

ARTIGO DE REVISÃO

*RHODOCOCCUS EQUI*C.C. Krewer¹, M.M. Costa², I. Schrank³, A.C. Vargas¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: agueda@ccr.ufsm.br

RESUMO

Rhodococcus equi é uma importante causa de broncopneumonia em potros com menos de seis meses de idade, sendo responsável pela mortalidade de eqüinos no mundo inteiro. É um microrganismo intracelular capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos. Apresenta três níveis de virulência de acordo com os diferentes antígenos expressos em sua superfície. Cepas virulentas apresentam um plasmídeo que codifica a proteína de superfície VapA e são isoladas principalmente de potros com pneumonia e de alguns pacientes humanos. Cepas com virulência intermediária expressam a proteína VapB e predominam em suínos e humanos com AIDS. Cepas avirulentas não expressam antígenos de superfície e são encontradas principalmente no ambiente e em pacientes humanos. Um dos fatores responsáveis pela ampla distribuição da enfermidade em potros é a imaturidade do sistema imunológico dos animais acometidos pela infecção, que pode se tornar endêmica em alguns criatórios. Em humanos, as formas de infecção são ainda desconhecidas, mas o contato com eqüinos é relatado em um terço dos casos. Devido à importância clínica da doença, são necessários métodos diagnósticos que promovam sua identificação precoce, facilitando e aumentando as chances de sucesso com o tratamento. Os métodos mais utilizados atualmente são o cultivo microbiológico, testes sorológicos para detecção de anticorpos séricos nos animais e técnicas de PCR que detectam a região 16S do rDNA e o fragmento do gene *vapA* do microrganismo.

PALAVRAS-CHAVE: *Rhodococcus equi*, pneumonia, potros, virulência.

ABSTRACT

RHODOCOCCUS EQUI: A REVIEW. *Rhodococcus equi* is an important cause of bronchopneumonia in 1- to 6-month-old foals, being responsible for 3% of horse death in many countries of the world. It is an intracellular microorganism able to survive and to multiply inside macrophages. Three virulence levels have been identified in *R. equi*, by the presence of virulence associated antigens on the bacteria surface. Virulent strains have a plasmid encoding VapA protein and are isolated from diseased foals and some human patients. Intermediate virulent strains show VapB protein and are commonly found in swine and HIV infected patients. Avirulent strains do not show virulence antigens and are found in the environment and humans. The immature immune system is the major cause of the susceptibility of foals to the *R. equi* pneumonia. In humans, the infection routes are still unknown, but contact with horses is related with one-third of human infections. Due the clinical importance of the disease, diagnostic methods for early identification in animals are necessary, increasing the chances for treatment. The more common diagnostic methods are microbiologic culture, serologic tests and PCR techniques for 16S rDNA and *vapA* detection.

KEY WORDS: *Rhodococcus equi*, pneumonia, foals, virulence.

As bactérias do gênero *Rhodococcus* são actinomicetos nocardioformes, membros da família *Mycolata*, que contém também gêneros como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia*. Existem aproximadamente 12 espécies separadas pela diver-

sidade de metabolismo, aplicação industrial ou potencial em biorremediação (PRESCOTT *et al.*, 2004). Duas delas são reconhecidas como patógenos: *Rhodococcus equi* em mamíferos e *Rhodococcus fascians* em plantas (BELL *et al.*, 1998).

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Colegiado de Zootecnia, Petrolina, PE, Brasil.

³Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS, Brasil.

A primeira descrição do gênero *Rhodococcus* ocorreu em 1891 (BELL *et al.*, 1998) e o primeiro relato de isolamento do *R. equi* foi feito em 1923, a partir de lesões em um potro infectado na Suécia. Nesta ocasião, a bactéria foi denominada *Corynebacterium equi* (TAKAI *et al.*, 1994b). Com os avanços nos métodos usados para classificar os actinomicetos nocardioformes, este microrganismo foi então reclassificado dentro do gênero *Rhodococcus* (cocos com pigmento vermelho).

R. equi é considerado um actinomiceto nocardioforme, devido ao seu crescimento em micélio com fragmentação de elementos cocóides ou cocobacilares (HOLT *et al.*, 1994) que, após coloração, mostram-se gram positivos, pleomórficos e capsulados (QUINN *et al.*, 2005). Em cultivo, apresenta-se como colônias mucóides branco-acizentadas que, quando incubadas por períodos prolongados, demonstram pigmento salmão. É considerado um microrganismo intracelular facultativo, pois provoca o desenvolvimento de lesões piogranulomatosas nos animais graças à sua habilidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos. Uma característica importante das espécies do gênero *Rhodococcus* é a presença do ácido micólico na parede celular, o qual está relacionado com a patogenicidade das cepas (MEIJER; PRESCOTT, 2004).

Trata-se de um importante patógeno de potros onde as manifestações clínicas mais comuns são: broncopneumonia, enterite e linfadenite. Com menor frequência podem ocorrer: diarreia, celulite, abscesso subcutâneo, artrite séptica e osteomielite, além de abscessos em várias partes do corpo (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Em suínos, o microrganismo é comumente isolado de linfonodos submandibulares provocando lesões semelhantes às da tuberculose (PRESCOTT, 1991). Em bovinos e caprinos, pode ocasionar lesões granulomatosas no fígado (SOEDARMANTO *et al.*, 1997). Nas demais espécies animais, a infecção é rara e geralmente decorrente de estados de imunossupressão (PRESCOTT, 1991). Nesta última década, *R. equi* tem sido descrito também em humanos como um importante agente de pneumonia, abscessos pulmonares e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, em especial os portadores de HIV (BYRNE *et al.*, 2001).

R. equi é amplamente distribuído pelo ambiente e tem sido isolado de uma grande variedade de fontes incluindo solos, pedras, fezes e intestino de animais doentes e sadios (BELL *et al.*, 1998). É um organismo predominantemente telúrico e apresenta requerimentos nutricionais simples, facilmente supridos pelas fezes dos animais, devido à sua riqueza em ácidos orgânicos voláteis (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Esta bactéria é aeróbica estrita, encontrada normalmente no trato gastrointestinal de eqüinos, onde se multiplica no intestino delgado. Essa multiplicação ocorre apenas

nas primeiras 12 semanas de vida do potro e não é observada em cavalos adultos (TAKAI, 1997), provavelmente devido ao desenvolvimento de um novo tipo de microbiota intestinal. Os eqüinos ingerem alimentos contaminados com *R. equi* durante o pastejo e, por isso, apresentam o microrganismo nas suas fezes que, quando liberadas, constituem-se numa grande fonte para multiplicação do agente (TAKAI *et al.*, 1991a). A característica coprofágica dos potros (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993) e a inalação do microrganismo (TAKAI *et al.*, 1994b) contribuem para a infecção dos animais. A temperatura ótima de desenvolvimento é de 30° C, embora apresente uma boa multiplicação a 37° C. Isso explica o motivo pelo qual a maior parte dos casos de infecção por *R. equi* ocorra no verão, época em que as condições climáticas favorecem a multiplicação do microrganismo e a dispersão de partículas de poeira, que beneficiam sua inalação (TAKAI, 1997; MEIJER; PRESCOTT, 2004).

A suscetibilidade dos potros para a infecção permanece ainda parcialmente explicada (COHEN *et al.*, 2005) e provavelmente está relacionada com a combinação de fatores que incluem: a) a quantidade de microrganismo inalada ou ingerida deve ser equivalente à dose infectiva, a qual parece ser bastante baixa para potros; b) a idade de maior suscetibilidade dos animais está entre 1 e 6 meses, época que coincide com o declínio dos anticorpos maternos adquiridos via colostro; c) o sistema imune do animal nessa idade encontra-se ainda imaturo, principalmente em nível de resposta celular (PRESCOTT, 1991; CHAFFIN *et al.*, 2003). Devido a esses fatores o *R. equi* é considerado um patógeno oportunista (TAKAI *et al.*, 1995a).

O microrganismo é responsável por cerca de 3% das mortes de potros no mundo (TAKAI *et al.*, 1994a), porém a distribuição da infecção é muito variável, desde endêmica em algumas fazendas, a esporádica ou não relatada em outras. Essa variação na ocorrência parece ser relacionada a fatores ambientais como umidade, temperatura e pH do solo, os quais contribuem para a multiplicação do microrganismo (MEIJER; PRESCOTT, 2004). As condições de manejo como o tamanho da fazenda, número de animais, tipo de material encontrado no piso das cocheiras e o transporte dos potros entre fazendas durante o primeiro mês de vida também estão envolvidos com a ocorrência da enfermidade (COHEN *et al.*, 2005). A virulência das cepas do microrganismo presentes no criatório, também é um fator importante para disseminação da infecção (PRESCOTT, 1991). Apesar dessas diferenças na distribuição da enfermidade, a maioria dos animais apresenta evidências imunológicas da infecção, sendo que os anticorpos estão presentes em níveis maiores nas fazendas endemicamente afetadas (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993).

A virulência do *R. equi* está relacionada com a capacidade do microrganismo em inibir a fusão fagolisossomal e se multiplicar no interior dos macrófagos, resistindo à eliminação pulmonar, hepática e esplênica pelo hospedeiro (KANALY *et al.*, 1993). Como candidatos a fatores de virulência do microrganismo, pode-se citar o ácido micólico da parede celular, cujo tamanho da cadeia de carbono pode estar diretamente relacionado à virulência, já que cepas contendo ácidos com longas cadeias são letais para camundongos (GOTOH *et al.*, 1991; MEIJER; PRESCOTT, 2004). Há ainda o “fator equi”, que inclui polissacarídeos capsulares, os quais poderiam inibir a fagocitose do microrganismo, e algumas exoenzimas (como a colesterol oxidase e a fosfolipase C), que destruiriam tecidos do hospedeiro por sua acentuada atividade membranolítica (MACHANG’U; PRESCOTT, 1991; LINDER; BERNHEIMER, 1997). Entretanto, existem dúvidas relacionadas ao papel desses constituintes na virulência do microrganismo, uma vez que podem estar presentes em isolados virulentos ou não (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993; TAKAI *et al.*, 1995a). Estudo recente mostrou que a colesterol oxidase não é importante para a virulência do *R. equi*, uma vez que cepas mutantes do microrganismo, com deleção do gene que codifica para a referida proteína, permaneceram virulentas para camundongos em potros infectados experimentalmente (PEI *et al.*, 2006). Como um terceiro candidato pode-se considerar a virulência associada a antígenos e plasmídeos, que permite a classificação das cepas de *R. equi* em 3 tipos (TAKAI *et al.*, 1991b). Isolados virulentos e de virulência intermediária são caracterizados pela presença de antígenos associados à virulência VapA (15 a 17kDa) e VapB (20kDa), respectivamente, cujos genes estão presentes em plasmídeos (RIBEIRO *et al.*, 2005). Cepas virulentas VapA positivas são amplamente distribuídas no ambiente equino e causam principalmente broncopneumonia em potros com menos de seis meses de idade (TAKAI *et al.*, 1993). Existem pelo menos 11 tipos de plasmídeos de virulência em isolados considerados VapA positivos, os quais apresentam tamanhos de 85 kb (tipos I-IV), 87 kb (tipos I e III) e 90 kb tipos (I-V) (RIBEIRO *et al.*, 2005). Cepas com virulência intermediária, consideradas VapB positivas, são encontradas especialmente em linfonodos submandibulares de suínos e em isolados de humanos imunossuprimidos (TAKAI *et al.*, 1996a). Existem pelo menos 16 tipos de plasmídeos distintos nesses isolados, os quais variam em tamanho de 79 a 100 kb (tipos 1-16). O terceiro nível de virulência corresponde às cepas avirulentas, que estão presentes principalmente no solo e não apresentam plasmídeo relacionado à virulência (RIBEIRO *et al.*, 2005). Recentemente, foram descritos dois novos tipos de plasmídeos em *R. equi*. Um deles está relacionado com a expressão da VapB, denominado “tipo 17”, pois mostrou padrão de

digestão enzimática (*EcoRI* e *EcoT22I*) diferente dos 16 tipos já determinados (MAKRAI *et al.*, 2005a). O segundo novo tipo de plasmídeo foi descrito em potros do Brasil e está relacionado com a expressão de VapA, denominado “87 kb tipo III” (RIBEIRO *et al.*, 2005).

A proteína VapA é, portanto, o principal antígeno de virulência codificado por plasmídeo relacionado com a infecção em eqüinos, sendo também a proteína melhor caracterizada até o momento. É codificada por uma família de genes presente em plasmídeos considerados de virulência que variam em tamanho de 85 a 90 kb (BYRNE *et al.*, 2001). VapA é uma proteína de superfície aparentemente ancorada por sua porção N-terminal ao envelope celular (TAN *et al.*, 1995). Sua expressão é termorregulada, ocorrendo entre 34 e 41°C e aumentando em condições de baixo pH (TAKAI *et al.*, 1994b). Esse fato pode estar relacionado às condições adversas de sobrevivência do microrganismo no interior do macrófago, onde precisa se defender dos ROI e RNI (intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio), e da acidificação, entre outros fatores. Sendo assim, muitas bactérias intracelulares aumentam a expressão de genes de virulência em pH ácido. Foi recentemente comprovado que o mesmo acontece com o plasmídeo de virulência do *R. equi*, já que algumas proteínas codificadas por genes plasmidiais (VapA e D) aumentam sua expressão em condições adversas de pH (BENOIT *et al.*, 2001).

Dois plasmídeos de virulência contendo o gene *vapA* de isolados de potros foram seqüenciados (TAKAI *et al.*, 2000a). A análise dos dados obtidos forneceu 69 seqüências abertas de leitura (ORFs) nesses plasmídeos. Quando comparadas com seqüências de genes conhecidos em outros microrganismos, três regiões funcionais do plasmídeo foram identificadas. Duas dessas contêm genes similares aos codificadores de proteínas envolvidas em conjugação e replicação plasmidial, estabilidade e segregação. As ORFs 34, 38, 39 e 40 são análogas as seqüências encontradas em um plasmídeo de *Micrococcus* sp. e estão organizadas de maneira semelhante, sugerindo uma origem comum. A identificação de genes similares àqueles adquiridos por conjugação sugere que o plasmídeo pode mover-se entre as cepas virulentas e avirulentas. Embora isso não tenha sido bem demonstrado, é muito provável que esse fato esteja relacionado com o mecanismo pelo qual o plasmídeo se propague em uma população de cepas avirulentas. A terceira região de 27.5 kb apresenta características típicas de uma ilha de patogenicidade: tem conteúdo G+C mais baixo que o restante do plasmídeo, e é flanqueada por genes similares a resolvases de transposons. Esta região contém pelo menos 25 ORFs incluindo a presença de 7 membros da família de genes *vap* (*vapA*, C, D, E, F, G, e H), com exceção do *vapF*, os demais codificam proteínas (TAKAI *et al.*, 2000a). Diferentemente da

proteína VapA, que fica ancorada na parede celular, as demais são secretadas da célula para o ambiente (BYRNE *et al.*, 2001). Estudo recente sugeriu a presença do gene *vapI* como um novo membro da ilha de patogenicidade. Excetuando-se os genes da família *vap*, foi verificado que as outras ORFs da ilha de patogenicidade não apresentaram similaridade com genes de função conhecida de outros microrganismos (TAKAI *et al.*, 2000a). Além dos genes da família *vap*, foram observados mais quatro que potencialmente codificam proteínas, aumentando o número para 10 proteínas secretadas, as quais parecem ser importantes para a virulência, uma vez que podem interagir com o hospedeiro (TAKAI *et al.*, 2000a; MEIJER; PRESCOTT, 2004).

Entretanto, existem relatos de amostras desprovidas de plasmídeo de virulência ocasionando doenças no homem e animais, especialmente bovinos e caprinos (CANTOR *et al.*, 1998). Dados de infecções experimentais revelam que os isolados clínicos são mais patogênicos que os ambientais (COSTA *et al.*, 2006). Todas as cepas que apresentam a proteína VapA são virulentas para camundongos, sugerindo seu importante papel na patogênese da infecção por *R. equi* e sua utilidade como marcador epidemiológico da virulência bacteriana (COSTA *et al.*, 2006; MAKRAI *et al.*, 2002). A perda do plasmídeo coincide com a diminuição da patogenicidade do *R. equi* para camundongos e eqüinos (TAKAI *et al.*, 1995c). Segundo PRESCOTT (1991), existe um mecanismo molecular capaz de atenuar a virulência de isolados do *R. equi*, já que o antígeno proteico, com 15-17 kDa da cepa isolada de um caso clínico fatal em 1923, foi perdido depois de repetidas passagens "in vitro", tornando a cepa avirulenta para camundongos. Cepas sem plasmídeo também perdem a capacidade de sobreviver e replicar no interior de macrófagos, mostrando queda drástica na letalidade para camundongos (TAKAI *et al.*, 1991b). A perda do plasmídeo foi relatada também a 42° C por CHIRINO-TREJO *et al.*, (1987).

Apesar da descoberta que a virulência do *R. equi* para os eqüinos depende de um plasmídeo, o subsequente seqüenciamento do mesmo não ofereceu muitas informações novas em relação ao conhecimento dos mecanismos de virulência do microrganismo. Um dos motivos seria a ausência de similaridade das proteínas codificadas dentro da ilha de patogenicidade com proteínas de outros organismos, sugerindo que o *R. equi* emprega um novo mecanismo de virulência que não se assemelha ao de nenhum microrganismo já descrito (MEIJER; PRESCOTT, 2004).

Existem três formas clínicas principais de infecção por *R. equi* em potros: pneumonia aguda, pneumonia crônica, acompanhada de abscessos piogranulosos e a forma intestinal, associada a linfadenite mesentérica (TAKAI *et al.*, 1995a). A suscetibilidade dos

potros ao *R. equi*, parece estar relacionada com a imaturidade do sistema imunológico, tanto humoral, como celular (MARTENS *et al.*, 1991; HONDALUS, 1997). A exposição a um grande número de bactérias virulentas durante o período em que decrescem os níveis de anticorpos maternos no potro (idade de quatro a seis semanas) é o principal fator predisponente à infecção (TAKAI *et al.*, 1995a). Estudos "in vitro" demonstraram que cepas virulentas quando fagocitadas replicam rapidamente no interior dos macrófagos e inibem a fusão fago-lisossomal, desta maneira escapando da morte intracelular (HONDALUS; MOSSER, 1994). Além disso, podem também provocar uma degranulação inespecífica dos lisossomos (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993).

Os sinais clínicos da doença aguda, associada com abscessos pulmonares múltiplos e maciços, são: febre (acima de 41° C), tosse, muitas vezes com descarga nasal bilateral, depressão e taquipnéia. Entretanto, a severidade da pneumonia nem sempre está correlacionada com os achados na auscultação, principalmente porque os potros desenvolvem uma habilidade de compensar a perda funcional progressiva do pulmão, fato que também dificulta o diagnóstico precoce (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993). Com o desenvolvimento dos abscessos pulmonares, os potros mostram um aumento progressivo na frequência respiratória, a qual passa a ser realizada com dificuldade. A doença crônica progride em animais não tratados, até a morte por insuficiência respiratória, devido à necrose e destruição do parênquima pulmonar (GASKIN *et al.*, 1990). Potros com a forma crônica da doença podem desenvolver severa diarreia como resultado da invasão da mucosa do cólon pelo microrganismo. As alterações intestinais, freqüentemente, seguem a infecção pulmonar, devido à deglutição de secreções pulmonares contaminadas (TAKAI, 1997). Raramente ocorre enterocolite sem envolvimento pulmonar (HONDALUS, 1997). Quando outros sítios, que não o pulmonar e intestinal, são afetados pela infecção, geralmente ocorre disseminação por via hematogena (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993).

Em animais adultos a infecção é rara, pois os anticorpos adquiridos na primeira fase da vida são protetores e, principalmente, porque o animal tem exposições repetidas ao agente no ambiente durante a vida adulta (HINES *et al.*, 2001). Entretanto, a infecção já foi relatada nesses animais apresentando evolução e sinais clínicos semelhantes aos que ocorrem em potros, com envolvimento dos pulmões, intestino e linfonodos (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993). Esses casos geralmente são associados com imunossupressão ou condições severas de estresse (VENGUST *et al.*, 2002).

Na última década, o *R. equi* tem se destacado como um patógeno emergente em humanos. O primeiro caso foi relatado por GOLUB *et al.* (1967), onde o micror-

ganismo foi isolado de um abscesso pulmonar em paciente imunocomprometido. A maioria das infecções humanas (cerca de 85%) tem sido relacionada com imunocomprometimento sendo que um substancial aumento no número de casos ocorreu desde 1981 com o advento da AIDS (VERVILLE *et al.*, 1994). Pacientes transplantados e em tratamento quimioterápico contra o câncer também são alvos da infecção por *R. equi* (RIBEIRO *et al.*, 2005), pois drogas imunossupressivas suprimem a produção de interferon gama (IFN γ) pelos linfócitos T CD4⁺, prejudicando o funcionamento normal do sistema imune (PRESCOTT, 1991). Nos pacientes imunocompetentes, sugere-se que a infecção possa estar relacionada com algum agente primário, como parasitas ou outras bactérias, assim como ocorre nos eqüinos (NAPOLEÃO *et al.*, 2005).

O aumento da prevalência deste microrganismo como um patógeno humano e sua detecção por diagnóstico laboratorial induziram o aparecimento de vários relatos envolvendo tanto pacientes imunocomprometidos, como imunocompetentes (MIZUNO *et al.*, 2005). A taxa de mortalidade em infecções causadas pelo *R. equi* está em torno de 11% para pacientes imunocompetentes e 20 a 55% para pacientes imunocomprometidos. Esses altos valores estão geralmente relacionados ao uso de terapia inadequada no início do tratamento, quando o diagnóstico laboratorial ainda não foi realizado (KEDLAYA *et al.*, 2001).

Em pacientes humanos, o microrganismo tem sido isolado em sangue, escarro, pulmão, lavado brônquico, fluido pleural, linfonodos, cérebro, fluido peritonial, humor vítreo, fluido de abscesso e cateteres intravenosos (VERVILLE *et al.*, 1994). A infecção pulmonar em pacientes imunossuprimidos é a forma mais comum de ocorrência da enfermidade. O mecanismo de contaminação para o homem ainda é desconhecido, apesar do contato com o ambiente eqüino e suas fezes ser relatado em um terço das infecções nesses pacientes (TAKAI *et al.*, 1995b). Sabe-se, ainda, que a exposição ao solo contaminado com fezes de herbívoros é a principal fonte do microrganismo tanto para o homem como para os animais (PRESCOTT, 1991; TAKAI *et al.*, 1994a). Pessoas expostas a eqüinos, fazendas e jardins têm um alto risco de contrair a infecção (VERVILLE *et al.*, 1994). A presença de indivíduos portadores de *R. equi* entre funcionários de um haras do Rio Grande do Sul, onde a doença é endêmica, já foi comprovada (COSTA *et al.*, 1999).

Em humanos, a presença de cepas contendo o plasmídeo de virulência não parece ser essencial para o desenvolvimento da infecção. TAKAI *et al.* (1994a), encontraram muitos isolados de indivíduos que não continham o plasmídeo de virulência e que não eram virulentos para camundongos. VULLO *et al.* (1996) demonstraram que humanos infectados com *R. equi* não produzem anticorpos contra os antígenos de 15

a 17 kDa e sim contra uma proteína de 60 kDa. Todas essas evidências sugerem um mecanismo diferente de infecção por *R. equi* em humanos e eqüinos. A virulência dos isolados humanos sem plasmídeo também pode estar associada com a resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Comparados com os isolados suscetíveis, os isolados β -lactâmicos resistentes apresentam "apêndices" na superfície celular, aparentemente similares às caudas de bacteriófagos. A presença de vírus nestes isolados pode ser correlacionada com as partículas semelhantes a bacteriófagos que foram encontradas no sobrenadante da cultura de isolados que produzem esses "apêndices" (NORDMANN *et al.*, 1994).

A maioria das cepas isoladas de pacientes humanos com AIDS é virulenta ou de virulência intermediária, apresentando plasmídeo de 90 kb tipo 5, enquanto que as cepas isoladas de pacientes com outros tipos de imunossupressão (pacientes oncológicos ou transplantados, principalmente) são avirulentas. Como grande parte dos isolados de linfonodos de suínos apresentam a mesma classificação e tipo de plasmídeo, sugere-se uma relação epidemiológica entre infecções humanas por *R. equi* e a presença do patógeno em suínos (MAKRAI *et al.*, 2005a).

Estudos recentes têm mostrado o isolamento do microrganismo em gatos e cães, onde ocasiona basicamente lesões piogranulomatosas nas extremidades (TAKAI *et al.*, 2003). É interessante que a prevalência de *R. equi* virulentos em gatos e cães é muito semelhante à encontrada em pacientes com e sem AIDS, respectivamente. O vírus da imunodeficiência felina (FIV) é amplamente distribuído na população de gatos de todo o mundo. Nesses animais, assim como em pacientes com AIDS, a maioria dos isolados de *R. equi* é do tipo virulento. Já em cães, a maioria dos isolados é do tipo avirulento, assim como ocorre nos pacientes humanos sem AIDS. Dessa maneira é possível que existam fortes ligações epidemiológicas entre a infecção de humanos e cães e gatos, onde esses animais podem ser uma possível fonte de infecção para os seus donos (TAKAI *et al.*, 2002; TAKAI *et al.*, 2003).

A imunidade dos potros contra a pneumonia por *R. equi* depende tanto de fatores humorais como celulares, porém o papel exato de cada um deles ainda não foi determinado (PRESCOTT *et al.*, 2004). Os primeiros estudos mostraram um baixo nível de anticorpos detectáveis no soro após a infecção por *R. equi* (SHALKA, 1987). Esse fato foi relacionado à hipótese de a resposta imune ser basicamente celular. Entretanto, com o desenvolvimento de técnicas para detecção de anticorpos como o ELISA, verificou-se a presença dessas imunoglobulinas em concentrações consideráveis no soro dos potros estudados (PRESCOTT, 1991).

A idade de desenvolvimento da pneumonia por *R. equi* coincide e pode estar relacionada com o declínio de anticorpos maternos que ocorre, aproximadamente,

entre a quinta e a décima semanas de vida do potro (GIGUÈRE *et al.*, 2003). Uma evidência do papel dos anticorpos na proteção contra *R. equi* seria a correlação entre a utilização do plasma hiperimune, freqüentemente usado em fazendas onde a doença é endêmica, com a redução tanto da morbidade como da mortalidade dos potros. Tal fato pode estar relacionado com a capacidade dos anticorpos de bloquear os estágios iniciais da infecção, alterando a rota pela qual a bactéria entra no macrófago, ou aumentando a fusão fago-lisossomal. (HINES *et al.*, 1997; CAUCHARD *et al.*, 2004). HOOPER-MCGREY *et al.* (2001) mostraram que anticorpos purificados contra as proteínas VapA e VapC conferiram proteção aos potros contra infecções experimentais, de maneira semelhante à obtida com plasma hiperimune. No entanto, potros nascidos de éguas vacinadas não estão protegidos contra a infecção através da transferência passiva de anticorpos. Esta falha pode estar relacionada ao isotipo de anticorpo produzido nas éguas vacinadas, mas esses dados ainda não foram investigados (MARTENS *et al.*, 1991; VARGA *et al.*, 1997). É possível também que os anticorpos colostrais declinem a níveis não protetores na época de maior exposição dos potros ao *R. equi* ou que o efeito protetor do plasma se deva a outros componentes (fibronectina, complemento e citocinas) que não anticorpos (GIGUÈRE, PRESCOTT, 1997). Esta hipótese é reforçada por pesquisa que comprovou que potros infectados experimentalmente, não apresentaram diferença significativa quanto à sobrevivência quando tratados com plasma normal ou hiperimune (PERKINS *et al.*, 2002). Há lacunas importantes no conhecimento do papel exato dos anticorpos contra a infecção por *R. equi*. Pouco se sabe sobre a relevância dos isotipos de imunoglobulina envolvidos e a sua especificidade contra a bactéria (HINES *et al.*, 1997). Sugere-se, entretanto, que os anticorpos estejam envolvidos apenas nos estágios iniciais da infecção, pois, uma vez que o microrganismo tem localização intracelular, torna-se inacessível dentro dos macrófagos, reforçando a importância da resposta imune celular (HAGUIGUI; PRESCOTT, 2005; PRESCOTT *et al.*, 2004).

A maior parte do conhecimento atual sobre a resposta imune celular contra o *R. equi* é adquirida de modelos em camundongos. Linhagens de camundongos deficientes em linfócitos T e linfócitos B são incapazes de eliminar o *R. equi* e desenvolvem lesões pulmonares (YAGER *et al.*, 1991). Os dois principais mecanismos pelos quais os linfócitos T eliminam a bactéria são a toxicidade direta das células infectadas (MHC classe I, restrito a LT CD8⁺) e a secreção de citocinas (relacionada principalmente a LT CD4⁺) (HINES *et al.*, 1997). Os LT CD4⁺ podem ser divididos em 2 tipos: Th1 e Th2, com base nas diferentes citocinas que produzem (MOSMANN; SAD, 1996). Os Th1 têm

capacidade de produzir IFN γ e IL-2, enquanto os Th2 produzem IL-4, IL-5 e IL-10. Em camundongos e humanos, muitos agentes infecciosos produzem respostas preferencialmente dos tipos Th1 ou Th2 (HINES *et al.*, 1997). O balanço relativo entre os dois tipos de resposta, que se auto-regulam por inibição recíproca, determinam a habilidade do hospedeiro em controlar o número de patógenos intracelulares (YAMAMURA *et al.*, 1991). Os microrganismos que sobrevivem e se replicam dentro dos macrófagos mostram sua habilidade para escapar dos efeitos microbicidas. IFN γ é o maior ativador de macrófagos, sendo capaz de superregular algumas rotas microbicidas como a produção de ROI e RNI e o estímulo da fusão fago-lisossomal (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Esses mecanismos são aumentados por ação de outras citocinas como IL-2 e TNF, mas diminuídos por IL-10. Existem evidências de que a ativação dos macrófagos mediada por linfócitos pode estar envolvida com a eliminação do *R. equi* (HINES *et al.*, 1997; PATTON *et al.*, 2005). Camundongos imunocompetentes, infectados experimentalmente com *R. equi*, desenvolvem uma resposta imune do tipo 1 (Th1) e progressivamente eliminam a infecção. Da mesma forma, os animais que recebem anticorpos contra IL-4 eliminam a infecção e mostram aumento nos níveis de IFN γ . Entretanto, os camundongos, nos quais a resposta tipo 2 (Th2) é induzida pela administração de anticorpos mono-clonais contra IFN γ , falham em eliminar a infecção e desenvolvem granulomas. Esses estudos mostram que uma resposta tipo 1 é protetora e que uma resposta não protetora tipo 2 está envolvida com a patogênese da doença (KANALY *et al.*, 1996).

Aparentemente, a infecção por cepas de *R. equi* virulentas em potros pode resultar em um efeito imunomodulatório que dirige a resposta por um caminho Th2 ineficiente e não conduz uma resposta efetiva. GIGUÈRE *et al.* (1999) comprovaram que potros experimentalmente infectados com cepas de *R. equi* virulentas mostram marcada redução na produção de IFN γ por linfócitos T CD4⁺, quando comparados com linfócitos isolados de animais inoculados com cepas avirulentas. A eliminação de cepas de *R. equi* virulentas dos pulmões de cavalos adultos experimentalmente infectados foi associada com o aumento do número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ produtores de IFN γ . Esta diferença entre a resposta imune de adultos e potros não imunes pode estar relacionada com fatores exclusivos do sistema imune dos potros ou com diferenças entre animais imunes e não imunes (HINES *et al.*, 2003). Além disso, HOOPER-MCGREY *et al.* (2005) observaram uma resposta imune dominante IgGb e IgGt contra a proteína VapA no soro de potros doentes, quando comparados a potros e cavalos adultos saudáveis e imunes, os quais desenvolvem resposta imune IgGa.

Contudo, não se sabe até o momento quais fatores determinam a direção para uma resposta Th1 ou Th2, porém os genes do plasmídeo de virulência desempenham um papel significativo nesse sentido (HOOPER-McGREVY *et al.*, 2005). O número de bactérias inaladas ou ingeridas também é importante. Por exemplo, a BCG usada para imunizar camundongos em baixas doses determina uma resposta quase exclusivamente mediada por células, Th1 e em altas doses determina uma mistura de respostas Th1 e Th2 (POWER *et al.*, 1998). Um efeito similar pode ocorrer em *R. equi*. A presença e provavelmente o isotipo de anticorpo recebido da mãe também são significativos. Outros fatores que predispoem potros a uma resposta Th2 podem ser também importantes. Diversos autores têm sugerido que o herpesvírus equino tipo 2 (EHV-2) predispoem a pneumonia por *R. equi*, pois a imunização contra o EHV-2 parece controlar a pneumonia por *R. equi* (NORDEGRHAN *et al.*, 1996).

A lenta disseminação da infecção pulmonar, aliada à habilidade dos potros de compensar discretamente a progressiva perda da função pulmonar, torna o diagnóstico clínico precoce difícil. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial da enfermidade assume uma grande importância, tornando-se algumas vezes indispensável. A avaliação hematológica dos potros acometidos pela infecção demonstra leucocitose com neutrofilia e monocitose. O aumento nos níveis de fibrinogênio (> 3,0 g/L) é altamente sugestivo de infecção por *R. equi* em potros jovens (dois a quatro meses), contudo, níveis normais podem ser encontrados no curso da infecção (VARGAS, 2007). Um estudo recente comparou a quantidade de leucócitos de potros com duas e quatro semanas de vida e que posteriormente seriam ou não afetados pelo *R. equi*. Nesse sentido, foi comprovado que os potros que desenvolveram pneumonia apresentavam, com quatro semanas de vida, quantidade de neutrófilos significativamente menor do que os potros não afetados. Com duas semanas de vida, potros posteriormente pneumônicos apresentavam relação LT CD4⁺:CD8⁺ menor que os não pneumônicos. Esses dados podem inferir sobre um novo mecanismo na patogenicidade, principalmente porque foi comprovado recentemente que os linfócitos desempenham um importante papel na defesa contra patógenos intracelulares. Com base nessas informações, sugere-se que os clínicos devem ter cuidado ao utilizar a neutrofilia como marcador de infecção por *R. equi*, pelo menos no primeiro mês de vida (CHAFFIN *et al.*, 2004).

Como os parâmetros hematológicos observados nos animais são algumas vezes variáveis ou de difícil interpretação, o diagnóstico definitivo deve ser feito através de cultura bacteriológica combinada com o exame citológico do exsudato traqueobronquial. A presença de cocobacilos pleomórficos gram positivos

nessas amostras é sugestivo de infecção por *R. equi* (VARGAS, 2007). A cultura em ágar sangue ovino mostra crescimento de colônias lisas, mucóides e não hemolíticas (QUINN *et al.*, 2005), embora o isolamento de colônias hemolíticas já tenha sido relatado (PATE *et al.*, 2004). Após períodos prolongados de incubação as colônias mostram pigmento salmão. O teste CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen Test) é uma das provas diferenciais para a identificação do microrganismo, no entanto a identificação definitiva é realizada através de provas bioquímicas, onde o patógeno mostra-se incapaz de fermentar açúcares como glicose, maltose e sacarose, porém demonstra capacidade de reduzir nitrato a nitrito e produzir urease (QUINN *et al.*, 2005). Existem ainda meios de cultivo que promovem o isolamento do *R. equi* a partir de materiais contaminados como fezes ou solo. Dentre eles, os principais são o meio seletivo NANAT (“nalidixic acid novobiocin actidione-cycloheximide potassium telurite”) (WOLCOOK *et al.*, 1979) e os recentemente descritos CAZ-NB (agar ceftazidima-novobiocina) e TCP (*trimethoprim, cefoperazone, polymyxin B*), ambos contendo antimicrobianos que inibem contaminantes e favorecem a seleção do *R. equi* (MAKRAI *et al.*, 2005b).

Para o diagnóstico sorológico têm sido utilizados os testes de imunodifusão em gel de ágar, inibição da hemólise sinérgica, imunodifusão radial e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Os três primeiros testes detectam o “fator equi” de *R. equi* e parecem ser úteis ao diagnóstico nos estágios tardios da infecção (TAKAI *et al.*, 1996b). Entretanto, um teste sorológico que diferencie claramente potros com pneumonia em desenvolvimento dos clinicamente saudáveis facilitaria muito o diagnóstico nas fazendas, pois o reconhecimento precoce da enfermidade reduz os custos com a terapia (GIGUÈRE *et al.*, 2003). O teste ELISA seria uma alternativa para esse problema, entretanto tem sido muito difícil, na prática, aliar sensibilidade e especificidade dos anticorpos contra *R. equi* utilizando essa metodologia. Pode ser, entretanto, um teste útil para diagnosticar a enfermidade em propriedades onde o *R. equi* não é endêmico (PHUMMONA *et al.*, 2005). O teste ELISA-VapA, que detecta anticorpos contra a proteína de virulência VapA, tem pouco valor diagnóstico, pois muitos potros saudáveis têm anticorpos contra cepas virulentas, porém pode ser utilizado na diferenciação de animais expostos a cepas virulentas e avirulentas. Dessa maneira, os 5 testes sorológicos disponíveis para detecção de pneumonia por *R. equi* em equinos não permitem diferenciar potros doentes dos sadios (MARTENS *et al.*, 2002; GIGUÈRE *et al.*, 2003). O fracasso desses testes como métodos diagnósticos pode estar relacionado a fatores como: a) potros com infecção subclínica podem desenvolver anticorpos e serem positivos nesses testes; b) potros em estágios precoces da infecção podem

não ter desenvolvido anticorpos e c) a grande exposição dos potros ao *R. equi* leva ao desenvolvimento de anticorpos sem necessariamente produzir doença clínica (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Portanto, até o momento, a utilidade dos testes sorológicos está na capacidade de monitorar a exposição da criação e não no diagnóstico de casos clínicos individuais (GIGUÈRE *et al.*, 2003).

Um grande avanço para o diagnóstico laboratorial da pneumonia por *R. equi* foi o desenvolvimento da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) que detecta a presença do microrganismo em lavados bronquiais de potros (BELLON *et al.*, 1997). Esta metodologia apresenta rapidez, sensibilidade e especificidade, facilitando o tratamento precoce da infecção. A grande vantagem da técnica de PCR é o reconhecimento do gene 16S do rDNA que é específico e, portanto, identifica as cepas de *R. equi* independente da presença ou não do plasmídeo contendo o gene *vapA* (BELL *et al.*, 1996). Para identificação de cepas virulentas foi desenvolvida uma técnica de PCR que amplifica seqüências de genes específicos do plasmídeo de virulência *vapA* e que, portanto, pode ser amplamente utilizada para diagnóstico precoce da infecção (TAKAI *et al.*, 1995c). Quando comparada com outros testes diagnósticos como análise de plasmídeo, padrão de proteínas e patogenicidade para camundongos, a técnica de PCR apresenta vantagens na diferenciação de isolados virulentos e avirulentos para eqüinos. Além disso, pode ser utilizada em estudos epidemiológicos (TAKAI *et al.*, 1997). Recentemente foi desenvolvida a técnica de PCR multiplex que permite identificar cepas de *R. equi* e simultaneamente avaliar a presença de genes *vapA* relacionados à virulência, diminuindo o tempo necessário para o diagnóstico (HALBERT *et al.*, 2005).

Cepas de *R. equi vapB* positivas não são patogênicas para potros. Quando desafiados com essas cepas os animais rapidamente eliminam o microrganismo sem o desenvolvimento de sinais clínicos (TAKAI *et al.*, 2000b). Por outro lado, humanos e suínos são infectados preferencialmente por *R. equi vapB* positivos, o que sugere que deve haver uma especificidade de hospedeiro mediada pelo plasmídeo. (TAKAI *et al.*, 1995b; TAKAI *et al.*, 2000b). Com base nesses dados, foram desenvolvidas técnicas de PCR que permitem identificar o tipo de plasmídeo presente no isolado (*vapA* ou *vapB* positivo), as quais podem auxiliar no diagnóstico ou em estudos epidemiológicos sobre a distribuição do microrganismo (OLDFIELD *et al.*, 2004). Recentemente foi desenvolvida uma técnica de PCR "real time" para detecção e quantificação de isolados de *R. equi* virulentos, baseada na identificação do gene *vapA*. A metodologia pode ser realizada a partir de fluido traqueo bronquial e constitui-se em um método rápido para detecção e quantificação de cepas viru-

lentas do microrganismo com eficiência comparável ao método padrão de quantificação pela cultura. A PCR em tempo real é particularmente útil para acompanhamento da eficiência da terapia antimicrobiana (HARRINGTON *et al.*, 2005).

O método de PCR e a cultura para *R. equi* são considerados "provas ouro" para o diagnóstico, mas resultados positivos não significam necessariamente doença clínica, pois o animal pode estar apenas em um estado de portador. Para diagnóstico definitivo, devem ser sempre aliadas à análise dos sinais clínicos dos animais (GIGUÈRE *et al.*, 2003).

O reconhecimento precoce da pneumonia, com isolamento e tratamento dos potros infectados, reduz as perdas e previne a disseminação de organismos virulentos. O *R. equi* é sensível a uma variedade de agentes antimicrobianos "in vitro", contudo, sua natureza intracelular torna a resposta ineficiente "in vivo" para a maioria destas drogas. A combinação da eritromicina e rifampicina tem se mostrado útil no tratamento da pneumonia por *R. equi* em potros, embora já existam relatos de resistência do microrganismo a estas drogas (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Nesses casos a azitromicina e a claritromicina têm sido utilizadas com sucesso (JACKS *et al.*, 2001; JACKS *et al.*, 2002). Novas estratégias antimicrobianas, baseadas na modificação da captação e utilização do íon ferro pelos microrganismos, têm sido descritas recentemente. Nesse sentido, foi comprovado que o Gálio é capaz de inibir o crescimento do *R. equi* e outras bactérias intracelulares (HARRINGTON *et al.*, 2006).

A administração de plasma hiperimune, por via intravenosa, aos potros no primeiro mês de vida, bem como a utilização profilática da eritromicina e rifampicina em intervalos periódicos podem reduzir significativamente a ocorrência de pneumonia por *R. equi* (FERNANDEZ *et al.*, 1997). A vacinação dos potros vem sendo estudada ao longo dos anos com resultados controversos, pois a imunidade mediada por células parece ser importante na prevenção ou eliminação da infecção por *R. equi*. Por outro lado, vacinas que promovam a imunidade de mucosas (IgA) têm se mostrado bastante eficientes. A vacinação com peptídeos presentes no antígeno *VapA* induziram a produção de uma forte resposta de mucosas no trato respiratório de animais vacinados (TAOUJI *et al.*, 2002). Estudos recentes têm demonstrado que a vacinação de camundongos utilizando DNA contendo o gene *vapA* estimula a resposta de camundongos contra a infecção por *R. equi* através da produção de anticorpos IgG, os quais convergem para uma resposta tipo 1. Os níveis de anticorpos podem aumentar com a inclusão do gene que codifica para IL-12 na preparação. Essa vacina promoveu um aumento na relação IgG2a:IgG1 que são indicadores de resposta imune tipo 1 e 2, respectivamente (HAGUIGUI; PRESCOTT, 2005).

Outras medidas de controle incluem a redução das partículas de poeira no meio ambiente dos potros, por meio do aguçamento de passeios, remoção e compostagem de fezes, isolamento de potros que retornaram de criações onde a doença é endêmica e exame cuidadoso e regular de potros anoréxicos, febris ou com tosse, para evidenciar doença respiratória (PRESCOTT; HOFFMAN, 1993).

Nesta última década importantes avanços foram obtidos para o entendimento dos mecanismos utilizados pelo *R. equi* para proliferar no hospedeiro. Atualmente as pesquisas tem se concentrado na identificação das bases moleculares empregadas pelo *R. equi* na subversão da resposta imune de potros, bem como a forma de desenvolver uma vacina eficaz.

REFERÊNCIAS

- BELL, K.S.; PHILIP, J.C.; CHRISTOFI, N.; AW, D.W.J. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, v.23, p.72-74, 1996.
- BELL, K.S.; PHILIP, J.C.; AW, D.W.; CHRISTOFI, N. The genus *Rhodococcus*. *Journal of Applied Microbiology*, v.85, n.2, p.195-210, 1998.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFRAY, Y.; HARTKE A. Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *R. equi* during acid tolerance response. *Research in Microbiology*, v.152, p.439-449, 2001.
- BYRNE, B.A.; PRESCOTT, J.F.; PALMER, G.H.; TAKAI, S.; NICHOLSON, V.M.; ALPERIN, D.C.; HINES S.A. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infection and Immunity*, v.69, n.2, p.650-656, 2001.
- CANTOR, C.H.; BYRNE, B.A.; HINES, S.A.; RICHARDS, H.M. Vap-A negative *Rhodococcus equi* in a dog with necrotizing pyogranulomatous hepatitis, osteomyelitis, and myositis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.10, p.297-300, 1998.
- CAUCHARD, J.; SEVIN, C.; BALLEST, J.-J.; TAOUJI, S. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary Microbiology*, v.104, p.73-81, 2004.
- CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D.; MARTENS, R.J.; EDWARDS, R.F.; NEVILL, M. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.223, n.12, p.1797-1799, 2003.
- CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D.; MARTENS, R.J.; EDWARDS, R.F.; NEVILL, M.; SMITH I. R. Hematologic and immunophenotypic factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals at equine breeding farms with endemic infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.100, p.33-48, 2004.
- CHIRINO-TREJO, J.M.; PRESCOTT, J.F. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Whole-cell Preparations of *Rhodococcus equi*. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.51, p.297-300, 1987.
- COHEN, N.D.; O'CONNOR, M.S.; CHAFFIN, M.K.; MARTENS, R.J. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.226, n.3, p.404-413, 2005.
- COSTA, M.M.; KREWER, C.C.; NAPOLEÃO, F.C.; GRAÇA, D.L.; GUARALGI, A.L.M.; VARGAS, A.C. Pesquisa de portadores de *Rhodococcus equi* entre trabalhadores rurais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20., 1999, Salvador, BA. *Anais*. Salvador: 1999.
- COSTA, M.M.; MACHADO, A.A.; KREWER, C.C.; ILHA, M.R.S.; GRAÇA, D.L.; GUARALDI, A.L.M.; VARGAS, A.C. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* in mice, isolated from environment, human and horse clinical samples. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.26, n.3, p.167-170, 2006.
- FERNANDEZ, A.S.; PRESCOTT, J.F.; NICHOLSON, V.M. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA)-enriched antigens. *Veterinary Microbiology*, v.56, n. 3/4, p.187-192, 1997.
- GASKIN, J.M.; BREWER, B.; KOTERBA, A. Diagnostic significance or serological responses to *Rhodococcus equi* in horses. In: ACVIM FORUM, 8., 1990, Washington. *Proceedings*. Washington: University of Florida, 1990. p.579-584.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, v.56, n.3/4, p.313-334, 1997.
- GIGUÈRE, S.; WILKIE, B.N.; PRESCOTT, J.F. Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, v.67, n.10, p.5041-5047, 1999.
- GIGUÈRE, S.; HERNANDEZ, J.; GASKIN, S.; MILLER C.; BOWNMAN J.L. Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Clinical Diagnosis and Laboratory Immunology*, v.10, n.2, p.241-245, 2003.

- GOLUB, B.; FALK, G.; SPRINK, W.W. Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of first human infection. *Annual Internal Medicine*, v.66, n.6, p.1176-1176, 1967.
- GOTOH, K.; MITSUYAMA, M.; IMAISUMI, S.; KAWAMURA, I.; YANO, I. Mycolic acid-containing glycolipid as a possible virulence factor of *Rhodococcus equi* for mice. *Microbiology and Immunology*, v.35, n.3, p.175-185, 1991.
- HAGHIGHI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Assessment in mice of VapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.104, p.215-225, 2005.
- HALBERT, N.D.; REITZEL, R.A.; MARTENS, R.J.; COHEN, N.D. Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the vapA gene. *American Journal of Veterinary Research*, v.66, p.1380-1385, 2005.
- HARRINGTON, J.R.; GOLDING, M.C.; MARTENS, R.J.; HALBERT, N.D.; COHEN, M.D. Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*. *American Journal of Veterinary Research*, v.66, n.5, p.755-761, 2005. Erratum in: *American Journal of Veterinary Research*, v.66, n.7, p.1139, 2005.
- HARRINGTON, J.R.; MARTENS, R.J. COHEN, N.D.; BERNSTEIN, L.R. Antimicrobial activity of gallium against virulent *Rhodococcus equi* in vitro and in vivo. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapy*, v.29, n.2, p.121-127, 2006.
- HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.56, p.177-185, 1997.
- HINES, M.T.; PAASCH, K.M.; ALPERIN, D.C.; PALMER, G.H.; WESTHOFF, NC.; HINES, S.A. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.79, p.101-113, 2001.
- HINES, S.S.; STONE, D.M.; HINES, M.T.; ALPERIN, D.C.; KNOWLES, D.P.; NORTON, L.K.; HAMILTON, M.J.; DAVIS, W.C.; MCGUIRE, T.C. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Clinical Diagnostic and Laboratory Immunology*, v.10, n.2, p.208-215, 2003.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. Nocardioforms actinomycetes. In: _____ (Ed.). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9.ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 1994. p.625-633.
- HONDALUS, M.K.; MOSSER, D.M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and Immunity*, v.62, n.10, p.4167-4175, 1994.
- HONDALUS, M.K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.56, p.257-268, 1997.
- HOOPER-McGREVY, K.E.; GIGUERRE, S.; WILKIE, B.N.; PRESCOTT, J.F. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, n.8, p.1307-1313, 2001.
- HOOPER-McGREVY, K.E.; WILKIE, B.N.; PRESCOTT, J.F. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. *Vaccine*, v.23, p.5760-5767, 2005.
- JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; GRONWALL, R.R.; BROWN, M.P.; KELLY, A.; MERRITT, B.S. Pharmacokinetics of azithromycin and concentration in body fluids and bronchoalveolar cells in foals. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, p.467-475, 2001.
- JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; GRONWALL, R.R.; BROWN, M.P.; MERRITT, B.S. Disposal of oral clarithromycin in foals. *Veterinary Pharmacology Therapy*, v.25, p.359-362, 2002.
- KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, S.A. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice. *Infection and Immunity*, v.61, n.11, p.4929-4932, 1993.
- KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, G.H. Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. *Infection Immunity*, v.64, n.4, p.1126-1132, 1996.
- KEDLAYA, I.; ING, M.B.; WONG, S.S. *Rhodococcus equi* Infections in Immunocompetent Host: Case Report and Review. *Clinical Infectious Diseases*, v.32, p.39-47, 2001.
- LINDER, R.; BERNHEIMER, A.W. Oxidation of macrophage membrane cholesterol by intracellular *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.56, n.3/4, p.269-276, 1997.
- MACHANG'U, R.S.; PRESCOTT, J.F. Role of antibody to extra cellular proteins of *Rhodococcus equi* in protection against *R. equi* pneumonia in foals. *Veterinary Microbiology*, v.26, n.4, p.323-333, 1991.
- MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; SEKIMOTO, R.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; VARGA, J.; FODOR, L.; SOLYMOSI, N.; MAJOR, A. Characterization of virulence plasmid

- types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Veterinary Microbiology*, v.88, p.377-384, 2002.
- MAKRAI, L.; TAKAYAMA, S.; DÉNES, B.; HAJTÓS, I.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; MAJOR, A.; FODOR, L.; VARGA, J.; TAKAI, S. Characterization of Virulence Plasmids and Serotyping of *Rhodococcus equi* Isolates from Submaxillary Lymph Nodes of Pigs in Hungary. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.3, p.1246-1250, 2005a.
- MAKRAI, L.; FODOR, L.; VENDEG, I.; SZIGETI, Z.; DENES, B.; REICKZIEGEL, J.; VARGA, J. Comparison of selective media for the isolation of *Rhodococcus equi* and description of a new selective plating medium. *Acta Veterinaria Hungarica*, v.53, n.3, p.275-285, 2005b.
- MARTENS, R.J.; MARTENS, J.G.; FISKE, R.A. Failure of passive immunization by colostrums from immunized mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, v.21, p.19-22, 1991.
- MARTENS, R.J.; COHEN, N.D.; CHAFFIN, M.K.; TAKAI, S.; DOHERTY, C.L.; ANGULO, A.B.; EDWARDS, R.F. Evaluation of 5 serologic assays to detect *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.221, n.6, p.825-833, 2002.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. *Veterinary Research*, v.35, p.383-396, 2004.
- MIZUNO, Y.; SATO, F.; SAKAMOTO, M.; YOSHIKAWA, K.; YOSHIDA, M.; SHIBA, M.; ONODERA, S.; MATSUURA, R.; TAKAI, S. VapB-positive *Rhodococcus equi* infections in an HIV-infected patient in Japan. *Journal of Infectious Diseases*, v.11, p.37-40, 2005.
- MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Advances in Immunology*, v.46, p.111-147, 1989.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T cells subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, v.17, p.138-146, 1996.
- NAPOLEÃO, F.; DAMASCO, P.V.; CARMELLO, T.C.F.; VALE, M.D.; ANDRADE, A.F.B.; HIRATA JUNIOR, R.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Pyogenic Liver Abscess Due to *Rhodococcus equi* in an Immunocompetent Host. *Journal of Clinical Microbiology*, v.43, n.2, p.1002-1004, 2005.
- NORDENGRABH, A.M.; RUSVAI, M.; MERZA, M.; EKSTROM, B.; MOREIN, B.; BELAK, S. Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of bifactorial disease with EHV-2 immunomodulating complexes. *Veterinary Microbiology*, v.51, p.55-68, 1996.
- NORDMANN, P.; KELLER, M.; ESPINASSE, F.; RONCO, E. Correlation between Antibiotic Resistance, Phage-Link Particle Presence, and Virulence in *Rhodococcus equi* Human Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.2, p.377-383, 1994.
- OLDFIELD, C.; BONELLA, H.; REINVICK, L.; DODSON, H.I.; ALDERSON, G.; GOODFELLOW, M. Rapid determination of vapA/vapB genotype in *Rhodococcus equi* using a differential polymerase chain reaction method. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.85, n.4, p.317-326, 2004.
- PATE, M.; PIRŠ, T.; ZDOVC, I.; KRT, B.; OCEPEK, M. Haemolytic *Rhodococcus equi* Isolated from a Swine Lymph Node with Granulomatous Lesions. *Journal of Veterinary Medicine*, v.51, p.249-250, 2004.
- PATTON, K.M.; MCGUIRE, T.C.; HINES, M.T.; MEALEY, R.H.; HINES, S.A. *Rhodococcus equi* - Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Immune Horses and Development in Asymptomatic Foals. *Infection and Immunity*, v.73, n.4, p.2083-2093, 2005.
- PEI, Y.; DUPONT, C.; SYDOR, T.; HAAS, A.; PRECOTT, J.F. Cholesterol oxidase (ChoE) is not important in the virulence of *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.118, n.3/4, p.240-246, 2006.
- PERKINS, G.A.; YEAGER, A.; ERB, H.N.; NYDAM, D.V.; DIVERS, T.J.; BOWMAN, J.I. Survival of foals with experimentally induced *Rhodococcus equi* infection given either hyperimmune plasma containing *R. equi* antibody or normal equine plasma. *Veterinary Therapy*, v.3, p.334-346, 2002.
- PHUMMOONNA, T.; BARTON, M.D.; HEUZENROEDER, M.W. Recognition of a B-cell Epitope of the VapA Protein of *Rhodococcus equi* in newborn and Experimentally Infected Foals. *Journal of Medical Veterinary*, v.52, p.291-295, 2005.
- POWER, C.A.; WEI, G.; BRESCHER, P.A. Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infection and Immunity*, v.66, p.5743-5750, 1998.
- PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, v.29, n.12, p.2696-2700, 1991.
- PRESCOTT, J.F.; HOFFMAN, J.F. *Rhodococcus equi*. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, v.9, n.2, p.375-385, 1993.
- PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. In: PRESCOTT, C.L., THOEN, C.O., PRESCOTT, J.F., SONGER, J.G. (Ed.). *Pathogenesis of bacterial infections of animals*. 3rd ed. Ames: Blackwell Publishing, 2004.

- RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YASUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, and a new variant, 87-kb Type III. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Diseases*, v.28, p.53-61, 2005.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Gênero *Rhodococcus*. In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.334-345.
- SELLON, D.C.; WALKER, K.; SUYEMOTO, M.; ALTIER, C. Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids. *American Journal of Veterinary Research*, v.58, n.11, p.1232-1237, 1997.
- SHALKA, B. Dynamics of equi-factor antibodies in sera of foals kept on farms with differing histories of *Rhodococcus equi* pneumonia. *Veterinary Microbiology*, v.14, n.3, p.269-276, 1987.
- SOEDARMANTO, I.; OLIVEIRA, R.; LÄMMLER, C.; DÜRRLING, H. Identification and experimental relationship of *Rhodococcus equi* isolated from cases of lymphadenitis in cattle. *Zentralbl att fur Bakteriologie*, v.286, n.4, p.457-467, 1997.
- TAKAI, S.; OHBUSH, S.; KOIKE, K. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse breeding farms with and without endemic infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v.29, n.12, p.2887-2889, 1991a.
- TAKAI, S.; SEKISAKI, T.; OSAWA, A. Association between a large plasmid and 15-17 kDa antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, v.59, p.4056-4060, 1991b.
- TAKAI, S.; ANZAI, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; KAMADA, M. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from lesions of infected foals. *Bulletin of Equine Research Institute*, v.30, p.9-14, 1993.
- TAKAI, S.; SASAKI, Y.; IKEDA, T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *Journal of Clinical Microbiology*, v.32, n.2, p.457-460, 1994a.
- TAKAI, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKISAKI, T. Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. *Veterinary Microbiology*, v.39, n.1/2, p.187-192, 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.; FUKUNAGA, N.; OCHIDA, Y.; KAMISAWA, K.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKISAKI, Y. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *Journal of Infection Disease*, v.172, n.5, p.1306-1311, 1995b.
- TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OZAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15-to 17-Kilodalton antigens. *Journal of Clinical Microbiology*, v.33, p.1624-1627, 1995c.
- TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCSHIAI, S.; YMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKISAKI, T. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, n.4, p.1034-1037, 1996a.
- TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCSHIAI, S.; SAKAI, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, T. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.58, n.7, p.669-672, 1996b.
- TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Veterinary Microbiology*, v.56, n.3/4, p.167-176, 1997.
- TAKAI, S.; HINES, S.A.; SEKIZAKI, T.; NICHOLSON, V.M.; ALPERIN, D.A.; OSAKI, M.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, K.; OGINO, N.; KAKUDA, T.; DAN, H.; PRESCOT, J.F. DNA Sequence and Comparison of Virulence Plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infection and Immunity*, v.68, n.12, p.6840-6847, 2000a.
- TAKAI, S.; ANZAI, T.; FUJITA, Y.; AKITA, O. SHODA, M.; TSUBAKI, S.; WADA, R. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20 kDa protein (VapB) in foals. *Veterinary Microbiology*, v.76, n.1, p.71-80, 2000b.
- TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TRINARONG, C.; ROJANASTHIEN, S.; SIRIMALAISUWAN, A.; TESAPRATEEP, T.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* on soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. *American Journal of Therapeutic Medicine*, v.66, n.1, p.52-55, 2002.
- TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; TAKARN, P.; KHANTAWA, B.; TAMURA, M.; TAKAYAMA, S.; YAMATODA, N.; KIMURA, A.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; SHIRO, T.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patient with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. *Journal of Infectious Diseases*, v.188, n.11, p.1717-1723, 2003.

- TAOUJI, S.; BRÉARD, E.; PEYRET-LACOMBE, A.; PRONOST, S.; FORTIER, G.; COLLOBERT-LAUGIER, C. Serum and mucosal antibodies of infected foals recognized two distinct epitopes of Vap A of *Rhodococcus equi*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, v.34, p.299-306, 2002.
- TAN, C.; PRESCOTT, J.F.; PATTERSON, M.C.; NICHOLSON, V.M. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Canadian Journal of Veterinary Research*, v.59, n.1, p.51-59, 1995.
- VARGA, J.; FODOR, L.; RUSVAI, M.; SOOS, I.; MAKRAI, L. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. *Veterinary Microbiology*, v.56, n.3/4, p.205-212, 1997.
- VARGAS, A.C. Infecção por *Rhodococcus equi*. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. (Ed.). *Doenças de ruminantes e eqüídeos*. 3 ed. Santa Maria: ed. Pallotti, 2007. 722p.
- VENGUST, M.; STAEMPFLI, H.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse. *Canadian Veterinary Journal*, v.43, p.706-708, 2002.
- VERVILLE T.D.; HUYCKE M.M.; GREENFIELD R.A.; FINE D.P.; KUHLS T.L.; SLATER L.N. *Rhodococcus equi* infections of humans. *Medicine*, v.73, n.3, p.119-132, 1994.
- VULLO, V.; MATROIANI, C.M.; LICHTNER, M.; MENGONI, F.; CHIAPPINI, E.; D'AGOSTINO, C.; DELIA, S. Serologic responses to *Rhodococcus equi* in individuals with and without human immunodeficiency virus infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, v.15, n.7, p.588-594, 1996.
- WOLCOOK, J.B.; FARMER, A.T.; MULTIMER, M.D. Selective medium for *Corynebacterium equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, v.9, n.5, p.640-642, 1979.
- YAGER, A.C.; PRESCOTT, C.A.; KRAMAR, D.P.; HANNAH, H.; BALSON, G.A.; CROY, B.A. The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. *Veterinary Microbiology*, v.28, n.4, p.363-376, 1991.
- YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; DEANS, R.J.; WENBERG, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; MODILIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprose lesions. *Science*, v.254, p.277-279, 1991.

Recebido em 18/4/07

Aceito em 1/9/08