01	0.312	1.68 (0.61–4.61)
B-lines				
None or single	Reference category	-	-	-
Multiple B lines	0.56 (0.35)	1.60	0.109	1.76 (0.88–3.51)
Random effects				
Foal (F)	0.68 (0.35)	1.96	0.050	-
Stud (S)	0.44 (0.50)	0.89	0.374	-
Year (D)	0.01 (0.13)	0.05	0.962	-

**Table 2.** The mixed-effect binary logistic model evaluating the relationship between the presence of lung ultrasound (LUS) abnormalities and respiratory clinical signs suggestive of *Rhodococcus equi* pneumonia.

life. In our study, a continuous decrease in LUS abnormalities partially correlated with the time of treatment implementation. The severity of respiratory clinical signs remained similar throughout the study, which further supports the low sensitivity of clinical parameters to diagnose *R. equi* pneumonia. In studies by other authors, foals developed clinical signs suggestive of rhodococcal pneumonia and were treated later in life, possibly due to different management practices<sup>8,11,25</sup>.

Our findings only partially agreed with one of the recent and most important results from a breeding farm in Germany that linked only very high TMDs of lung abscesses (up to 15 cm) with treatment implementation<sup>6</sup>. Foals described in another study from Germany<sup>26</sup> showed clinical signs significantly later than ours (approximately 14–16 weeks of age vs. 7–8 weeks of age, respectively). The age of affected foals appeared to be negatively correlated with the severity of the disease<sup>27</sup>; however, these findings might also be associated with specific management strategies, climate or location and do not necessarily represent general conclusions between the age and severity of the disease. To our knowledge, the morbidity and mortality rates as well as the severity of disease may vary significantly between regions, breeding seasons, or even particular studs<sup>8</sup>. Some of the factors that can explain differences between the situations in studs include the number of foals born per season, the size and construction of the stables, the number of qualified workers, and the availability of pastures<sup>28</sup>. Finally, we consider it difficult to agree with treating only foals presenting both clinical signs and very severe pulmonary lesions, as indicated in one paper<sup>6</sup>, since fever and dyspnoea may be of serious concern, especially in very young foals. Although highly sensitive, LUS also has some limitations in diagnosing pulmonary pathology, and it can visualize abnormalities located close to the pleural surface but not in the pulmonary parenchyma; thus, certain lesions might sometimes be omitted<sup>10,14,29</sup>. Additional diagnostic modalities, such as thoracic radiographs and computed tomography, can also be considered in more complex cases.

According to the results from our study, the presence of LUS abnormalities in foals among Polish studs included in our program did not differ considerably; however, on one of the farms, substantially more foals developed clinical signs. The exact reason for this finding is unknown; however, some of the explanations include different environmental conditions and management strategies. We plan to thoroughly examine this stud in the future. Previous data have shown that despite being a ubiquitous pathogen, virulent *R. equi* may not always be isolated from soil, even on farms with confirmed endemic infections<sup>30–32</sup>. Some authors have indicated the relationship between the density of mares and foals and the increased risk of developing clinical signs<sup>30</sup>. Although there are no strict environmental management practices established for prophylaxis against rhodococcosis, some papers indicate a link between early exposure to airborne *R. equi* and a subsequent higher risk of developing pneumonia<sup>33,34</sup>. The significantly higher prevalence of respiratory signs and mortality rate in stud B further support the effect of the environment on the development of disease. We consider stud B to have worse biosecurity management strategies due to the higher density of horses in one stall and more intense rotation of external mares coming for obstetrical diagnostic and insemination to the stud applied veterinarians. Moreover, studies

Variable	Regression coefficient (standard error)	Model statistic	P-value	Adjusted odds ratio (95% confidence intervals)
Fixed effects				
Intercept	-30.6 (9.11)	-	-	-
Age at examination	-0.10 (0.05)	-2.05	0.041	0.90 (0.82–0.996)
Breed				
Arabian (Pure or mixed)	Reference category			
Thoroughbreds	-0.14 (0.48)	-0.30	0.765	0.87 (0.34–2.20)
Body temperature (°C)	0.79 (0.24)	3.33	<0.001	2.20 (1.38–3.50)
Lung auscultation				
Normal	Reference category			
Mild murmurs and crackles	0.89 (0.27)	3.24	0.001	2.43 (1.42–4.16)
Marked murmurs and crackles	1.85 (0.40)	4.63	<0.001	6.35 (2.90–13.9)
Variables removed in the backward stepwise elimination				
Heart rate per minute	0.01 (0.01)	0.87	0.376	1.01 (0.99–1.02)
Lymph nodes				
Normal	Reference category			
Unilaterally enlarged	0.53 (0.38)	1.38	0.168	1.69 (0.80–3.57)
Bilaterally enlarged	-0.01 (0.32)	-0.02	0.987	1.00 (0.53–1.88)
Dyspnea	0.84 (1.25)	0.67	0.501	2.31 (0.20–26.8)
Mucous membranes				
Pink and moist	Reference category			
Pale	-0.84 (0.93)	-0.90	0.369	0.43 (0.07–2.69)
Congested	0.95 (1.71)	0.55	0.580	2.58 (0.09–73.9)
Random effects				
Foal (F)	0.83 (0.23)	3.60	<0.001	-
Stable (S)	0.14 (0.27)	0.54	0.591	-
Year (Y)	0.19 (0.25)	0.75	0.456	-

**Table 3.** The mixed linear model (MLM) evaluating the relationship between various clinical signs and the presence of lung abscesses suggestive of *Rhodococcus equi* pneumonia.

have shown that both affected foals<sup>35</sup> and their dams<sup>36</sup> may have increased faecal shedding of virulent *R. equi*. Insufficient hygienic practices may result in higher levels of so-called alveolar permeable fractions of dust, which are known to reach the lower respiratory tract<sup>37</sup> and convey some biological particles, such as bacteria<sup>38</sup>. This finding is also compatible with the observation that the air concentration of virulent *R. equi* strains was significantly higher inside the stables than on paddocks<sup>28</sup>. These observations may indicate the influence of environmental factors on the prevalence or course of the disease and partially explain the exacerbation of severe and even fatal cases observed during our study among foals born at the end of the most intense foaling season in Poland. The aforementioned hypothesis is in line with a recent study from Japan, showing an association between the month of birth and initial colonization of *R. equi* in the trachea of neonatal foals, suggesting that a certain period during the foaling season might be positively correlated with developing *R. equi* pneumonia. Moreover, this paper also demonstrates that the greatest percentage of *R. equi*-positive foals based on clinical signs and microbiological culture from transtracheal aspiration detected in foals were born in March and April<sup>39</sup>.

Our study confirmed previous findings that LUS abnormalities suggestive of pulmonary rhodococcosis start to develop from the first weeks of foals' life, peak around the age of 2 months, and then gradually decline, either with or without treatment. The most common LUS abnormalities are lung abscesses, followed by multiple B-lines and other pleural lesions. Contrary to LUS findings, respiratory clinical signs remained unchanged for the entire period of the first 4 months of foal life. The occurrence of multiple B-lines and other pleural lesions decreased with the resolution of clinical signs, while lung abscesses persisted beyond the first 4 months of life in approximately one-fourth of all foals examined in the study. Our results are in line with previous studies reporting similar routine monitoring of foals for *R. equi* infection<sup>5,7,8,27</sup>.

To some extent, our work supports recently made recommendations to examine the effects of selective antimicrobial treatments<sup>1</sup>. Our results strongly indicated that the presence of pulmonary abscesses with diameters above 15 mm and other pleural lesions are significantly linked with the occurrence of clinical signs of pulmonary rhodococcal infections. They cannot be viewed as the only criteria for treatment implementation but may justify the monitoring of subclinical foals. Unfortunately, the use of LUS has already gained some negative opinions due to excessive antimicrobial treatment of subclinical cases with mild sonographic pulmonary lesions and subsequent alarming growth of antimicrobial resistance<sup>2,3,40–43</sup>. Accurate criteria for recognizing foals with suspected *R. equi* infection that truly need antibiotic therapy are yet to be determined.

Recently, LUS has been shown to be a valid method of recognizing and monitoring pneumonia in preweaned calves<sup>44</sup>. This approach in cattle can be considered similar to the one to rhodococcal pneumonia in foals due to

challenges with antemortem diagnosis, field settings, a great number of patients, diversification between farms, and potential disadvantages of other diagnostic tools. LUS examination allows us to monitor the affected animals safely and continuously and to base the decision regarding the introduction and discontinuation of antimicrobial therapy on more precise grounds<sup>45</sup>. This is important in the management of infectious diseases due to possible rapid changes in clinical signs in response to appropriate antibiotic therapy. Early discontinuation of antibiotics in the face of persistent severe pulmonary lesions may lead to the reoccurrence of clinical diseases and significantly worsen the prognosis for survival, especially if antimicrobial resistance has developed<sup>46</sup>. On the other hand, unnecessarily prolonged treatment with antimicrobials may also result in increased antimicrobial resistance; thus, a method of assessing the current status of pneumonia is highly desired<sup>45,46</sup>. This problem has not been frequently investigated in clinical studies, despite the very long duration of recommended therapy. Proper monitoring of clinical signs might allow safe shortening of the treatment, compared to recommended standard protocols, based on LUS findings supporting the decision of discontinuation of the antimicrobials<sup>6,15,26</sup>.

Ultrasound screening has become popular in clinical settings because it can be performed quickly and safely, and the result is immediately available. This is particularly valuable in field conditions, where numerous animals have to be examined in a short time. Laboratory diagnostic methods, such as inflammatory markers (white blood cell counts, fibrinogen concentration, serum amyloid A, or procalcitonin), were not considered accurate factors to recognize the onset and progression of rhodococcosis<sup>47–50</sup>. Additionally, microbiological or PCR confirmation based on methods such as bronchoalveolar lavage (BAL) or tracheobronchial aspirate (TBA) presents serious disadvantages, including the risk of endoscopic examination, which may alter breathing in already dyspnoeic animals or require sedation of the severely ill and pyretic foal<sup>4,51</sup>. Moreover, this method has the potential for false results<sup>52</sup> and requires some time, which is highly unwanted in regard to neonatal diseases. These concerns especially apply to an early diagnosis in field conditions. Our results, along with some previous studies, support the hypothesis that developing an appropriate ultrasound monitoring program may lead to more effective monitoring of clinical signs and management of pulmonary rhodococcosis in the field condition of a stud. Based on the findings from our study, we propose that performing LUS at least every 2 weeks may improve the diagnosis of the diseases, especially in the most severe cases.

Our study has several limitations, mostly due to its field character and the multiple participants involved. Only two studs participated in the screening for the entire period. Moreover, for organizational reasons, foals were not followed up for the same period, and the number of examinations they underwent was not the same for all of them. This could have influenced the power and reliability of the statistical analysis. Additionally, some procedures needed to be simplified or unified among the participating studs, especially diagnostic procedures. Based on our clinical experience, we decided to shorten the lists of clinical signs and LUS findings connected with pulmonary rhodococcosis to the three most common observations each. Nevertheless, we are aware that the clinical manifestation of rhodococcosis can sometimes differ significantly and depend on the form (pulmonary or extrapulmonary), age of the foal, or severity of LUS findings. Some of our encounters with less typical courses of rhodococcal infections have already been described<sup>53</sup>.

One of the crucial concerns in regard to infectious diseases is the most precise diagnosis. The majority of researchers would prefer to have microbiological or PCR confirmation of the pathogen involved. We agree that such evidence ends most of the discussions about the accuracy of the diagnosis. However, we believe that the risk of misdiagnosis in the case of rhodococcal pneumonia is very limited. The combined clinical and ultrasonographic manifestation of pulmonary rhodococcosis is highly specific. Although not pathognomonic, lung abscessation in the preweaned age is rarely described in cases other than *R. equi*<sup>4,7,51,54</sup>. On the other hand, one study showed that the concentration of virulent *R. equi* in the exhaled air of both healthy and affected foals does not differ significantly<sup>55</sup>. The same results may apply to the material collected during BAL or TBA. The material collected from the trachea and bronchi might be *R. equi* positive in most foals, independent of their health status due to its environmental characteristics. It may result in many false-positive diagnoses. Finally, the most important concern is to limit unnecessary antimicrobial use, but positive results alone of microbiological culture or PCR do not define which foals truly require treatment.

We agree that the results from two (or more) independent veterinarians would add more accuracy to our research; however, no other veterinarian was available to perform such a comparison. Nevertheless, having the same person perform all the diagnostics enabled a high level of consistency. Moreover, the veterinarian who performed LUS was the one most experienced in this procedure on the team, and they were always able to consult with another equine-specialized veterinarian regarding the results.

Owing to the field character of this study, it may be considered highly representative of the actual health status and decisions regarding rhodococcosis. However, its character may also impose a limit to some of the analysis and results. We expect the implementation of antimicrobial treatment to have a substantial impact on the presence of clinical findings and lung abnormalities<sup>15</sup>. In most cases, implementing antimicrobial drugs allowed us to reduce fever and improve clinical conditions within a few days. Moreover, the size of most abscesses also gradually decreased after treatment implementation. Unfortunately, we cannot be sure about the extent of the effect of antimicrobial therapy since we did not compare treated foals with any foals given a placebo. Such a comparison would certainly be highly valuable from an academic point of view, but we consider such a study unethical. A paper considering some of the effects of different drugs or their combinations, including the placebo group, was already published; however, the study was performed on foals with lung abscesses and elevated WBC, regardless of their clinical status<sup>3</sup>. Moreover, changes in the therapeutic plan were regulated in accordance with the current health status of a particular foal and often modified. The relationship between the size of the abscesses and the presence of clinical findings in our study might be partially influenced by these variabilities; however, these limitations would be very hard to eliminate.

Additionally, some unfortunate circumstances, including widespread abortions due to the equine herpes virus outbreak in 2019 and limitations in travelling in 2020/2021 due to the COVID-19 pandemic, substantially

reduced the number of participating foals. Finally, as university workers, we were responsible for repeated clinical and ultrasound examinations according to the LUS monitoring program. While we could recommend additional diagnostic procedures and treatment options, the decisive voice belonged to the owners and stud veterinarians. In the case of field clinical research on quite expensive animals, the consequences of invasive diagnostic procedures and different treatment approaches were also vastly considered.

## Conclusions

In Poland, clinical pulmonary rhodococcosis affects approximately 1/4 of the population of foals in some selected endemic studs, while subclinical pulmonary rhodococcosis appears to be present in approximately 70% of foals in these studs. The most frequently observed LUS abnormalities in preweaned foals are lung abscesses occurring at approximately 2 months of age. Other pleural lesions and multiple B-lines were less frequent. The presence of lung abscesses of a maximum diameter larger than 15 mm and the presence of other pleural lesions are significantly and strongly linked with the occurrence of clinical rhodococcosis, so they may be considered factors indicating the development of clinical disease. Increased body temperature and the presence of wheezes and crackles in chest auscultation are significantly associated with the presence of lung abscesses; however, clinical signs lack sufficient diagnostic sensitivity to allow for an accurate diagnosis of rhodococcosis. Future studies are needed to develop more efficient monitoring and treatment protocols in equine breeding farms.

## Data availability

Any additional information might be available on request from the corresponding author.

Received: 28 January 2023; Accepted: 6 November 2023

Published online: 08 November 2023

## References

- Giguère, S. & Cohen, N. D. Controversies in therapy of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Equine Vet. Educ.* **30**, 336–341. <https://doi.org/10.1111/eve.12870> (2018).
- McCracken, J. L. Screening for *Rhodococcus equi* pneumonia. in *Robinson's Current Therapy in Equine Medicine*, 737–740 (Elsevier, 2015). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4555-5.00176-X>.
- Venner, M., Rödiger, A., Laemmer, M. & Giguère, S. Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet. J.* **192**, 293–298 (2012).
- Huber, L. *et al.* Monitoring foals by thoracic ultrasonography, bacterial culture, and PCR: Diagnostic of *Rhodococcus equi* subclinical pneumonia in south of Brazil. *J. Equine Vet. Sci.* **60**, 104–108 (2018).
- Madrigal, R. G. *et al.* Use of serial quantitative PCR of the vapA gene of *Rhodococcus equi* in feces for early detection of *R. equi* pneumonia in foals. *J. Vet. Intern. Med.* **30**, 664–670 (2016).
- Arnold-Lehna, D., Venner, M., Berghaus, L. J., Berghaus, R. & Giguère, S. Changing policy to treat foals with *Rhodococcus equi* pneumonia in the later course of disease decreases antimicrobial usage without increasing mortality rate. *Equine Vet. J.* <https://doi.org/10.1111/evj.13219> (2019).
- McCracken, J. L. & Slovis, N. M. Use of thoracic ultrasound for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia on endemic farms. *AAEP Proc.* **55**, 1–10 (2009).
- Coleman, M. C. *et al.* Foal-level risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia at a quarter horse breeding farm. *J. Equine Vet. Sci.* **72**, 89–96 (2019).
- Tarancón, I., Leiva, M., Jose-Cunilleras, E., Ríos, J. & Peña, T. Ophthalmologic findings associated with *Rhodococcus equi* bronchopneumonia in foals. *Vet. Ophthalmol.* **22**, 660–665 (2019).
- Venner, M., Walther, S. M., Münzer, B. & Stadler, P. *Diagnostic of Pulmonary Abscesses in foals-Comparison of Sonographic and Radiographic Examination* Vol. 30 (Pferdeheilkunde, 2014).
- Kahn, S. K. *et al.* Randomized, controlled trial comparing *Rhodococcus equi* and poly-N-acetyl glucosamine hyperimmune plasma to prevent *R. equi* pneumonia in foals. *J. Vet. Intern. Med.* **35**, 2912–2919 (2021).
- Kalinowski, M., Jarosz, Ł & Grądzki, Z. Assessment of antimicrobial susceptibility of virulent strains of *Rhodococcus equi* isolated from foals and soil of horse breeding farms with and without endemic infections. *J. Equine Vet. Sci.* **91**, 103114 (2020).
- Giguère, S. *et al.* Diagnosis, treatment, control, and prevention of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J. Vet. Intern. Med.* **25**, 1209–1220 (2011).
- Łobaczewski, A. *et al.* Lung ultrasound for imaging of b-lines in dogs and cats: A prospective study investigating agreement between three types of transducers and the accuracy in diagnosing cardiogenic pulmonary edema, pneumonia and lung neoplasia. *Animals* **11**, 3279 (2021).
- Rutenberg, D., Venner, M. & Giguère, S. Efficacy of tulathromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **31**, 901–906 (2017).
- Giguère, S. *et al.* Retrospective comparison of azithromycin, clarithromycin, and erythromycin for the treatment of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **18**, 568–573 (2004).
- Rzewuska, M. *et al.* Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*). *Vet. Microbiol.* **172**, 272–278 (2014).
- Traczewski, M. M. B. M. *et al.* *Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated From Animals* Vol. 6 (CLSI supplement Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017).
- Altman, D., Machin, D., Bryant, T. & Gardner, M. *Statistics with Confidence: Confidence Intervals and Statistical Guidelines* (BMJ Books, 2000).
- Chaffin, M. K., Cohen, N. D., & Martens, R. J. Evaluation of equine breeding farm management and preventative health practices as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **222**(4), 476–485. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.222.476> (2003).
- Cohen, N. D., O'Conor, M. S., Chaffin, M. K. & Martens, R. J. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **226**, 404–413 (2005).
- Studies on the persistence of transfused *Rhodococcus equi* antibodies in Thoroughbred foals. *Anim. Reprod. Sci.* **121**, 359–360 (2010).
- Lopez, A. M., Hines, M. T., Palmer, G. H., Alperin, D. C. & Hines, S. A. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**, 1270–1276 (2002).
- Sanz, M. G., Loynachan, A. & Horohov, D. W. *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomised experimental challenge of neonatal foals. *Vet. Rec.* **178**, 261–261 (2016).

25. Kahn, S. K. *et al.* Transfusion with 2 L of hyperimmune plasma is superior to transfusion of 1 L or less for protecting foals against subclinical pneumonia attributed to *Rhodococcus equi*. *J. Equine Vet. Sci.* **79**, 54–58 (2019).
26. Wetzig, M., Venner, M. & Giguère, S. Efficacy of the combination of doxycycline and azithromycin for the treatment of foals with mild to moderate bronchopneumonia. *Equine Vet. J.* <https://doi.org/10.1111/evj.13211> (2019).
27. Arnold-Lehna, D., Venner, M., Berghaus, L. J., Berghaus, R. & Giguère, S. Efficacy of treatment and survival rate of foals with pneumonia: Retrospective comparison of rifampin/azithromycin and rifampin/tulathromycin. *Pferdeheilkunde* **35**, 423–430 (2019).
28. Muscatello, G. *et al.* Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. *Equine Vet. J.* **38**, 263–265 (2010).
29. Punsmann, S., Hellige, M., Hoppe, J., Freise, F. & Venner, M. Diagnostic imaging in acute interstitial pneumonia in foals: High variability of interpretation of chest radiographs and good conformity between ultrasonographic and post-mortem findings. *Vet. Radiol. Ultrasound* **62**, 490–497 (2021).
30. Cohen, N. D. *et al.* Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 385–395 (2008).
31. Takai, S. *et al.* Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. *J. Vet. Diagn. Invest.* **13**, 484–490 (2001).
32. Martens, R. J. *et al.* Association of disease with isolation and virulence of *Rhodococcus equi* from farm soil and foals with pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **217**, 220–225 (2000).
33. Cohen, N. D. *et al.* Association of perinatal exposure to airborne *Rhodococcus equi* with risk of pneumonia caused by *R. equi* in foals. *Am. J. Vet. Res.* **74**, 102–109 (2013).
34. Kuskie, K. R. *et al.* Associations between the exposure to airborne virulent *Rhodococcus equi* and the incidence of *R. equi* pneumonia among individual foals. *J. Equine Vet. Sci.* **31**, 463–469 (2011).
35. Witkowski, L. *et al.* Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates from horses in Poland: PVapA characteristics and plasmid new variant, 85-kb type V. *BMC Vet. Res.* **13**, 1–10 (2017).
36. Huber, L., Giguère, S., Berghaus, L. J., Hanafi, A. & Ryan, C. Fecal shedding of *Rhodococcus equi* in mares and foals after experimental infection of foals and effect of composting on concentrations of *R. equi* in contaminated bedding. *Vet. Microbiol.* **223**, 42–46 (2018).
37. Claussen, G. & Hessel, E. F. Particulate matter in equestrian stables and riding arenas. *J. Equine Vet. Sci.* **55**, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.evsv.2017.04.004> (2017).
38. Grzyb, J., Podstawski, Z. & Bulski, K. Bacterial aerosol, particulate matter, and microclimatic parameters in the horse stables in Poland. *Environ. Sci. Pollut. Res.* <https://doi.org/10.1007/s11356-021-18142-6> (2021).
39. Takai, S. *et al.* Birth month associated with tracheal colonization of *Rhodococcus equi* in newborn foals on horse-breeding farms with sporadic rhodoccosis in Japan. *Vet. Microbiol.* **267**, 109373 (2022).
40. Giguère, S., Berghaus, L. J. & Willingham-Lane, J. M. Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0004> (2017).
41. Erol, E., Shaffer, C. L. & Lubbers, B. V. Synergistic combinations of clarithromycin with doxycycline or minocycline reduce the emergence of antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. *Equine Vet. J.* <https://doi.org/10.1111/evj.13508> (2021).
42. Huber, L. *et al.* Emergence of resistance to macrolides and rifampin in clinical isolates of *Rhodococcus equi* from foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, 18 (2018).
43. Huber, L. *et al.* Prevalence and risk factors associated with emergence of *Rhodococcus equi* resistance to macrolides and rifampicin in horse-breeding farms in Kentucky, USA. *Vet. Microbiol.* **235**, 243–247 (2019).
44. Rhodes, V. *et al.* Diagnosis of respiratory disease in preweaned dairy calves using sequential thoracic ultrasonography and clinical respiratory scoring: Temporal transitions and association with growth rates. *J. Dairy Sci.* **104**, 11165–11175 (2021).
45. Jourquin, S. *et al.* Randomized field trial comparing the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in a natural outbreak of calf pneumonia using lung reaeration as a cure criterion. *J. Vet. Intern. Med.* <https://doi.org/10.1111/jvim.16348> (2022).
46. Palma, E., Tilocca, B. & Roncada, P. Antimicrobial resistance in veterinary medicine: An overview. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1914. <https://doi.org/10.3390/ijms21061914> (2020).
47. Giguère, S., Berghaus, L. J. & Miller, C. D. Clinical assessment of a point-of-care serum amyloid A assay in foals with bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **30**, 1338–1343 (2016).
48. Cohen, N. D. *et al.* Study of serum amyloid A concentrations as a means of achieving early diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Vet. J.* **37**, 212–216 (2010).
49. Passamonti, F. *et al.* *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: An assessment of the early diagnostic value of serum amyloid A and plasma fibrinogen concentrations in equine clinical practice. *Vet. J.* **203**, 211–218 (2015).
50. Giguère, S., Hernandez, J., Gaskin, J., Miller, C. & Bowman, J. L. Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **222**, 775–781 (2003).
51. Leclerc, M., Magdesian, K. G., Kass, P. H., Pusterla, N. & Rhodes, D. M. Comparison of the clinical, microbiological, radiological and haematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria. *Vet. J.* **187**, 109–112 (2011).
52. Hillidge, C. J. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet. Microbiol.* **14**, 337–342 (1987).
53. Rakowska, A. *et al.* Less typical courses of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Vet. Sci.* **9**, 605 (2022).
54. Bianchi, M. V. *et al.* Causes and pathology of equine pneumonia and pleuritis in southern Brazil. *J. Comp. Pathol.* **179**, 65–73 (2020).
55. Muscatello, G., Gilkerson, J. R. & Browning, G. F. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 734–737 (2009).

## Acknowledgements

The authors would like to sincerely thank Katarzyna Dembek DVM, PhD, DACVIM from North Carolina State University for her valuable suggestions and support with the editing of the manuscript.

## Author contributions

A.R., A.B. and L.W. planned the study. A.R. and A.B. collected field data. A.R. reviewed the literature and wrote the preliminary version of the manuscript. M.Cz. prepared statistical analysis, tables and figures. A.B., M.Cz. and L.W. provided suggestions on the revision. All authors approved the final version of the manuscript.

## Funding

The study was partially supported by a grant from the National Science Centre (Decision No. DEC-2011/03/B/NZ6/04682), a grant from the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Poland (Decision

No. 9506/E-385/R/2018), and Financial Support System for Scientists and Research Teams Warsaw University of Life Sciences Project No. S00134/2020.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46833-2>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to A.R.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023

## Case Report

# Less Typical Courses of *Rhodococcus equi* Infections in Foals

Alicja Rakowska <sup>1,\*</sup>, Agnieszka Marciak-Karcz <sup>2</sup>, Andrzej Bereznowski <sup>1</sup>, Anna Cywińska <sup>3</sup>,  
Monika Żychska <sup>1</sup> and Lucjan Witkowski <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences, 02-787 Warsaw, Poland

<sup>2</sup> Private Veterinary Practice, 13-400 Aubagne, France

<sup>3</sup> Faculty of Biological and Veterinary Sciences, Nicolaus Copernicus University, 87-100 Toruń, Poland

\* Correspondence: alicja\_rakowska@sggw.edu.pl

**Simple Summary:** For decades, *Rhodococcus equi* infections remain one of the most common causes of death in foals before weaning, coming from endemic studs. The pathogen can create many problems other than its classical form—pneumonia. Such issues are described in the clinical cases presented in this paper. The first case concerns the potential contribution of rhodococcal infection to a grave outcome in a prematurely born foal lost as a yearling. Another presents so-called “extrapulmonary disorders” (EPD) and a theory of inherited immunodeficiency in a breeding dam line from one stud. The third case is connected with a suspected atypical location of the pulmonary abscess. The last example is associated with drug-induced anhidrosis. These clinical pictures may be considered rare or interesting and worth presenting in a scientific report.

**Abstract:** This article aims to present several interesting and less typical courses of *Rhodococcus equi* infections in foals, collected during the 2019–2021 foaling seasons in some Polish studs. The study was conducted by the Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Warsaw University of Life Sciences—SGGW, and concentrated on ultrasonographic contribution to diagnostics and treatment of the disease. Among many standard cases of rhodococcal pneumonia, some rare ones occurred. The aforementioned issues include the potential contribution of rhodococcal infection to a grave outcome in a prematurely born filly, lost as a yearling, so-called “extrapulmonary disorders” (EPD), a hypothesis of inherited immunodeficiency with grave outcome in a breeding dam line from one stud, and macrolide-induced anhidrosis. The main benefit of this report would be to supplement the general picture of clinical rhodococciosis.

**Keywords:** *Rhodococcus equi*; extrapulmonary disorders; macrolide-induced anhidrosis; primary IgM deficiency



**Citation:** Rakowska, A.; Marciak-Karcz, A.; Bereznowski, A.; Cywińska, A.; Żychska, M.; Witkowski, L. Less Typical Courses of *Rhodococcus equi* Infections in Foals. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 605. <https://doi.org/10.3390/vetsci9110605>

Received: 22 September 2022

Accepted: 27 October 2022

Published: 31 October 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

For many decades, *Rhodococcus equi* remains one of the main problems in foals before weaning worldwide. Despite being thoroughly described, this ubiquitous, opportunistic, intracellular, Gram + pathogen creates a severe risk of significant health problems and loss of foals in certain endemic studs. Its impact in a particular season and stud varies [1–5].

Commonly, rhodococcal infections are classified as pyogranulomatous pneumonia; however, the latest clinical papers identify many different forms of the disease, affecting tissues and organs other than the respiratory system. Increasing numbers of so-called “extrapulmonary changes” are being reported [4,6–9]. Additionally, many problems arise from the management of the disease. Lack of satisfying immunoprophylaxis, different approaches to diagnosis, no validated treatment alternatives, and problems with antimicrobial resistance creates a constant challenge for both researchers and field veterinarians [1,3,4,10–14].

This clinical report presents some less typical cases that have been presented for clinical and ultrasound evaluation during the studies on equine rhodococciosis provided

in central and eastern Poland by the Division of Veterinary Epidemiology and Economics, Warsaw University of Life Sciences (SGGW), during 2019–2021 breeding seasons.

## 2. Clinical Cases: History and Examination Results

### 2.1. Clinical Approach

The monitoring program of rhodococcosis in foals including lung ultrasound was established in 5 horse studs in cooperation with SGGW. The participating studs are considered endemic based on the history of multiple *Rhodococcus equi* infections confirmed by post-mortem examinations and positive microbiological culture on blood agar, CAZ-NB and API Coryne tests from the samples collected in previous breeding seasons. A total of 192 foals were examined during the program. The screening aimed to improve and promote non-invasive and widely available field management of rhodococcosis in equine breeding centres. Considering the prior history of multiple foal loss due to *Rhodococcus equi* and scientific reports which claimed a higher probability of such infections in pneumonic foals of 2–3 months of age than any other pathogens [15–19], the diagnosis was based on the clinical picture and ultrasonographic evaluation of the lungs and pleural cavity (Draminski 4Vet Slim, linear transducer 8–10 MHz) [6,20,21]. Imaging diagnostics were performed roughly in two-week intervals, between the 3rd week and 4th month of life or later in case of clinical problems in older foals. The alluded approach emerged from a constant need to improve clinical diagnostics and treatment protocols which vary significantly in different seasons, counties, and studs [1,17,22,23].

#### 2.1.1. Case 1—Premature Foal

A one-month-old Anglo-Arabian filly, born nearly a month prematurely was appointed for a clinical and ultrasound examination in early June 2019. At the delivery, apparent signs of immaturity were observed, such as small size, domed forehead, silky hair, tendon laxity, and general weakness. Because of the presence of the suckling reflex, the owner decided to introduce the treatment. She received colostrum within the first 12 h of her life from the local high-quality colostrum reserves (>30% of sugar, digital Colostrum Refractometer, KRUUSE, Langeskov, Denmark). Supportive treatment with dexamethasone (0.05 mg/kg IV) and butafosfan with B12 vitamin (0.05 mg/kg IV) was also administered. During her first weeks of life, she was bottle-fed with a milk replacer and received supportive therapies including physiotherapy and assistance with standing up and learning to nurse whenever it became possible. The foal was isolated from other horses for a prolonged time due to its weakness and significantly smaller size.

Her first examination took place at 5 weeks of age. This stud participated in a lung ultrasound screening program; however, the inclusion of the filly was primarily delayed due to her isolation and specific maintenance. Physical examination revealed pyrexia (rectal temperature of 39.6 °C) with a mildly elevated respiratory rate (56 breaths/min), tachycardia (108 beats/min), capillary refill time (CRT) of 2 s, pink and moist mucus membranes and mandibular lymph nodes within a normal range. She had no audible abnormalities on the thoracic auscultation. During the ultrasound examination, multiple B-lines were detected bilaterally. A multifocal abscess of significant size was detected on the left side at the 12th intercostal space (ICS). Furthermore, a 10 mm abscess occurred at the 14th ICS on the right side, and an irregular abscessation was visible cranially from the 9th ICS (Figure 1). Antimicrobial treatment with clarithromycin (7.5 mg/kg 2/daily PO) and rifampicin (5 mg/kg 2/daily PO) was implemented on the same day and continued for the following ten weeks, according to the changes in the filly's weight [1].



**Figure 1.** Ultrasonographic picture of an irregular abscessation observed in the right lobe from 9th ICS cranially during the first examination of Case 1. Visible parts of the abscess are 35.6 mm in width and 21.7 mm in depth.

During the treatment, she presented both recurrent fever and lesions of variable size and number. In her third month of life, the filly developed clinical signs of retrobulbar abscess. It progressed to partial blindness and left-sided microphthalmia over the next month, despite the additionally implemented treatment of topical tropicamide and gentamicin.

The filly was monitored until she was nearly 5 months old. Neither clinical findings nor major ultrasound abnormalities were present at that time. She had a small number of B-lines of variable width, present mostly in the cranial parts of the lungs and suggestive of post-inflammatory fibrous changes.

The case came back in July 2020, when she was 14 months old. This yearling was appointed for an ultrasound examination due to her quickly deteriorating condition and significant dyspnoea. Noticeable underweight and left-side microphthalmia were observed. On physical examination, a rectal temperature of 37.9 °C with a mildly elevated respiratory effort (28 breaths/min) and heart rate (HR; 76 beats/min), CRT of 2 s, pink and moist mucus membranes and mandibular lymph nodes within a normal range were noted. Apparent and loud wheezes were detected during thoracic auscultation. No other clinical abnormalities were reported. Ultrasound examination revealed a significant amount of free fluid in the pleural cavity bilaterally, with multiple hyperechoic shadows suggestive of fibrin clots. A few days later the yearling died. A shortened field necropsy was performed on the same day. A significant amount of fibrotic, turbid pleural fluid was confirmed in the thoracic cavity. Moreover, the size of the lungs was severely decreased and macroscopically presented major post-inflammatory and fibrotic changes. A small amount of turbid, fibrotic fluid was also present in the abdominal cavity, with chronic inflammatory changes in intestinal mucosa and mildly enlarged mesenteric lymph nodes. The owner decided not to pursue further post-mortem diagnostics. Bacteriological examination of the lung parenchyma revealed the presence of *Rhodococcus equi* and *Streptococcus* sp. β-haemolytic type.

### 2.1.2. Case 2—Problematic Bloodline

Two foals from the same Anglo-Arabian dam breeding line were undergoing a clinical and ultrasound examination as a part of a monitoring program aiming to recognize early signs of rhodococcosis in foals. Both mares, mother (Dam 1) and daughter (Dam 2) from this line had been successfully inseminated with two different, unrelated sires and were expecting foals in the 2020 breeding season. Both dams had a history of abortions or losses of foals in prior years; however, due to breeder change, it was not yet investigated.

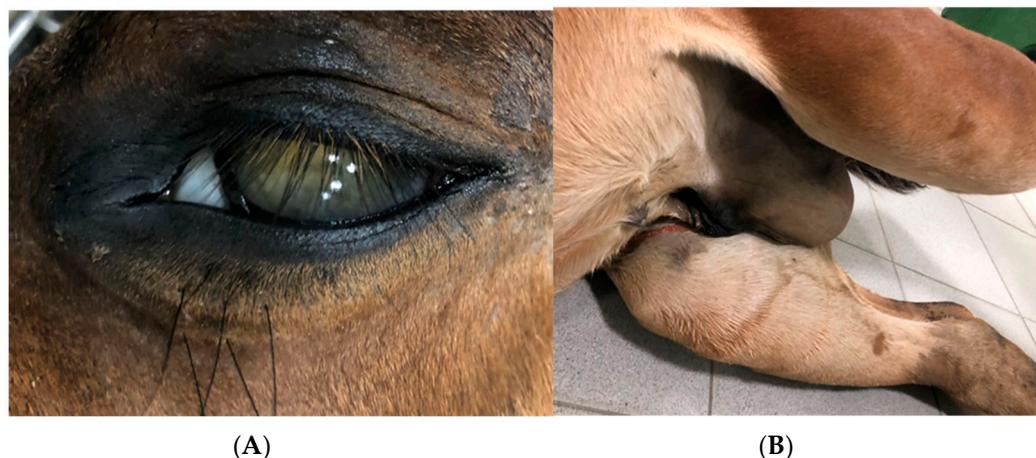
### 2.1.3. Case 2.1

#### Dam 2 Gave Birth to a Healthy Colt at the End of January 2020

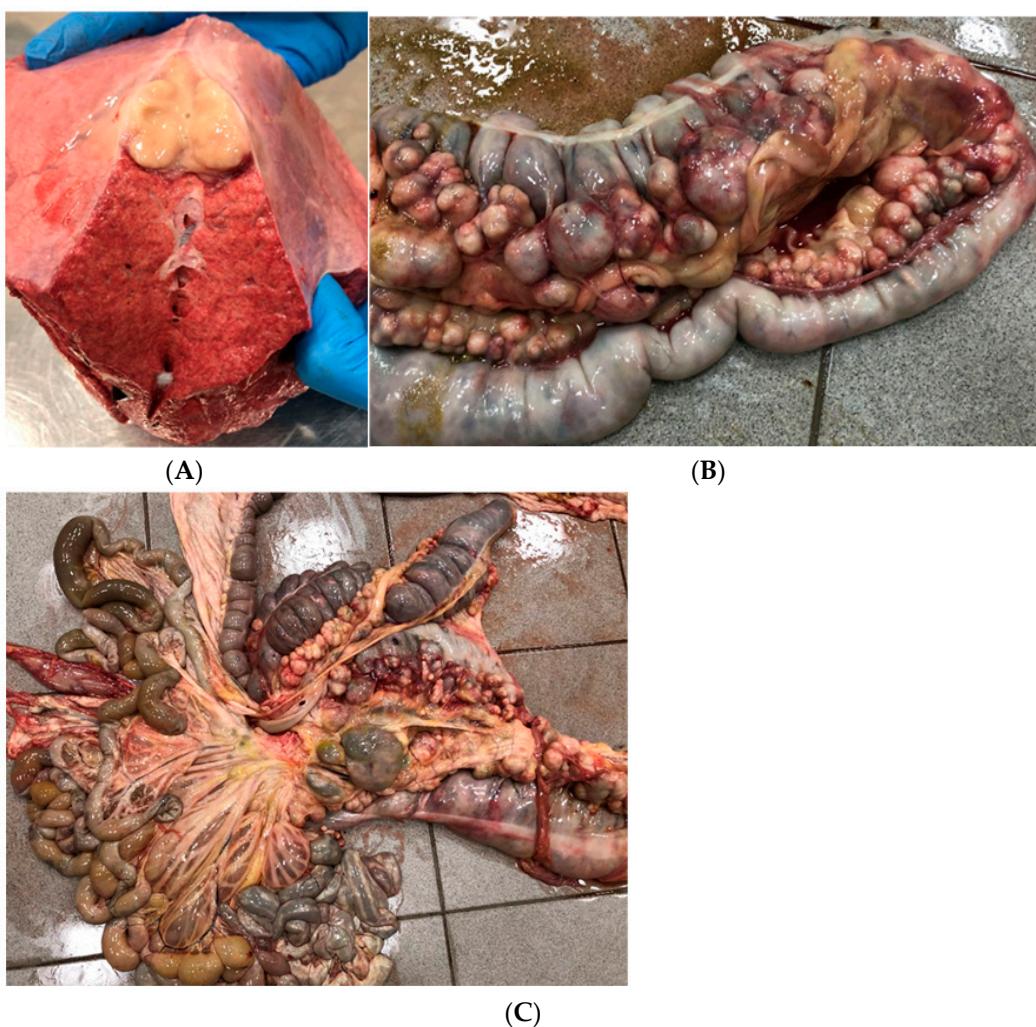
This foal underwent his first monitoring examination at the 3 weeks of age. He had no history of previous health issues. On physical examination, a rectal temperature of 38.7 °C with a respiratory rate within normal and tachycardia (100 beats/min), CRT < 2 s, pale pink and moist mucus membranes and mandibular lymph nodes within a normal range were noted. No auscultation abnormalities were detected. Ultrasound examination revealed a small number of B-lines, which might be considered acceptable for a foal at his age. The monitoring was performed in two weeks intervals, with no significant exacerbations detected until 8 weeks of age.

The foal was reported pyreptic at 10 weeks. On physical examination, a rectal temperature of 40.1 °C with a mildly elevated respiratory rate and HR of 76 beats/min, CRT of 2 s, pale pink and moist mucus membranes, and mandibular lymph nodes within normal were noted. No auscultation abnormalities were detected. A small number of B-lines and a few small consolidations in the right cranial lobe were recognized during the ultrasound examination. Since then, the colt was treated with tulathromycin (2.5 mg/kg 1/week IM) and rifampicin (5 mg/kg 2/daily PO) according to the changes in the foal's weight [1,13]. He was euthanized a month later, at 14 weeks old, due to progressive deterioration.

A necropsy was performed on the following day. The external evaluation showed significant underweight, bilateral uveitis (Figure 2a), and arthritis with a significant amount of synovial fluid, especially in the tarsal joints. Additionally, excessive overgrowth of the synovia was recognized. Internal evaluation of the thorax revealed fibrotic pleural fluid, inflammatory foci, and a few abscesses of 10–15 mm in diameter in the lung parenchyma (Figure 3a), particularly in the cranial and dorsal parts. Mediastinal lymph nodes were severely enlarged and purulent, which is rarely described [19]. Internal evaluation of the abdomen showed fibrotic, turbid fluid in the peritoneum, multiple abscesses along the large intestine with mesenteric lymph nodes abscessation (Figure 3b,c), and advanced inflammatory changes in the intestinal mucosa. Moreover, scrotal oedema (Figure 2b) with fibrotic, turbid fluid inside the tunica vaginalis, bilateral testicle atrophy, and inguinal hernia with omentum partially inside the scrotum were present. A bacteriological examination of the samples from the lung tissue and mesenteric lymph nodes confirmed the presence of *Rhodococcus equi*. The inflammatory changes in tarsal joints seemed to be immune-mediated aseptic polysynovitis since no microbiological culture from the synovial membrane samples was confirmed.



**Figure 2.** Anatomopathological findings concerning Case 2.1. Uveitis (A), scrotal edema and hernia (B).



**Figure 3.** Anatomopathological findings concerning Case 2.1. Dissection of a pulmonary abscess (A), large intestine and mesenteric abscessation (B,C).

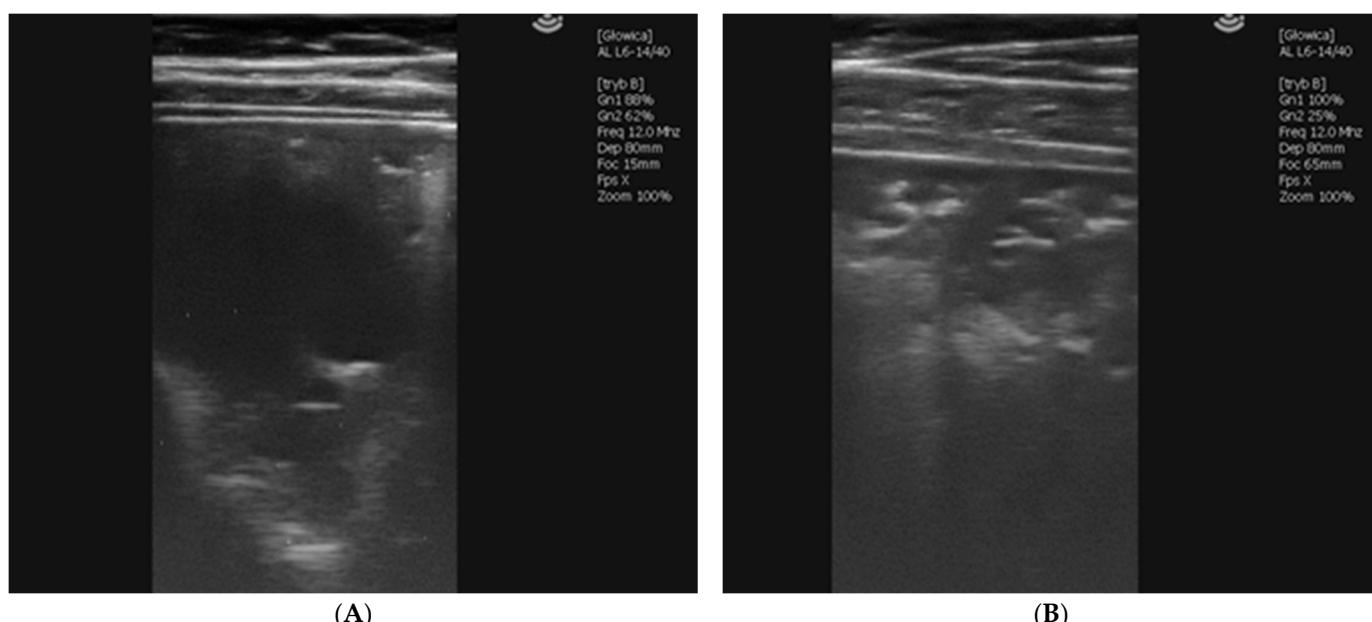
#### 2.1.4. Case 2.2

Dam 1 Gave Birth to a Healthy Filly at the Beginning of June 2020

This foal also underwent her first screening at 3 weeks old. She had no history of prior health issues. On physical examination, a rectal temperature of 38.6 °C with a respiratory

rate within a normal range and HR of 104 beats/min, CRT < 2 s, pink and moist mucus membranes and mandibular lymph nodes within a normal range were detected. She had no abnormalities audible on thoracic auscultation. Ultrasound examination revealed a small number of B-lines, which might be considered acceptable for a foal of this age. During the next ultrasound examination (5 weeks old) clinical parameters of the filly stayed within a normal range; however, a significant number of B-lines up to 5 mm was recognized with a few small consolidations in cranial lobes.

The filly was reported pyreptic with 39.9 °C being 7 weeks old. She also had a mildly elevated respiratory rate and tachycardia (96 beats/min), CRT of 2 s, pink mucus membranes, and mandibular lymph nodes within a normal range were detected. She had audible wheezes on thoracic auscultation. Ultrasound examination revealed two significant abscesses of 25 and 40 mm in diameter localized in 12 and 11 intercostal spaces, respectively on the left side (Figure 4a) and two abscesses on the right side, one of 43 mm in 11 ICS and another one, multifocal and irregular of significant size in 10–8 ICS (Figure 4b). The treatment was started on the same day (tulathromycin 2.5 mg/kg 1/week IM and rifampicin 5 mg/kg 2/daily PO) and conducted according to the changes in the filly's weight [1,13]. The foal was examined for the last time at 12 weeks, with poor improvement and persistent recurrent fever, and died three days later.



**Figure 4.** Ultrasonographic picture of an irregular abscessation with hypoechoic fluid in the left lobe in 11th ICS (A) and a multifocal abscessation in the right lobe from 11th ICS cranially in the right lobe (B) observed during the first examination of Case 2.2.

A necropsy was performed on the following day. The foal was in moderate body condition. The examination revealed multiple variable sizes of abscesses and inflammatory changes in lung parenchyma and a moderate amount of turbid pleural fluid. No extra-pulmonary changes were detected. Bacteriological examination of the lung parenchyma revealed the presence of *Rhodococcus equi* and *Streptococcus* sp. β-haemolytic type.

Due to significant health issues and deaths of the previous foals and suspicions of the breeder about congenital predispositions, it was decided to perform a laboratory test to determine the Immunoglobulin levels of the family. Accordingly, the mother's (Dam 1), daughter's (Dam 2), and grandson's Ig levels were investigated in the laboratory at the beginning of May. The second examination took place in August and included Dam 1 and her filly. The results of the examinations are presented in Table 1.

**Table 1.** Results of immunoglobulin levels investigation. The Ig reference values for foals above 60 days of life are the same as for adult horses.

Horse	Results from the Beginning of May 2020		Results from the End of August 2020	
	IgG (Ref. Value 500–2000)	IgM (Ref. Value 90–150)	IgG (Ref. Value 500–2000)	IgM (Ref. Value 90–150)
Dam 1	1480 mg/dL	340.1 mg/dL	2190 mg/dL	272.3 mg/dL
Filly from Dam 1			630 mg/dL	4.5 mg/dL
Dam 2 *	1310 mg/dL	34.8 mg/dL		
Colt from Dam 2	1390 mg/dL	14.2 mg/dL		

\* Daughter of Dam 1.

The results indicated that none of the horses had IgM levels within a normal range, and all of the offspring showed significant IgM deficiency. Thus, it might be suspected that Dam 1 might pass some congenital immunological defect affecting the foals' losses. No apparent clinical signs that might indicate infection were detected in both mares during the blood sampling. As a result, the breeder decided to withdraw both mares from reproduction without further investigation.

#### 2.1.5. Case 3—Suspicion of Extrapulmonary Disorders

A 6-week-old Arabian filly was appointed for a clinical and ultrasound examination due to weakness, mild diarrhoea, reduced appetite, no weight gain, and apathy for a few days. She was not included in an ultrasound screening program. Her daily rectal temperature measurements had stayed within a normal range and there have been no other health complaints about her since birth.

During the first physical examination, a rectal temperature of 38.3 °C with a respiratory rate within a normal range and HR of 64 beats/min, CRT of 2 s, pink and moist mucus membranes and mandibular lymph nodes within normal were detected. She had mild auscultation wheezes present on the left side of the thorax. A small number of B-lines were detected bilaterally during the ultrasound examination, which may be considered normal for a foal at this age. However, on the left side at the 16th intercostal space, an abscess of 45 mm was detected. This location is considered less common for a single pulmonary consolidation since most of the lesions are usually detected in the cranial and medial parts of the lungs [20]. Moreover, her clinical appearance described above implied the possibility of extrapulmonary disorders connected with abdominal abscessation; however, no such changes were available to visualize during the ultrasound examination. Due to the significant size of the abscess and the poor general condition of the filly, antimicrobial treatment was recommended and implemented on the following day. She was treated with tulathromycin (2.5 mg/kg 1/week IM) according to the changes in the filly's weight [13]. The antimicrobial treatment was conducted until she reached 11 weeks when no signs of abscessation were detected during the ultrasound examination.

Clinical parameters stayed within a normal range during the treatment, and no fever incidents were detected. It took approximately two weeks for the foal to regain the expected condition and the abscess to reduce in size (26.4 mm). On the following examination, the abscess became irregular due to fibrotic tissue appearing in the lung parenchyma and the exact abscess' size was not available to be measured. During the last examination, there were no remains of the abscess detected.

#### 2.1.6. Case 4—Drug-Induced Hyperthermia

A 5-week-old Angloarabian filly, was appointed for a clinical and ultrasound examination due to pyrexia and dyspnoea. The haematologic results from the day of pyrexia onset presented in Table 2 indicate acute inflammation and dehydration. Her daily rectal

temperature measurements stayed within a normal range until two days before the ultrasound examination, when it reached 39.2 °C. She was given benzylpenicillin (8 mg/kg, IM) with streptomycin (10 mg/kg, IM) and metamizole (22 mg/kg, IV) for three days which reduced the fever.

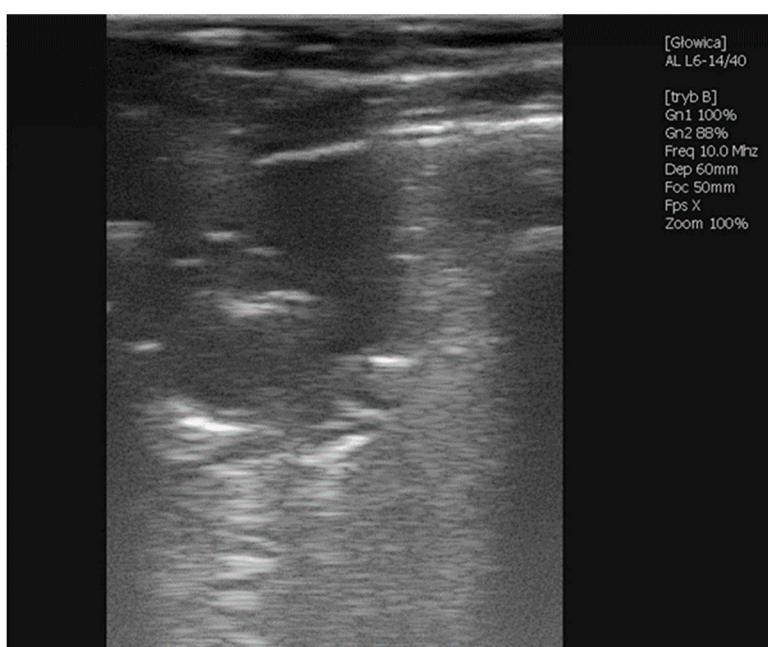
**Table 2.** Haematological results of Case 4 from the day of pyrexia onset with reference values [24].

	RBC	MCV	HCT	PLT	MPV	WBC	HGB	MCH	MCHC	LYMF	GRAN	MID
Ref. value	6.5–9.99	38–53	33–48	115–450	-	5.0–12.6	11–16	12–16	31–37	1.4–2.3	2.75–8.19	-
Case 4	9.96	32	31.9	360	7.3	29.7	20.7	20.8	64.8	4.6	23.5	1.5

RBC—red blood cell count; MCV—mean cell volume; HCT—haematocrit; PLT—platelet count; MPV—mean platelet volume; WBC—white blood cell count; HGB—haemoglobin; MCH—mean cell haemoglobin; MCHC—mean corpuscular haemoglobin concentration; LYMF—lymphocytes; GRAN—granulocytes; MID—mid-range absolute cell count.

During the first examination two days later, she presented dyspnea. Her rectal temperature was 38.6 °C HR 64 beats/min, CRT 2 s, pink mucus membranes, mandibular lymph nodes within a normal range, and she had no other apparent health issues. She had no audible auscultation abnormalities on any side of the thorax. A moderate number of B-lines were detected bilaterally during the ultrasound examination, which might be considered acceptable for a foal at this age for a short period. An irregular abscess of significant diameter was detected on the left side at the 8–6th intercostal space. On the right side of the thorax, another irregular abscess occurred at the 11–8th intercostal space. Antimicrobial treatment was recommended and implemented on the same day. The filly was treated with clarithromycin (7.5 mg/kg 2/daily PO) and rifampicin (5 mg/kg 2/daily PO) according to the changes in the filly's weight [1]. The antimicrobial treatment was conducted until the filly reached 14 weeks when no abnormalities were detected during an ultrasound examination.

The second examination of the filly happened to occur at the beginning of June (7 weeks of age). The outdoor temperatures were reaching 30 °C during the daytime and the foal presented rectal temperatures from 39.5 °C up to 41.0 °C for a few days, with little response to antipyretic drugs. However, an ultrasound examination revealed a significant reduction in the abscesses' size (Figure 5). Since macrolides are known to have an anhidrosis potential in some horses, such a case was suspected. Therefore, the stable staff was asked to wet the filly with cold water regularly and to carefully monitor the rectal temperatures for a few days. Hyperthermia secondary to macrolide-induced anhidrosis seemed to be the proper diagnosis and owing to regularly wetting the filly and careful temperature checks, no other antipyretic drugs were needed. The procedure was implemented throughout the treatment, which took nearly two months in total. Wetting was conducted whenever the outdoor temperature was high and the stable staff reported increased rectal temperature (above 39 °C) during the morning examination.



**Figure 5.** Ultrasonographic picture of a circular abscessation observed in the left lung, 16th ICS during the second examination of Case 3. Visible parts of the abscess are 26.4 mm in depth and 23.3 mm in width.

### 3. Discussion

*Rhodococcus equi* is commonly associated with respiratory signs in foals from endemic studs. However, attaining reports about extrapulmonary findings and persisting impact of *Rhodococcus* on the health of endemic areas may indicate underlying issues. Extrapulmonary findings are often bound with more severe cases and worse prognoses [6,8,25–27]. This approach may be very accurate, but our ability to diagnose some of them, especially those connected with abdominal abscessations, is limited due to the most common locations of the changes, often superimposed by gaseous loops of the intestines. Moreover, clinical findings of abdominal abscessation are usually very unspecific and often restricted to diarrhoea and underweight. Those cases can also be difficult to differentiate from macrolide-induced problems. Many extrapulmonary incidents are confirmed and reported only based on post-mortem examination [25,27], or, in the case of skeletal abscesses during the radiological examination due to different reasons. Both types of changes may be significantly underdiagnosed. In the aforementioned Case 2.2, abdominal signs were suspected due to cachexia, persisting diarrhoea and slow response to antimicrobial treatment.

Ophthalmic changes are barely reported and generally worsen prognoses [6,26]. What is more, the papers describe cases of rhodococcal infections referred for hospital treatment, which are usually more severe [6]. In the alluded cases, ophthalmic changes terminated in the loss of foals. Filly described in Case 1 seemed to have the retrobulbar abscess at least partially cured. The eye bulb became microphthalmic, but the filly reacted properly to rapid movements and light changes on the affected side.

One of the most important problems while managing rhodococcosis is undoubtedly an extremely limited number of therapeutics effective in vivo [1,4,12–14,25,28]. Additionally, increasing antimicrobial resistance presents a serious threat to both human and veterinary medicine [29–31]. Unfortunately, in many countries, we lack such data, or, as in Poland, they are limited only to some regions [28,31]. In all of the aforementioned fatal cases, antimicrobial resistance against antibiotics selected for treatments was not detected.

Antimicrobial resistance does not end the list of disadvantages. Digestive issues and dysbiosis resulting from the use of certain drugs, especially macrolides, may create a serious risk for both mares and foals [32]. What is more, macrolide-induced anhidrosis may present

even greater peril. These reactions in certain foals are connected with ion channels and  $\beta_2$ -adrenergic receptors, but the proceedings and prognosis in such incidents are still not settled [33,34]. Up to date, in case of such antimicrobial adverse effects, the only solution implemented in cooperating studs relies on careful monitoring of the foals by appropriately qualified and responsible stable staff and their minute fulfilment of the recommendations.

Genetic susceptibility for rhodococcal infections in foals was not established and scientific reports on that matter are also extremely limited [2,35]. Some genes were suspected to possibly influence the development and course of clinical rhodococcosis but were not yet extended for more biological samples and results. Other papers claim no strict reliance on genetic factors in the development of clinical rhodococcosis [35]. It might be possible that some mares deliver foals that are of higher risk due to lower colostrum quality. Some foals may also be more prone to the disease due to increased exposure to pathogens caused by environmental factors or higher periodic faecal shedding among the group [3,4,36–38] but not for any strictly genetic problem. Thus some epigenetic and environmental factors may become crucial for further investigation.

Another suspicion arises around recurrent problems in certain bloodlines, frequently reported by field practitioners but not mentioned in scientific reports. In such cases, stud veterinarians often briefly investigate the matter in local laboratories; however, it usually ends with no clear answer. The key to resolving the problem may stay beyond genetic profile. For instance, some authors report a correlation between early Equine Herpes Virus type 1 or 2 (EHV1 and 2) infections and an increased risk of developing clinical rhodococcosis [39,40]. This hypothesis may be at least partially true for many reasons. The possibility of post-viral immunosuppression after early herpes infection being connected with increased susceptibility to clinical rhodococcosis is worth considering. Other species, including humans, significantly less affected by environmental *Rhodococcus*, suffer from the disease mostly when immunologically deficient [4,10,41–45]. What is more, susceptibility often occurs simultaneously with the highest exposure to a significant number of clinical and subclinical foals confirmed to have increased faecal shedding [36]. This hypothesis can also be supported considering that clinical signs usually develop during the immunological gap in foals. Nevertheless, these matters are still to be investigated.

The deficiency in immunoglobulins type M (IgM) of possibly inherited background suspected above partially binds earlier hypotheses. Reports about deficient IgM in horses are extremely rare. Primary selective IgM deficiency is usually mentioned in the manuals with a grave prognosis due to the foals being highly prone to multiple and recurrent bacterial and viral infections, especially pneumonia. The issue typically occurs in Arabians or AQH breeds [24,46]. The IgM deficiency was also described in a colt with a confirmed impaired B-cell response. IgMs are known to take part in initial antigen recognition and humoral activation, so this may partially explain the primary inability to fight infection in such foals and the following deterioration [47]. Secondary selective IgM deficiency is associated with lymphoma in adult horses; however, despite high sensitivity, it failed to be its only marker during diagnostic trials [48,49]. Although IgG seems to play a major role in clearing rhodococcal infections, IgM levels were also found elevated in the bronchoalveolar lavage (BAL) of foals affected with rhodococcosis [49]. These immunologic patterns remain yet undetermined; however, congenital immunological deficiencies could be considered in some recurrent problems of certain bloodlines.

The study presents certain limitations. The monitoring program was introduced as an additional tool to improve diagnostic procedures and treatment outcomes in endemic studs, thus the veterinarian performing lung ultrasound diagnosis was only an advisor to the stud veterinarians, who held full responsibility for the decisions regarding diagnosis and treatment. Moreover, the article gathers a few retrospective clinical cases, which unfortunately made most of the additional diagnostic procedures no longer available to perform.

#### 4. Conclusions

Regardless of being an old and common dilemma, *Rhodococcus equi* and its clinical presentation remain a very challenging problem in endemic horse studs. What is particularly important is to preserve both scientific and clinical points of view to critically assess the ideas and implement proper solutions in managing the disease in field conditions, which remains an ultimate goal in solving clinical problems.

**Author Contributions:** A.R. and A.M.-K. performed diagnostic and veterinary procedures or sampling; A.R., A.B., M.Ż. and L.W. performed necropsies; A.R., A.B. and A.C. analysed and selected data; M.Ż. was responsible for photographic documentation and laboratory data curation; A.R. prepared and wrote the manuscript; A.B., A.C. and L.W. supervised the work. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was partially funded by grants from the Ministry of Science and Higher Education of Poland, decision no. 9506/E-385/R/2018 and Ministry of Education and Science of Poland, decision no. 16/491568/SPUB/SP/2021.

**Institutional Review Board Statement:** The study was carried out following the standards recommended by The Act of the Polish Parliament of 15 January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes (Journal of Laws 2015, item 266). According to Polish legal regulations (The Act of the Polish Parliament of 15 January 2015 on the Protection of Animals Used for Scientific or Educational Purposes, Journal of Laws 2015, item 266) no formal ethics consent was required for this study except for the informed consent for participation in the study, which was obtained from the owner of the studs.

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained in advance from all of the representatives responsible for animals involved in the study.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

#### References

1. Giguère, S.; Cohen, N.D.; Keith Chaffin, M.; Slovis, N.M.; Hondalus, M.K.; Hines, S.A.; Prescott, J.F. Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2011**, *25*, 1209–1220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Heller, M.C.; Jackson, K.A.; Watson, J.L. Identification of Immunologically Relevant Genes in Mare and Foal Dendritic Cells Responding to Infection by *Rhodococcus equi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *136*, 144–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Dawson, T.R.M.Y.; Horohov, D.W.; Meijer, W.G.; Muscatello, G. Current Understanding of the Equine Immune Response to *Rhodococcus equi*. An Immunological Review of *R. equi* Pneumonia. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2010**, *135*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Muscatello, G.; Leadon, D.P.; Klay, M.; Ocampo-Sosa, A.; Lewis, D.A.; Fogarty, U.; Buckley, T.; Gilkerson, J.R.; Meijer, W.G.; Vazquez-Boland, J.A. *Rhodococcus equi* Infection in Foals: The Science of “Rattles”. *Equine Vet. J.* **2007**, *39*, 470–478. [[CrossRef](#)]
5. Witkowski, L.; Kaba, J.; Rzewuska, M.; Nowicki, M.; Szalusi-Jordanow, O.; Kita, J. Development of ELISA Test for Determination of the Level of Antibodies against *Rhodococcus equi* in Equine Serum and Colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2012**, *149*, 280–285. [[CrossRef](#)]
6. Tarancón, I.; Leiva, M.; Jose-Cunilleras, E.; Ríos, J.; Peña, T. Ophthalmologic Findings Associated with *Rhodococcus equi* Bronchopneumonia in Foals. *Vet. Ophthalmol.* **2019**, *22*, 660–665. [[CrossRef](#)]
7. Reuss, S.M.; Chaffin, M.K.; Schmitz, D.G.; Norman, T.E. Sonographic Characteristics of Intraabdominal Abscessation and Lymphadenopathy Attributable to *Rhodococcus equi* Infections in Foals. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2011**, *52*, 462–465. [[CrossRef](#)]
8. Reuss, S.M. *Rhodococcus equi*, Extrapulmonary Disorders and Lack of Response to Therapy. *Equine Vet. Educ.* **2021**, *34*, 399–400. [[CrossRef](#)]
9. Morresey, P.R.; Garrett, K.S.; Carter, D. *Rhodococcus equi* Occipital Bone Osteomyelitis, Septic Arthritis and Meningitis in a Neurological Foal. *Equine Vet. Educ.* **2011**, *23*, 398–402. [[CrossRef](#)]
10. Lin, W.V.; Kruse, R.L.; Yang, K.; Musher, D.M. Diagnosis and Management of Pulmonary Infection Due to *Rhodococcus equi*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2019**, *25*, 310–315. [[CrossRef](#)]
11. Giguère, S.; Jacks, S.; Roberts, G.D.; Hernandez, J.; Long, M.T.; Ellis, C. Retrospective Comparison of Azithromycin, Clarithromycin, and Erythromycin for the Treatment of Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2004**, *18*, 568–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Wetzig, M.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of the Combination of Doxycycline and Azithromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *Equine Vet. J.* **2019**, *52*, 613–619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Rutenberg, D.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of Tulathromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2017**, *31*, 901–906. [CrossRef]
14. Hildebrand, F.; Venner, M.; Giguère, S. Efficacy of Gamithromycin for the Treatment of Foals with Mild to Moderate Bronchopneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 333–338. [CrossRef] [PubMed]
15. Leclerc, M.; Magdesian, K.G.; Kass, P.H.; Pusterla, N.; Rhodes, D.M. Comparison of the Clinical, Microbiological, Radiological and Haematological Features of Foals with Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* and Other Bacteria. *Vet. J.* **2011**, *187*, 109–112. [CrossRef] [PubMed]
16. Bianchi, M.V.; Mello, L.S.; Ribeiro, P.R.; Wentz, M.F.; Stolf, A.S.; Lopes, B.C.; de Andrade, C.P.; Snel, G.G.M.; Sonne, L.; Driemeier, D.; et al. Causes and Pathology of Equine Pneumonia and Pleuritis in Southern Brazil. *J. Comp. Pathol.* **2020**, *179*, 65–73. [CrossRef]
17. McCracken, J.L.; Slovis, N.M. Use of Thoracic Ultrasound for the Prevention of *Rhodococcus equi* Pneumonia on Endemic Farms. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.* **2009**, *55*, 38–44.
18. Huber, L.; Gessler, L.T.; Sanz, M.G.; Garbade, P.; Vargas, Á.; Silveira, B.P. Monitoring Foals by Thoracic Ultrasonography, Bacterial Culture, and PCR: Diagnostic of *Rhodococcus equi* Subclinical Pneumonia in South of Brazil. *J. Equine Vet. Sci.* **2018**, *60*, 104–108.e1. [CrossRef]
19. Giguère, S.; Roberts, G.D. Association between Radiographic Pattern and Outcome in Foals with Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi*. *Vet. Radiol. Ultrasound* **2012**, *53*, 601–604. [CrossRef]
20. Venner, M.; Walther, S.M.; Münzer, B.; Stadler, P. Diagnostic of Pulmonary Abscesses in Foals—Comparison of Sonographic and Radiographic Examination. *Pferdeheilkunde* **2014**, *30*, 561–566. [CrossRef]
21. Łobaczewski, A.; Czopowicz, M.; Moroz, A.; Mickiewicz, M.; Stabińska, M.; Petelicka, H.; Frymus, T.; Szalut-Jordanow, O. Lung Ultrasound for Imaging of B-Lines in Dogs and Cats—A Prospective Study Investigating Agreement between Three Types of Transducers and the Accuracy in Diagnosing Cardiogenic Pulmonary Edema, Pneumonia and Lung Neoplasia. *Animals* **2021**, *11*, 3279. [CrossRef] [PubMed]
22. Arnold-Lehna, D.; Venner, M.; Berghaus, L.J.; Berghaus, R.; Giguère, S. Changing Policy to Treat Foals with *Rhodococcus equi* Pneumonia in the Later Course of Disease Decreases Antimicrobial Usage without Increasing Mortality Rate. *Equine Vet. J.* **2020**, *52*, 531–537. [CrossRef] [PubMed]
23. Cauchard, S.; Giguère, S.; Venner, M.; Muscatello, G.; Cauchard, J.; Cohen, N.D.; Haas, A.; Hines, S.A.; Hondalus, M.K.; Horohov, D.W.; et al. *Rhodococcus equi* Research 2008–2012: Report of the Fifth International Havemeyer Workshop. *Equine Vet. J.* **2013**, *45*, 523–526. [CrossRef]
24. Slovis, N.M.; McAuliffe, S.B. *Color Atlas of Diseases and Disorders of the Foal*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; ISBN 9780702028106.
25. Reuss, S.M.; Chaffin, M.K.; Cohen, N.D. Extrapulmonary Disorders Associated with *Rhodococcus equi* Infection in Foals: 150 Cases (1987–2007). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **2009**, *235*, 855–863. [CrossRef]
26. Wilkes, E.J.A.; Hughes, K.J.; Kessell, A.E.; Raidal, S.L. Successful Management of Multiple Extrapulmonary Complications Associated with *Rhodococcus equi* Pneumonia in a Foal. *Equine Vet. Educ.* **2016**, *28*, 186–192. [CrossRef]
27. le Corre, S.; Janes, J.; Slovis, N.M. Multiple Extra-Pulmonary Disorders Associated with *Rhodococcus equi* Infection in a 2-Month-Old Foal. *Equine Vet. Educ.* **2021**, *33*, 396. [CrossRef]
28. Kalinowski, M.; Jarosz, Ł.; Grądzki, Z. Assessment of Antimicrobial Susceptibility of Virulent Strains of *Rhodococcus equi* Isolated From Foals and Soil of Horse Breeding Farms With and Without Endemic Infections. *J. Equine Vet. Sci.* **2020**, *91*, 103114. [CrossRef] [PubMed]
29. Huber, L.; Giguère, S.; Slovis, N.M.; Carter, C.N.; Barr, B.S.; Cohen, N.D.; Elam, J.; Erol, E.; Locke, S.J.; Phillips, E.D.; et al. Emergence of Resistance to Macrolides and Rifampin in Clinical Isolates of *Rhodococcus equi* from Foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *63*. [CrossRef]
30. Huber, L.; Giguère, S.; Cohen, N.D.; Slovis, N.M.; Hanafi, A.; Schuckert, A.; Berghaus, L.; Greiter, M.; Hart, K.A. Prevalence and Risk Factors Associated with Emergence of *Rhodococcus equi* Resistance to Macrolides and Rifampicin in Horse-Breeding Farms in Kentucky, USA. *Vet. Microbiol.* **2019**, *235*, 243–247. [CrossRef]
31. Burton, A.J.; Giguère, S.; Sturgill, T.L.; Berghaus, L.J.; Slovis, N.M.; Whitman, J.L.; Levering, C.; Kuskie, K.R.; Cohen, N.D. Macrolide- and Rifampin-Resistant *Rhodococcus equi* on a Horse Breeding Farm, Kentucky, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 282–285. [CrossRef]
32. Noah Cohen, B.D. *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals: An Update on Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. AAEP 2021. Available online: <https://aaep.org/horsehealth/rhodococcus-equ-i-pneumonia-foals-update-epidemiology-diagnosis-treatment-and-prevention> (accessed on 10 September 2022).
33. Stieler, A.L.; Sanchez, L.C.; Mallicote, M.F.; Martabano, B.B.; Burrow, J.A.; MacKay, R.J. Macrolide-Induced Hyperthermia in Foals: Role of Impaired Sweat Responses. *Equine Vet. J.* **2016**, *48*, 590–594. [CrossRef] [PubMed]
34. Patterson Rosa, L.; Mallicote, M.F.; MacKay, R.J.; Brooks, S.A. Ion Channel and Ubiquitin Differential Expression during Erythromycin-Induced Anhidrosis in Foals. *Animals* **2021**, *11*, 3379. [CrossRef] [PubMed]
35. Mcqueen, C.M.; Dindot, S.V.; Foster, M.J.; Cohen, N.D. Genetic Susceptibility to *Rhodococcus equi*. *J. Vet. Intern. Med.* **2015**, *29*, 1648–1659. [CrossRef] [PubMed]

36. Huber, L.; Giguère, S.; Berghaus, L.J.; Hanafi, A.; Ryan, C. Fecal Shedding of *Rhodococcus equi* in Mares and Foals after Experimental Infection of Foals and Effect of Composting on Concentrations of *R. equi* in Contaminated Bedding. *Vet. Microbiol.* **2018**, *223*, 42–46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Cohen, N.D.; Chaffin, M.K.; Kuskie, K.R.; Syndergaard, M.K.; Blodgett, G.P.; Takai, S. Association of Perinatal Exposure to Airborne *Rhodococcus equi* with Risk of Pneumonia Caused by *R. equi* in Foals. *Am. J. Vet. Res.* **2013**, *74*, 102–109. [[CrossRef](#)]
38. Madrigal, R.G.; Shaw, S.D.; Witkowski, L.A.; Sisson, B.E.; Blodgett, G.P.; Chaffin, M.K.; Cohen, N.D. Use of Serial Quantitative PCR of the VapA Gene of *Rhodococcus equi* in Feces for Early Detection of *R. equi* Pneumonia in Foals. *J. Vet. Intern. Med.* **2016**, *30*, 664–670. [[CrossRef](#)]
39. Nordengrahn, A.; Rusvai, M.; Merza, M.; Ekstrijm, J.; Morein, B.; Bela, S. Equine Herpesvirus Type 2 (EHV-2) as a Predisposing Factor for *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals: Prevention of the Bifactorial Disease with EHV-2 Immunostimulating Complexes. *Vet. Microbiol.* **1996**, *51*, 55–68. [[CrossRef](#)]
40. Perez-Ecija, A.; Mendoza, F.J.; Estepa, J.C.; Bautista, M.J.; Pérez, J. Equid Herpesvirus 1 and *Rhodococcus equi* Coinfection in a Foal with Bronchointerstitial Pneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **2016**, *78*, 1511–1513. [[CrossRef](#)]
41. Stewart, A.; Sowden, D.; Caffery, M.; Birt, M.; Broom, J. *Rhodococcus equi* Infection: A Diverse Spectrum of Disease. *IDCases* **2019**, *15*, e00487. [[CrossRef](#)]
42. Zychska, M.; Witkowski, L.; Klementowska, A.; Rzewuska, M.; Kwiecien, E.; Stefanska, I.; Czopowicz, M.; Szalus-Jordanow, O.; Mickiewicz, M.; Moroz, A.; et al. *Rhodococcus equi*—Occurrence in Goats and Clinical Case Report. *Pathogens* **2021**, *10*, 1141. [[CrossRef](#)]
43. Bordin, A.I.; Gressler, L.T.; Alexander, E.R.C.; Sule, P.; Cirillo, J.D.; Edwards, J.F.; Cohen, N.D. Guinea Pig Infection with the Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi*. *Vet. Microbiol.* **2018**, *215*, 18–22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Suzuki, Y.; Kubota, H.; Madarame, H.; Takase, F.; Takahashi, K.; Sasaki, Y.; Kakuda, T.; Takai, S. Pathogenicity and Genomic Features of VapN-Harboring *Rhodococcus equi* Isolated from Human Patients. *Int. J. Med. Microbiol.* **2021**, *311*, 151519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Salmuna, Z.N.; Azim, W.A.W.A.; Harun, A. *Rhodococcus equi* Pulmonary Infection in an Immunocompromised Patient: Case Report and Literature Review. *Clin. Microbiol. Newslet.* **2018**, *40*, 128–130. [[CrossRef](#)]
46. Boy, M.G.; Zhang, C.; Antczak, D.F.; Hamir, A.N.; Whitlock, R.H.; Baker, J.A. Unusual Selective Immunoglobulin Deficiency in an Arabian-Foal. *J. Vet. Intern. Med.* **1992**, *6*, 201–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Weldon, A.D.; Zhang, C.; Antczak, D.F.; Rebhun, W.C. Selective IgM Deficiency and Abnormal B-Cell Response in a Foal. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **1992**, *201*, 1396–1398. [[PubMed](#)]
48. Taintor, J.; Schleis, S. Equine Lymphoma. *Equine Vet. Educ.* **2011**, *23*, 205–213. [[CrossRef](#)]
49. Perkins, G.A.; Nydam, D.V.; Flaminio, M.J.B.F.; Ainsworth, D.M. Serum IgM Concentrations in Normal, Fit Horses and Horses with Lymphoma or Other Medical Conditions. *J. Vet. Intern. Med.* **2003**, *17*, 337–342. [[CrossRef](#)]



## **Oświadczenie współautorów**



Warszawa, 6.09.2024

lek. wet. Alicja Rakowska

Samodzielnny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

**Rakowska A**, Cywińska A, Witkowski L. Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. Animals (Basel). 2020 Oct 18;10(10):1910.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu pracy, opracowaniu materiałów źródłowych oraz przygotowaniu, korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 80%



Alicja Rakowska

Warszawa, 9.09.2024

prof. dr hab. Anna Cywińska  
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, **Cywińska A**, Witkowski L. Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. Animals (Basel). 2020 Oct 18;10(10):1910.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu pracy oraz korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 10%



Anna Cywińska

Warszawa, 6.09.2024

dr hab. Lucjan Witkowski, prof. SGGW  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Cywinska A, **Witkowski L.** Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. Animals (Basel). 2020 Oct 18;10(10):1910.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu pracy oraz korekcie publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 10%



Lucjan Witkowski

Warszawa, 6.09.2024

lek. wet. Alicja Rakowska

Samodzielnny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

**Rakowska A, Czopowicz M, Bereznowski A, Witkowski L.** Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis. *Sci Rep.* 2023 Nov 8;13(1):19401.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu badań terenowych i zbieraniu danych, opracowaniu wyników, materiałów źródłowych i przygotowaniu, korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 65%



Alicja Rakowska

Warszawa, 9.09.2024

prof. dr hab. Michał Czopowicz  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, **Czopowicz M**, Bereznowski A, Witkowski L. Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis. Sci Rep. 2023 Nov 8;13(1):19401.

polegał na uczestnictwie w przygotowaniu i przeprowadzeniu analizy statystycznej, opracowaniu wyników oraz w przygotowaniu, korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 20%



Michał Czopowicz

Warszawa, 6.09.2024

dr Andrzej Bereznowski  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Czopowicz M, **Bereznowski A**, Witkowski L. Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis. Sci Rep. 2023 Nov 8;13(1):19401.

polegała na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu badań, udziale w wykonaniu badań terenowych i zbieraniu danych oraz w korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 8%

Andrzej Bereznowski



Warszawa, 6.09.2024

dr hab. Lucjan Witkowski, prof. SGGW  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Czopowicz M, Bereznowski A, **Witkowski L.** Investigation of the relationship between pulmonary lesions based on lung ultrasound and respiratory clinical signs in foals with suspected pulmonary rhodococcosis. Sci Rep. 2023 Nov 8;13(1):19401.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu badań oraz w korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 7%



Lucjan Witkowski

Warszawa, 6.09.2024

lek. wet. Alicja Rakowska  
Samodzielnny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

**Rakowska A, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, Cywińska A, Żychska M, Witkowski L.**  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct 31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu badań terenowych i sekcyjnych, zbieraniu danych, opracowaniu wyników i materiałów źródłowych oraz w przygotowaniu, korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 65%



Alicja Rakowska

Warszawa, 6.09.2024

lek. wet. Agnieszka Marciniak-Karcz  
Prywatna Praktyka Weterynaryjna  
Aubagne, Francja

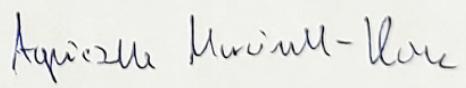
### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, **Marciniak-Karcz A**, Bereznowski A, Cywińska A, Źychska M, Witkowski L.  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct  
31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w wykonaniu badań terenowych i zbieraniu danych.

Mój udział procentowy szacuję na 12%



Agnieszka Marciniak-Karcz

Warszawa, 6.09.2024

dr Andrzej Bereznowski  
Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Marciak-Karcz A, **Bereznowski A**, Cywińska A, Żychska M, Witkowski L.  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct 31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji i planu badań, wykonaniu badań terenowych i sekcyjnych, zbieraniu danych oraz w Korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 8%

Andrzej Bereznowski



Warszawa, 9.09.2024

prof. dr hab. Anna Cywińska  
Katedra Nauk Podstawowych i Przedklinicznych  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, **Cywińska A**, Żychska M, Witkowski L.  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct 31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji, wyników oraz w Korekcie i redakcji publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 5%



Anna Cywińska

Warszawa, 9.09.2024

lek. wet. Monika Żychska

Samodzielnny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, Cywińska A, **Żychska M**, Witkowski L.  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct 31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w wykonaniu badań sekcyjnych, dokumentacji fotograficznej i w  
opracowaniu wyników.

Mój udział procentowy szacuję na 2%

Monika Żychska



Warszawa, 6.09.2024

dr hab. Lucjan Witkowski, prof. SGGW  
Samodzielnny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej  
Instytut Medycyny Weterynaryjnej  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

### OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że mój wkład w powstanie pracy:

Rakowska A, Marciniak-Karcz A, Bereznowski A, Cywińska A, Żychska M, **Witkowski L.**  
Less Typical Courses of Rhodococcus equi Infections in Foals. Vet Sci. 2022 Oct 31;9(11):605.

polegał na uczestnictwie w opracowaniu koncepcji badań, w wykonaniu badań sekcyjnych, opracowaniu wyników oraz w korekcie publikacji.

Mój udział procentowy szacuję na 8%



Lucjan Witkowski



Wyrażam zgodę na udostępnienie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW

*Alica Radwańska*  
(czytelny podpis autora pracy)

