

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rhodococcus equi* EM
ÉGUAS PRENHAS E POTROS**

Carla Braga Martins

Prof. Dr. José Corrêa de Lacerda Neto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - UNESP, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária - área de concentração em Clínica Médica Veterinária.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Fevereiro-2003

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

CARLA BRAGA MARTINS - nascida na cidade de Niterói/RJ, em 05 de janeiro de 1974, portadora do RG nº 009911706-1 IFP/RJ. Médica Veterinária graduada pela Universidade Federal Fluminense (UFF), com início em março de 1993 e término em dezembro de 1997, CRMV 11907/SP. Participou do programa de aprimoramento na área de Reprodução e Obstetrícia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus de Jaboticabal, no período de fevereiro de 1999 a janeiro de 2001. Ingressou no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária na FCAV - UNESP/Jaboticabal em março de 2001, na área de Clínica Médica Veterinária.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores;

Se não houver flores, valeu a sombra das folhas;

Se não houver folhas, valeu a intenção das sementes.

Ao meu pai, irmão, tios Ique e Angela,
com todo o meu amor...

Ofereço

À minha mãe, avó (Elza) e Nn Irvana Girl - "in memoriam",

com saudades...

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela minha saúde, por tudo o que conquistei, por me proteger e dar forças para lutar e seguir sempre adiante;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias-UNESP/Jaboticabal, por me acolher e se tornar a minha segunda casa;

À CNPQ, pela bolsa de Mestrado concedida;

Ao meu orientador José Corrêa de Lacerda Neto, pela oportunidade, apoio, orientação, boa vontade e amizade;

À professora Rosângela Zacarias Machado, pelo incentivo, ensinamentos, boa vontade e orientação, fundamentais para a realização deste trabalho;

À professora Mirela Tinnuci, pela disponibilidade, boa vontade, ensinamentos e convivência sempre amigável;

As técnicas Maria Antonieta, Rosângela (Toti) e aos demais colegas do Departamento de Patologia Veterinária, pelas facilidades encontradas, apoio técnico e bons momentos de descontração;

Ao Prof. Dr. Wilson Rodrigues pela disponibilidade, contribuindo com sua opinião e experiência;

Ao Prof. Euclides Braga, pela orientação estatística;

Ao Prof. Fernando Davila, pela disponibilização do laboratório de Microbiologia;

Aos colegas do Departamento de Microbiologia Henry Gamez e João (mosquito), pela grande contribuição e brincadeiras;

Ao técnico João do Departamento de Tecnologia, pela grande colaboração;

À prof. Dra. Maria Cristina Roque da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e a doutoranda Luciana Colbachini Ferraz, pela doação de material, receptividade, boa vontade e ensinamentos fundamentais para realização deste experimento;

Ao Médico Veterinário Marcelo Mandrá Lima, por ter tornado possível a realização deste estudo, pela atenção, ensinamentos e amizade;

Ao Sr. José Mendonça, proprietário do Haras Agromen por ter concedido a oportunidade de desenvolver este trabalho;

Aos Senhores Arnaldo e Nilda Mozer pela hospitalidade, amizade e carinho;

À todos os Funcionários da Fazenda de Criação São Geraldo - Haras Agromen, em especial ao Sr. Arnaldo, Edson (Russo) e Jean, pela grande colaboração;

À amiga e companheira Paula Valente, pelos momentos de sonhos, lutas e baladas;

À amiga Elaine Piffer, pelos momentos de grande parceria; e a sua família que me acolheu me fazendo sentir parte dela;

Aos meus amigos do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, em especial a família “Dan” (Flora, Samira, Andrey, Guilherme, Eduardo, Raphael, Wando, Fabiana, Zamur, Luana e Bel) pelo convívio, união, apoio, ajuda, amizade e brincadeiras gostosas;

Aos meus amigos Karen, Chiquinho, Dani, Regina, Carla, Flávia, Juliana, Viviane, Halim, Ricardo (Lepra), Nilson, Simone, Fabrício, Ana Paula, Andréa e Cláudia (Gaúchas), João, Fabiana, Maricy e Rogério, pela oportunidade de convivência;

Ao meu maninho Ricardo Braga Martins, pela torcida, confiança e amor que sempre me dedicou;

Ao meu tio Luiz Henriques (Ique), por ter sido sempre o meu maior exemplo de vida, força e coragem;

À minha mais que amiga Fernanda Garrido, pela parceria, carinho, força, incentivo e confiança dedicados em tantos anos de amizade;

À minha tia Angela Aurnheimer Martins, por ter ajudado a tornar possível o sonho de estar hoje aqui e por estar sempre pronta a me ajudar;

Ao meu pai Carlos Aurnheimer Martins, por ter me ensinando a amar a terra e aos animais, me inspirando a ser quem eu sou;

Ao meu cãozinho Pompom, meu fiel e grande amigo, por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida;

Aos “meus” Cavalos, sensíveis e sinceros em todas as atitudes;

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUÇÃO	3
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1 HISTÓRICO.....	5
2.2 CARACTERÍSTICAS.....	5
2.3 HABITAT.....	6
2.4 EPIDEMIOLOGIA.....	7
2.5 FONTES DE INFECÇÃO.....	8
2.6 TRANSMISSÃO.....	8
2.7 PERÍODO DE INCUBAÇÃO.....	9
2.8 PATOGENIA.....	9
2.9 SINAIS CLÍNICOS.....	10
2.10 DETERMINANTES DE VIRULÊNCIA.....	11
2.11 SUSCEPTIBILIDADE.....	13
2.12 IMUNIDADE.....	14
2.13 DIAGNÓSTICO.....	16
2.14 TRATAMENTO.....	18
2.15 PREVENÇÃO E CONTROLE.....	18
2.16 IMPACTO SOBRE A VIDA ATLÉTICA DO ANIMAL.....	21
2.17 INFECÇÃO NO HOMEM.....	21
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 DESCRIÇÃO DO CRIATÓRIO.....	23
3.2 ANIMAIS.....	23
3.3 ANTÍGENOS.....	25
3.4 EXAME CLÍNICO.....	25

3.5 COLHEITA DE MATERIAL.....	26
3.5.1 Amostras de sangue.....	26
3.6 ANÁLISES LABORATORIAIS	26
3.6.1 Dot Blot.....	26
3.6.2 Teste ELISA indireto.....	27
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
IV. RESULTADOS.....	31
4.1 ACHADOS CLÍNICOS.....	31
4.2 RESPOSTA IMUNE HUMORAL.....	33
4.2.1 Dot Blot.....	33
4.2.2 Determinação dos Níveis de ELISA.....	33
4.2.3 Éguas vacinadas (Grupos I e II).....	34
4.2.4 Grupos Vacinado e Controle.....	37
4.3.3 Potros (Grupos III e IV).....	38
V. DISCUSSÃO.....	40
VI. CONCLUSÃO	50
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
VI. APÊNDICE.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Percentual de potros (n=16) distribuídos de acordo com o tempo decorrido entre o nascimento e a primeira mamada.....	32
Figura 2. Média dos Níveis de Elisa observados nos grupos de éguas vacinadas em relação aos antígenos APTX e comercial, em diferentes momentos.....	35
Figura 3. Média dos níveis de ELISA observados nos grupos controle e vacinados em relação aos antígenos APTX e comercial, em diferentes momentos.....	37
Figura 4. Média dos níveis de ELISA observados nos grupos de potros, em relação aos antígenos APTX e comercial, em diferentes momentos.....	38

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição das éguas de acordo com o tempo de eliminação da placenta e a qualidade do colostro.....	31
TABELA 2. Distribuição dos potros de acordo com o tempo de ingestão do colostro.....	32
TABELA 3. Determinação dos Níveis de ELISA de acordo com as faixas de A/P.....	33
TABELA 4. Distribuição das éguas vacinadas (n=16) submetidas ao ELISA-teste com os antígenos APTX e comercial, em Níveis de ELISA em diferentes momentos.....	36
TABELA 5. Distribuição dos potros (n=16) submetidos ao ELISA-teste com os antígenos APTX e comercial, em níveis de ELISA em diferentes momentos.....	36
TABELA 6. Distribuição das éguas vacinadas (n=16) em relação aos níveis de ELISA e diferentes momentos de colheita de amostras Séricas.....	39
TABELA 7. Distribuição dos potros (n=16) em relação aos níveis de ELISA e diferentes momentos de colheita de amostras séricas.....	39

TITULAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rhodococcus equi* EM ÉGUAS PRENHAS E POTROS

RESUMO

A transferência de imunidade passiva, através da ingestão do colostro é um fator de grande importância para a sobrevivência de potros neonatos. O colostro é rico em imunoglobulinas, que constitui para esses animais a única fonte de proteção contra os agentes infecciosos durante o período neonatal, fase em que os animais apresentam maior susceptibilidade às doenças. Dentre estas, destaca-se a infecção ocasionada pelo *Rhodococcus equi*, responsável por elevadas taxas de mortalidade e grandes perdas econômicas. A infecção possui distribuição mundial e causa pneumonia supurativa e enterite associada a linfadenite em potros com menos de seis meses de idade. Apesar da sua grande importância no Brasil, a rodococose ainda é pouco estudada em nossas condições. O objetivo deste estudo foi comparar a resposta imune humoral entre éguas das raças Brasileiro de Hipismo (BH) e Bretã previamente imunizadas para *R. equi*, e avaliar o efeito da imunoprevenção ativa materna na transferência de anticorpos específicos protetores, via colostro, para neonatos eqüinos, utilizando na detecção de anticorpos o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste), comparando dois diferentes antígenos (APTX e comercial). Os resultados demonstraram que ocorreu aumento na titulação de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* nos grupos de éguas após a vacinação e transferência de anticorpos através do colostro para os potros neonatos. Não houve efeito da raça na produção de anticorpos. O antígeno comercial detectou títulos de anticorpos maiores e mais persistentes do que o antígeno APTX. O ELISA teste demonstrou sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*R. equi*.

Palavras chave: eqüino, pneumonia, enterite, *Rhodococcus equi*.

ANTIBODIES TITULATION TO *Rhodococcus equi* PREGNANT MARES AND FOALS

ABSTRACT

The passive immunity transfer through colostrum is very important to new-born foals survival. The colostrum is immunoglobulin full, which is responsible to protect against infectious agents during new-born period, stage that animals present higher susceptibility to diseases. Among these, the infection caused by *Rhodococcus equi* has the great importance, responsible for large economics damage and high mortality rates in animals illness. The infection has a world-wide distribution and it causes suppurative pneumonia and enteritis associated to lymphadenitis in foals under 6 months old. Although its great importance in Brazil, this disease is not well studied. The aims of this study was to compare the humoral immune response between the breeds "Brasileiro de hipismo" (BH) and Breton, previously vaccinated against *Rhodococcus equi*, and to evaluate the matern immunoprophylaxis effect in the specific antibodies transfer through colostrum to new-born foals, using the Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA-test) comparing two different antigens ("APT-X" and commercial"). The results demonstrated that there were an increase in mares antibodies after vaccination and also antibodies transfer through colostrum to new-born foals. There was no breed effect in the antibodies production. The Commercial antigen demonstrated antibodies titulation higher and more persistent than APT-X antigen. The ELISA-test demonstrated sensible *R. equi* antibodies determination.

Key words: pneumonia, enteritis, *Rhodococcus equi*, foal.

I. INTRODUÇÃO

O *Rhodococcus equi* (*R. equi*), é um constituinte natural da flora microbiana intestinal dos equinos, podendo, em condições especiais, se tornar um patógeno importante, sendo responsável pelo desenvolvimento de pneumonia abscedante e/ou enterite em potros nos primeiros seis meses de vida.

A infecção é considerada oportunista em potros, ocorrendo no período em que a imunidade adquirida pelo colostro está diminuída e o sistema imunológico do recém-nascido ainda não está totalmente maduro. A importância desta afecção reside, principalmente, nos elevados prejuízos econômicos acarretados pela perda de animais relacionada a alta taxa de mortalidade e ao custo, duração e pouca eficiência do tratamento.

No Brasil, embora a rodococose seja considerada uma das doenças mais severas da equideocultura, existem poucos estudos desenvolvidos em nossas condições, enfocando a prevenção dessa enfermidade em neonatos eqüinos. Entretanto, algumas soluções têm sido tentadas por pesquisadores buscando prevenir possíveis falhas na transmissão passiva de imunoglobulinas e também no sentido de estimular as imunidades passiva e/ou ativa contra o *R. equi*.

Concomitantemente, na ânsia de encontrar soluções para o problema tão grave, criadores de eqüinos e veterinários de campo têm utilizado todos os recursos disponíveis na tentativa de encontrar soluções práticas para uma situação considerada crítica. Além de mudanças nas práticas de manejo e adequações sanitárias de pastos e instalações, têm-se buscado recursos, que mesmo não encontrando respaldo na literatura científica, oferecem, ao menos, algumas soluções para esses criadores e seus animais.

Dentre as inúmeras alternativas colocadas, a vacinação das éguas no final da gestação tem ganhado corpo tornando-se prática corriqueira entre os grandes haras que vêem nela a melhor solução para o combate a rodococose. Embora, a vacinação contra *R. equi* não seja feita de forma sistemática no Brasil, um número considerável

de propriedades utilizam uma vacina produzida na Argentina, denominada comercialmente de Rhodovac[®].

Existe uma grande polêmica quanto à importância real do uso da vacina na prevenção da doença. O grupo composto pelos defensores é constituído principalmente por aqueles que adotaram a prática rotineira da vacinação, alguns a pelo menos três anos, e tem conseguido controlar satisfatoriamente a afecção. Do outro lado, encontra-se o grupo constituído pelos cépticos e alguns pesquisadores que não conseguiram comprovar cientificamente a sua eficiência imunológica.

Considerando-se a importância da doença e a falta de comprovação da eficiência da vacinação, este trabalho se propôs:

1. Avaliar a cinética da resposta de anticorpos (classe IgG) anti *Rhodococcus equi* em éguas Brasileiro de Hipismo (BH) e Bretãs, prenhes e vacinadas, comparando o efeito da raça nesta resposta;
2. Avaliar o efeito da imunização materna na transferência de anticorpos protetores em neonatos eqüinos, comparando a resposta entre os potros que receberam colostro de éguas BH e Bretãs;
3. Avaliar e comparar a reatividade de dois antígenos (APTX e comercial) no teste ELISA indireto.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico

A primeira descrição de isolamento da bactéria, inicialmente denominada de *Corynebacterium equi*, foi feita por Magnusson em 1923, na Suécia (MARTENS et al., 1989b). Estudos sobre a classificação de espécies, realizados em meados da década de setenta, visando a sistematização de agentes infecciosos com características morfológicas e bioquímicas semelhantes, propuseram a criação de um novo gênero, denominado *Rhodococcus*, que passou a englobar dez novas espécies (Bousfield e Goodfellow, 1976; Goodfellow e Alderson, 1977; citados por BARTON e HUGHES, 1980). Desta maneira, o *Corynebacterium equi* passou a ser denominado, desde então, de *Rhodococcus equi* (BARTON e HUGHES, 1980).

O gênero *Rhodococcus*, pertencente ao grupo dos Actinomicetos Nocardiformes, abrange bactérias gram positivas de morfologia variável agrupadas primariamente com base na composição da parede celular (FINNERTY, 1992).

2.2 Características

O *Rhodococcus equi* é uma bactéria Gram-positiva, filamentosa, pleomórfica, que não forma esporos, não apresenta motilidade, não fermenta carboidrato e é ácido resistente (JONES et al., 1997). É um microorganismo aeróbico obrigatório, mas pode crescer em atmosfera contendo até 40% de dióxido de carbono. Cresce na faixa de temperatura de 5 a 42°C com ponto ótimo em torno de 30°C (BARTON e HUGHES, 1980).

Segundo Timoney (1988), o *R. equi* é mais resistente ao calor que as bactérias comuns, resistindo a valores de alcalinidade e acidez extremos e à dessecação. É resistente também, à maioria dos desinfetantes químicos e as condições ambientais adversas, como calor e frio (BURKS, 1996). Estas características permitem a viabilidade da bactéria por longos períodos no meio ambiente.

O microrganismo possui uma cápsula lipopolissacarídica, a qual inibe a fagocitose e o ajuda a aderir-se na superfície das células que mais tarde infecta (KNIGHT, 1969; COSTERTON et al., 1978; WOOLCOCK e MUTIMER, 1978).

2.3 Habitat

Takai et al. (1986), demonstraram que o *R. equi* é encontrado no trato digestório de herbívoros, sugerindo ser constituinte da microbiota intestinal principalmente de eqüinos (WOOLCOCK et al., 1980; NAKAZAWA et al., 1983; PRESCOTT et al, 1984; TAKAI e TSUBAKI, 1985). O patógeno é eliminado pelas fezes destes animais, e ao atingir o solo multiplica-se rapidamente. Sua eliminação ocorre a partir do sétimo dia pós-infecção persistindo por 30 dias (ANZAI et al., 1997). Hughes e Sulaiman (1987), relataram que o seu crescimento apresenta considerável incremento em solos contendo fezes.

Takai et al. (1987), isolaram a bactéria em 80% das amostras de fezes coletadas antes e após o parto em éguas provenientes de propriedades com diversos níveis de infecção. Nestas propriedades os autores também isolaram *R. equi* a partir do solo e do ar das instalações nos meses em que ocorrem os nascimentos de potros e observaram um aumento do número de bactérias isoladas em dias secos e ventosos.

Segundo Beech (1991), os potros podem excretar grande número de microorganismos durante suas primeiras oito semanas de vida, mas as condições anaeróbicas inibem a multiplicação do patógeno. Takai et al. (1986), assinalaram que o *R. equi* pode ser encontrado em fezes de potros durante a primeira semana de vida, e a sua concentração permanece alta durante as oito primeiras semanas. A presença dessa bactéria no trato gastro-intestinal foi considerada a principal fonte de estimulação antigênica da resposta imune em potros (PRESCOTT et al., 1980; WILKS et al., 1982; NAKAZAWA et al., 1983).

O estabelecimento da flora intestinal bacteriana nos potros ocorre no período do nascimento até 12^a semana de vida. Nesse período, o *R. equi* pode atingir concentrações intestinais elevadas colocando em risco a saúde dos animais. Após a 12^a semana de vida ocorre o declínio da concentração intestinal da *R. equi* nos potros. A

capacidade de multiplicação dessas bactérias nos potros sugere o porquê da permanência dessa enfermidade nas fazendas de reprodução (PRESCOTT et al., 1997).

Algumas teorias relacionam a diarreia observada em potros de duas a três semanas de idade, com uma reação à colonização do trato gastrointestinal pelo *R. equi* (OGLESBY, 1998).

2.4 Epidemiologia

O *R. equi* é um microrganismo ubíquo, encontrado no solo de todos os continentes, com exceção da Antártica. Reconhecido como parasita intracelular facultativo, está associado a diferentes afecções nos animais, afetando bovinos, ovinos, suínos, macacos, eqüinos, principalmente potros, e inclusive o homem (LINDER, 1997).

O *Rhodococcus equi* é um dos patógenos bacterianos mais importantes causadores de pneumonia fatal em eqüinos jovens com idade entre um e quatro meses. No Brasil, a rodococose é considerada uma das doenças mais severas na criação de potros, mas raramente acomete cavalos adultos (BECÚ, 1999).

Segundo Jones et al. (1997), a morbidade pode atingir 20% e a mortalidade 80% entre os animais da criação com menos de seis meses. Em algumas propriedades o *R. equi* ocorre esporadicamente e em outras a ocorrência é endêmica (TAKAI, 1997; CARLTON e McGAVIN, 1988).

Esta infecção não atinge, simultaneamente, um número expressivo de animais e em algumas propriedades acaba tornando-se uma doença enzoótica (MARTENS et al., 1988).

A diferença de prevalência da doença nas propriedades não está diretamente relacionada à concentração de *R. equi* no solo, mas à quantidade de *R. equi* virulentos (TAKAI et al., 1995a). A frequência dos plasmídeos associados à virulência em *R. equi* obtidos de potros com pneumonia foi significativamente maior do que nas amostras isoladas do solo em propriedades positivas para a doença (BEECH, 1991; MARTENS et al., 2000).

Jubb e Kennedy (1993), sugeriram que a ocorrência da rodococose estaria associada com as diferenças de susceptibilidade do animal. A prevalência parece aumentar em ambientes empoeirados e com clima seco. O número de *R. equi* que pode ser isolado do ar nos estábulos é maior quando a temperatura, aridez e os ventos aumentam, diminuindo nos dias chuvosos (TAKAI et al., 1991). Mesmo quando a concentração desta bactéria no solo dos pastos está elevada, potros que pastam parecem correr menor risco do que aqueles que vivem ao redor dos estábulos, onde há maior probabilidade de se encontrar um ambiente empoeirado (BEECH, 1991).

2.5 Fontes de infecção

O solo foi apontado como a principal fonte de infecção em potros (Jubb e Kennedy, 1993). Outras fontes apontadas foram as fezes das éguas, assim como a sua flora faríngea e uterina (TAKAI et al. 1987), alimentos e água contaminados por exsudato (BURROWS, 1968), *Parascaris equorum*, através da migração larvária pelo organismo desempenharia o papel de veiculador do agente (LANGENEGGER et al., 1970). Martens et al. (1989a), sugeriram que a infecção por *R. equi* poderia ocorrer de forma secundária a onfaloflebite.

Beech (1991), relatou que devido à multiplicação do *R. equi* nas fezes de cavalos saudáveis, as fezes são consideradas fonte inicial de exposição para potros jovens, uma vez que para estes a coprofagia é tida como atitude comportamental rotineira, e acredita-se que seja um processo fisiológico responsável pelo desenvolvimento da microbiota cecal.

2.6 Transmissão

Existe alguma controvérsia a respeito da transmissão deste patógeno; se ocorre por inalação (via aerógena) ou ingestão (via oral). Entretanto, a maioria dos autores consultados relataram que a via mais comum é a aerógena, especialmente durante a época de seca, quando há maior acúmulo de poeira, facilitando a aspiração do agente infectante (BLOOD e RADOSTIS, 1991; DAVIS et al., 1995; JONES et al., 1997; TAKAI, 1997; BECÚ, 1999; FAYET, 1999).

A ingestão desses microrganismos é provavelmente a principal via de exposição para os potros, mas acredita-se que raramente induza à doença do trato respiratório (MARTENS et al., 1989b; BEECH, 1991).

2.7 Período de incubação

O período de incubação da doença é de 13 a 19 dias, sendo mais provável a ocorrência da infecção nas três primeiras semanas de vida, em decorrência da falha de transferência de imunidade passiva (PEIRÓ et al., 2002).

2.8 Patogenia

Hietala e Ardans (1987), demonstraram que o *R. equi* é um agente intracelular facultativo, capaz de sobreviver e multiplicar-se no interior de macrófagos alveolares do hospedeiro e interferir na fusão fagossoma-lisossoma. A opsonização da bactéria com anticorpos contra componentes capsulares do *R. equi* aumenta essa fusão, e à maior eficiência em eliminar a bactéria no interior do macrófago alveolar.

A imunidade mediada por células parece ser importante na prevenção ou na eliminação de infecções causadas por *R. equi* (ELLENBERGER et al., 1984). Estudos realizados em camundongos infectados com *R. equi* demonstraram que as células Th-1, uma subclasse de linfócitos TCD4+, são necessárias para o desenvolvimento de uma resposta imune bem sucedida contra este patógeno (HINES et al., 1997). Entre outros fatores, as células Th-1 produzem interferon-gama (INF- γ), citocina ativadora de macrófagos, que regula positivamente as vias necessárias para a morte microbiana, estimulando a fusão fagossomo-lisossomo e aumentando a expressão dos receptores Fc. Os efeitos do INF- γ são potencializados pela interleucina 2 (IL-2), outra citocina Th-1 (AINSWORTH, 1999).

Em contraste, uma diferente classe de linfócitos CD4+, as células Th-2, coordenam respostas imunes caracterizadas pela secreção de IL-4, IL-5 e IL-10. Como a IL-10 regula negativamente a atividade macrófágica, não se sabe ainda se os potros afetados desenvolvem e mantêm infecções por *R. equi* devidas à resposta Th-2 ou à resposta Th-1 (AINSWORTH, 1999). O papel das citocinas na remoção do *R. equi*

pulmonar nos eqüinos é uma importante questão que ainda permanece sem resposta (HINES et al., 2000).

2.9 Sinais Clínicos

A infecção caracteriza-se por uma broncopneumonia supurativa crônica e enterite, associadas a altas taxas de mortalidade (BECÚ, 1999). Há duas formas clínicas de ocorrência natural da pneumonia: subaguda e a crônica. A subaguda é caracterizada por pneumonia piogranulomatosa miliar difusa e os potros afetados geralmente morrem dentro de alguns dias de manifestação de angústia respiratória. Na forma crônica, a pneumonia progride durante semanas ou meses, e os poucos sobreviventes podem apresentar fibrose pulmonar e capacidade respiratória diminuída. Embora acredite-se que a infecção ocorra no período neonatal, os sinais freqüentemente não são notados até que o potro tenha mais que um mês de idade (MARTENS et al., 1989b; BEECH, 1991).

Dungworth (1993), relatou que a forma intestinal se desenvolve com quadro de diarréia e inflamação piogranulomatosa dos linfonodos mesentéricos que pode evoluir para caseosa resultando em uma enterocolite, estando geralmente associada com a manifestação respiratória. Em 50% dos casos de ocorrência de lesões pulmonares há manifestação intestinal. Yager (1987) e Burks (1996), relataram que a diarréia pode ser o único sinal presente inicialmente. Dungworth (1993), relatou que o aparecimento da forma intestinal isolada é rara.

Segundo Becú (1999), a principal manifestação clínica em potros é a broncopneumonia abscedante de evolução crônica, associada à linfadenite supurativa. Outros sintomas observados foram a dispnéia, febre, tosse, apatia, corrimento nasal mucopurulento, desinteresse em mamar e emaciação progressiva, diarréias, artrite, osteomielite, abscessos subcutâneos, panofalmia e uveíte. Fitzgerald e Yamini (1995), descreveram a ocorrência de aborto em égua associada à pneumonia no potro, causada pelo *R. equi*.

2.10 Determinantes de virulência

Determinados fatores de virulência conferem ao *R. equi* mecanismos de evasão do sistema imune, possibilitando ao microorganismo multiplicar-se no interior de macrófagos e neutrófilos, dificultando o estabelecimento da resposta imune adequada e induzindo lesões do tipo granulomatosa, de difícil resolução tecidual. Estas características também os tornam refratários à terapia antimicrobiana convencional (VIVRETE, 1992; HINES et al., 1997).

Takai et al. (1991b), utilizando soros de potros infectados naturalmente, caracterizaram os antígenos produzidos por amostras de *R. equi* e sugeriram que uma proteína de 15-17 quilodalton (kDa) designada como VapA, estaria associada à virulência e poderia ser utilizada como marcador da contaminação ambiental por amostras virulentas da bactéria. Os autores demonstraram que todas as amostras de *R. equi* virulentas testadas continham o antígeno 15-17kDa e um plasmídeo de 85kb (quilobase). A perda desse plasmídeo determinava o desaparecimento da proteína e um intenso decréscimo na letalidade para o camundongo.

Takai et al. (1993), estudando amostras isoladas de casos clínicos em eqüinos, encontraram em todas as amostras, exceto uma, o antígeno associado à virulência. Verificaram ainda, que todas as amostras virulentas apresentavam o plasmídeo de 85-90 kb. Os autores concluíram que as infecções em eqüinos seriam causadas apenas por amostras que possuíssem o antígeno de virulência, e que a amostra isolada sem a proteína de virulência teria perdido o plasmídeo que a codificaria durante o cultivo laboratorial.

Takai et al. (1992), demonstraram que o antígeno 15-17 kDa estava localizado na superfície externa da bactéria, e sua expressão era influenciada pela temperatura de crescimento das bactérias. Em temperaturas baixas (25-32°C) não havia expressão, enquanto que entre 34° e 41°C a proteína era sintetizada em quantidade considerável.

Fontanals et al. (1997), relataram que outros antígenos de alto peso molecular (21, 44 e 66 KDa), associados ao VapA (15 e 17 KDa), poderiam ser importantes na indução de anticorpos protetores contra pneumonia por *R. equi* em potros jovens, e que

estes antígenos estariam presentes em altas concentrações na vacina Rhodovac e induziriam antigenicidade vacinal.

Tan (1995) e Fernandez et al. (1997), constataram em potros uma resposta humoral intensa à proteína VapA, e sugeriram que a mesma constituiria um importante antígeno podendo ser utilizada como imunógeno.

Outros antígenos como as exoenzimas conhecidas como fatores equi (Prescott et al., 1984) e polissacarídeos capsulares, foram considerados protetores, quando administrados em éguas e potros, sendo efetivos na prevenção da doença (WOOLCOCK et al., 1987).

A maioria das cepas de *R. equi* produz os fatores equi, identificados como proteínas solúveis de atividades distintas; uma sendo a colesterol oxidase e outra a fosfolipase. Aparentemente, exercem seus efeitos sobre os componentes internos da membrana celular de eritrócitos, sendo responsáveis pela lise destas células (BECÚ e POLLEDO, 1995).

Takai et al. (1991b), observaram que o soro de animais infectados, também reagia com uma proteína de 74kDa que corresponderia ao “fator equi” descrito por Prescott et al. (1982). Segundo Prescott et al. (1984), o soro da maioria dos potros com pneumonia de ocorrência natural contém anticorpos para os “fatores equi”. Alguns pesquisadores sugerem que a ação desses fatores sobre a membrana lisossomal contribuiria para a degeneração celular que ocorre após os macrófagos alveolares do potro fagocitarem *R. equi* viáveis (HONDALUS, 1997; AINSWORTH, 1999).

Takai et al. (2001), relataram a descoberta de dois novos plasmídeos de *R. equi* associados à virulência (90 kb tipo III e 90 kb tipo IV) isolados em um potro que veio a óbito com quadro de pneumonia severa e enterite ulcerativa, indicando que este animal foi infectado com dois tipos distintos de *R. equi*. Considerando-se assim, a existência de pelo menos 10 tipos de plasmídeos isolados em eqüinos no mundo, sendo cinco tipos isolados apenas no Japão. Este trabalho reportou também, a existência de diferenças geográficas na distribuição dos plasmídeos.

2.11 Susceptibilidade

A rodococose acomete apenas potros, em geral com idade inferior a quatro e seis meses. Não ocasiona problemas em equinos adultos, mesmo quando a exposição ambiental é alta (TAKAI, 1997).

A susceptibilidade de potros a esta doença não foi plenamente elucidada, sugerindo que ocorre devido a associação de fatores como: a) exposição do sistema respiratório a um grande número de microorganismos de *R. equi* (aerossóis), especialmente nos períodos mais secos e empoeirados e em locais com alta densidade populacional; b) declínio da imunidade passiva proveniente da mãe e c) ausência de um mecanismo humoral e celular competentes (ELLENBERGER et al., 1984b; KANALY et al., 1993).

A susceptibilidade de potros ao *R. equi* é um fenômeno atribuído em parte, à imaturidade das respostas imune-humorais e mediada por células (YAGER, 1987; TAKAI et al., 1995b). Estudos *in vitro* demonstraram que bactérias virulentas fagocitadas conseguiram replicar-se dentro de macrófagos, inibindo a fusão fagossomo-lisossomo e, portanto, evitando sua morte intracelular (ZINK et al., 1985; HIETALA e ARDANS, 1987; HONDALUS e MOSSER, 1994).

Wilks et al. (1982), relataram provável existência de indivíduos ou de linhagens familiares mais susceptíveis à infecção pelo *R. equi*. Falcon et al. (1985), estudando propriedades com infecção por *R. equi*, constataram a predileção desta bactéria pela raça Árabe. Todavia, Finger (1996), observou um maior índice de isolamento da bactéria nos animais mestiços do que nos da raças Puro Sangue Inglês e Brasileiro de Hipismo. Segundo Yager (1987), a susceptibilidade genética ao *R. equi* pode ser um dos principais fatores determinantes do desenvolvimento clínico da doença.

A inalação da poeira, infecção viral concomitante, migração de parasitos e outros fatores que causam “stress” podem determinar o aparecimento da doença (MARTENS et al., 1988).

2.12 Imunidade

Sob circunstâncias normais, a proteção imunológica temporária contra as infecções comuns nas primeiras semanas de vida é propiciada sob a forma de anticorpos passivamente transferidos, via colostro, pois não ocorre transferência transplacentária de imunoglobulinas em eqüinos (JEFFCOTT, 1974; McCLURE, 1994).

O neonato possui enterócitos especializados no trato gastrointestinal, capazes de absorver por pinocitose, moléculas de grande porte como as imunoglobulinas. Porém, esta capacidade de absorção, mantêm-se por curto período, perdurando do nascimento até 18 a 24 horas de vida, encontrando-se nas primeiras seis a doze horas, a fase máxima de absorção (JEFFCOTT, 1987).

A falha da transferência de imunidade passiva (FTIP) pode ocorrer devido a vários fatores, tais como, o pequeno volume e baixa concentração de imunoglobulinas do colostro, a perda do colostro antes do parto através da lactação prematura, a ingestão de um volume insuficiente pelo neonato, ou a baixa absorção de imunoglobulinas pelos enterócitos. A FTIP ocorre freqüentemente em potros prematuros, pois estes nascem fracos e não mamam adequadamente (JEFFCOTT, 1974; KRUSE e WAGNER, 1984).

Infecções bacterianas, particularmente septicemia, artrite séptica, pneumonia e enterite são algumas das condições clínicas apresentadas pelos neonatos nas duas primeiras semanas de vida sugestivas de FTIP. Quando a transferência de imunidade passiva é adequada, não aparecem sintomas clínicos de doenças infecciosas por diversas semanas (McCLURE, 1994).

Hietala et al. (1985), demonstraram que anticorpos específicos transferidos passivamente ao potro pelo colostro se mantêm em concentrações adequadas até os dois meses de idade, quando entram em declínio. Segundo McClure (1994), a produção de imunoglobulinas pelo potro inicia-se imediatamente após a exposição aos antígenos ambientais, porém estes só se tornam detectáveis após uma a duas semanas de vida, atingindo concentrações significativas por volta dos dois meses de idade. Devido a este fato, os potros são altamente susceptíveis aos agentes infecciosos durante o período neonatal imediato. Hietala et al. (1985), ressaltaram que os anticorpos produzidos pelo

animal, só alcançam títulos semelhantes aos dos adultos entre cinco e seis meses de idade.

A infecção por *R. equi* pode ser considerada oportunista, por atingir principalmente eqüinos jovens entre dois e três meses de idade, coincidindo com o período em que ocorre a diminuição do título de anticorpos adquiridos pelo colostro e o sistema imunológico ainda não está totalmente maduro (TAKAI, 1997).

O requerimento do estímulo imunológico pode esclarecer a menor ocorrência de infecções graves em eqüinos de faixa etária acima de seis meses (HIETALA e ARDANS, 1987). A maioria dos potros expostos ao *R. equi* em sua vida precoce, elimina o microorganismo sem apresentar sinais clínicos. A memória imunológica resultante desta exposição parece proteger contra o desenvolvimento da doença na idade adulta, mesmo na presença de cepas virulentas (HINES et al., 2000).

Dois tipos principais de células fagocíticas: macrófagos alveolares e neutrófilos polimorfonucleares (PMN), compreendem a linha inicial de defesa do pulmão contra os microorganismos inalados. A eficiência da defesa contra pneumonias bacterianas depende de um número adequado de células fagocíticas na porção caudal do sistema respiratório, e da capacidade fagocítica e de eliminação intracelular de bactérias apresentadas por estas células. Testes *in vitro* demonstraram que tanto os PMN de potros jovens, quanto os de eqüinos adultos são capazes de fagocitar e exterminar o *R. equi* (YAGER et al., 1986).

Sabe-se que a maior eficiência das células fagocíticas é alcançada na presença de anticorpos opsonizantes em níveis adequados. Principalmente no caso de bactérias encapsuladas, a presença de anticorpos opsonizantes é fundamental para ocorrer fagocitose. Como o *R. equi* é encapsulado, supõe-se que o título de anticorpos específicos tenha um papel fundamental na resistência do hospedeiro à doença (HIETALA et al. 1985).

Hietala e Ardans (1987), sugeriram que anticorpos específicos foram importantes na proteção contra pneumonia causada pelo *R. equi*, uma vez que conseguiram relacionar a severidade das lesões com o título de anticorpos.

Estudos recentes demonstraram que os linfócitos T CD4+ e CD8+ estavam associados aos mecanismos envolvidos na eliminação do *R. equi* (HINES et al., 2000).

2.13 Diagnóstico

O diagnóstico precoce dessa infecção é importante, embora seja extremamente difícil devido ao seu início insidioso, não sendo geralmente diagnosticada até que os sinais de pneumonia estejam evidentes (TAKAI, 1997). O diagnóstico pode ser feito através de radiografias do pulmão, hemograma, exame e cultura do lavado traqueal e testes sorológicos (GIGUÈRE e PRESCOTT, 1997; OGLESBY, 1998; BECÚ, 1999).

As imagens radiográficas são geralmente utilizadas para o acompanhamento da evolução e da severidade da pneumonia, bem como da resposta à terapia (GIGUÈRE e PRESCOTT, 1997).

O lavado traqueal associado ao isolamento bacteriano têm sido o método de maior valor, e o mais indicado na rotina de diagnóstico da rodococose (ANZAI et al., 1997; OGLESBY, 1998).

A realização de hemograma, além de exames bioquímicos para determinação de concentrações de proteína plasmática e fibrinogênio são indicados em casos suspeitos de pneumonia por *R. equi*. A hiperfibrinogenemia é um dos achados mais consistentes, entretanto raramente pode haver concentração normal do fibrinogênio. A linfopenia persistente é um indicativo de imunodeficiência (GIGUÈRE e PRESCOTT, 1997).

Os testes sorológicos são basicamente divididos em três tipos: Imunodifusão em gel de ágar (IDGA), Inibição de hemólise sinérgica e ELISA. O diagnóstico sorológico da infecção pelo *R. equi* é problemático, pois os potros expostos a esta bactéria produzem anticorpos sem necessariamente apresentarem a doença clínica. Do mesmo modo, os anticorpos maternos podem causar um resultado falso positivo, confundindo a sua interpretação (GIGUÈRE et al., 1997).

Testes sorológicos tais como: aglutinação direta de bactérias, hemoaglutinação indireta, fixação de complemento e imunodifusão em gel de ágar, tem sido propostos.

Entretanto, os anticorpos anti-*R. equi* oriundos de infecções que ocorrem naturalmente, podem não ser detectados devido a fraca resposta humoral (TAKAI et al., 1985).

O teste ELISA tem sido utilizado para realização de diagnóstico sorológico, por possuir elevada sensibilidade, reação rápida e capacidade de processamento, sendo considerado por Ellenberger et al. (1984b), Hietala et al. (1985) e Takai et al. (1985) como um dos métodos mais adequados para aplicações clínicas. Este teste também têm demonstrado uma resposta consistente quanto a detecção de anticorpos específicos para o *R. equi* em equinos saudáveis e por transferência passiva em potros (HIETALA et al., 1985; TAKAI et al, 1985). Demonstrou ainda, maior sensibilidade que o IDGA, e por isso sua utilização seria valiosa na detecção precoce de anticorpos em animais infectados (TAKAI et al, 1985).

Takai et al. (1990), argumentaram que o IDGA, apesar de não possuir a sensibilidade do teste ELISA, seria mais adequado para utilização à campo devido a sua simplicidade e baixo custo. No mesmo trabalho os autores propuseram a utilização de um teste resultante da combinação do ELISA e da imunodifusão radial utilizando o “fator equi” como antígeno. O teste denominado RIDEA (“Radial Immunodiffusion Enzyme Assay”), foi tão específico quanto o ELISA e mais sensível que o IDGA.

Takai et al. (1994a), desenvolveram na última década um teste ELISA específico capaz de detectar anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em equinos de diversas idades, naturalmente expostos ao patógeno e em potros infectados experimentalmente. O teste ELISA tem sido útil em detectar a presença de anticorpo específico contra *R. equi*, contudo, os resultados têm sido variáveis (BEECH, 1991; AINSWORTH, 1999). Entretanto, Cuteri et al. (2002), observaram que o ELISA-teste é um método rápido, eficaz e confiável para a detecção da infecção em potros.

O “Western blotting” pode ser usado para identificar amostras virulentas isoladas de cavalos e do meio ambiente (BURROWS et al., 1985; TAKAI et al., 1991).

Recentemente a técnica de reação de cadeia polimerase (PCR) tem sido aplicada a amostras de sangue ou a aspirados transtraqueais, a fim de melhorar a sensibilidade e rapidez do diagnóstico (TAKAI et al., 1995b; SELLON et al., 1997). SELLON et al. (2000), relataram que devido a grande sensibilidade do PCR, os

resultados podem ser falso-positivos, provavelmente devido à detecção de contaminantes do ambiente. Assim, o diagnóstico final deveria ser sempre com base no histórico, na apresentação clínica e nos resultados de todas as informações diagnósticas possíveis (SELLON et al., 2000).

2.14 Tratamento

O *R. equi* tem se mostrado sensível a diversas drogas anti-bacterianas *in vitro*, porém com resultados bastante variáveis *in vivo*, inclusive o aparecimento de altas taxas de recidiva (PEIRÓ et al., 2002). O tratamento é difícil, não só pela resistência do *R. equi* aos antibacterianos, como também pela propriedade intracelular facultativa da bactéria. A eritromicina associada a rifampicina ainda é o tratamento de eleição para se tratar esta doença em virtude da baixa concentração inibitória mínima (CIM) destas drogas (BEECH, 1991; WARNER, 1996; BERTONE, 1998; AINSWORTH, 1999). Devido ao fato destas drogas serem lipossolúveis, apresentam boa penetração em membranas celulares, obtendo concentrações terapêuticas satisfatórias nos pulmões, nas secreções bronquiais e dentro dos fagócitos (PRESCOTT e SWEENEY, 1985; HILLIDGE e ZERTUCHE, 1987; BEECH, 1991; WILSON, 1992; AINSWORTH, 1999). Além disto, permanecem ativas dentro dos piogranulomas, esterilizando-os (ZERTUCHE e HILLIDGE, 1987).

2.15 Prevenção e controle

A prevenção e o controle da doença é difícil. Sua natureza insidiosa dificulta a detecção precoce e o isolamento de potros infectados. A má ventilação e a formação de poeira são os fatores mais difíceis de se controlar (BEECH, 1991).

Segundo Varga et al. (1997), o manejo adequado, higiene rigorosa, reconhecimento precoce da doença, isolamento e tratamento dos potros doentes com antibióticos específicos constituem as medidas mais importantes para o controle da pneumonia causada pelo *R. equi* em potros.

Alguns pesquisadores têm avaliado a eficácia da administração de plasma hiperimune, visando aumentar as concentrações de imunoglobulinas sérica e com isso,

prevenir possíveis falhas da transmissão passiva de imunoglobulinas e promover imunidade passiva contra o *R. equi* (MARTENS et al., 1989b; DAVIS et al., 1995). Martens et al. (1989b), constataram ainda, que os animais submetidos à administração de plasma imune, apresentaram maior resistência a doença.

Madigan et al. (1991), compararam o título de anticorpos alcançado no potro através do colostro da égua vacinada e da transfusão de plasma imune. Os autores observaram que apesar do aumento de anticorpos no colostro ser significativo, a proteção conferida não era suficiente para evitar o aparecimento da pneumonia. Entretanto, o plasma hiperimune administrado antes da exposição do agente foi significativamente protetor para o potro.

A redução do desafio infeccioso pode ser crítica. Isso inclui o isolamento de potros doentes e eliminação de suas fezes, diminuição da formação de poeira, rotação de pastagens e irrigação de áreas poeirentas. Na Argentina e em outros países sul-americanos a enfermidade é controlada com a vacinação das éguas com a vacina Rhodovac, antes do parto e, em alguns casos, com a administração do soro hiperimune para os recém-nascidos (BECÚ et al., 1997).

A vacina Rhodovac¹, é preparada sob condições que induzem a síntese e preservação de muitos antígenos, incluindo fatores equi; a partir de diversas culturas extraídas de cepas virulentas de *R. equi* isoladas de animais infectados em fazendas Argentinas enzooticamente afetadas pelo *R. equi*. Esta vacina, consiste de material extra-celular solúvel proveniente dessas culturas. Desde 1992, vem sendo testada a campo obtendo resultados promissores. Atualmente, é a única vacina contra *R. equi* aprovada e usada em vários países, inclusive no Brasil (BECÚ et al., 1997; BECÚ, 1999).

Fontanals et al. (1997), demonstraram que a vacina Rhodovac contém a proteína de virulência VapA, bem como uma variedade de outros antígenos, que proporcionam uma excelente capacidade imunogênica em cavalos adultos.

¹Laboratório “Clínica Equina SRL” - Argentina

O fabricante dessa vacina preconiza a administração de duas doses de 1ml cada, em éguas prenhes aos 30 e 45 dias antes da data prevista para o parto, por via subcutânea. Desta forma acredita-se que proverá a transferência de imunidade passiva via colostro para os potros recém-nascidos.

Apesar dos bons resultados mencionados para essa vacina, diversos pesquisadores relatam que não existe uma vacina comercial disponível eficaz contra esta enfermidade, pois não conferem imunidade satisfatória aos potros (DAVIS et al., 1995; OSGLEBY, 1998).

Uma nova técnica de prevenção, atualmente sob investigação, é a vacina de DNA, baseada na administração de DNA de plasmídeo, o que resulta na síntese “in vivo” de proteínas antigênicas do patógeno, mas ainda não se sabe o que pode ocorrer a longo prazo com esse DNA estranho envolvido no genoma do hospedeiro (BECÚ,1999).

Becú (1999), relatou que seria preferível a indução da imunidade ativa nos potros ao invés da imunidade passiva por meio de plasma hiperimune ou da vacinação das éguas, no entanto sugeriu que a resposta imune do potro jovem é muito limitada, quando comparada a do adulto.

O valor protetor dos anticorpos anti-*R.equi* ainda não foi comprovado (ELLENBERGER et al., 1984). Entretanto, a imunidade humoral parece estar envolvida na proteção precoce de potros jovens (ELLENBERGER et al., 1984; TAKAI, 1985) embora a imunidade mediada por células seja reconhecida por desempenhar um importante papel na eliminação da infecção por *R. equi* em desafios experimentais em camundongos (KANALY et al., 1993).

A titulação de anticorpos em potros recém-nascidos auxilia na identificação dos animais que não tenham recebido imunidade passiva adequada da mãe. Podendo estes, serem suplementados com o plasma hiperimune; principalmente em locais onde a enfermidade é endêmica e provoca muitas mortes. O Laboratório “Clínica Equina” preconiza a suplementação dos potros com plasma aos 25 e 30 dias de vida.

2.16 Impacto sobre a vida atlética do animal

Vários estudos têm sido realizados no intuito de se verificar a longo prazo o impacto da doença sobre a vida atlética do animal. Baldwin et al. (1992), relataram casos bem sucedidos de animais tratados para broncopneumonia por *R. equi* durante quatro a oito semanas, dois quais pelo menos um deles veio a competir em corridas. No entanto, nestes casos a doença foi reconhecida e tratada no estágio inicial. Ainsworth et al. (1993a), não detectou alterações pulmonares em radiografias realizadas ao longo dos meses, sugerindo que a pneumonia não causaria seqüelas. Ainsworth et al. (1993b), a partir dos resultados dos testes clínicos, patológicos, radiológicos, endoscópicos e de função pulmonar, concluíram que não existia sequelas em animais previamente infectados e tratados com sucesso. Alguns estudos revelaram que potros da raça Puro Sangue Inglês que se recuperaram da pneumonia e corriam na idade adulta (Christley e Hodgson, 1994; Lavoie et al., 1994) possuíam desempenho comparável a grupos controle saudáveis (BERNARD et al., 1991; AINSWORTH et al., 1998). Contudo, a porcentagem de potros infectados pelo *R. equi* que eventualmente chegavam a correr foi significativamente menor em relação à população sadia, sugerindo que a infecção causava um efeito deletério no desempenho atlético (AINSWORTH et al., 1998).

2.17 Infecção no homem

No homem, a rodococose é apontada como doença emergente assumindo particular importância nos últimos dez anos e está relacionada a indivíduos imunodeprimidos, entre os quais estão os pacientes convalescentes de transplantes, com neoplasias malignas, sob terapia imunossupressiva, alcoólatras e portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (EMMONS et al., 1991; PRESCOTT, 1991; LINDER, 1997).

A transmissão da doença ao homem deriva da exposição ao agente no ambiente, geralmente secundária a lesões transcutâneas (Prescott, 1991), ou segundo Doig et al. (1991), proveniente de contato com animais.

Takai et al. (1994b), relataram que a maior parte das amostras de *R. equi* isoladas em humanos infectados ou não pelo vírus HIV não carregam o plasmídeo de virulência e são avirulentos para o camundongo.

Em 30% dos casos, os pacientes infectados possuem histórico de contato com animais, solo ou ambos. A infecção geralmente é subaguda, associada a febre, tosse produtiva ou não e perda de peso (LINDER, 1997).

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição do Criatório

A Fazenda São Geraldo, com 1287 hectares de área total, de propriedade do Haras Agromen, encontra-se localizada no município de Ipuã, região norte do Estado de São Paulo, dedicando-se à criação extensiva de cavalos da raça Brasileiro de Hipismo. A propriedade também possui éguas da raça Bretão que são utilizadas como receptoras de embrião, devido ao seu porte avantajado, bom comportamento materno, rusticidade e grande produção de leite. A propriedade não possui sêmen ou reprodutores desta raça e não tem interesse na criação.

Além dessas éguas Brasileiro de Hipismo (BH) e Bretão, a propriedade possui cinco animais sem raça definida (SRD), machos e fêmeas, utilizados nos serviços gerais do criatório.

A partir dos meados da década de 90 a criação começou a sofrer os reveses da rodococose, causando grandes prejuízos financeiros. A cerca de quatro anos foram introduzidas novas práticas de manejo e adotada a vacinação com a vacina Rhodovac®.

3.2 Animais

Foram utilizados 37 eqüinos sadios, distribuídos em cinco grupos. O grupo I foi constituído por oito éguas raça BH, o grupo II era formado por oito éguas da raça Bretão (receptoras de embrião), ambas no último terço de gestação e vacinadas contra *R. equi*. Também foram utilizados todos os conceptos (n=16) dos grupos I e II, potros BH com idade entre o momento do nascimento até os cinco meses de idade. Esses foram divididos em dois grupos (III e IV), com oito potros cada. Os potros do grupo III mamaram o colostro em suas próprias mães, enquanto que os potros do grupo IV, frutos de embriões doados por éguas BH e implantados no útero de éguas Bretãs, mamaram o colostro após o nascimento nas suas mães adotivas. Foram utilizados ainda, cinco animais sem raça definida (machos e fêmeas), destinados ao serviço na fazenda como grupo controle, compondo o grupo V.

Os animais eram mantidos em piquetes com gramínea de *Coast-cross*, sal mineral e água "*ad libidum*". Suplementados com ração à base de milho, farelo de trigo, farelo de soja e feno de *Coast-cross*, produzida na própria fazenda, duas vezes ao dia e com feno de *Coast-cross* e silagem de milho era oferecidos uma vez ao dia.

As éguas foram inseminadas com sêmen fresco ou congelado, neste caso com o auxílio do endoscópio. Sete dias após, foi realizado a colheita dos embriões, seguido da transferência destes das éguas atletas para as éguas receptoras, cujos ciclos estrais foram previamente sincronizados com os ciclos das doadoras.

Cada égua pertencente aos grupos I e II recebeu duas aplicações da vacina anti-*Rhodococcus equi*¹ (1ml/dose), por via subcutânea, sendo a primeira aos 45 dias e a segunda aos 15 dias antes da data prevista para o parto. Os animais pertencentes aos grupos III, IV e V não foram vacinados.

As éguas gestantes foram transferidas para os piquetes maternidade em torno de 15 dias antes da data prevista para o parto, quando o úbere começou a encher, formando grupos de quatro indivíduos, onde eram observadas durante 24 horas. Nesta época, também foi realizada a desverminação dos animais.

Após o nascimento, o cordão umbilical dos potros neonatos foi desinfectado com tintura de iodo a 2% no coto remanescente do mesmo, em seguida este procedimento era realizado uma vez ao dia durante sete dias.

Em torno dos 20 dias de idade os potros, juntamente com suas mães, foram transferidos para piquetes contendo unidades de arraçoamento para o fornecimento de ração especialmente formulada para os potros até o desmame, à base de leite ninho, aveia e milho. Nesta ocasião foram desverminados. Aos quatro meses de idade foi realizada a primeira vacinação nos potros contra Encefalomielite, Tétano e Influenza².

¹ Rhodovac®, Clínica Eqüina SRL, Capitán Sarmiento, Argentina

² Fluvac, Fortdodge

3.3 Antígenos

As amostras de soro foram testadas contra os dois tipos de antígenos: o comercial¹ e o cultivado para *R. equi* (APTX) segundo o protocolo de Prescott et al. (1997), a partir da cepa virulenta ATCC 33701.

O APTX consiste em uma preparação semi-purificada da proteína VaPA, extraído pelo detergente Triton X e precipitado em acetona (PRESCOTT et al., 1997).

O APTX foi submetido à Eletroforese em gel de poliacrilamida, em seguida foi feito a transferência do material para a membrana de nitrocelulose para a realização do “immunoblotting”, seguido da incubação com o anticorpo monoclonal anti-VapA, onde foi possível verificar a expressão do VapA em uma banda difusa com massa molecular ao redor de 15-17 kDa. Uma parte desses antígenos foram gentilmente cedidos pela Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Roque Barreira do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, e elaborados pela sua doutoranda Luciana Colbachini Ferraz. A outra parte foi produzida no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-UNESP Jaboticabal.

3.4 Exame Clínico

Os exames clínicos foram realizados nos animais antes da colheita das amostras de sangue, nos momentos referidos no item 3.5.1. Os parâmetros avaliados foram: aparência geral, condição física e coloração das mucosas gengival e conjuntival. Imediatamente após o parto, as éguas tiveram suas glândulas mamárias avaliadas quanto à consistência e ausência ou presença de leite; e os potros foram avaliados quanto ao estado geral, presença do reflexo de sucção e tempo para a ingestão do colostro. As condições em que foram realizadas este experimento não permitiram a realização de um exame clínico minucioso nos animais.

¹ Rhododiagnos, Clínica Equina SRL, Capitán Sarmiento, Argentina

3.5 Colheita de material

3.5.1 Amostras de sangue

Amostras de sangue (10ml) das éguas pertencentes aos grupos I e II foram colhidas através de venopunção jugular, momentos antes das vacinações, ou seja, 45 e 15 dias antes da data prevista do parto, imediatamente após o parto, 60 e 150 dias após.

Foram colhidos 10ml de sangue da veia jugular dos potros, antes da ingestão do colostro, assim como 24 e 48 horas após o nascimento, e aos 60 e 150 dias de idade.

Os animais do grupo controle tiveram suas amostras de sangue colhidas da mesma forma, somente nos dois últimos momentos referentes aos outros grupos (60 e 150).

As amostras de sangue foram depositadas em tubos de “vacutainer”, previamente identificados e deixados à temperatura ambiente até a separação do soro. Foram colhidos 2ml de cada amostra, separados em duas alíquotas de 1ml cada e acondicionadas em tubos “eppendorf” devidamente identificados. Os tubos foram conservados a -20° C até a ocasião das análises laboratoriais.

3.6 Análises laboratoriais

3.6.1 Dot Blot

Foi realizado para verificar a reatividade dos antígenos APTX e o comercial incubados com soros controles positivos anti-*R.equi* e negativos.

Pequenos fragmentos de nitrocelulose¹ foram cortados e manipulados com pinça evitando-se a contaminação por proteínas estranhas. Estes fragmentos foram dispostos nas cavidades de uma placa de ELISA de fundo chato. Adicionou-se 2µl do antígeno no centro de cada disco de nitrocelulose, aguardando-se 1h em temperatura ambiente para secagem do antígeno. Foram, bloqueados por 12 h a 4°C com 0,6 ml de

¹ Nitrocellulose membrane for use in ECL Westernblotting – Amersham pharmacia biotech

tampão de bloqueio Tris 0,1 M, NaCl, 0,1 M e Tween 80 0,5% (TBS) com 5% de leite em pó desnatado¹. Os soros testes positivos e negativos para *R. equi* foram diluídos a 1:100 em TBS com leite em pó desnatado e incubados por 90 minutos em estufa a 37°C. Após esse período, os fragmentos foram lavados duas vezes com TBS com leite e uma vez com TBS somente (intervalo de cinco minutos entre cada lavagem). A cada fragmento foi adicionado 100 µl de conjugado anti-equino² diluído 1:20000 em TBS com leite e incubado por 90 minutos a 37°C. Os discos foram lavados com TBS sem leite por três vezes consecutivas com intervalos de cinco minutos. Em seguida, adicionou-se o substrato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato Nitro blue Tetrazolium³ (BCIP/NBT) para a revelação da reação. Aguardou-se 5 a 10 minutos para o desenvolvimento da cor.

3.6.2 Teste ELISA indireto

A titulação de anticorpos anti-*R. equi* foi realizada nos grupos experimentais nos momentos assinalados no item 3.5.1, através do ELISA-teste indireto, conforme a técnica preconizada por Takai et al. (1985, 1986), com algumas modificações segundo Machado et al. (1997). As amostras de soro foram testadas concomitantemente contra dois tipos de antígenos (APTX e comercial).

3.6.2.1 Preparo do antígeno

O antígeno comercial foi descongelado à temperatura ambiente. Já o antígeno APTX liofilizado foi diluído em 1ml de água Milli Q estéril.

A quantificação protéica do antígeno APTX foi realizada no laboratório de Química de Proteínas da Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, através da análise de aminoácidos pelo método do fenil-tio-carbamil (PTC) utilizando a cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Já o conteúdo protéico do antígeno comercial foi determinado pelo método de Hartree (1972), no laboratório de Imunoparasitologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/UNESP – Jaboticabal.

¹ Molico - Nestlé

² Conjugate anti-horse - Sigma A 6063

³ Sigma

3.6.2.2 Dose de reatividade ótima de antígeno, soro e conjugado

As diluições ótimas dos antígenos e dos soros controle positivo e negativo foram determinadas por titulação em bloco, utilizando os antígenos nas concentrações de 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml e 2,0 µg/ml em tampão carbonato-bicarbonato (0,05 M, pH 9,6), e os soros de referência positivo e negativo nas diluições de 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 em tampão de solução salina fosfatada 0,01 M e pH 7,4 (PBS), contendo 0,05% de Tween 80 (PBS Tween 80).

O conjugado usado, constituído de IgG de coelho anti IgG de eqüino acoplada à fosfatase alcalina, foi diluído a 1:15000 em PBS-Tween 80 acrescido de 6% de leite em pó desnatado.

3.6.2.3 Soro de referência positivo

Para obtenção dos soros de referência positivos foram utilizados o soro positivo controle presente no kit de diagnóstico para imunodifusão¹ e soros de eqüinos (n=16), colhidos após a segunda vacinação para *R. equi*.

3.6.2.4 Soro de referência negativo

As amostras de soros de referência negativos foram obtidas dos potros recém-nascidos, antes da ingestão do colostro.

3.6.2.5 Descrição da reação

A cada cavidade da placa para ELISA² foram adicionados 100µl do antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05 M pH 9,6, ajustando-se a concentração protéica para 2,0 µg/ml. As placas foram incubadas durante a noite em câmara úmida a 4°C. Após três lavagens consecutivas com PBS-Tween 80, as placas foram bloqueadas com leite em pó desnatado diluído a 6% em PBS-Tween 80 em câmara úmida a 37°C por duas horas.

¹ Rhodiagnos - Clinica Eqüina SRL, Capitán Sarmiento, Argentina

² Nunclon Surface – Nalge Nunc International

Após a lavagem da mesma forma, 100 µl dos soros teste e dos soros de referência positivo e negativo diluídos em PBS-Tween 80 (1:200) foram adicionados em duplicatas à placa de ELISA. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 90 minutos, e a seguir lavadas novamente. A cada cavidade adicionou-se 100 µl do conjugado diluído a 1:15000 em PBS-Tween 80 acrescido de 6% de leite em pó desnatado. As placas foram incubadas a 37°C em câmara úmida por 90 minutos e, em seguida, lavadas novamente. Adicionou-se 100 µl do substrato¹ da enzima fosfatase alcalina paranitrofenil fosfato (pNPP) diluído a 1 mg/ml em tampão dietalonamina pH 9,8, e as placas foram incubadas por 60 minutos em temperatura ambiente. Decorrido este prazo, a leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA MRX TC Plus – Dynex Technology, com filtro de 405nm.

3.6.2.6 Tratamento dos dados

Os valores de absorbância média dos soros foram agrupados em níveis de ELISA (NE), os quais variaram de 0 (zero) a 9 (nove). O limite máximo do nível zero foi determinado pela média dos valores de absorbância de soros de animais não imunes ao *Rhodococcus equi*, acrescidos de dois desvios padrões. A partir desse limite, os intervalos entre os outros níveis de ELISA foram definidos por acréscimo de 35%, conforme preconizado por Machado et al. (1997), para sistema *Babesia spp.*

¹ Substrato da fosfatase – Kirkegaard Perry Laboratories

3.7 Análise Estatística

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Models) do programa computacional SAS (Statistical Analysis Systems) v.8.2, segundo o delineamento em parcelas e subparcelas subdivididas no tempo, tendo como parcela a combinação de duas raças com dois antígenos e na subparcela os momentos de coleta de amostra.

Nas éguas vacinadas as variáveis foram analisadas segundo o esquema em parcelas subdivididas no tempo, com os grupos (BH e Bretãs), nas parcelas e nas subparcelas, os tempos (-45: 45 dias antes do parto, -15: 15 dias antes do parto, 0: imediatamente após o parto, 60 dias pós-parto e 150 dias pós-parto) em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições.

As variáveis foram analisadas da mesma forma nos potros, diferindo nestes apenas os grupos (conceptos de éguas BH e Bretãs) e os tempos (0: antes da ingestão do colostro, 1: 24 horas após o nascimento, 2: 48 horas após nascimento, aos 60 dias e aos 150 dias de idade).

O grupo controle (não vacinado), foi submetido à mesma análise comparando com os grupos de éguas vacinadas, apenas nos momentos 60 e 150.

As comparações múltiplas das médias dos grupos nos vários momentos foram feitas utilizando o Teste de Tukey (STEEL & TORRIE, 1980).

IV. RESULTADOS

4.1 Achados Clínicos

Todas as éguas tiveram partos eutócicos. O tempo médio para a eliminação da placenta foi de 115 minutos. Apenas uma égua reteve a placenta além do tempo considerado normal, solucionando-se o problema após administração de ocitocina por via intra-muscular. Sem exceções, as placentas apresentaram aspecto macroscópico normal. A qualidade macroscópica do colostro, ou seja, a viscosidade, variou de ralo (semelhante ao leite) a intensamente viscoso (concentrado). Duas éguas começaram a perder colostro em torno de quatro a oito dias antes do parto. Na tabela 1 encontram-se os parâmetros clínicos observados por ocasião do parto das éguas estudadas nesse experimento.

Tabela 1. Distribuição racial das éguas de acordo com o tempo de eliminação da placenta e a qualidade do colostro.

Égua	Raça	Tempo de eliminação da placenta (minutos)	Qualidade macroscópica do colostro
1	BH	50	++
2	BH	210	+++
3	BH	45	-/+
4	BH	120	++/+++
5	BH	40	++/+++
6	BH	15	+++
7	BH	145	++
8	BH	70	+++
9	B	120	++++
10	B	240	++++
11	B	50	++
12	B	2	++/+++
13	B	90	+
14	B	260	+++
15	B	210	++/+++
16	B	180	+++
Média	-	115,44	-

-/+ : ralo; + : viscosidade baixa; ++/+++ : viscosidade moderada; ++++ : viscosidade intensa
 BH: Brasileiro de Hipismo B: Bretã

Os potros nasceram saudáveis e mamaram o colostro no tempo médio de 175 minutos. Nenhum deles apresentou alterações clínicas dignas de nota entre o período do nascimento e os cinco meses de idade (momento da última colheita de amostras). Os tempos decorridos entre o nascimento e a primeira mamada, estão apresentados na Tabela 2 e a distribuição deles por porcentagem de ocorrência na Figura 1.

Tabela 2. Distribuição dos potros de acordo com o tempo de ingestão do colostro.

Potro	Raça da mãe de leite	Tempo de ingestão do colostro (minutos)
Nn 1	BH	160
Nn 2	BH	160
Nn 3	BH	150
Nn 4	BH	135
Nn 5	BH	240
Nn 6	BH	90
Nn 7	BH	150
Nn 8	BH	120
Nn 9	B	135
Nn 10	B	280
Nn 11	B	420
Nn 12	B	170
Nn 13	B	150
Nn 14	B	145
Nn 15	B	135
Nn 16	B	160
Média	-	175

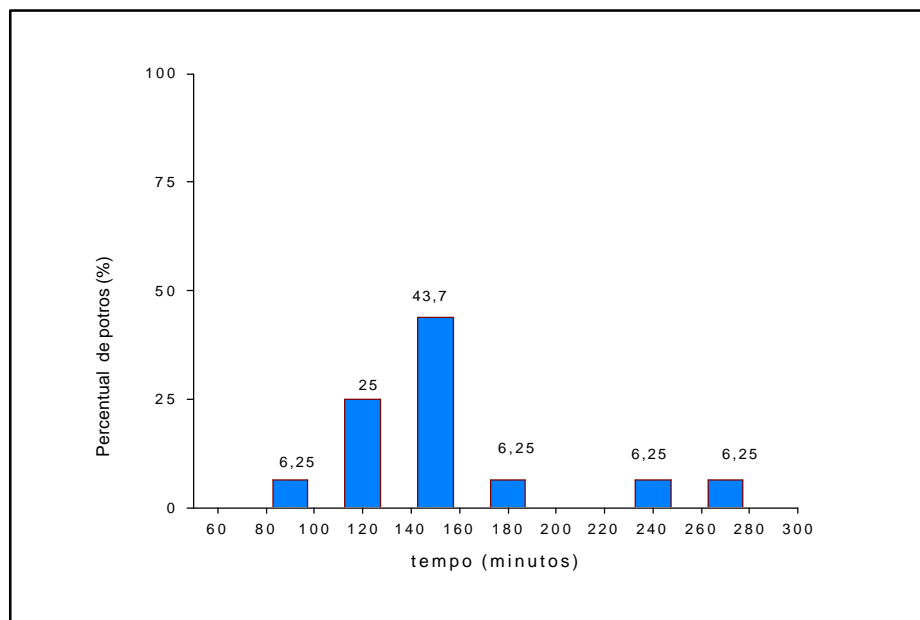


Figura 1. Percentual de potros (n=16) distribuídos de acordo com o tempo decorrido entre o nascimento e a primeira mamada.

4.2 Resposta Imune Humoral

4.2.1 Dot Blot

Os antígenos APTX e comercial não reagiram com os soros dos grupos controle negativos, no entanto reagiram com os soros do grupo controle positivos testados.

4.2.2 Determinação dos Níveis de ELISA

Os resultados da titulação em bloco determinaram a concentração ótima dos antígenos em 2,0 µg/ml para o ELISA IgG, em tampão carbonato/bicarbonato. Diluição única de 1:200 foi adotada para os soros de referência positivo e negativo e soros teste no ELISA IgG. O conjugado foi utilizado numa diluição de 1:15000.

Após a aplicação do ELISA-teste indireto a 16 soros negativos, obteve-se para os mesmos uma média de A/P (amostra em relação ao positivo) de $0,1771 \pm 0,0035$ para o antígeno (Ag) APTX e $0,1637 \pm 0,00309$ para o Ag comercial, conforme descrito por Machado et al. (1997). Dessa forma a escala de nível de ELISA (NE) ficou definida como mostrado na tabela 3:

Tabela 3. Determinação dos Níveis de ELISA de acordo com as faixas de Amostra em relação ao positivo (A/P).

Antígeno APTX		Antígeno comercial	
Faixas de A/P	NE	Faixas de A/P	NE
0,000-0,184	0	0,000-0,169	0
0,185-0,248	1	0,170-0,228	1
0,249-0,334	2	0,229-0,307	2
0,335-0,450	3	0,308-0,414	3
0,451-0,607	4	0,415-0,559	4
0,608-0,819	5	0,560-0,754	5
0,820-1,105	6	0,755-1,017	6
1,106-1,491	7	1,018-1,372	7
1,492-2,012	8	1,373-1,852	8
2,013-2,716	9	1,853-2,500	9

Ponto de corte = 3 0>NE>3 = negativo NE>4 = positivo

Atribuiu-se como negativo os níveis de ELISA entre 0, 1, 2 e 3 (faixas de A/P de 0,000 - 0,450 para o Ag APTX; e 0,000 - 0,414 para o Ag comercial) e positivo o nível ≥ 4 (faixas de A/P de 0,451 - 2,716 para o Ag APTX e 0,415 - 2,500 para o Ag comercial).

4.2.3 Éguas vacinadas (Grupos I e II)

Os títulos de anticorpos anti-*R.equi* classificados em Níveis de ELISA, detectados 45 dias antes do parto e antes da administração da primeira dose da vacina foram os mais baixos registrados nos dois grupos de éguas. Aumentos significativos ($p < 0,01$) foram registrados nos dois grupos de éguas, 15 dias antes do parto, momento da segunda vacinação. As concentrações de anticorpos elevaram-se discretamente após aplicação da segunda dose da vacina, atingindo a titulação máxima no momento do parto. A partir de então, houve um declínio até os 60 e 150 dias após o parto. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,01$) para as concentrações de anticorpos entre as raças, e entre os antígenos APTX e comercial. Até o momento do parto, o Ag APTX detectou títulos maiores, a partir de então observou-se decréscimo até os 60 dias, seguido de uma discreta diminuição observada aos 150 dias. Enquanto que para o Ag comercial, o declínio foi mais discreto a partir do parto até os 60 dias, mantendo-se constante até os 150 dias. Não houve diferenças significativas entre os dois últimos momentos para os dois antígenos testados (Figura 2, Tabela 4).

Devido à inexistência de respostas vacinais diferentes entre as duas raças de éguas estudadas, em relação ao título de anticorpos para *R. equi*, os animais dos dois grupos foram unificados para demonstração dos resultados, conforme demonstrado na Figura 2 (gráfico C) e na Tabela 4 e 5.

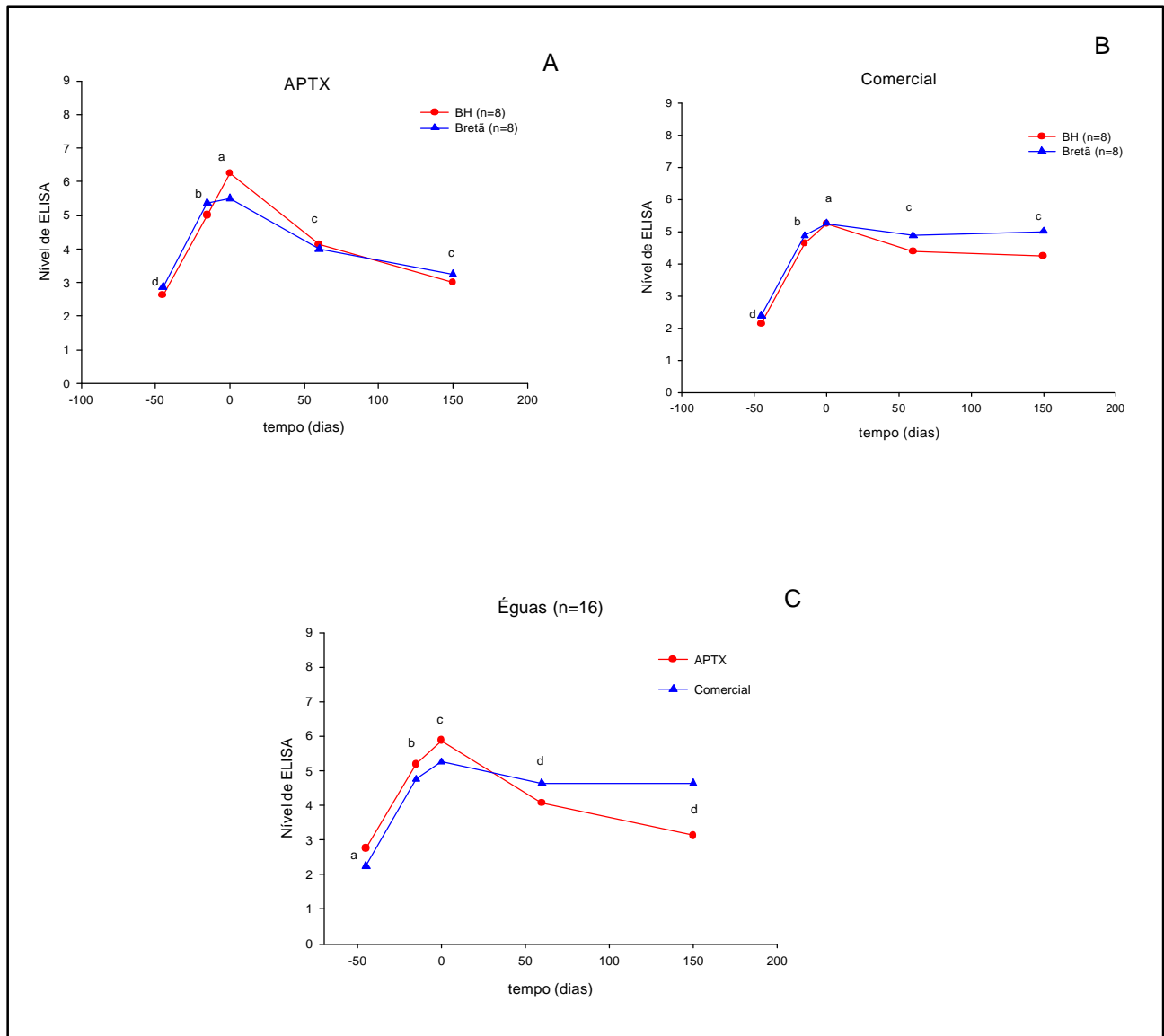


Figura 2. Média dos Níveis de ELISA observados nos grupos de éguas vacinadas em relação aos antígenos APTX e comercial, em diferentes momentos. O gráfico C reuniu as 16 éguas no mesmo grupo.

Nas tabelas 4 e 5 estão apresentados os dados da distribuição das éguas estudados em relação aos Níveis de ELISA nos diferentes momentos de colheita, respectivamente. Foram considerados como efeito protetor negativo os níveis entre 0 e 3, e positivo os níveis maiores que 3.

Tabela 4. Distribuição das éguas vacinadas (n=16) submetidas ao ELISA-teste com os antígenos APTX e comercial, em níveis de ELISA em diferentes momentos.

Tempo (dias)	Níveis de ELISA	
	APTX	Comercial
-45	2,7500 ^a	2,2500 ^a
-15	5,1875 ^b	4,7500 ^b
0	5,8750 ^c	5,2500 ^c
60	4,0625 ^d	4,6250 ^d
150	3,1250 ^d	4,6250 ^d

Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes

0: imediatamente após o parto

Das 16 éguas vacinadas, duas (12,5%) apresentaram títulos de anticorpos protetores antes da vacinação frente ao antígeno APTX, e apenas uma (6,25%) para o antígeno comercial. Aos 15 dias antes da data prevista para o parto, 100% das éguas foram positivas, aos 60 dias após o parto (75%), e aos 150 dias (apenas 25%) para o antígeno APTX. Em relação ao antígeno comercial, 87,5% das éguas foram positivas aos 15 dias antes do parto e aos 60 dias pós-parto e 93,7% aos 150 dias após o parto (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição das éguas vacinadas (n=16) em relação aos níveis de ELISA e diferentes momentos de colheita de amostras séricas.

Nível de ELISA	Antígeno	Éguas/ Momentos (dias)									
		-45		-15		0		60		150	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0>NE>3 (negativos)	APTX	14	87,5	0	0	0	0	4	25,0	12	75,0
	Comercial	15	93,7	2	12,5	9	56,3	2	12,5	1	6,25
NE>3 (positivos)	APTX	2	12,5	16	100	16	100	12	75,0	4	25,0
	Comercial	1	6,25	14	87,5	7	43,8	14	87,5	15	93,7

0: após o parto

4.2.4 Grupos Vacinado e Controle

Os títulos de anticorpos observados nos animais do grupo controle foram significativamente menores que aqueles apresentados pelos dois grupos de éguas vacinadas ($p < 0,01$). Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) foram observadas entre os dois antígenos testados quando se comparou o grupo de éguas vacinadas com o grupo controle. O antígeno comercial detectou maiores médias de Densidade ótica que o antígeno APTX. Não foram observadas diferenças significativas em relação aos momentos de colheita de amostras (60 e 150 dias). Esses resultados encontram-se apresentados na Figura 3.

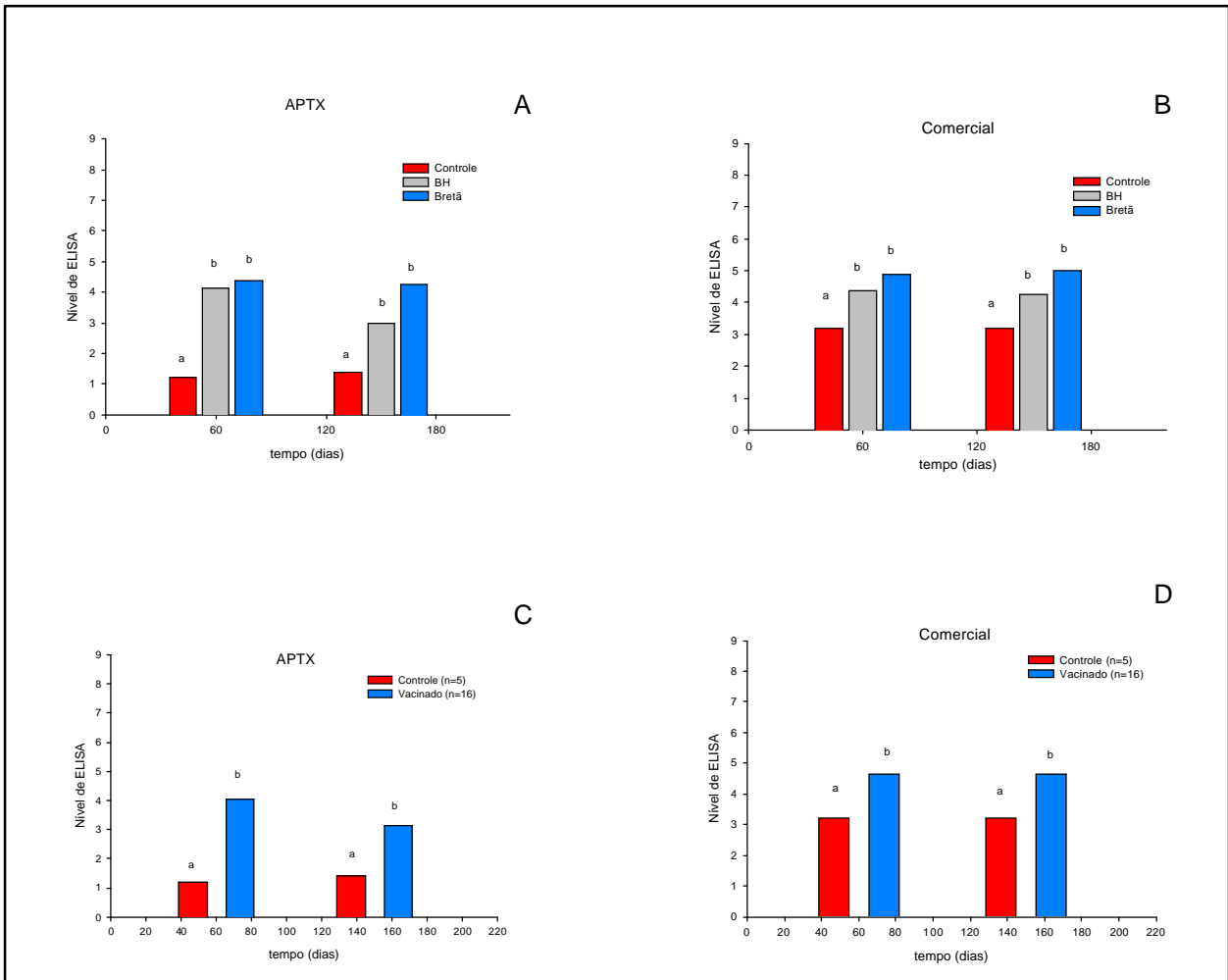


Figura 3. Média dos Níveis de ELISA observados nos grupos controle e vacinados em relação aos antígenos APTX e comercial, em diferentes momentos. Os gráficos C e D reuniram as 16 éguas vacinadas no mesmo grupo.

4.2.5 Potros (Grupos III e IV)

Em relação aos títulos de anticorpos dos potros nascidos de éguas BH e Bretãs, estes encontravam-se no momento do nascimento, no seu valor mais baixo, elevando-se significativamente após a ingestão do colostro ($p < 0,01$). Discreta diminuição de anticorpos foi observada 60 dias após o nascimento, a qual se manteve constante até os 150 dias. As concentrações de anticorpos não demonstraram diferenças significativas entre os dois grupos de potros. Foram registradas diferenças significativas tanto para o momento de colheita ($p < 0,01$), como para o tipo de antígeno empregado ($p < 0,05$) (Figura 4, Tabela 6).

Assim como nos grupos de éguas, os títulos de anticorpos para *R. equi* nos dois grupos de potros foram agrupados de acordo com as médias dos níveis de ELISA, em diferentes momentos e estão relacionados na Tabela 6 e 7.

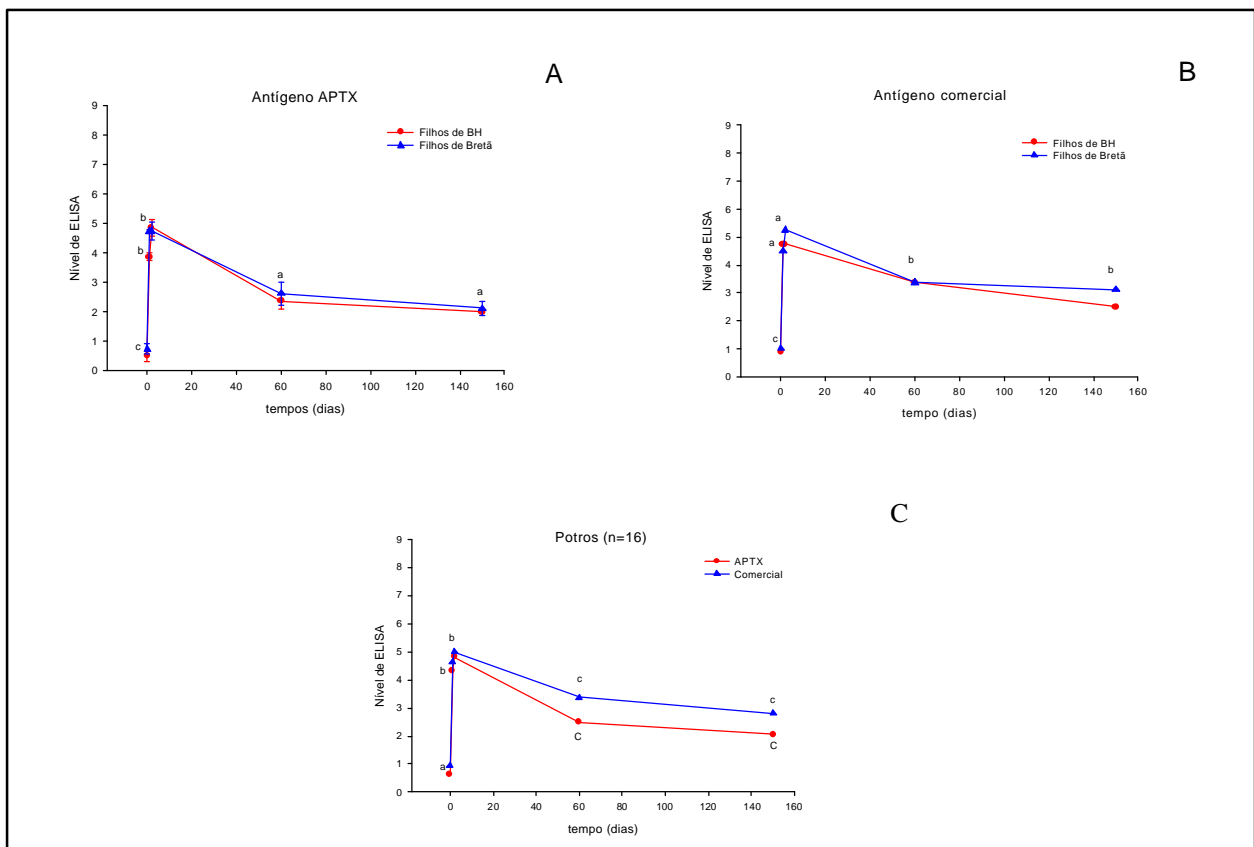


Figura 4. Média dos Níveis de Elisa observados nos dois grupos de potros (filhos de éguas BH e Bretãs), submetidos ao ELISA-teste com os antígenos APTX e comercial em diferentes momentos. O gráfico C reuniu os 16 potros no mesmo grupo.

Tabela 6. Distribuição dos potros (n=16) submetidos ao ELISA-teste com os antígenos APTX e comercial, em níveis de ELISA em diferentes momentos.

Tempo (dias)	Níveis de ELISA	
	APTX	Comercial
0	0,6250 ^a	0,9375 ^a
1	4,3125 ^b	4,6250 ^b
2	4,8125 ^b	5,0000 ^b
60	2,5000 ^c	3,3750 ^c
150	2,0625 ^c	2,8125 ^c

0: jejum de colostro

Letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes

Em relação ao antígeno APTX, 93,7% dos potros apresentaram títulos protetores ($NE \geq 4$) nas primeiras 24 e 48 horas após o nascimento, reduzindo para 12,5% aos 60 dias e aos 150 dias 100% dos potros apresentaram NE negativos. O antígeno comercial detectou 75% dos potros com titulação positiva nas primeiras 24 horas de vida, 81,3% às 48 horas, 50% aos 60 dias e 12,5% aos 150 dias (Tabela 7).

Tabela 7. Distribuição dos potros (n=16) em relação aos níveis de ELISA e diferentes momentos de colheita de amostras séricas.

Nível de ELISA	Antígeno	Potros/Momentos (dias)									
		0		1		2		60		150	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
0>NE>3 (negativos)	APTX	16	100	1	6,253	1	6,25	14	87,5	16	100
	Comercial	16	100	4	25,0	3	18,7	8	50,0	14	87,5
NE>3 (positivos)	APTX	0	0	15	93,7	15	93,7	2	12,5	0	0
	Comercial	0	0	12	75,0	13	81,3	8	50,0	2	12,5

0: jejum de colostro

V. DISCUSSÃO

O tempo médio para eliminação das placentas nas éguas foi de 115 minutos, mantendo-se dentro do intervalo fisiológico descrito para a espécie eqüina (THRELFALL, 1992). Das 16 éguas estudadas, 12 (75%) eliminaram a placenta até três horas após o parto. Apenas quatro éguas (25%) retiveram a placenta além deste tempo, no entanto, realizou-se a intervenção em somente uma, pois nas outras três as placentas estavam levemente presas e foram naturalmente eliminadas. Segundo Spensley (1993), a eliminação da placenta pelas éguas deve ocorrer no período máximo de três horas após o parto, já que nesta espécie a placenta é do tipo epiteliocorial difusa, o que lhe confere menor adesividade a parede uterina, tornando mais rápida a sua expulsão. Considerando-se que a retenção da placenta é uma das causas predisponentes de endometrite bacteriana, e esta poderá interferir negativamente na fertilidade da égua, a intervenção deve ser efetuada sempre que o período limite for ultrapassado (WINTZER, 1990; RICKETTS e ALFONSO, 1991).

A qualidade macroscópica do colostro variou bastante entre as éguas. No entanto, 87,5% apresentaram colostro de ótima qualidade, com viscosidade moderada a intensa. O colostro de boa qualidade, rico em imunoglobulinas, apresenta segundo Koterba (1990), consistência viscosa, espessa e pegajosa. Apenas duas éguas (12,5%) apresentaram o colostro com viscosidade baixa, considerado de má qualidade. Essas éguas começaram a perder o colostro em torno de uma semana antes do parto, e seus filhos apresentaram titulação de anticorpos após a ingestão do colostro, inferior aos demais. A secreção do colostro possui vida média curta, e ocorre somente uma vez ao final de cada gestação, sendo transformado em leite dentro de 12 horas após a primeira sucção (JEFFCOTT, 1974; PEARSON et al., 1984). A diminuição da qualidade do colostro está relacionada a baixa concentração de imunoglobulinas e conseqüentemente, confere má capacidade imunoprotetora ao neonato (KOTERBA, 1990). Entretanto, nenhum dos potros desenvolveu no período neonatal afecções decorrentes de baixa capacidade imunológica.

O tempo médio para a ingestão do colostro pelos potros foi de 175 minutos, com maior concentração de animais (75%) entre 90 e 150 minutos. Sendo que o tempo

máximo decorrido foi de 270 minutos. Esses períodos foram semelhantes aos relatados por Rossdale (1967) e Korteba (1990), que observaram um tempo médio para a ingestão do colostro de 111 a 120 minutos respectivamente, com intervalos variando entre 35 e 420 minutos.

Considerando-se que o sistema imunológico dos neonatos eqüinos não é tão efetivo quanto o de um animal adulto, os recém-nascidos dependem profundamente da imunidade passiva conferida pelo colostro para prevenir infecções oportunistas como a rodococose (KOTERBA, 1993). Diante das dificuldades relacionadas ao diagnóstico e tratamento desta afecção, inúmeros pesquisadores se propuseram a buscar a sua prevenção através da estimulação passiva e/ou ativa do sistema imunológico (ELLENBERGER, 1984b).

Os resultados de nossa pesquisa, em relação à imunização de éguas, mostraram elevação sérica significativa de anticorpos anti-*R. equi* após a administração da vacina Rhodovac a qual manteve-se elevada até o parto, apresentando um ligeiro declínio até os 150 dias pós-parto. No entanto, neste último período os títulos ainda foram considerados protetores ($NE \geq 4$) para os dois antígenos testados. Algumas éguas apresentaram títulos de anticorpos elevados antes da vacinação. Entretanto, a vacinação produziu elevação marcante do título de anticorpos mesmo nesses animais. Ellenberger (1984b), utilizando o teste ELISA para analisar soros de eqüinos de diversas idades em animais expostos naturalmente ao *R. equi*, observou uma grande variação nos títulos de anticorpos encontrados, porém sem relação com a presença de sinais clínicos. Esse autor ressaltou ainda, que os valores protetores desses anticorpos não puderam ser comprovados. Segundo Takai et al. (1987), eqüinos normais de todas as idades podem apresentar anticorpos anti *R. equi*.

Os primeiros relatos científicos a investigarem o reforço imunológico, consideraram a efetividade da administração parenteral de plasma hiperimune na prevenção da pneumonia por *R. equi* em potros infectados experimentalmente, mostrando a importância de fatores humorais no controle da doença e a capacidade da imunoprofilaxia humoral em alterar a progressão de rodococose (MARTENS et al., 1989). Madigan et al. (1989), estudaram a imunidade adquirida passivamente por potros

contra a rodococose através da administração de plasma hiperimmune, e observaram que havia uma correlação entre níveis séricos de IgG total e a quantidade de anticorpos específicos contra o *R. equi*. Os autores concluíram que a administração de plasma hiperimmune causou boa proteção contra pneumonia por *R. equi* até 60 dias após a administração. No mesmo trabalho, também estudaram a transferência de anticorpos através do colostro de éguas imunizadas contra o *R. equi* e observaram que os potros que mamaram o colostro de forma adequada tiveram uma elevação dos títulos de anticorpos específicos. Com isso sugeriram, que deveria ser feita tanto a vacinação das éguas prenhas, como a administração do plasma, a fim de garantir uma boa proteção aos potros no período de maior susceptibilidade às doenças. Posteriormente, em outro estudo, compararam os títulos de anticorpos nos potros decorrentes da ingestão do colostro de égua vacinadas e da transfusão de plasma hiperimmune. Os autores observaram que apesar do aumento de anticorpos no colostro ser significativo, a proteção conferida não foi suficiente para evitar o aparecimento da pneumonia. Entretanto, o plasma hiperimmune administrado antes da exposição foi altamente efetivo em reduzir a ocorrência e a mortalidade decorrentes de infecções pelo *R. equi* (MADIGAN et al., 1991). Inúmeras pesquisas demonstraram que a administração de plasma hiperimmune estava associada a elevação do título de anticorpos séricos dos potros que os recebiam (DAVIS et al., 1995). A administração de plasma hiperimmune aos neonatos, até 48 horas após o nascimento e após três a quatro semanas de vida tem oferecido resultados melhores que a imunização de éguas com antígeno APTX (PRESCOTT et al., 1997).

Quanto aos potros estudados, apesar de não terem sido vacinados, os títulos de anticorpos contra *R. equi* aumentaram significativamente após a ingestão de colostro. Resultados semelhantes foram encontrados por Fontanals et al. (1997). Hietala et al. (1985), demonstraram que os anticorpos específicos adquiridos com o colostro se mantiveram em níveis adequados até os dois meses de idade, quando entraram em declínio e os anticorpos autógenos, aumentaram após 45 e 60 dias de idade. Os títulos de anticorpos detectados pelo antígeno comercial se mantiveram elevados até os 150 dias de idade, sendo mais duradouros que os detectados pelo

APTX, que aos 60 dias deixaram de ser considerados como títulos protetores. Porém, permanece a dúvida se estes anticorpos presentes em níveis protetores aos 150 dias foram adquiridos passivamente ou produzidos ativamente, pois segundo Gaskin et al. (1990), os potros soroconvertem para *R. equi* sete dias após a exposição ao agente. Possivelmente, o contato natural do neonato com o agente infeccioso estimularia precocemente o funcionamento do sistema imune, enquanto em potros que receberam colostro de éguas vacinadas é necessário que os anticorpos maternos atinjam valores mínimos para que ocorra soroconversão (PRESCOTT et al., 1996), o que ocorreria entre a quinta e sexta semanas, segundo Becú e Polledo (1995), ou em torno da oitava e décima semanas (PRESCOTT et al., 1997), porém atingindo concentrações semelhantes a de animais adultos somente em torno de seis meses (HIETALA et al., 1985).

Outras formas de imunização foram idealizadas, como a vacinação de éguas, na tentativa de aumentar os anticorpos colostrais e, conseqüentemente, transferir imunidade passiva aos potros neonatos. Embora vários antígenos do *R. equi*, incluindo a proteína VapA, as exoenzimas conhecidas como “fatores equi” e os polissacarídeos capsulares sejam postulados como protetores, ainda não existe uma vacina eficaz contra esse patógeno (WOOLCOCK et al., 1987; DAVIS et al., 1995). Takai et al. (1991), sugeriram que a vacinação de éguas e a administração de plasma hiperimune aos potros poderia ser viável para o controle dessa enfermidade. Enquanto Fernandez et al. (1996), relataram que o único método comprovado para se evitar a pneumonia por *R. equi* é a transfusão de plasma hiperimune.

Segundo Becú (1999), na Argentina e em outros países sul-americanos a enfermidade é controlada com a vacinação das éguas antes do parto, e em alguns casos com a administração do plasma hiperimune nos potros, sendo esta efetuada somente quando os títulos de anticorpos 48 horas após o nascimento são baixos. Becú et al. (1997), observaram um efeito significativo da vacinação de éguas prenhas com a vacina Rhodovac, na prevenção contra a pneumonia pelo *R. equi*. Esses autores observaram um efeito melhor com a associação da vacinação das éguas prenhas e a administração de plasma hiperimune aos potros.

A identificação da proteína associada a virulência VapA adquiriu importância, tornando-se a principal ferramenta na imunoprofilaxia da rodococose em potros (TAKAI et al., 1991a). O antígeno APTX, rico em proteína VapA, foi utilizado por Prescott et al. (1996) para imunização de éguas prenhes em final de gestação, esses pesquisadores observaram aumentos nos títulos de anticorpos específicos, porém os resultados apesar de promissores foram inconclusivos. Prescott et al. (1997), utilizaram o antígeno APTX para imunizar éguas prenhes e seus potros oriundos de criatórios brasileiros, e verificaram altos títulos de anticorpos nas mães e uma resposta imune humoral baixa nos potros, sugerindo que esta falha imunológica devia-se ao insuficiente desenvolvimento dos mecanismos humorais nos mesmos. Observaram ainda, um aumento na ocorrência da pneumonia por *R. equi* nos potros vacinados. Segundo Becú et al. (1997), a vacinação dos potros produziu resultados insatisfatórios, pois conferiu baixa concentração de anticorpos anti-*R. equi*. Além disto, este autor ressaltou que a vacinação tanto de potros como de éguas poderia ser um erro, pois ao se vacinar as éguas os anticorpos colostrais poderiam bloquear nos potros a resposta a vacina.

Outros estudos semelhantes foram realizados na mesma época na Hungria por Varga et al. (1997), empregando vacinas inativadas e antígenos não purificados em éguas prenhes e potros neonatos. Apesar dos resultados clínicos terem sido favoráveis, os títulos de anticorpos no soro de potros vacinados na primeira semana de vida foram considerados baixos, sugerindo que a proteção devia-se provavelmente à vacinação repetida de potros e não a ingestão do colostro produzido pelas éguas vacinadas. A princípio, os resultados permitem concluir que a imunização de éguas com o objetivo de aumentar os anticorpos no colostro não era, aparentemente o melhor caminho a seguir.

Algumas hipóteses tem sido levantadas para justificar a inadequada resposta imune em potros produzida pela ingestão do colostro de éguas vacinadas com antígeno APTX. Estudos realizados por Kanaly e Ardans (1992), demonstraram em ratos infectados com *R. equi* a importância da imunidade celular na proteção contra a infecção e que tal resposta não é obtida em eqüinos neonatos pela ingestão de colostro. Por outro lado, demonstrou-se que os anticorpos colostrais possuem capacidade opsonizante e, desta forma, podem ativar a atividade fagocítica de

macrófagos (HIETALA e ARDANS, 1987). Embora pareça que a imunidade celular seja mais importante do que a humoral na proteção contra a pneumonia pelo *R. equi* (KANALY et al., 1993), os anticorpos são importantes na proteção dos potros nas primeiras semanas de vida (PRESCOTT et al., 1996).

Estudos mais detalhados demonstraram que pelo menos duas subclasses de imunoglobulinas são induzidas pela vacinação com APTX, a IgGb e a IgGt, enquanto a infecção natural induziu com maior intensidade a produção de IgGa. Uma das hipóteses propostas para explicar estes resultados sugere que a fabricação de vacinas utilizando partículas totais do *R. equi* forneceria uma maior amplitude de antígenos e, conseqüentemente, produziria uma resposta imune mais diversificada. Este conceito também justificaria a melhor efetividade do plasma hiperimune, produzido a partir de culturas celulares totais, quando comparado à vacinação das éguas com antígeno APTX (PRESCOTT et al., 1997).

Tentativas de promover resposta imune utilizando vacinação de potros neonatos foram realizadas por inúmeros pesquisadores (PRESCOTT et al., 1996, PRESCOTT et al., 1997, VARGA et al., 1997). Entretanto, os resultados obtidos não foram promissores. Prescott et al. (1997) ao estudar a imunização de éguas e potros em criatórios brasileiros, com o antígeno APTX, observaram que houve aumento na ocorrência de pneumonia por *R. equi* nos animais jovens. Outros estudos, conduzidos em condições de clima temperado, chegaram às mesmas conclusões (PRESCOTT et al., 1996). Aparentemente, os anticorpos maternos bloqueiam os antígenos vacinais nos potros e não conferem imunidade suficiente (BECÚ, 1997). Por outro lado, a imunização de animais jovens com vacinas não purificadas obtiveram resultados mais animadores (VARGA et al., 1997).

Um programa de imunoprofilaxia para *R. equi* de éguas tem sido estabelecido em inúmeras criações de Puro Sangue Inglês na Argentina desde 1992. As éguas são anualmente imunizadas durante os dois últimos meses de prenhes com vacina contendo antígenos solúveis de *R. equi*, incluindo o VapA e exoenzimas, denominadas "fatores equi". A mortalidade causada pela pneumonia provocada pelo *R. equi* em potros filhos de fêmeas vacinadas foi reduzida de 3% para 1,2%, quatro anos após a

instituição do programa de vacinação (BECÚ e POLLEDO, 1995, BECÚ et al., 1997). A repercussão destes resultados obtidos no país vizinho, tem estimulado criadores brasileiros a adotarem o mesmo programa de imunização o qual, aparentemente, tem apresentado, também em nossas condições, resultados bastante satisfatórios (LIMA, 2001 - comunicação pessoal¹).

Porém não se pode atribuir exclusivamente esse resultados às práticas vacinais, uma vez que outras práticas de manejo foram adotadas simultaneamente, como a redução da lotação de animais por piquete.

Os resultados obtidos por Fontanals et al. (1997), analisando a composição da vacina argentina sugeriram que outros antígenos de alto peso molecular, além do VapA, podem ser importantes na indução de anticorpos que protegem os potros jovens da pneumonia por *R. equi*. Estes antígenos estariam presentes em altas concentrações nesta vacina.

Prescott et al. (1980), sugeriram que a amplitude da resposta imune ao *R. equi* em potros normais seria maior em torno dos dois meses de idade. Takai et al. (1996), estudando propriedades contaminadas com cepas virulentas de *R. equi*, detectaram na maioria dos potros aparentemente saudáveis, através do teste ELISA, aumentos significativos na concentração de anticorpos séricos, seis a dez semanas após o nascimento. Esses títulos se mantiveram mais ou menos constantes até em torno da 14^a semana. Observaram ainda, que a produção de anticorpos contra o antígeno VapA ocorreu durante os três primeiros meses de vida e que durante as quatro primeiras semanas de vida esses anticorpos foram raramente detectados.

Embora possam ser empregados inúmeros testes na detecção de anticorpos anti-*R. equi*, optou-se na presente pesquisa, pela utilização do teste ELISA.

Segundo Takai et al. (1985) e Prescott et al. (1996), a Imunodifusão em agar gel, a Fixação de complemento e a Hemoaglutinação indireta não são suficientemente sensíveis e foram considerados de baixo ou nenhum valor para o diagnóstico da infecção pelo *R. equi*.

¹ LIMA, M.M. Médico Veterinário da Fazenda de Criação São Geraldo – Haras Agromen

Para Cuteri et al. (2002), os anticorpos anti-*R. equi* não foram provavelmente detectados em muitos ensaios experimentais devido a pobre resposta humoral relacionada a esses testes. Por outro lado, o teste ELISA foi considerado mais sensível que os anteriores (LINDER, 1997). Takai et al. (1985), aperfeiçoaram o teste ELISA para detecção de anticorpos anti-*R. equi*. Cuteri et al. (2002), confirmaram que esse teste ELISA foi um método rápido e confiável para detecção desses anticorpos em potros.

Quanto as raças estudadas, sabe-se que a raça Bretão produz maior quantidade de leite que as outras raças. A égua Bretã fornece ao potro em média 24 litros de leite diariamente, enquanto que as outras raças fornecem em média 14 litros. Objetivando obter um melhor desenvolvimento destes produtos no desmame, as Bretãs tem sido muito utilizadas pelos criadores de BH para amamentar os potros.

A diferença de crescimento dos potros tanto ao nascer como ao desmame pode atingir de cinco a dez centímetros de altura na cernelha, além de uma musculatura mais destacada¹. Na propriedade onde foi realizado este experimento observou-se diferença no desenvolvimento de dois potros irmãos, filhos de mesmo pai e mãe, dos quais um foi implantado no útero de uma égua Bretã. O potro que mamou colostro na égua Bretã obteve maior desenvolvimento que o que mamou na égua BH (LIMA, 2001- - comunicação pessoal)². No entanto não foram observadas diferenças quanto a concentração de anticorpos séricos anti-*R. equi* entre éguas BH e Bretãs e nem entre seus produtos.

O teste com o antígeno comercial detectou uma maior persistência da imunidade e revelou melhores resultados que o antígeno APTX. Embora, os resultados obtidos para os dois antígenos tenham sido significativamente diferentes para os grupos de potros e entre os grupos controle e vacinado; os valores demonstraram um mesmo comportamento e, apresentaram o mesmo ponto de corte na escala de determinação do Nível de ELISA (NE=4).

¹ Padrão racial do cavalo Bretão. Disponível em: www.horsewordbrasil.com.br

² LIMA, M.M. (Comunicação pessoal, 2001). Médico Veterinário da Fazenda de Criação São Geraldo – Haras Agromen

Uma possível explicação para este fato seria porque o antígeno APTX consiste de uma preparação semi-purificada da proteína VapA, enquanto o antígeno comercial possui outros determinantes antigênicos, além da VapA. Com o processo de purificação para a síntese do APTX pode ter ocorrido a perda de alguns componentes da parede e cápsula bacteriana no sobrenadante das culturas. As éguas foram imunizadas com a vacina Rhodovac, que segundo Sutcliffe (1997), consiste de material solúvel extracelular proveniente de cultura do *R. equi*. Essa vacina foi produzida pelo mesmo Laboratório que o antígeno comercial testado, e o antígeno APTX avaliou a resposta induzida por vários determinantes antigênicos presentes na vacina, além da proteína VapA.

Fontanals et al. (1997), analisaram os antígenos presentes em três lotes dessa vacina e observaram que todos eles possuíam alta concentração de proteínas e padrões similares de multiplicidade de proteínas. Demonstraram ainda que esta vacina contém proteínas produtoras de determinantes antigênicos VapA, bem como a variedade de antígenos, com uma excelente capacidade imunogênica em cavalos adultos.

Quanto a diferença na magnitude das respostas entre os antígenos testados deve-se possivelmente, a diferença na distribuição dos polipeptídeos presentes em cada um, necessitando de estudos adicionais para a caracterização dos antígenos utilizados.

Segundo Finger (1996), a variação da resposta detectada pelos antígenos pode ser devido a diferença de origem das amostras destes. A explicação para este fato, seria um menor título do “fator equi” produzido pela amostra bacteriana, resultando em antígenos menos concentrados, que seriam menos eficientes em detectar animais reagentes. Segundo Nakazawa (1980), os “fatores equi” são antigenicamente homogêneos em diferentes amostras de *R. equi*. Desta forma, este autor sugeriu que as diferenças ocorrem devido à quantidade de “fator equi” produzido e à capacidade de precipitação do antígeno, e não à variação antigênica das amostras.

Esse estudo mensurou apenas a resposta imune humoral das éguas e potros através do teste ELISA. Embora pouco se conheça a respeito do papel e da importância

da imunidade celular e humoral contra o *R. equi* em potros, os mecanismos mediados por células foram considerados por Prescott (1991) e Yager (1987), como fonte principal de imunidade nas infecções ocasionadas pelo *R. equi*, devido a natureza intracelular do patógeno.

Embora a vacinação das éguas tenha acarretado uma diminuição no número de casos clínicos provocados pelo *R. equi* e na mortalidade, permanece a dúvida do efeito protetor dos anticorpos transferidos passivamente pelo colostro e da importância da vacinação de éguas prenhas. Esses achados foram semelhantes aos relatados por Lazzari et al. (1996), ao avaliar a resposta humoral de outra vacina contra *R. equi*.

Quanto ao esquema de vacinação, ainda não existe um consenso a respeito da vacinação das éguas, potros ou ambos e quais seriam os melhores momentos para a realização.

Novos estudos deverão ser realizados no intuito de identificar os antígenos presentes na vacina Rhodovac e o seu papel na proteção contra o *R. equi*. Sendo também necessários esclarecimentos sobre os fatores envolvidos no mecanismo da resposta imune à infecção por *Rhodococcus equi* e na formulação de medidas preventivas eficazes a serem adotadas.

VI. CONCLUSÃO

Mediante aos resultados obtidos nesta pesquisa e as condições em que foi realizado pode-se concluir que:

- A vacina Rhodovac induziu a formação de anticorpos protetores às éguas imunizadas.
- Não houve efeito da raça quanto à produção de anticorpos anti-*R. equi*.
- Houve transferência de anticorpos anti-*R. equi* através do colostro para todos os potros.
- Não houve diferenças quanto à titulação de anticorpos anti-*R. equi* nos potros que mamaram em éguas Brasileiro de Hipismo e Bretãs.
- O antígeno comercial detectou títulos de anticorpos maiores e mais persistentes do que o antígeno APTX.
- A cinética da resposta imune humoral nos animais estudados foi similar em relação aos dois antígenos testados.
- O ELISA teste demonstrou sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*R. equi*.
 - A utilização da vacina Rhodovac propiciou o desaparecimento dos casos de rodococose na propriedade, até o presente momento.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH, D.M. et al. Lack of residual lung damage in horses in wich *Rhodococcus equi* - induced pneumonia had been diagnosed. **American Veterinary Journal**, Schaumburg, v.54, n.12, p.2115-2120, 1993a.

AINSWORTH, D.M. et al. Recognition of *Pneumocystis carinii* in foals with respiratory distress. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.25, n.2, p.103-104, 1993b.

AINSWORTH, D.M. et al. Associations between physical examination, laboratory, and radiografic findings and outcome and subsequent racing performance of foals with *Rhodococcus equi* infection: 115 cases (1984-1992). **Journal of the American Veterinary Research**, Schaumburg, v.213, n.4, p.510-515, 1998.

AINSWORTH, D.M. Rhodococcal infections in foals. **Equine Veterinary Education**, Newmarket, v.11, n.4, p.191-198, 1999.

ANDRADE, L.S. **Fisiologia e manejo da reprodução eqüina**, Recife, 1983, 388p.

ANZAI, T. et al. Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals, **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, n.3-4, p.337-345, 1997.

ARDANS, A.A. Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi* (*Corynebacterium equi*) pneumonia in foals. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 32, 1987, Lexington. **Proccedings...** p.129-144.

BALDWIN, J.L. et al. *Rhodococcus equi* enteritis, colonic lymphadenitis, and peritonitis in three foals with nonresponsive *Rhodococcus equi* bronchopneumonia. **Equine Practice**, Santa Barbara, v.14,n.1, p.15-18, 1992.

BARKER, I.K.; VAN DREUMEL, A.A.; PALMER, N. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4ed. San Diego: Academic Press, 1993, v.2, p.252-253.

BARTON, M.D.; HUGHES, K.L. *Corynebacterium equi*: a review. **The Veterinary Bulletin**, Farnham Royal, v.50, n.2, p.65-80, 1980.

BECÚ, T.; POLLEDO, G. Experiences with *R. equi* immunoprophylaxis in Argentina. **Equine Veterinary Data**, v.16, n.1, p.8-9, 1995.

BECÚ, T.; POLLEDO, G.; GASKIN, J.M. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.193-204, 1997.

BECÚ, T. Shinji Takai estuda o *Rhodococcus* na Argentina. **Saúde Equina**, São Paulo, v.2, n.13, p.16-17, 1999.

BEECH, J. Infections caused by bacteria, mycoplasmas, parasites, and fungi. In: **Equine respiratory disorders**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1991. p.188-194.

BERNARD, B. et al. The influence of foal pneumonia on future racing performance. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 37, 1991. Lexington. **Proceedings...** p.17-18.

BERTONE, J.J. Pneumonia and other disorders associated with *Rhodococcus equi*. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Equine internal medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p.970-980.

BLOOD, D.C.; RADOSTIS, O.M. Doenças causadas por *Corynebacterium spp.* In: **Clínica Veterinária**. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p.488-490.

BURKS, B.S. Managing *Rhodococcus equi* infections in foals. **Veterinary Medicine**, Chicago, p.656-662, 1996.

BURROWS, G.E. *Corynebacterium equi* infection in two foals. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v. 152, n.8, p.1119-1124, 1968.

BURROWS, G.E.; MacALLISTER, C.G.; BECKSTROM, D.A. Rifampin in the horse: comparison of intravenous, intramuscular and oral administrations. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.46, n.2, p.442-446, 1985.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. **Patologia veterinária especial de Thompson**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 1988. 76p.

CHRISTLEY, R.M.; HODGSON, D.R. *Rhodococcus equi* pneumonia in foals and the effect on subsequent race performance. **Australian Equine Veterinarian**, Artaemon, v.12, n.12, p.76-79, 1994.

COSTERTON, J.W.; GEESEY, G.G.; CHENG, K.J. How bacteria stick. **Scientific American**, New York, v.288, n.1, p.86-95, 1978.

CUTERI, V. et al. A serological survey of *Rhodococcus equi* infection in foals in central Italy: comparison of two antigens using an ELISA test. Disponível em: <<http://w.w.w.pubmed.com>>. Acesso em: 10 out. 2002.

DAVIS, J. et al. Oral administration of concentrated equine serum to newborn foals prevents failure of passive transfer of immunoglobulin and provides passive immunity for *Rhodococcus equi*. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 41, 1995, Lexington. **Proceedings...** p.176-177.

DOIG, C.; GILL, M.J.; CHURCH, D.L. *Rhodococcus equi* an easily missed opportunistic pathogen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Oslo, v.23, p.1-6, 1991.

DUNGWORTH, D.L. The respiratory system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 4 ed., v.2. San Diego: Academic Press, 1993. p.652-653.

ELLENBERGER, M.A.; KAEBERLE, M.L.; ROTH, J.A. Equine cell-mediated immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.45, n.11, p.2424-2427, 1984a.

ELLENBERGER, M.A.; KAEBERLE, M.L.; ROTH, J.A. Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.45, n.11, p.2428-2430, 1984b.

EMMONS, W.; REICHWEIN, B.; WINSLOW, D. *Rhodococcus equi* infection in the patient with AIDS: literature review and report of unusual case. **Review Infectious Diseases**, Chicago, v.13, p.91-96. 1991.

FALCON, J. et al. Clinical and radiographic findings in *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, Schaumburg, v.186, n.6, p.593-599, 1985.

FAYET, G. Profilaxia das doenças respiratórias em equinos. **Hora Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.10, p.55-60, 1999.

FERNANDEZ, S.A.; PRESCOTT, F.J.; NICHOLSON, M.V. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice if IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (Vapa)-enriched antigens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.187-192. 1997.

FINGER, G.P. **Caracterização de amostras de *Rhodococcus equi* de eqüinos no Rio Grande do Sul**. 1996. 99f. Dissertação (Mestrado em Bacteriologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

FINNERTY, W.R. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*, **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.193-218, 1992.

FITZGERALD, S.D.D.; YAMINI, B. Rhodococcal abortion and pneumonie in an equine fetus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, Columbia, v.7, p.157-158, 1995.

FONTANALS, M.A. et al. Antigenic analysis of *Rhodococcus equi* preparations using different horse sera. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.247-255. 1997.

GASKIN, J.M.; BREWER, B.; KOTERBA, A. Diagnostic significance of serological responses to *Rhodococcus equi* in horses. In: AMERICAN COLLECTION VETERINARY INTERNAL MEDICINE FORUM, 8, 1990, Washington (**Abstract**).

GUIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, n.3-4, p.313-334. 1997.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analysis Biochemistry**, Orlando, v.48, p.422-427, 1972.

HIETALA, S.K.; ARDANS, A.A.; SANSOME, A. Detection of *Corynebacterium equi* specific antibody in horses by enzyme-linked immunosorbent assay. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.46, n.1, p.13-15, 1985.

HIETALA, S.K.; ARDANS, A.A. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi* exposed and non-exposed foals. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.14, n.3, p.307-320, 1987.

HILLIDGE, C. J.; ZERTUCHE, J-M. L. *Corynebacterium equi* lung abscesses in foals. In: ROBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. 2.ed., Philadelphia: Saunders, 1987. p.230-232.

HINES, S.A. et al. Immunity to *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, n.3-4, p.177-185, 1997.

HINES, M.T. et al. **Immunity to *Rhodococcus equi***: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses, 2000. Disponível em: <<http://w.w.w.pubmed.com>>. Acesso em: 10 out. 2002.

HONDALUS, M.K.; MOSSER, D.M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. **Infection and Immunity**, Washington, v.62, n.10, p.4167-4175, 1994.

HONDALUS, M.K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, n.3-4, p.257-268, 1997.

HUGHES, K.L.; SULAIMAN, I. The ecology of and physicochemical influences on growth. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.241-250, 1987.

JEFFCOTT, L.B. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. **Biology Review**, v.47, p.439, 1972.

JEFFCOTT, L.B. Some practical aspects of the transfer of passive immunity to newborn foals. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 6, p.109-115, 1974.

JEFFCOTT, L.B. Passive transfer of immunity to foals. In: ROBINSON N.E. **Current therapy in equine medicine**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1987. p. 210-215.

JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Veterinary pathology**. 6.ed. Baltimore, 1997. p.486.

JUBB, K.U.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. The respiratory system. **Pathology of domestic animals**. 4 ed., San Diego: Academic Press, 1993. v. 2, p. 652-654.

KANALY, S.; HINES, S.; PALMER, G. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice. **Infectious Immunology**, v.61, p.4929-4932, 1993.

KNIGHT, H.D. Corynebacterium infections in the horse. Problems of prevention. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.155, n.2, p.446-452,1969.

KOTERBA, A.M.; DRUMMOND, W.H.; KOSCH, P.C. **Equine clinical neonatology**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1990. p. 71-83.

KOTERBA, A.M. Identificação do neonato de alto risco. In: Simith, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, v.1, 1993, p. 299-301.

KRUSE-ELLIOTT, K.; WAGNER, P.C. Failure of passive antibody transfer in the foal. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, Princeton, v.104, p. 385-386, 1984.

LANGENEGGER, J.; NEVES, I.P.; LANGENEGGER, C. Ocorrência da corinebacteriose em potros no Estado do Rio de Janeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.5, p. 473- 476, 1970.

LAVOIE, J.P.; FISET, I.; LAVERTY, S. Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.26, n.5, p.348-352, 1994.

LAZZARI, A. et al. *Rhodococcus equi*: Sorologia e avaliação da transferência passiva de anticorpos para potros. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.26, n.2, p.251-255, 1996.

LAZZARI, A. et al. Soroepidemiologia de *Rhodococcus equi* em eqüinos da região de Bagé, RS, pelo teste de Inibição da Hemóise Sinérgística. **Pesquisa Brasileira Veterinária**, Rio de Janeiro, v.17,n.3-4, p.1-10, 1997.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: two Coryneform bacteria increasingly recognized as agents of human infection. **Emergences Infectuous Diseases.**, v.3, p.1-10, 1997.

MACHADO, R.Z. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v.71, p.17-26, 1997.

MADIGAN, J.E.; HIETALA, S.; MULLER, N. Acquisition of passive immunity against *R. equi* in foal by administration of hyperimmune plasma. In: AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTICE, 35, 1989, Lexington. **Proccedings...** p.521-522.

MADIGAN, J.E.; HIETALA, S.; MULLER, N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* in foals by administration of hyperimmune plasma. **Journal of Reproductive and Fertility**, Cambridge, v.44, suppl., p. 571-578, 1991.

MARTENS, J.G; MARTENS, R.J.; RENSHAW, B.W. *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*: Bactericidal capacity of neutrophils from neonatal and adult horses. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.49, n.3, p.295-298, 1988.

MARTENS, R.J.; MARTENS, J.G.; FISKE, R.A. Foal pneumonia: a practical approach to diagnosis and therapy. In: WHITLOCK, R.H. **The Compendium collection: equine medicine and surgery in practice**. 1982. p.217-229.

MARTENS, R.J. et al. *Rhodococcus equi* foal. Pneumonia: pathology and immunoprophylaxis. In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 35, 1989a. Lexington. **Proceedings...** p.199-213.

MARTENS, R.J. et al. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. **Equine Veterinary Journal**, New market, v.21, n. 4, p.249-255, 1989b.

MARTENS, R.J.; MARTENS, J.G.; FISKE, R.A. Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.12, suppl., p.19-22, 1991.

MARTENS, R.J. et al. Prevalence and virulence of *Rhodococcus equi* in sick foals and soil of horse-breeding farms in Texas. **Equine Practice**, Santa Barbara, v.22, n.3, p.6-7, 2000.

McCLURE, J.J. Distúrbios Imunológicos. In: SMITH, B.P **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, 1994. v.2, p.1591-1597.

MULLER, S.N.; MADIGAN, E.J. Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: results of 5 years study. In: ANNUAL CONT. AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PACTITIONERS, 38, 1992, Lexington, **Proceedings...** p.193-201.

NAKAZAWA, M. Detection of colt serum antibody against *Corynebacterium equi* by agar gel diffusion. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.42, p.551-555., 1980.

NAKAZAWA, M. et al. Serogrouping of *Rhodococcus equi*. **Microbiology Immunology**, Tokyo, v.27, p.837-846, 1983.

OGLESBY, R.N. Foal pneumonia: *Rhodococcus equi*. Disponível em: <<http://www.horseadvice.com>> Acesso em: 20 mar. 1998.

PEARSON, R.C. et al. Times of appearance and disappearance of colostral IgG in the mare. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.45, p.186, 1984.

PEIRÓ, R.J. et al. Pneumonia em potros causada pelo *Rhodococcus equi*. **Revista de Educação Continuada**, São Paulo, v.5, n.1, p.73-86, 2002.

PRESCOTT, J.F.; OGILVE, T.M.; MARKHAM, R.J.F. Lymphocyte immunostimulation in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.41, n.12, p.2073-2075, 1980.

PRESCOTT, J.F.; LASTRA, M.; BARKSDALE. Equi factor in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.16, n.5, p.988-990, 1982.

PRESCOTT, J.F.; COSHAN-GAUTHIER, R.; BARKSDALE, L. Antibody to equi factor (s) in the diagnosis of *Corynebacterium equi* pneumonia of foals. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Ottawa, v.48, p.370-373, 1984.

PRESCOTT, J.F.; SWEENEY, C.R. Treatment of *Corynebacterium equi* pneumonia in foals: a review. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.187, n.7, p.725-728, 1985.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Review**, Washington, v.4, p.20-34, 1991.

PRESCOTT, J.F. et al. Use of a virulence-associated protein based enzyme-linked immunosorbent assay for *Rhodococcus equi* serology in horses. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.28, p.344-349, 1996.

PRESCOTT, J.F. et al. Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against pneumonia. **American Journal of Veterinary Research**, Schamburg, v.58, p. 356-359, 1997.

RICKETTS, S.W.; ALFONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v.4, n.7, p.189-192, 1991.

ROSSADALE, P. D. Clinical studies on a newborn Thoroughbred foal. I. Perinatal behaviour. **Brazilian Veterinary Journal**, v. 123, p. 470-477, 1967.

SELLON, D.C. et al. Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 58, n.11, p.1232-1237, 1997.

SELLON, D.C.; McCONNICO, R.S.; VIVRETE, S.L. Diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: PCR or culture? In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 46, 2000, San Antonio. **Proceedings...** p.268-269.

SPENSLEY, M.S. Retenção de membranas fetais. In: Smith, B.P. **Tratado de medicina interna de grandes animais**. São Paulo: Manole, v.1, 1993, p.258-260.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2ed. New York: Mc Graw-Hill, 1980. 633p.

SUTCLIFFE, I.C. Macroamphiphilic cell envelope components of *Rhodococcus equi* and closely related bacteria. **Veterinary Microbiology**, Chicago, v.56, p.287-289, 1997.

TAKAI, S.; TSUBAKI, S. The incidence of *Rhodococcus equi* in domestic animals and soil. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.47, n.3, p.493-496, 1985.

TAKAI, S.; KAWASU, S.; TSUBAKI, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* infection in foal. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 46, n. 10, p. 2166-2170, 1985.

TAKAI, S. et al. Ecology of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* soil on a horse-breeding farm. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 12, p. 169-177, 1986.

TAKAI, S. et al. Ecology of *Rhodococcus equi* in horses and their environment on horse-breeding farm. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.233-239, 1987.

TAKAI, S.; KAZAMA, N.; TSUBAKI, S. Radial immunodiffusion enzyme assay for detection of antibody to *Rhodococcus equi* in horse sera. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.52, n.3, p.653-655, 1990.

TAKAI, S. et al. Association between a large plasmid and 15-to 17 kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, n.11, p.4056-4060, 1991a.

TAKAI, S. et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soils and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, n.12, p.2887-2889, 1991b.

TAKAI, S. et al. Identification of 15 to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.29, p. 439-443, 1991c.

TAKAI, S. et al. Virulence associated 15- to 17 kilodalton antigens in temperature dependent expression and location of antigens. **Infection and Immunity**, Washington, v.60, n.7, p.2995-2997, 1992.

TAKAI, S. et al. M. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from lesions of infected foals. **Bulletin Equine Research Institute**, Tokyo, n.30, p.9-14, 1993.

TAKAI, S. et al. Humoral antibody response to the antigens of virulent *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v.5, n.4, p.121-126, 1994a.

TAKAI, S. et al. T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, n.2, p.457-460, 1994b.

TAKAI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. *Rhodococcus equi* infections in foals current concepts and implication for future research. **Journal of Equine Science**, v.6, n.4, p.105-119, 1995a.

TAKAI, S. et al. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17 kilodalton antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.6, p.1622-1627, 1995b.

TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. **Veterinary Microbiology**, Chicago, v.56, n.3-4, p.167-176, 1997.

TAKAI, S. et al. Two news variants of the *Rhodococcus equi* virulence plasmid, 90kb type IV, recovered from a foal in Japan. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.82, n.4, p.373-381, 2001.

TAN, C. et al. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v.59, p.51-59, 1995.

THRELFALL, W. R. Retained placenta. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. M. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. 1992. p. 614-621.

TIMONEY, J.F. The Genus *Rhodococcus equi*. In: TIMONEY, J.F. et al. **Hagan and Bruner's: microbiology and infectious diseases of domestic animals**. 8ed., Ithaca: Comstock, 1988. p.255-258.

VARGA, J. et al. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.56, p.205-212, 1997.

VIVRETTE, S. The diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Equine Practitioners Veterinary Medicine**, v.87, n.2, p.144-49, 1992.

WARNER, A.E. Bacterial pneumonia in foals. In: SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**. 2.ed. St. Louis : Mosby, 1996. p.572-575.

WILSON, W.D. Foal pneumonia. In: ROBINSON, N.E. **Current therapy in equine medicine**. 3.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1992. p.466-473.

WILKS, C.R.; BARTON, M.D.; ALLISON, J.F. Immunity to and immunotherapy for *Rhodococcus equi*. **Journal of Reproductive and Fertility**, Cambridge, suppl.32, p.497-505, 1982.

WINTZER, H.J. Doença dos eqüinos. São Paulo: Manole, 1990, 438p.

WOOLCOCK, J.B.; MUTIMER, M.D. The capsules of *Corynebacterium equi* and *Streptococcus equi*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v.109, p.127-130, 1978.

WOOLCOCK, B.J.; MUTIMER, D.M.; FARMER, A.M.T. Epidemiology of *Corynebacterium equi* in horses. **Research in Veterinary Science**, v.28, p.87-90, 1980.

WOOLCOCK, B.J.; MUTIMER, D.M.; BOWLES, M.P. The immunological response of foals to *Rhodococcus equi*: a review. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.215-224, 1987.

YAGER, J.A. et al. *In vitro* bactericidal efficacy of equine polymorphonuclear leukocytes against *Corynebacterium equi*. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.47, n.2, p.438-440, 1986.

YAGER, J.A. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, Washington, v.14, p.225-232, 1987.

ZERTUCHE, J.M.L.; HILLIDGE, C.J. Therapeutic considerations for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Compendium on Continuing Education for Practicing Veterinarian**, v.9, n.9, p.965-971, 1987.

ZINK, M.C. et al. *In vitro* phagocytosis and killing of *Corynebacterium equi* by alveolar macrophages of foals. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v.46, n.10, p.2171-2174, 1985.

VIII. APÉNDICE

Tabela 8. Análise estatística das variáveis estudadas e coeficientes de variações das parcelas e subparcelas, em dois grupos de éguas vacinadas (BH e Bretã) submetidas ao ELISA-teste em relação as médias de níveis de ELISA correspondentes.

Variáveis	Níveis de ELISA (NE)
Fator p/ Raça	0,45 ^{NS}
Fator p/ Antígeno	0,15 ^{NS}
Fatorp/ Raça x Antígeno	0,45 ^{NS}
Fator p/ Momento	67,00 ^{**}
Fator p/ Raça x Momento	1,33 ^{NS}
Fator p/ Antígeno x Momento	10,29 ^{**}
Fator p/ Raça x Antígeno x Momento	0,47 ^{NS}
Coeficiente de variância p/ parcelas	38,85
Coeficiente de variância p/ subparcelas	18,98

** : estatisticamente significativo (P<0,01)

NS: não estatisticamente significativo

Tabela 9. Análise estatística das médias de níveis de ELISA nos dois grupos de éguas vacinadas (BH e Bretã) em relação aos antígenos APTX e Comercial, em diferentes momentos.

Variáveis	Raças	Antígenos		Momentos (dias)					Médias
		APTX	Comercial	-45	-15	0	60	150	
NE	BH	4,2000	4,1250	2,3750	4,8125	5,7500	4,2500	3,6250	4,1625 ^a
	Bretã	4,2000	4,4750	2,6250	5,1250	5,3750	4,4375	4,1250	4,3375 ^a
	Médias	4,2000 ^a	4,3000 ^a	2,5000 ^d	4,9688 ^b	5,5625 ^a	4,3438 ^c	3,8750 ^c	

letras diferentes indicam médias estatisticamente diferentes

NE: nível de ELISA

Tabela 10. Análise estatística das médias de níveis de ELISA nos dois grupos de éguas vacinadas submetidas ao ELISA-teste com os antígenos APTX e Comercial, em diferentes momentos.

Variáveis	Antígenos	Momentos (dias)				
		-45	-15	0	60	150
NE	APTX	2,7500	5,1875	5,8750	4,0625	3,1250
	Comercial	2,2500	4,7500	5,2500	4,6250	4,6250
	Médias	2,5000 ^d	4,9688 ^b	5,5625 ^a	4,3438 ^c	3,8750 ^c

Tabela 10. Análise estatística das variáveis estudadas e coeficientes de variações das parcelas e subparcelas, nos dois grupos de potros (filhos de BH e Bretã) submetidos ao ELISA-teste em relação as médias de níveis de ELISA correspondentes.

Estatísticas	Nível de ELISA
Fator p/ Grupo	1,07 ^{NS}
Fator p/ Antígeno	4,51*
Fator p/ Raça x Antígeno	0,03 ^{NS}
Fator p/ Momento	120,10**
Fator p/ Raça x Momento	0,12 ^{NS}
Fator p/ Antígeno x Momento	1,01 ^{NS}
Fator p/ Raça x Antígeno x Momento	1,34 ^{NS}
Coeficiente de Variância p/ parcelas	46,72
Coeficiente de Variância p/ subparcelas	27,53

*: estatisticamente significativo (P<0,05)

** : estatisticamente significativo (P<0,01)

NS: não estatisticamente significativo

Tabela 11. Análise estatística das variáveis estudadas e coeficientes de variações das parcelas e subparcelas, nos dois grupos de potros (filhos de BH e Bretã) submetidos ao ELISA-teste em relação as médias de níveis de ELISA correspondentes.

Variáveis	Grupos	Antígenos		Momentos (dias)					Médias
		APTX	Comercial	0	1	2	60	150	
	Filhos BH	2,7250	3,2500	0,6875	4,3125	4,8125	2,8750	2,2500	2,9875^a
NE	Filhos Bretã	3,0000	3,4500	0,8750	4,6250	5,0000	3,0000	2,6250	3,2250^a
	Médias	2,8625^b	3,3500^a	0,7813^c	4,4688^a	4,9063^a	2,9375^b	2,4375^b	

Letras iguais não diferem estatisticamente

Tabela 13. Análise estatística das médias de níveis de ELISA nos dois grupos de potros submetidos ao ELISA-teste com os antígenos APTX e Comercial, em diferentes momentos.

Variáveis	Antígenos	Momentos (dias)				
		0	1	2	60	150
	APTX	0,6250	4,3125	4,8125	2,5000	2,0625
NE	Comercial	0,9375	4,6250	5,0000	3,3750	2,8125
	Médias	0,7813^c	4,4688^a	4,9063^a	2,9375^b	2,4375^b

NE: nível de ELISA

Tabela 12. Análise estatística das variáveis estudadas e coeficientes de variações das parcelas e subparcelas, nos dois grupos de éguas vacinadas (BH e Bretã) e no grupo controle (n=5), submetidos ao ELISA-teste em relação as médias de níveis de ELISA .

Estatísticas	Nível de ELISA
Fator p/ Grupo	16,44**
Fator p/ Antígeno	20,94**
Fator p/ Raça x Antígeno	1,25 ^{NS}
Fator p/ Momento	3,88 ^{NS}
Fator p/ Raça x Momento	2,02 ^{NS}
Fator p/ Antígeno x Momento	3,88 ^{NS}
Fator p/ Raça x Antígeno x Momento	1,55 ^{NS}
Coeficiente de variância p/ parcelas	35,14
Coeficiente de variância p/ subparcelas	17,29

*: estatisticamente significativo (P<0,05)

** : estatisticamente significativo (P<0,01)

NS: não estatisticamente significativo

Tabela 13. Análise estatística das médias de níveis de ELISA nos dois grupos de éguas vacinadas (BH e Bretã) e no grupo controle, em relação aos antígenos APTX e Comercial nos diferentes momentos.

Variáveis	Grupos	Antígenos		Momentos (dias)		Médias
		APTX	Comercial	60	150	
NE	BH	3,5625	4,3125	4,2500	3,6250	3,9375^a
	Bretã	3,6250	4,9375	4,4375	4,1250	4,2813^a
	Controle	1,3000	3,2000	2,2000	2,3000	2,2500^b
	Médias	3,0476^b	4,2857^a	3,8333^a	3,5000^b	

Tabela 16. Análise estatística das médias de níveis de ELISA nos dois grupos de éguas vacinadas (BH e bretã) e no grupo controle em relação aos antígenos APTX e Comercial nos diferentes momentos.

Variáveis	Antígenos	Momentos (dias)	
		60	150
NE	APTX	3,3810	2,7143
	Comercial	4,2857	4,2857
	Médias	3,8333^a	3,5000^b