

## Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em potros

### Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against *Rhodococcus equi* in foals

Carla Braga Martins<sup>1</sup> Maria Antonieta Bonesso<sup>2</sup> Marcelo Mandrá Lima<sup>3</sup>  
Luciana Colbachini Ferraz<sup>4</sup> José Corrêa de Lacerda Neto<sup>5</sup>  
Rosângela Zacarias Machado<sup>6</sup>

#### RESUMO

A infecção ocasionada pelo *Rhodococcus equi* é responsável por elevadas taxas de mortalidade e grandes perdas econômicas na equideocultura. Diante da importância dessa enfermidade, este trabalho objetivou a padronização de um ensaio imunoenzimático indireto (ELISA teste) para a detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em potros ( $n=16$ ) antes e após a ingestão de colostro de mães vacinadas. Nesse ensaio, foram utilizados dois tipos de antígenos de *Rhodococcus equi*, o APTX (proteína semi-purificada VapA, extraído pelo detergente Triton X e precipitado em acetona), e o comercial<sup>1</sup>. Os resultados da titulação em bloco determinou a concentração ótima dos antígenos em  $2,0\mu\text{g ml}^{-1}$  e a diluição única do soro 1:200 para soros de referências negativo, positivo e soros testes. Anticorpos de classe IgG anti-*R.equi* foram detectados nos potros após a ingestão do colostro até 150 dias de experimento. O antígeno comercial detectou títulos de anticorpos maiores e de maior persistência que o APTX. No entanto, para ambos os antígenos utilizados, o ELISA-teste demonstrou elevada sensibilidade.

**Palavras-chave:** potros, ELISA, *Rhodococcus equi*.

#### ABSTRACT

The infection caused by *Rhodococcus equi* (*R.equi*) is responsible for large economic damage, losses

and high mortality rates. Due to the importance of this disease, the aim of this study was to standardize the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA test) for *Rhodococcus equi* antibodies detection in foals ( $n=16$ ) before and after colostrum ingestion in vaccinated mares. Two antigens of *Rhodococcus equi*, APTX and a commercial one were used. The results of block titulation determined optimal concentration of antigens on  $2.0\mu\text{g ml}^{-1}$  and the dilution of serum 1:200 to serum of negative and positive reference and serum tests. IgG antibodies anti-*R.equi* were detected in foals 150 days after colostrum ingestion. The commercial antigen detected higher and more persistent antibodies title when compared to APTX antigen. Both antigens that had used the ELISA-test, demonstrated high sensitivity.

**Key words:** foals, ELISA, *Rhodococcus equi*.

#### INTRODUÇÃO

O *Rhodococcus equi* (*R.equi*) é um microrganismo ubíquo, reconhecido como parasita intracelular facultativo, associado a diferentes afecções nos animais, afetando bovinos, ovinos, suínos, macacos, eqüinos e o homem (LINDER, 1997). Este patógeno é responsável por causar elevadas taxas de

<sup>1</sup>Médico Veterinário, Pós-graduando em Clínica Médica Veterinária, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, Departamento de Clínica Médica, Via de Acesso Professor Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail: carlabraga74@hotmail.com. Autor para correspondência.

<sup>2</sup>Biólogo, Técnico do Laboratório de Parasitologia da FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Pós-graduando em Reprodução Animal, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>4</sup>Médico Veterinário, Pós-graduando em Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Brasil.

<sup>5</sup>Professor Doutor Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

<sup>6</sup>Professor Titular da FCAV/UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil.

mortalidade e grandes perdas econômicas. A infecção causa pneumonia supurativa e enterite associada a linfadenite em potros com menos de seis meses de idade (BECÚ, 1999).

O *R. equi* é encontrado no trato digestório de herbívoros, podendo participar como constituinte da microbiota intestinal, principalmente em eqüinos (PRESCOTT et al., 1984; TAKAI & TSUBAKI, 1985; TAKAI et al., 1986). O estabelecimento da flora intestinal bacteriana nos potros ocorre até 12ª semana de vida e, neste período, o *R. equi* pode atingir concentrações intestinais elevadas, colocando em risco a saúde dos animais (PRESCOTT et al., 1997). Outro ponto a ser destacado é a coprofagia entre os potros jovens, atitude comportamental normal e responsável pelo desenvolvimento da microbiota cecal (BEECH, 1991), no entanto a via de transmissão mais comum deste patógeno é a aerógena (TAKAI, 1997; BECÚ, 1999; FAYET, 1999).

O diagnóstico precoce dessa infecção é importante, embora extremamente difícil e só possível quando os sinais de pneumonia evidenciam-se nos potros doentes (TAKAI, 1997). A detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* tem sido realizada por técnicas de imunodifusão em gel de ágar (IDGA), fixação de complemento (FC) e ensaio imunoenzimático indireto (ELISA). A maior sensibilidade do ELISA na detecção de anticorpos anti-*R. equi* foi verificada por vários pesquisadores (ELLENBERGER et al., 1984; HIETALA et al., 1985; TAKAI et al., 1985; TAKAI et al., 1994).

A imunidade passiva possui grande importância na proteção de potros contra *R. equi*, razão pela qual criadores de eqüinos vem utilizando vacinas comerciais (Rhodovac®) contra a rodococose em éguas no último terço da gestação. A identificação da proteína associada à virulência (VapA) de *R. equi* (TAKAI et al., 1991) caracterizou-a como importante ferramenta na imunoprofilaxia da rodococose em potros. Assim sendo, o antígeno APTX rico em proteína VapA também vem sendo utilizado para imunização de éguas prenhas no final da gestação (PRESCOTT et al., 1996). Diante do exposto, o presente trabalho objetivou padronizar o ELISA teste indireto na detecção de anticorpos da classe IgG anti-*Rhodococcus equi*, utilizando-se dois antígenos, o APTX (proteína semi-purificada VapA, extraído pelo detergente Triton X e precipitado em acetona segundo PRESCOTT et al. (1997)), e o comercial<sup>1</sup>. As reatividades dos dois antígenos foram testadas também pelo *Dot blotting*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 16 potros sadios filhos de éguas vacinadas contra o *R. equi*, provenientes da Fazenda São Geraldo, localizada no município de Ipuã, região norte do Estado de São Paulo. Cada égua recebeu duas doses da vacina Rhodovac<sup>®a</sup>, sendo estas administradas nos 45 e 15 dias pré-parto, respectivamente. Os animais foram mantidos em piquetes com gramínea de *Coast-cross*, sal mineral e água “*ad libidum*”. Em torno dos 20 dias de idade, os potros, juntamente com suas mães, foram transferidos para piquetes contendo unidades de arração para o fornecimento de ração especialmente formulada para os potros até o desmame, à base de leite ninho, aveia e milho.

Amostras de sangue (10ml) dos potros foram colhidas através de venopunção jugular, antes da ingestão do colostro, assim como 24 e 48 horas após o nascimento, e aos 60 e 150 dias de idade. As amostras de sangue foram depositadas em tubos 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 microtubos devidamente identificados. Os tubos foram conservados a -20°C até a ocasião das análises laboratoriais.

As amostras de soro foram testadas contra os dois tipos de antígenos: o comercial<sup>a</sup> 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 (SDS-PAGE), 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 cedido pelo Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, onde foi possível verificar a expressão do VapA em uma banda difusa com massa molecular ao redor de 15-17 kDa. O antígeno APTX foi produzido no Laboratório de Imunoparasitologia da FCAV-UNESP- Jaboticabal.

O *Dot Blotting* foi realizado para verificar a reatividade dos antígenos (APTX e o comercial) com soros controles positivos e negativos. Pequenos fragmentos de nitrocelulose<sup>b</sup> 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. Adicionaram-se 2ml do antígeno no

centro de cada disco de nitrocelulose, aguardando-se 1h em temperatura ambiente para secagem do antígeno. Os discos foram bloqueados por 12 h a 4°C com 0,6 ml de Tris 0,1M, NaCl, 0,1M e 0,5% de Tween 80 (TBS) com 5% de leite<sup>c</sup>. Os soros controle 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 discos foram lavados duas vezes com TBS com leite e uma vez com TBS somente (intervalo de cinco minutos entre cada lavagem). A cada disco, foi adicionado 100ml de conjugado anti-equíno<sup>d</sup> diluído 1:15000 em TBS com leite e incubado por 90 minutos a 37°C. Os discos foram lavados com TBS sem leite por três vezes consecutivas a intervalos de cinco minutos. Em seguida, adicionou-se o substrato 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato Nitro blue Tetrazolium<sup>e</sup> (BCIP/NBT) para a revelação da reação. Aguardaram-se 5 a 10 minutos para o desenvolvimento da cor.

A titulação de anticorpos anti-*R. equi* foi realizada nos grupos experimentais nos momentos assinalados acima, através da técnica de ELISA indireto, conforme a técnica preconizada por TAKAI et al. (1985, 1986) com algumas modificações (MACHADO et al., 1997). As amostras de soro foram testadas concomitantemente contra os dois tipos de antígenos (APTX e comercial).

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.

As diluições ótimas dos antígenos e dos soros controle positivo e negativo foram determinadas por titulação em bloco, utilizando os antígenos nas concentrações de 0,5mg ml<sup>-1</sup>, 1,0mg ml<sup>-1</sup> e 2,0mg ml<sup>-1</sup> em tampão carbonato-bicarbonato (0,05M, 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 equino acoplada à fosfatase alcalina, foi diluído a 1:15000 em PBS-Tween 80 acrescido de 6% de leite em pó desnatado.

Para obtenção dos soros de referência positivos, utilizou-se o soro positivo controle presente no kit de diagnóstico do antígeno comercial<sup>a</sup> e soros de equinos (n=16), colhidos após a segunda vacinação para *R. equi*. As amostras de soros de referência negativos foram obtidas dos potros recém-nascidos, antes da ingestão do colostro.

A cada cavidade da placa para ELISA<sup>f</sup>, foram adicionados 100ml do antígeno diluído em tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,6, ajustando-se a concentração protéica para 2,0mg ml<sup>-1</sup>. 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. Após a lavagem, 100ml 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, adicionaram-se 100ml 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. Adicionaram-se 100ml do substrato<sup>g</sup> da enzima fosfatase alcalina paranitrofenil fosfato (pNPP) diluído a 1mg ml<sup>-1</sup> em tampão dietalonamina de pH 9,8, e as placas foram incubadas por 60 minutos em temperatura de 37°C. Decorrido este prazo, a leitura da reação foi realizada em um leitor de ELISA (MRX TC Plus - Dynex Technology), com filtro de 405nm.

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 WILSON et al. (1984) para sistema *Newcastle* e MACHADO et al. (1997), para sistema *Babesia* spp.

Foi realizada a análise de variância (ANOVA) utilizando-se o procedimento GLM (General Linear Models) do programa computacional SAS (Statistical Analysis Systems), segundo o delineamento em parcelas subdivididas no tempo, tendo como parcela a combinação de dois antígenos e na subparcela os momentos de coleta de amostras. As comparações múltiplas das médias dos grupos nos vários momentos foram feitas utilizando o Teste de Tukey (STEEL & TORRIE, 1980).

## RESULTADOS

Os antígenos APTX e comercial não reagiram com os soros dos grupos controle negativos na diluição de 1:100, no entanto reagiram fortemente com os soros do grupo controle positivos testados (Figura 1). Os resultados da titulação em bloco determinaram a concentração ótima dos antígenos em 2,0mg ml<sup>-1</sup> 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  $0,177 \pm 0,004$  para o antígeno (Ag) APTX e  $0,164 \pm 0,0031$  para o Ag comercial, conforme descrito por Machado et al. (1997), para o sistema *Babesia bovis*. Dessa forma, a escala de níveis de ELISA (NE) ficou definida conforme demonstrado na tabela 1. 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 <sup>34</sup> (faixas de A/P de 0,451 - 2,716 para o Ag APTX e 0,415 - 2,500 para o Ag comercial).

Os títulos de anticorpos dos potros, considerados nulos antes da ingestão do colostro, elevaram-se significativamente após a sua ingestão ( $P < 0,01$ ). Discreta redução no nível de anticorpos foi observada 60 dias após o nascimento, a qual se manteve constante até os 150 dias. Foram registradas diferenças significativas, tanto para o momento de colheita ( $P < 0,01$ ), como para o tipo de antígeno empregado ( $P < 0,05$ ) (Figura 2).

Em relação ao antígeno APTX, 93,7% (n=15) dos potros apresentaram títulos protetores (NE<sup>34</sup>) nas primeiras 24 e 48 horas após o nascimento, reduzindo para 12,5% (n=2) aos 60 dias e aos 150 dias, todos os

animais (n=16) apresentaram NE negativos. O antígeno comercial detectou 75% (n=12) dos potros com titulação positiva nas primeiras 24 horas de vida, 81,3% (n=13) às 48 horas, 50% (n=8) aos 60 dias e 12,5% (n=2) aos 150 dias.

## DISCUSSÃO

Sob circunstâncias normais, a proteção imunológica temporária contra as infecções comuns nas primeiras semanas de vida é proporcionada sob a forma de anticorpos passivamente transferidos, via colostro, pois não ocorre transferência transplacentária de imunoglobulinas em equinos (JEFFCOTT, 1974; McCLURE, 1994). Neste trabalho, ficou demonstrado que houve transferência de anticorpos anti-*R.equi* através do colostro, tendo em vista que os títulos de anticorpos anti *R.equi* aumentaram significativamente após a ingestão do mesmo. Resultados semelhantes foram encontrados por FONTANALS et al. (1997). HIETALA et al. (1985) demonstraram que os anticorpos específicos adquiridos com o colostro permaneceram em níveis adequados até os dois meses de idade, quando entraram em declínio e deixaram de ser considerados como protetores.

Embora possam ser empregados inúmeros testes na detecção de anticorpos anti-*R. equi*, optou-se na presente pesquisa, pela utilização do ELISA teste. Segundo TAKAI et al. (1985) e PRESCOTT et al. (1996), a Imunodifusão em agar gel, a Fixação de complemento e a Hemaglutinação indireta não são suficientemente sensíveis e foram considerados de baixo ou nenhum valor para o diagnóstico da infecção pelo *R.equi*. Para CUTERI et al. (2002), os anticorpos anti-*R.equi* não foram provavelmente detectados em muitos ensaios experimentais, devido à baixa sensibilidade destes testes. No entanto, outros

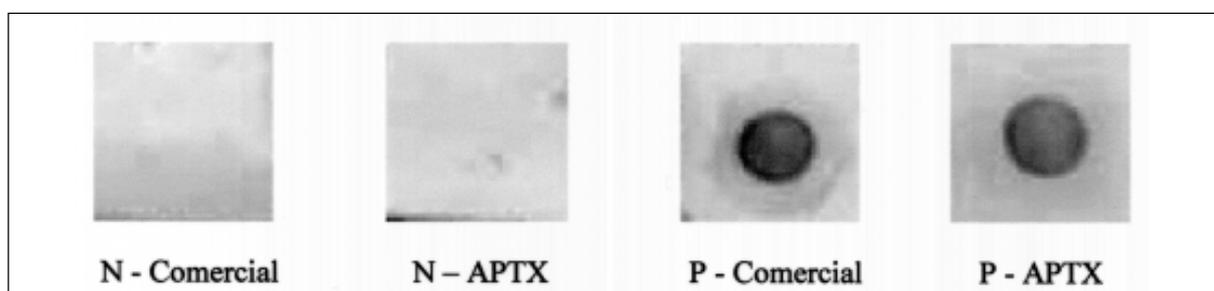


Figura 1 – Reação dos soros controles negativos e positivos testados com os antígenos APTX e comercial no *Dot blotting*; N – comercial: negativo em relação ao antígeno comercial; N-APTX: negativo em relação ao antígeno APTX; P- comercial: positivo em relação ao antígeno comercial; P – APTX: positivo em relação ao antígeno APTX.

Tabela 1 - Determinação dos níveis de ELISA (NE) anti-*R. equi* de acordo com as faixas de amostra em relação ao positivo (A/P) com os antígenos APTX e comercial. SP: Jaboticabal, 2003.

Antígeno APTX		Antígeno comercial	
Faixas de A/P	Nível de ELISA	Faixas de A/P	Nível de ELISA
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.

pesquisadores (TAKAI et al., 1985; CUTERI et al., 2002), desenvolveram um teste (o ELISA) para detecção de anticorpos anti-*R. equi*, sendo um método rápido e sensível na detecção desses anticorpos em potros.

O teste com o antígeno comercial demonstrou melhores resultados que o antígeno APTX. Uma possível explicação para este fato seria devido ao antígeno APTX consistir de uma

preparação semi-purificada da proteína VapA, já o antígeno comercial possivelmente apresenta outros determinantes antigênicos, além desta proteína. 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

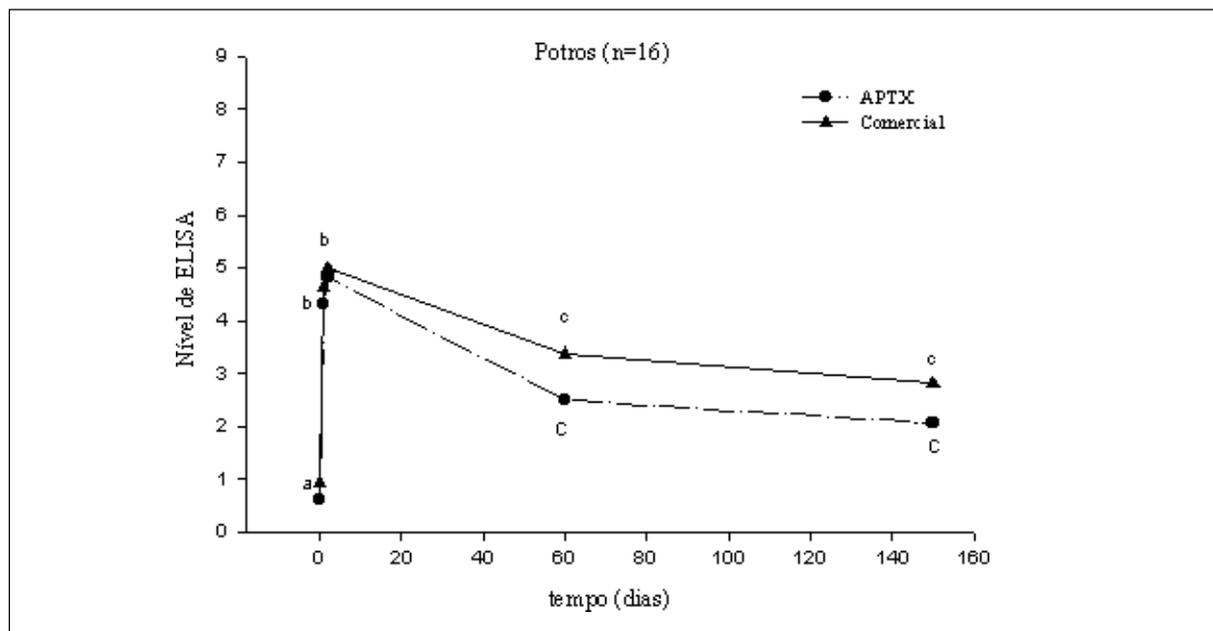


Figura 2 - Nível médio de Elisa observados nos potros, submetidos ao ELISA anti-*R. equi* com os antígenos APTX e comercial em diferentes momentos.

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. No entanto, a cinética da resposta imune humoral nos animais estudados foi similar em relação aos dois antígenos testados, apresentando o mesmo ponto de corte na escala de determinação do Nível de ELISA (NE<sup>34</sup>). O ELISA teste padronizado demonstrou elevada sensibilidade na detecção de anticorpos anti-*R.equi* em potros que ingeriram colostro de éguas vacinadas contra rodococose. Quanto à 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.

#### FONTES DE AQUISIÇÃO

- <sup>a</sup>Clínica Equina SRL, Capitán Sarmiento, Argentina  
<sup>b</sup>Nitrocellulose membrane for use in ECL Westernblotting – Amersham pharma biotech  
<sup>c</sup>Molico - Nestlé  
<sup>d</sup>Conjugate anti-horse - Sigma A 6063  
<sup>e</sup>Sigma  
<sup>f</sup>Nunclon Surface – Nalge Nunc International  
<sup>g</sup>Substrato da fosfatase – Kirkegaard Perry Laboratories

#### AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), que financiou integralmente a presente pesquisa (Processo nº 01/10120-6).

À Fazenda de Criação São Geraldo - Haras Agromen pela cessão dos animais.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEECH, J. Infections caused by bacteria, mycoplasmas, parasites, and fungi. In: \_\_\_\_\_. **Equine respiratory disorders**. Pennsylvania : Lea & Febiger, 1991. p.188-194.
- BECÚ, T. Shinji Takai estuda o *Rhodococcus* na Argentina. **Saúde Equina**, São Paulo, v.2, n.13, p.16-17, 1999.
- CUTERI, V. et al. **A serological survey of *Rhodococcus equi* infection in foals in central Italy: comparison of two antigens using an ELISA test**. Capturado em: 10 out. 2002. Online. Disponível na Internet. <http://www.pubmed.com>.
- ELLENBERGER, M.A. et al. Equine humoral immune response to *Rhodococcus (Corynebacterium) equi*. **American Journal Veterinary Research**, Schaumburg, v.45, n.11, p.2428-2430, 1984.
- FAYET, G. Profilaxia das doenças respiratórias em equinos. **Hora Veterinária**, Jaboticabal, v.18, n.10, p.55-60, 1999.

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

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.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Corynebacterium haemolyticum*: two Coryneform bacteria increasingly recognized as agents of human infection. **Emergences Infectious 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.

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.

PRESCOTT, J.F. et al. 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. 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.

STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2.ed. 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 incidente of *Rhodococcus equi* in domestic animals and soil. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v.47, n.3, p.493-496, 1985.

TAKAI, S. et al. 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. 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, 1991.

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, 1994.

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

WILSON, R.A. et al. An enzyme-linked immunosorbent assay that measures protective antibody levels to Newcastle disease virus in chickens. **Avian Diseases**, v.28, p.1079-1085, 1984.