

## *Rhodococcus equi* Parte 2 - imunologia e profilaxia

### *Rhodococcus equi* Part 2 - immunology and profilaxy

Ana Carolina Rusca Correa Porto<sup>\*</sup> Wilson Roberto Fernandes<sup>†</sup> Maria Cristina Roque Barreira<sup>‡</sup>

## - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

### RESUMO

*Rhodococcus equi* é um patógeno ubíquo e habitante da flora intestinal dos equinos de importância na neonatologia equina. Todos os potros são expostos à doença ao nascimento, porém alguns desenvolvem e outros não. Este artigo revisa características da resposta imune, tanto em adultos competentes quanto em potros suscetíveis ao patógeno. A resposta imune humoral é abordada, incluindo uma discussão sobre o uso do plasma hiperimune como ferramenta profilática. O papel dos mecanismos de imunidade inata na suscetibilidade de alguns potros ao *R. equi* é também abordado. Da mesma maneira, os componentes envolvidos na resposta cito-mediada são revisados, com atenção particular às pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de uma vacina efetiva para ser utilizada em potros.

**Palavras-chave:** *Rhodococcus equi*, genes vap, resposta imune, vacina.

### ABSTRACT

*Rhodococcus equi* is an important pathogen in equine neonatology that is ubiquitous and a normal intestinal inhabitant of equines. All foals are exposed at birth, however, some foals develop disease and others do not. This article reviews concepts of the equine immune response, both in the immune adult and susceptible neonate, with respect to this pathogen. Humoral immune responses are addressed, with a discussion on the use of hyperimmune plasma as a prophylactic tool. The role that innate immune mechanisms play in the susceptibility of some foals to *R. equi* infection is also highlighted. Likewise, cell-mediated immune components are reviewed, with

particular attention directed towards research to develop an effective vaccine for foals.

**Key words:** *Rhodococcus equi*, vap genes, immune response, vaccine.

### INTRODUÇÃO

Na primeira parte deste artigo, foram abordadas questões referentes à epidemiologia, às manifestações clínicas, aos métodos diagnósticos e ao tratamento da rodococose. Em seguida, serão apresentadas as recentes descobertas sobre o desenvolvimento da resposta imunitária dos potros frente ao *Rhodococcus equi*, bem como as estratégias profiláticas que vêm sendo utilizadas na tentativa de diminuir a incidência da doença.

#### Imunidade humoral

Segundo DAWSON et al. (2010), o desenvolvimento de uma resposta humoral tanto de mucosa, quanto sistêmica é necessária para a proteção contra a rodococose. A importância dessa resposta vem sendo também atribuída ao fato de o início do aparecimento das manifestações clínicas coincidir com o declínio dos anticorpos adquiridos passivamente pelo

<sup>†</sup>Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, 05508 270, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: carolvet\_1@hotmail.com.

<sup>\*</sup>Autor para correspondência.

<sup>‡</sup>Departamento de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

colostro (HOOPER-McGREVY et al., 2005), principalmente IgGb.

As imunoglobulinas equinas são IgG, IgA, IgM e IgE. IgGa e IgGb são os isótipos mais abundantes no soro e no colostro dos equinos (SHEORAN et al., 2000). Durante a vida intrauterina, o feto é capaz de produzir pequenas quantidades de IgM e IgGa (SHEORAN et al., 2000) e quantidades satisfatórias de IgGa, IgG(T) e IgA produzidas pelo potro podem ser detectadas entre a quinta e a oitava semana de vida (HOLZNAGEL et al., 2003). Já segundo SHEORAN et al. (2000), a IgGb endógena pode permanecer em concentrações inferiores às de IgGa e IgG(T) até o oitavo mês de vida. Porém, resultado diferente foi encontrado por JACKS et al. (2007), que concluíram que potros muito jovens podem montar uma resposta de IgGb, desde que sejam corretamente estimulados. A IgGb materna adquirida passivamente pelo potro apresenta uma meia-vida longa, comparada a de outras subclasses de IgG e, segundo SHEORAN et al. (2000), esse pode ser o fator responsável por insucessos em programas de vacinação de potros muito jovens.

Foi sugerido na década de 80 que a sobrevivência da bactéria no interior dos macrófagos seria direcionada pelo modo de entrada do *R. equi* nas células. Se a entrada ocorresse via fagocitose, mediada pela opsonização da bactéria por anticorpos específicos, seria desencadeada uma cascata intracelular que levaria à morte bacteriana, enquanto a entrada via receptores não alteraria o destino da bactéria. Mais recentemente, foi demonstrado que tal destruição ocorre devido a um aumento na fusão do fagossomo ao lisossomo (CAUCHARD et al., 2004), necessária para a ativação da via de morte bacteriana. Em indivíduos não imunes, a ligação de *R. equi* a células é dependente do sistema complemento, pois o C3b opsonizante depositado na superfície da bactéria é reconhecido por Mac-1, receptor de complemento de macrófagos (HONDALUS et al., 1993).

A lipoproteína de parede VapA é apontada como forte desencadeadora de resposta imune, já que anticorpos séricos contra tal proteína são encontrados tanto em cavalos adultos quanto em potros (HOOPER-McGREVY et al., 2003; JACKS et al., 2007). Uma resposta de IgGa e IgGb específica contra a VapA foi observada em cavalos adultos sete dias após o desafio experimental (LOPEZ et al., 2002). Porém um estudo mais recente demonstrou que a infecção experimental de cavalos adultos produziu um aumento significativo apenas de IgGb, quando comparado as outras subclasses de IgG e que esse aumento contribuiu para a opsonização da bactéria (JACKS et al., 2007). Contrastando com esse resultado, LEWIS et al. (2008),

investigando as funções efetoras das subclasses de IgG equina, demonstraram que IgGa e IgGb são os anticorpos mais importantes para a defesa contra patógenos comuns como o *R. equi*, através da estimulação da ativação do complemento e do *burst* respiratório.

A presença da IgA na mucosa representa a primeira linha de defesa do trato respiratório e tem sido relacionada a uma maior resistência à rodococose (DAWSON et al., 2010), já que a ausência dessa imunoglobulina durante os primeiros 28 dias de vida aumenta a suscetibilidade dos potros a infecções respiratórias (SHEORAN et al., 2000).

#### Imunidade celular

Devido à natureza intracelular facultativa de *R. equi*, os mecanismos de imunidade mediada por células são importantes na resistência contra essa bactéria e evidências mostram que essa resistência requer tanto mecanismos inatos quanto adaptativos (LIU et al., 2009a).

#### Imunidade inata

A habilidade das células do sistema imune inato, como neutrófilos e macrófagos, em controlar infecções primárias é claramente reconhecida, porém inadequada em neonatos, quando comparada a cavalos adultos (FLAMINIO et al., 2000). Essa diferença pode ser explicada pela limitação da habilidade de opsonização nesses animais, o que reduz a atividade fagocítica (McTAGGART et al., 2001). Adicionalmente, a expressão reduzida de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) em potros jovens também leva a uma redução da atividade fagocítica, já que essa citocina promove a ativação dos neutrófilos e consequente ativação da via de morte microbiana (DAWSON et al., 2010), fato que justifica a baixa capacidade de ativação desse mecanismo em potros de até 3 meses de idade (DEMMERS et al., 2001).

Já é relatado que os neutrófilos têm um papel importante na proteção contra a bactéria, visto que CHAFFIN et al. (2004) demonstraram que a concentração sanguínea de neutrófilos é significativamente menor em potros que irão desenvolver pneumonia por *R. equi* do que em potros da mesma fazenda que não desenvolverão. Além disso, estudos demonstram que camundongos neutropênicos infectados com *R. equi* possuem concentração muito maior de *R. equi* nos tecidos quando comparados a camundongos controles (MARTENS et al., 2005). Apesar de ter sido demonstrado que a função fagocítica de potros é menor do que a de cavalos adultos (McTAGGART et al., 2001), mecanismos não fagocíticos parecem estar envolvidos na resposta

imune contra *R. equi*. Resultados recentes demonstram que neutrófilos de potros promovem a expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias como o INF- $\gamma$  em resposta a estimulação *in vitro* por *R. equi* (NARREN et al., 2009).

O sistema imune inato reconhece os patógenos via diversos receptores, incluindo os receptores do tipo Toll (TLR - *toll-like receptors*) (AMATI et al., 2006). Esses receptores sinalizam a via de ativação de fatores transcricionais que regulam a produção de citocinas e outras moléculas regulatórias (NETEA et al., 2004) necessárias para a resposta inata. DARRAH et al. (2004) demonstraram que a interação de VapA com TLR-2 corresponde ao evento chave na ativação de macrófagos por *R. equi* e no desencadeamento de resposta inata à bactéria. Alguns estudos indicam uma deficiente sinalização via TLR por neonatos com consequente deficiência na resposta inata (MARODI, 2006). Similarmente, foi também relatado que a função das células dendríticas também está diminuída em neonatos, incluindo potros (MERAT et al., 2009), e a reduzida expressão de MHC de classe II (major histocompatibility complex - complexo de histocompatibilidade maior) pelas células apresentadoras de antígenos desses animais também podem contribuir para a suscetibilidade desses animais à rodococose (FLAMINIO et al., 2007; FLAMINIO et al., 2009).

#### Imunidade adaptativa

Em camundongos e humanos, subtipos de IgG funcionam como indicador de imunidade celular, refletindo um perfil Th1 ou Th2 de resposta. A associação direta de subtipos de IgG com o perfil de citocinas ainda não foi completamente estabelecido em equinos, porém alguns estudos relatam a associação de IgG(T) com perfil Th2 (HOOPER-McGREVY et al., 2003). Estudos recentes indicam que a imunidade contra o herpesvírus equino tipo 1 em cavalos é caracterizada por uma resposta de INF- $\gamma$  em detrimento a uma resposta de interleucina 4 (IL-4), e predominância de IgGa (COOMBS et al., 2006), já a proteção contra nematóides intestinais como *Strongylus vulgaris* depende de uma resposta de IL-4 e uma predominância de IgG(T) (SWIDERSKI et al., 1998).

Diversos estudos têm confirmado que a imunidade celular exerce papel central contra *R. equi* e que a ativação de macrófagos por mediadores, principalmente INF- $\gamma$ , é essencial para a morte da bactéria. DARRAH et al. (2000) demonstraram, em modelo murino, que a morte de *R. equi* por macrófagos depende da produção tanto de óxido nítrico (NO) como de superóxidos (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Inibindo a produção de um dos

dois compostos, os macrófagos perdem a capacidade de controlar a replicação da bactéria. KANALY et al. (1996) demonstraram que camundongos BALB/c imunocompetentes e infectados com *R. equi* virulento desenvolveram resposta Th1 com progressivo controle da infecção. Já camundongos que tiveram a resposta Th2 induzida, pelo uso de anticorpos anti-INF- $\gamma$ , falharam no controle da infecção (KANALY et al., 1995).

Ao desafiar cavalos por via intratraqueal, HINES et al. (2001 e 2003) demonstraram que o *clearance* de *R. equi* no lavado-broncoalveolar, está relacionado a uma intensa resposta linfoproliferativa, tanto de células T CD4+ como de células T CD8+, frente a antígeno solúvel de *R. equi* ou à proteína VapA recombinante, reforçando a conclusão que VapA corresponde a antígeno imunodominante. Além disso, células estimuladas apresentaram um aumento significativo na expressão de INF- $\gamma$  e aumento nos níveis de IgGa e IgGb contra VapA. JACKS et al. (2007) relataram que potros têm uma resposta linfoproliferativa fraca contra antígenos de *R. equi* e, segundo HINES et al. (2001), a resposta contra *R. equi* é compartimentalizada e pode ser detectada no pulmão, mas não no sangue periférico.

O mecanismo que regula a resposta imunitária neonatal não é completamente entendido. O estudo da resposta imune mediada por célula em neonatos humanos e murinos, normalmente revela uma pronunciada tendência no desenvolvimento de uma resposta de padrão Th2 (ADKINS, 2000). Segundo RUKAVINA & PODACK (2000), fatores placentários como a progesterona promovem uma diminuição na expressão IL-12 e aumento na expressão de IL-10, contribuindo para um padrão Th2 de resposta e para uma maior suscetibilidade do neonato à infecção por patógenos intracelulares. Segundo VELILLA et al. (2006), um sistema de apresentação de antígenos imaturo também pode estar envolvido na pobre resposta imunológica neonatal. Porém, em certas circunstâncias, neonatos conseguem montar uma resposta Th1 semelhante à de animais adultos (MARCHANT & GOLDMAN, 2005; JACKS et al., 2007). Isso sugere que, quando corretamente estimulados, neonatos são capazes de montar uma resposta celular específica (LIU et al., 2009b; SMOLEN et al., 2010). HARRIS et al. (2011) comprovaram essa hipótese ao demonstrar que potros inoculados pela via oral com *R. equi* virulento tiveram desenvolvimento acelerado de células T citotóxicas específicas quando comparados com os animais controles.

Até pouco tempo, acreditava-se que potros eram deficientes na habilidade de produzir INF- $\gamma$  e que a infecção com *R. equi* virulento poderia resultar em

imunomodulação ineficiente, direcionando uma resposta do tipo Th1 que seria eficaz, para uma resposta deletéria, do tipo Th2 (BREATHNACH et al., 2006). JACKS et al. (2007) demonstraram que potros jovens conseguem produzir uma resposta de INF- $\gamma$  adequada, desde que corretamente estimulados, e afirmaram que a infecção de potros não pode ser completamente atribuída à deficiência generalizada de INF- $\gamma$  ou a uma inapropriada polarização da resposta imune a um fenótipo Th2. No mesmo estudo, o grupo observou que, nos potros não estimulados, a produção de INF- $\gamma$  foi significativamente menor do que nos potros estimulados. Recentemente, a produção de INF- $\gamma$  por potros jovens tem sido relacionada à dose de antígeno que o animal é exposto (DAWSON et al., 2010). Baixas doses direcionam a uma resposta predominantemente Th1, enquanto altas doses promovem uma resposta de padrão Th2 (JACKS & GIGUERE, 2010).

Entre os fatores que podem estar envolvidos na suscetibilidade individual de potros à rodococose, destacam-se: exposição do sistema respiratório dos potros a um grande número de *R. equi* (JACKS & GIGUERE, 2010), ineficiência no sistema fagocítico (DEMMERS et al., 2001), deficiência da atividade de células T citotóxicas (PATTON et al., 2005); ineficiente produção de citocinas de padrão protetor (FLAMINIO et al., 2007) e atraso na maturação e na ativação de células apresentadoras de antígenos (MÉRANT et al., 2009; PARGASS et al., 2009), assim como observado em neonatos murinos (MUTHUKUMAR et al., 2000) e humanos (LANGRISH et al., 2002). Apesar disso, alguns potros de fazendas endêmicas permanecem saudáveis devido à resistência à infecção. Existem algumas hipóteses para esse fato e uma delas seria a possibilidade da suscetibilidade e da resistência à bactéria serem determinadas por diferenças nas funções imunológicas dos potros, individualmente. Algumas evidências suportam essa hipótese: um estudo demonstrou que a relação entre células T CD4+/CD8+ em amostras de sangue de potros de duas semanas de vida foi significativamente menor em potros que desenvolveram a pneumonia posteriormente, do que em potros que não desenvolveram (CHAFFIN et al., 2004). A resposta imune inata parece também estar envolvida nessa questão, já que, segundo DARRAH et al. (2004), a estimulação eficiente da resposta imune inata é um dos fatores essenciais para a pronta resposta de cavalos adultos imunocompetentes à infecção por *R. equi*.

Outras hipóteses também vêm sendo discutidas, como o polimorfismo de alguns genes associados ao metabolismo do ferro no potro, já que se sabe que o ferro é importante para o crescimento e

para a patogênese da bactéria e existem evidências que genótipos de transferrina diferem entre potros afetados e não afetados (MOUSEL et al., 2003). Além disso, recentemente foi observado que camundongos sem o gene para galectina-3 são mais resistentes à infecção por *R. equi* quando comparados a camundongos portadores do gene. Esse fato pode ser explicado pela ausência das funções inibitórias da galectina-3 sobre o sistema imune (FERRAZ et al., 2008).

#### Profilaxia

Diversas estratégias profiláticas vêm sendo utilizadas na tentativa de controle da rodococose. Entre elas, a implementação de medidas de manejo leva à diminuição da incidência da infecção. Dentre as condições de manejo adequadas, destacam-se: funcionário capacitado, diminuir práticas de lotação, evitar pastejo excessivo nos piquetes, evitar trânsito de animais, higiene rigorosa no local das instalações, separação de lotes por idade, checar a transferência de anticorpos passivos, diagnóstico precoce, isolamento e tratamento dos potros doentes com antibióticos específicos. Como a bactéria tem a capacidade de se multiplicar mais de 1000 vezes em poucos dias nos ácidos voláteis contidos nas fezes dos equinos, a prática de remoção do esterco diariamente foi sugerida, porém, para MUSCATELLO et al. (2006), essa prática não reduz a incidência da rodococose.

A administração de plasma hiperimune vem sendo utilizada de maneira profilática e alguns autores relatam a diminuição na morbidade e na mortalidade por *R. equi* (MADIGAN et al., 1991; CASTON et al., 2006). Em contraste, outros testes realizados não demonstraram sucesso na prevenção do desenvolvimento da pneumonia por *R. equi* após a utilização do plasma hiperimune em potros (GUGUERE et al., 2002; PERKINS et al., 2002). Segundo DAWSON et al. (2010), para que um plasma hiperimune seja eficiente, muitos fatores devem ser considerados tanto na sua produção quanto na sua administração. Com relação à produção, a qualidade do imunógeno, a dose e o adjuvante utilizados são fundamentais, bem como a competência do sistema imune do animal doador. Já a efetividade dessa prática no potro é altamente afetada pela quantidade de plasma administrado, momento da administração, competência do sistema imune inato do potro, condições de manejo e pelo número de bactérias virulentas no ambiente (DAWSON et al., 2010).

#### *Rhodococcus equi* e vacinas

A grande maioria das tentativas de imunização ativa de éguas e a subsequente transferência de imunidade passiva para o potro via

colostro não promoveu proteção contra o desenvolvimento da rodococose (CAUCHARD et al., 2004) e, segundo MEIJER & PRESCOTT (2004), essa falha pode estar relacionada à qualidade da vacina ou a classe de anticorpo cuja produção foi suscitada pelas vacinas utilizadas experimentalmente, já que estudos têm demonstrado não haver uma diminuição significativa na incidência da pneumonia causada por *R. equi* quando a bactéria morta ou inativada é usada como imunógeno (MADIGAN et al., 1991; VARGA et al., 1997). Já CAUCHARD et al. (2004), utilizando VapA como imunógeno em éguas prenhas, demonstraram um aumento sérico de IgG e da atividade opsonizante, que foi transferida para seus potros. Nesse estudo, os autores demonstram a proteção conferida pela imunização, já que nenhum caso da doença foi diagnosticado nos 32 potros nascidos de éguas vacinadas, enquanto quatro dos 15 potros nascidos de éguas não vacinadas desenvolveram a rodococose (P=0,02). Apesar de tal constatação, sabe-se que a incidência de falha na transferência passiva pode ser superior a 35% em alguns haras (DAWSON et al., 2010), fato que diminui o sucesso da prevenção da rodococose através da vacinação das éguas. Diante disso, estudos têm se voltado para o desenvolvimento de uma vacina contra rodococose a ser usada diretamente nos potros, encorajados principalmente pelas informações obtidas a partir do projeto genoma do *R. equi* (MUSCATELLO et al., 2007).

Em trabalho desenvolvido por HOOPER-MCGREY et al. (2005), potros foram imunizados oralmente aos dois, sete e 14 dias de vida com cepa virulenta de *R. equi*. Uma semana após a última vacinação, os animais foram desafiados intratraquealmente com *R. equi*. Animais não vacinados apresentaram pneumonia grave, vista na necropsia. Animais imunizados não apresentaram lesões pulmonares no exame pós-morte. A resposta humoral de animais imunizados e não imunizados mostrou que as proteínas VapA e VapC eram imunodominantes e que apenas nos potros imunizados foram detectados altos níveis de anticorpos específicos para proteínas Vap. A maior preocupação com relação ao uso de vacinas orais vivas é o impacto que ela pode causar no trato gastrointestinal dos potros, bem como no ambiente, e a solução para esse problema estaria no uso de vacinas vivas, porém atenuadas (DAWSON et al., 2010). Concordando com tal afirmação, BARBEY et al. (2011) desenvolveram uma preparação vacinal com o extrato bruto de *R. equi* ATCC 33701 e testaram apenas em camundongos, associada ou não a um adjuvante comercial. Os autores observaram que a preparação foi altamente imunogênica, quando associada ao adjuvante utilizado.

Novos estudos estão se baseando principalmente na tecnologia do DNA recombinante e vêm apresentando resultados variados (HAGHIGHI & PRESCOTT, 2005; VANNIASINKAM et al., 2003). Além disso, diversos estudos investigando o uso de peptídeos das proteínas associadas à virulência (Vaps) como candidatos a vacinas têm sido realizados e os resultados mostram um aumento de anticorpos específicos após a imunização em camundongos, potros e cavalos adultos (HOOPER-MCGREY et al., 2003; TAOUI et al., 2004; CAUCHARD et al., 2004), porém a efetividade desses peptídeos utilizados em potros não foi demonstrada após infecção experimental. OLIVEIRA et al. (2007) imunizaram camundongos BALB/c, por via oral, com linhagem de *Salmonella Typhimurium* atenuada carregando o gene *vapA* de *R. equi*, e verificaram que houve proteção frente ao desafio com *R. equi*, direcionada por uma resposta imunitária de perfil Th1 (OLIVEIRA et al., 2010).

O potencial das vacinas de DNA em estimular uma resposta humoral e celular com componentes do padrão Th1 tem incentivado a realização de diversos estudos utilizando modelos de doenças infecciosas em neonatos. Não é fácil prever o resultado da exposição de recém nascidos a pequenas quantidades de antígeno por um intervalo prolongado, porém vetores de DNA expressando antígeno microbiano utilizados em protocolos de imunização têm promovido uma resposta imune eficaz (GUNN et al., 2010). Segundo os autores, a preparação vacinal com *Salmonella* enterica foi muito eficiente na indução de proteção local e sistêmica, podendo ser aplicada na imunização de neonatos, mesmo na presença de anticorpos maternos. Em recente estudo publicado por SMOLEN et al. (2010), ficou demonstrado que neonatos humanos conseguem montar uma resposta celular efetiva quando corretamente estimulados. Da mesma forma, GUNN et al. (2010) produziram uma linhagem vacinal de *Salmonella* atenuada que se mostrou altamente imunogênica para camundongos de menos de 24 horas de vida.

Diferentes estratégias profiláticas vêm sendo testadas (CHAFFIN et al., 2008; VENNER et al., 2009). CHAFFIN et al. (2008) descreveram a eficiência da administração oral de azitromicina nas primeiras 2 semanas pós-parto em reduzir em 85% a incidência da rodococose em fazendas norte americanas endêmicas. Em contraste, estudo semelhante realizado na Alemanha não demonstrou diminuição da incidência da pneumonia (VENNER et al., 2009).

## CONCLUSÃO

O maior desafio enfrentado pelos grupos de pesquisa é o desenvolvimento de uma vacina capaz de induzir imunidade celular e humoral efetiva em potros neonatos. Novos esforços estão sendo realizados na tentativa de estimular o sistema imune inato, visto que a suscetibilidade desses animais pode ser em grande parte atribuída a falhas nesse tipo de resposta. O uso de agonistas de receptores do tipo Toll, bem como ativadores de CD1 e MHC de classe II podem vir incrementar a apresentação de antígenos protéicos às células T, promovendo um desenvolvimento efetivo da resposta celular contra *R. equi*.

## REFERÊNCIAS

- ADKINS, B. Development of neonatal Th1/Th2 function. **International Reviews of Immunology**, v.19, n.2-3, p.157-171, 2000. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/pdf/10.3109/08830180009088503>>. Acesso em: 19 jan. 2011. doi: 10.3109/08830180009088503.
- AMATI, L. et al. Toll-like receptor signalling mechanisms involved in dendritic cell activation: potential therapeutic control of T cell polarization. **Current Pharmaceutical Design**, v.12, n.32, p.4247-4254, 2006. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cpd/2006/00000012/00000032/art00014>>. Acesso em: 14 jan. 2011. doi: 10.2174/138161206778743583.
- BARBEY C. et al. Immune response to *Rhodococcus equi* ATCC 33701-secreted proteins in mice and identification of immunogenic recombinant proteins by dot-blotting. **Research in Veterinary Science, article in press** 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0034528811001779>>. Acesso em: 18 jun. 2011. doi: 10.1016/j.rvsc.2011.05.003.
- BREATHNACH, C.C. et al. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.112, n.3-4, p.199-209, 2006.
- CASTON, S.S. et al. Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimental infected foals. **Veterinary Therapeutics: Research in applied veterinary medicine**, v.7, n.4, p.361-375, 2006.
- CAUCHARD, J. et al. Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with protective VapA candidate vaccine. **Veterinary Microbiology**, v.104, n.1-2, p.73-81, 2004.
- CHAFFIN, M.K. et al. 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, n.1-2, p.33-48, 2004.
- CHAFFIN, M.K. et al. Chemoprophylactic effects of azithromycin against *Rhodococcus equi* - induced pneumonia among foals at equine breeding farms with endemic infections. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.232, n.7, p.1035-1047, 2008. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdfplus/10.2460/javma.232.7.1035>>. Acesso em: 17 jan. 2011. doi: 10.2460/javma.232.7.1035.
- COOMBS, D.K. et al. Cytokine responses to EHV-1 infection in immune and non-immune ponies. **Veterinary Immunology Immunopathology**, v.111, n.1-2, p.109-116, 2006.
- DARRAH, P.A. et al. Cooperation between reactive oxygen and nitrogen intermediates in killing of *Rhodococcus equi* by activated macrophages. **Infection and Immunity**, v.68, n.6, p. 3587-3593, 2000. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/reprint/68/6/3587>>. Acesso em: 15 jan. 2011.
- DARRAH, P.A. et al. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. **Journal of Immunology**, v.173, n.3, p.1914-1924, 2004. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/173/3/1914.full.pdf+html>>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- DAWSON, T.R.M.Y. et al. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, n.1-2, p.1-11, 2010.
- DEMMERS, S. Neutrophil functions and serum IgG in growing foals. **Equine Veterinary Journal**, v.33, n.7, p.676-680, 2001.
- FERRAZ, L.C. et al. Lack of galectin-3 alters the balance of innate immune cytokines and confers resistance to *Rhodococcus equi* infection. **European Journal of Immunology**, v.38, n.10, p.2762-2775, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.200737986>>. Acesso em: 12 jan. 2011. doi: 10.1002/eji.200737986.
- FLAMINIO, M.J. et al. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, n.3-4, p.267-285, 2000.
- FLAMINIO, M.J. et al. The effect of CpG-ODN on antigen presenting cells of the foal. **Journal of Immune based Therapies and Vaccines**, v.5, n.1, p.1-17, 2007. Disponível em: <<http://www.jibtherapies.com/content/5/1/1>>. Acesso em: 01 out. 2010. doi: 10.1186/1476-8518-5-1.
- FLAMINIO, M.J. et al. Foal monocyte-derived dendritic cells become activated upon *Rhodococcus equi* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.2, p.176183, 2009.
- GIGUÈRE, S. et al. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.220, n.1, p.59-63, 2002. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdfplus/10.2460/javma.2002.220.59>>. Acesso em: 21 out. 2010. doi: 10.2460/javma.2002.220.59.
- GUNN, B.M. et al. Construction of recombinant attenuated *Salmonella enterica Typhimurium vaccine* (RASV) vector strains for safety in newborn and infant mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.17, n.3, p.354-362, 2010. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/CVI.00412-09v1>>. Acesso em: 21 out. 2010. doi: 10.1128/CVI.00412-09.

- HAGHIGHI, H.R.; PRESCOTT, J.F. Assessment in mice of vapA-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.104, n.3-4, p.215-225, 2005.
- HARRIS S.P. Early development of cytotoxic T lymphocytes in neonatal foals following oral inoculation with *Rhodococcus equi*. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.141, n.3-4, p.312-316, 2011.
- HINES, T.M. et al. Immunity to *Rhodococcus equi*: antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.79, n.1-2, p.101-113, 2001.
- HINES, S.A. et al. 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 and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.2, p.208-215, 2003. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/10/2/208>>. Acesso em: 14 jan. 2011. doi: 10.1128/CDLI.10.2.208-215.2003.
- HOLZNAGEL, D.L. et al. Onset of immunoglobulin production in foals. **Equine Veterinary Journal**, v.35, p.620-622, 2003.
- HONDALUS, M.K. et al. The intracellular bacterium *Rhodococcus equi* requires Mac-1 to bind to mammalian cells. **Infection and Immunity**, v.61, n.7, p.2919-2929, 1993.
- HOOPER-MCGREVVY, K. et al. Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.10, n.3, p.345-351, 2003. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/10/3/345>>. Acesso em: 14 jan. 2011. doi: 10.1128/CDLI.10.3.345-351.2003.
- HOOPER-MCGREVVY, K.E. et al. 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, n.50, p.5760-5767, 2005.
- JACKS, S. et al. Experimental infection of neonatal foals with *Rhodococcus equi* triggers adult-like gamma interferon induction. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.14, n.6, p.669-677, 2007. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/14/6/669>>. Acesso em: 14 jan. 2011. doi:10.1128/CDLI.14.6.669-677.2007.
- JACKS, S.; GIGUERE, S. Effects of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*: a pilot study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.133, n.2-4, p.282-286, 2010.
- KANALY, S.T. et al. Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. **Infection and Immunity**, v.63, n.8, p.3037-3041, 1995.
- KANALY, S.T. et al. Transfer of a CD4+ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. **Infection and Immunity**, v.64, n.4, p.1126-1132, 1996.
- LANGRISH, C.L. et al. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v.128, n.1, p.118-123, 2002. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2249.2002.01817.x/pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2011. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01817.
- LEWIS, M.J. et al. The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. **Molecular Immunology**, v.45, p.818-827, 2008.
- LIU, M. et al. Activation of foal neutrophils at different ages by CpG oligodeoxynucleotides and *Rhodococcus equi*. **Cytokine**, v.48, n.3, p.280-289, 2009a.
- LIU, T. et al. Basal and stimulus-induced cytokine expression is selectively impaired in peripheral blood mononuclear cells of newborn foals. **Vaccine**, v.27, n.5, p.674-683, 2009b.
- LOPEZ, A.M. et al. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.9, n.6, p.1270-1276, 2002. Disponível em: <<http://cvi.asm.org/cgi/reprint/9/6/1270>>. Acesso em: 12 jan. 2011. doi: 10.1128/CDLI.9.6.1270-1276.2002.
- MADIGAN, E.J. et al. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.44, p.571-578, 1991.
- MARCHANT, A.; GOLDMAN, M. T cell-mediated immune responses in human newborns: ready to learn? **Clinical and Experimental Immunology**, v.141, n.1, p.10-18, 2005. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2249.2005.02799.x/pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02799.x.
- MARODI, L. Innate cellular immune responses in newborns. **Clinical Immunology**, v.118, n.2-3, p.137-144, 2006.
- MARTENS, R.J. et al. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.7040-7042, 2005.
- McTAGGART, C. et al. A comparison of foal and adult horse neutrophil function using flow cytometric techniques. **Research in Veterinary Science**, v.71, n.1, p.73-79, 2001.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v.35, n.4, p.383-396, 2004.
- MERANT, C. et al. Young foal and adult horse monocyte-derived dendritic cells differ by their degree of phenotypic maturity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.131, n.1-2, p.1-8, 2009.
- MOUSEL, M.R. et al. *Rhodococcus equi* and genetic susceptibility: assessing transferrin genotypes from paraffin-embedded tissues. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.15, n.5, p.470-472, 2003.
- MUSCATELLO, G. et al. Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian Thoroughbred farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.9, p.6152-6160, 2006.

- MUSCATELLO, G. et al. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of 'rattles'. **Equine Veterinary Journal**, v.39, n.5, p.470-478, 2007.
- MUTHUKKUMAR, S. et al. The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny. **Journal of Immunology**, v.165, n.9, p.4803-4813, 2000.
- NARREN, J.R. et al. Age-related changes in cytokine expression by neutrophils of foals stimulated with virulent *Rhodococcus equi* in vitro. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.15, n.127, p.212-219, 2009.
- NETEA, M.G. et al. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. **Journal of Leukocyte Biology**, v.75, n.2, p.749-755, 2004.
- OLIVEIRA, A.F. et al. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the vapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. **Microbes and Infection**, v.9, n.3, p.382-390, 2007.
- OLIVEIRA, A.F. et al. Vaccination of mice with *Salmonella* expressing VapA: mucosal and systemic TH1 responses provide protection against *Rhodococcus equi* infection. **Plos One**, v.5, n.1 p.e8644, 2010. Disponível em: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0008644>>. Acesso em: 12 jan. 2011.
- PARGASS, I.S. et al. The influence of age and *Rhodococcus equi* infection on CD1 expression by equine antigen presenting cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.130, n.3-4, p.197-209, 2009.
- PATTON, K. et al. *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. Disponível em: <<http://iai.asm.org/cgi/reprint/73/4/2083>>. Acesso em: 09 jan. 2011. doi: 10.1128/IAI.73.4.2083-2093.2005.
- PERKINS, G.A. et al. Survival of foals with experimentally induced *Rhodococcus equi* infection given either hyperimmune plasma containing *R. equi* antibody or normal equine plasma. **Veterinary Therapeutics**. v.3, n.3, p.334-346. 2002.
- RUKAVINA, D.; PODACK, E.R. Abundant perforin expression at the maternal-fetal interface: guarding the semiallogeneic transplant? **Immunology Today**, v.21, n.4, p.160-163, 2000.
- SHEORAN, A.S. et al. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.61, n.9, p.1099-1105, 2000. Disponível em: <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdfplus/10.2460/ajvr.2000.61.1099>>. Acesso em: 09 jan. 2011. doi: 10.2460/ajvr.2000.61.1099.
- SMOLEN, K.K. et al. Neonatal immunization with *Listeria monocytogenes* induces T cells with an adult-like avidity, sensitivity, and TCR-V repertoire, and does not adversely impact the response to boosting. **Vaccine**, v.28, n.1, p.235-242, 2010.
- SWIDERSKI, C.E. et al. T cell cytokine responses to *Strongylus vulgaris* in infected and vaccinated ponies. In: WERNERY, U. et al. **Equine infectious diseases**. Newmarket: R & W Publications, 1998. p.206-210.
- TAOUI, S. et al. Immunogenicity of syntetic peptides representing linear B-cell epitopes of VapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine**, v.22, n.9-10, p.1114-1123, 2004.
- VANNIASINKAM, T. et al. The immunogenicity of *Rhodococcus equi* GroEL2-based vaccines in a murine model. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.98, n.1-2, p.91-100, 2003.
- VARGA, J. et al. Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. **Veterinary Microbiology**, v.56, n.3-4, p.205-212, 1997.
- VELILLA, P.A. et al. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. **Clinical Immunology**, v.121, n.3, p.251-259, 2006.
- VENNER, M. et al. Efficacy of azithromycin in preventing pulmonary abscesses in foals. **Veterinary Journal**, v.179, n.2, p.301-303, 2009.