

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFECÇÃO POR *Rhodococcus equi* EM POTROS**

**LUIZ GUSTAVO SCHNEIDER DE OLIVEIRA**

**PORTO ALEGRE**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**INFECÇÃO POR *Rhodococcus equi* EM POTROS**

**LUIZ GUSTAVO SCHNEIDER DE OLIVEIRA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de concentração em Cirurgia, Morfologia e Patologia Animal, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (RS).

Orientador: **David Driemeier**

**PORTO ALEGRE**  
**2013**

CIP - Catalogação na Publicação

Oliveira, Luiz Gustavo Schneider  
Infecção por Rhodococcus equi em potros / Luiz  
Gustavo Schneider Oliveira. -- 2013.  
89 f.

Orientador: David Driemeier.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias,  
Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Pneumonia. 2. Imuno-histoquímica. 3. Equinos.  
I. Driemeier, David, orient. II. Título.

LUIZ GUSTAVO SCHNEIDER DE OLIVEIRA

INFECÇÃO POR *Rhodococcus equi* EM POTROS

Aprovado em 25 de fevereiro de 2013

**APROVADO POR:**

---

Prof. Dr. David Driemeier

Orientador e Presidente da Banca

---

Prof. Dr. Aldo Gava

Membro da Banca

---

Prof. Dr. Saulo Petinatti Pavarini

Membro da Banca

---

Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Schild

Membro da Banca

## **AGRADECIMENTOS**

Vai além da capacidade da memória, recordar prontamente de todo o apoio que se recebe na busca da formação. Desde o início do estágio na graduação até a conclusão dessa etapa, vão mais de cinco anos de convivência e aprendizado.

Muito antes da vida profissional, cabe aos pais, Noé e Maria Helena, e aos demais familiares, os méritos de fornecer as bases e os valores que orientam nossa conduta.

Um agradecimento especial aos Professores David Driemeier, Cláudio Cruz, Flademir e Angélica Wouters pela orientação dedicada.

Igualmente agradecidos a Fabiana Boabaid, Tatiane Watanabe, Gabriela Fredo e Suyene Souza pelo auxílio na realização das técnicas imuno-histoquímicas e histoquímicas.

Gratos a Professora Luciana Sonne, Gisele Boos, Paula Almeida e Danilo Gomes e pela correção e edição textual.

Agradecemos ainda a Priscila Guerra pelos exames microbiológicos, a Paulo Bandarra pela ajuda nas coletas de dados e amostras a campo e, ao Professor Saulo Pavarini pela participação no projeto inicial.

Além dos colegas da Universidade, agradecemos à Professora Agueda Vargas e à Letícia Gressler pela realização dos exames de biologia molecular.

## RESUMO

*Rhodococcus equi* é um importante patógeno bacteriano em medicina veterinária, associado, sobretudo, a pneumonias piogranulomatosas em potros no primeiro semestre de vida. São descritos neste trabalho vinte casos de infecção por *R. equi* em potros recebidos para necropsia no Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul entre janeiro de 1997 e janeiro de 2013. Os históricos clínicos obtidos com os veterinários apresentaram grande variabilidade e, mesmo os sinais clássicos de comprometimento respiratório e febre só foram vistos em metade dos casos. Os dados obtidos em uma visita a uma propriedade demonstram que a superpopulação de potros e a introdução de fêmeas no grupo de parição contribuíram para a ocorrência de um surto. Exames de necropsia e de histologia revelaram que pneumonia piogranulomatosa multifocal foi a forma de apresentação mais constante (dezenove casos), seguida por linfadenite piogranulomatosa (dez casos) e tiflocolite piogranulomatosa e ulcerativa (cinco casos). Três animais apresentaram osteomielite piogranulomatosa, dos quais, dois em vértebras. Uveítes e polissinovites assépticas foram constatadas em três casos. Exame imuno-histoquímico anti-*Rhodococcus equi* revelou-se positivo em todos os pulmões com lesões, embora os linfonodos tenham sido positivos em apenas três das nove amostras testadas. O exame bacteriológico das amostras de necropsia foi positivo em quinze casos clínicos, assim como em uma amostra de solo da propriedade visitada. O exame de reação da polimerase em cadeia (PCR) revelou o gene de virulência *VapA* de *R. equi* em todos os isolados clínicos, mas não na amostra de solo. Adicionalmente os pulmões foram testados por imuno-histoquímica para *Pneumocystis* sp.e apresentaram marcação em treze dos vinte casos.

**Palavras chave:** pneumonia, equinos, imuno-histoquímica, *Rhodococcus equi*.

## ***ABSTRACT***

*Rhodococcus equi* is an important bacterial pathogen in veterinary medicine, especially associated with piogranulomatous pneumonia in foals under six months of age. Twenty cases of *R. equi* infection in foals received for necropsy at the Pathology Veterinary Sector (SPV) of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) between January 1997 and January 2013 are described in this paper. Clinical history obtained with veterinary practitioners presented high variability, and even classical respiratory signs and fever were only observed in half of the cases. Data collected in an investigative visiting to a breeding farm showed that the foal superpopulation and the introduction of females to the parturition group contributed to the occurrence of an outbreak. Necropsy and histologic examinations revealed that multifocal piogranulomatous pneumonia was the most constant presentation (nineteen cases), followed by piogranulomatous lymphadenitis (ten cases) and piogranulomatous and ulcerative typhlocolitis (five cases). Three animals presented piogranulomatous osteomyelitis, two of them in vertebrae. Aseptic uveitis and polisynovitis were verified in three cases. Anti-*Rhodococcus equi* immunohistochemical examination stained positive in all lungs containing lesions, although lymphnodes have stained positive in only three of nine samples tested. Bacteriologic examination of the necropsy samples was positive in fifteen cases and in a soil sample from the visited breeding farm. Polymerase chain reaction (PCR) test revealed the *VapA* virulence factor of *R. equi* in all clinical isolates, but not in the soil sample. Additionally, the lungs were tested to the presence of *Pneumocystis* sp. by immunohistochemistry, and stained positive in thirteen of twenty cases.

**Keywords:** pneumonia, equine, immunohistochemistry, *Rhodococcus equi*.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Dados gerais dos equinos necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS acometidos por *Rhodococcus equi*. .....**38**

**Tabela 2:** Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi*. ....**59**

**Tabela 3:** Intensidade e distribuição de marcação de *Pneumocystis* sp. em exame imuno-histoquímico de pulmões de potros acometidos por *Rhodococcus equi*. .....**74**



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Infecção por *R. equi* em potros:** equino Holsteiner, fêmea, dois meses, em bom estado corporal (caso 18). ..... **41**
- Figura 2. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação cárpica com aumento do líquido sinovial, coloração amarelada e perda de viscosidade (caso 18). ..... **41**
- Figura 3. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação tíbio-társica com aumento da quantidade de líquido sinovial de aspecto sanguinolento (caso 13). ..... **42**
- Figura 4. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação tíbio-társica aumentada e fistulada com intensa fibrose e material caseoso (caso 14). ..... **42**
- Figura 5. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com nódulos amarelados de 1 a 5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente (caso 05). ..... **43**
- Figura 6. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com nódulos amarelados de 3 a 10 cm de diâmetro, com distribuição multifocal e área de coalescência em porção crânio-ventral (caso 18). Linfonodo traqueobrônquico moderadamente aumentado. .... **43**
- Figura 7. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com nódulo de consistência firme e aspecto caseoso em superfície de corte. .... **44**
- Figura 8. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com nódulo de consistência flutuante e conteúdo liquefeito. .... **44**
- Figura 9. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte de pulmões demonstrando múltiplos nódulos amarelados com diferentes distribuições: A) distribuição multifocal com nódulos bem delimitados e sem consolidação internodular. B) distribuição multifocal com nódulos bem delimitados, região internodular consolidada e com edema de septos interlobulares. C) distribuição multifocal a coalescente em porção mediastinal; região internodular consolidada e com edema de septos interlobulares. D) distribuição multifocal a coalescente em porção ventral; região internodular consolidada. .... **45**
- Figura 10. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões não colabados, pesados, com impressões das costela e consistência firme (caso 20). ..... **46**
- Figura 11. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões não colabados com nódulo focal de aproximadamente 7 cm de diâmetro sobre a incisura cardíaca do lobo cranial direito; porção cranial consolidada e com nodulações amareladas pouco delimitadas entremeadas. Superfície pleural opacificada na porção dorsal dos lobos diafragmáticos (caso 20). ..... **46**
- Figura 12. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com hemorragia multifocal a coalescente (caso 13). ..... **47**

<b>Figura 13. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: hemorragia e edema difusos na musculatura esquelética e tecido subcutâneo.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 14. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: câmara anterior com deposição de material grumoso amarelado.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 15. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: diafragma abaulado, pneumotórax (caso 18).....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 16. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: bolha de gás sob a pleura do lobo diafragmático esquerdo (caso 18).....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 17. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: pulmões com o parênquima exposto sob a área de enfisema (caso 18).....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 18. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: traqueia com nódulos amarelados, por vezes ulcerados, com cerca de 0,5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente (caso 03).....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 19. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: mucosa esofágica hiperêmica com formação de membrana amarelada e friável na superfície (caso 17).....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 20. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: língua com superfície dorsal e lateral com extensas úlceras lineares profundas (caso 17).....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 21. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: ceco, mucosa com úlceras irregulares multifocais a coalescentes com periferia hiperêmica e deposição de fibrina na superfície (caso 17).....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 22. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: cólon, mucosa com áreas elevadas e bem delimitadas de 0,5 a 2 cm de diâmetro com centro ulcerado (caso 18).....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 23. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: linfonodos cecais e colônicos acentuadamente aumentados e hiperêmicos; mucosa do ceco com úlceras irregulares multifocais a coalescentes recobertas por fibrina (caso 17).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 24. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: linfonodos cecais e colônicos acentuadamente aumentados (caso 06).....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 25. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: linfonodos cecais acentuadamente aumentados; superfície serosa de ceco e cólon com evidenciação dos vasos linfáticos; superfície mucosa com edema intenso e úlceras multifocais de contorno irregular pouco delimitadas (caso 06).....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 26. Infecção por <i>R. equi</i> em potros: coluna vertebral com segunda vértebra lombar de coloração amarelada e consistência friável em superfície de corte; canal medular invadido por material liquefeito e medula espinhal comprimida.....</b>	<b>56</b>

- Figura 27. Infecção por *R. equi* em potros:** potro com aumento cervical delimitado, imediatamente caudal ao ramo esquerdo da mandíbula de consistência macia e contorno esférico (caso 14). .....56
- Figura 28. Infecção por *R. equi* em potros:** abscesso de aproximadamente 20 cm de diâmetro com cápsula incisada, exibindo líquido acastanhado no interior (caso 14). ....57
- Figura 29. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte transversal do atlas exibindo aspecto esbranquiçado e friável da asa esquerda com destruição óssea e formação de cápsula de tecido conjuntivo na região ventro-lateral (caso 14). .....57
- Figura 30. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície pleural da junção costo-condral da terceira costela esquerda com nódulo de cerca de 5 cm de diâmetro e aproximadamente 0,5 cm de elevação (caso 17). .....58
- Figura 31. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte da extremidade esternal da terceira costela esquerda: medular de coloração amarelada e consistência friável. Periferia amarelada e liquefeita. ....58
- Figura 32. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com extensa área de necrose com infiltrado piogranulomatoso focal (seta); área adjacente com atelectasia e abundante infiltrado de neutrófilos e macrófagos (\*). Hematoxilina e eosina (HE), obj. 4x. ....64
- Figura 33. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com abundante infiltrado piogranulomatoso composto por neutrófilos e macrófagos com citoplasma repleto de bactérias (setas) HE, obj. 20x. ....65
- Figura 34. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com inúmeros macrófagos contendo pequenos cocos Gram positivos (setas). Coloração de Brown-Hopps, obj. 40x. ....65
- Figura 35. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com infiltrado piogranulomatoso com célula gigante tipo corpo estranho. Observa-se células degeneradas no citoplasma da célula fagocitária (seta) HE, obj. 40x. ....66
- Figura 36. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com espessamento e mineralização de septos alveolares com infiltrado predominantemente neutrofílico e intensa deposição de fibrina intra-alveolar. HE, obj. 20x. ....67
- Figura 37. Infecção por *R. equi* em potros:** PCR para identificação do gênero *Rhodococcus* e do gene de virulência *VapA*. RG: marcador do gênero. *VapA*: marcador do gene de virulência. CTP: controle positivo; CTN: controle negativo; R504: caso 15; R539: caso 17; R1016: caso 18; R1224: amostra de solo. R900: amostra anatomopatológica não incluída no estudo. Observar as bandas de RG e *VapA* nos controles positivos e a ausência das mesmas nos controles negativos. As amostras de isolamentos de casos clínicos foram todas positivas para os marcadores RG e *VapA*. A

amostra de solo foi positiva apenas para RG, mas não para o marcador de virulência VapA. ....69

**Figura 38. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão, marcação de bactérias no interior de macrófagos e células gigantes. Imuno-histoquímica anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 40x.....70

**Figura 39. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão, marcação de bactérias em macrófagos e células gigantes na periferia da lesão piogranulomatosa. IHQ anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 40x .....71

**Figura 40. Infecção por *R. equi* em potros:** intestino grosso com marcação de bactérias em macrófagos na mucosa e submucosa. IHQ anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 20x.....71

**Figura 41. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com marcação positiva de estruturas ovais de aproximadamente 4 a 8 µm, sobretudo em septos alveolares. Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp.pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno AEC, obj. 20x .....72

**Figura 42. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com marcação positiva de estruturas ovais de aproximadamente 4 a 8 µm, tanto em septos alveolares como no interior de alvéolos. Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp.pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno AEC, obj. 40x. ....73

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>15</b>
2.1. Etiologia .....	15
2.2. Infecção clínica em diferentes espécies .....	15
2.3. Ecologia e epidemiologia .....	17
2.4. Patogenia e patogenicidade .....	19
2.5. Coinfecção por <i>Pneumocystis</i> sp. e <i>Rhodococcus equi</i> .....	21
2.6. Imunidade .....	22
2.7. Sinais clínicos em equinos .....	24
2.8. Diagnóstico .....	27
2.9. Achados patológicos .....	30
2.10. Tratamento .....	31
2.11. Prevenção .....	33
<b>3. Material e Métodos</b> .....	<b>34</b>
3.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos .....	34
3.2. Patologia macroscópica .....	34
3.3. Bacteriologia .....	34
3.4. Estudo molecular (PCR) .....	35
3.5. Histopatologia .....	35
3.6. Imuno-histoquímica (IHQ) .....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1. Epidemiologia .....	37
4.2. Sinais clínicos .....	40
4.3. Achados de necropsia .....	40
4.4. Histopatologia .....	64
4.5. Exames microbiológicos .....	68

<b>4.6. PCR.....</b>	<b>69</b>
<b>4.7. Exames imuno-histoquímicos.....</b>	<b>70</b>
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>82</b>

## 1. INTRODUÇÃO

*Rhodococcus equi* foi descrito pela primeira vez por Magnusson no sul da Suécia no ano de 1923, causando pneumonia piogranulomatosa em potros (PRESCOTT, 1991). Subsequentemente foi isolado de potros na Austrália, Estados Unidos e Índia, assim como de suínos, bovinos, búfalos e ovinos (WEINSTOCK; BROWN, 2002). Em seres humanos, apesar de já haver sido isolado em 1967, a infecção só tornou-se frequente a partir da disseminação do vírus da AIDS na década de 1980 (PRESCOTT, 1991).

Atualmente é reconhecido em todo o mundo como um dos agentes patogênicos mais importantes em potros entre um e seis meses de idade (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). No Brasil, apesar da carência de dados a enfermidade é assinalada como uma das doenças de maior impacto na criação de equinos (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011a,b).

No Rio Grande do Sul a soropidemiologia revela alta prevalência de anticorpos anti *R. equi* em potros provenientes de haras que não apresentam doença (LAZZARI et al., 1997). Um estudo das lesões associadas com a morte de equinos recebidos para necropsia em um laboratório de Patologia Veterinária do Rio Grande do Sul revelou que em quatro décadas, de 335 casos analisados, apenas três possuíam diagnóstico de infecção por *R. equi* (PIEREZAN et al. 2009b).

A manifestação mais frequente em equinos consiste em broncopneumonia piogranulomatosa, frequentemente associada à enterocolite ulcerativa (CASWELL; WILLIAMS, 2007; ZINK; YAGER; SMART, 1986). Pneumonias são as causas mais importantes de morbidade e mortalidade em potros a partir de um mês de vida e *R. equi* encontra-se no rol das entidades nosológicas do trato respiratório inferior dessa faixa etária (PARADIS, 2006).

Dada a importância do agente na equinocultura, que adquire importância no cenário nacional, torna-se crucial reconhecer com clareza os sinais, as lesões e os fatores predisponentes da enfermidade. Somado a isso, a crescente importância do agente em saúde pública reforça a necessidade de melhor compreendê-lo (PRESCOTT, 1991).

O objetivo deste trabalho é descrever lesões macroscópicas, microscópicas e dados clínicos de potros infectados por *R. equi* e demonstrar o agente nas lesões por meio de exame imuno-histoquímico. Aliado a isso, buscou-se por diferentes métodos outros patógenos associados.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Etiologia

Previamente denominado *Corynebacterium equi*, a bactéria *Rhodococcus equi* é um cocobacilo Gram positivo de distribuição mundial que possui metabolismo aeróbico e hábito saprofítico no solo (QUINN et al., 2011). Fisiologicamente é adaptado ao solo tão bem quanto ao trato gastrointestinal de animais herbívoros, realizando infecções oportunistas em animais suscetíveis (BARTON, 1984).

O gênero *Rhodococcus* possui doze espécies, das quais quatro já foram isoladas em casos clínicos, porém a que possui maior potencial patogênico é *R. equi*. Pertencente à ordem *Actinomycetales*, em que estão classificadas as bactérias do gênero *Mycobacterium*, possui em comum propriedade serem álcool-ácido resistentes, habilidade de crescimento intra-celular e de produzir lesões pulmonares (QUINN et al., 2011).

Em relação mais estreita com bactérias de importância em medicina veterinária, estão os gêneros *Corynebacterium* e *Nocardia*. Dentro do gênero há, ainda, um fitopatógeno denominado *Rhodococcus fascians*, que causa um tipo de galha que afeta as folhas de uma ampla variedade de vegetais, entre os quais, o tabaco (GOETHALS et al. 2001).

É identificado pelo crescimento em meios não enriquecidos e formação de colônias mucoides de cor salmão, que indicam a produção de cápsula e pigmento. A última característica lhe valeu o nome genérico, que significa coco de cor vermelha (GOODFELLOW; ALDERSON, 1977). Porém na sua morfologia há certo pleomorfismo, que varia de cocoide a bastonete de até 5µm de comprimento, de acordo com a cepa (QUINN et al. 2011).

### 2.2. Infecção clínica em diferentes espécies

Diferente do que ocorre em potros, em que a infecção pulmonar por *R. equi* representa a causa mais importante de pneumonia, os equinos adultos raramente são acometidos pela enfermidade, que ocorre, geralmente devido à imunossupressão ou outra doença concomitante (GIGUÈRE PRESCOTT, 1997; LÉGUILLETTE; ROY; LAVOIE, 2002; VENGUST; STÆMPFLI; PRESCOTT, 2002; YAGER 1987; ZINK; YAGER; SMART, 1986). Das outras espécies domésticas, apenas no suíno a infecção por *R. equi* pode ser considerada comum (PRESCOTT, 1991). Em um estudo conduzido



na Holanda com suínos ao abate, foi possível isolar *R. equi* em 44 de 98 (44.9%) animais com linfadenite cervical, constituindo assim um diagnóstico diferencial de linfadenites por *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (KOMIJN et al., 2007).

Em caprinos a infecção por *R. equi* foi registrada no Rio Grande do Sul, caracterizada por nódulos de conteúdo caseoso de aproximadamente 5 cm de diâmetro no fígado e pulmões, que recordavam lesões ocasionadas por *Corynebacterium pseudotuberculosis* (DAVIS et al., 1999; SANTOS et al., 2007). Em ovinos o agente foi encontrado em uma ocasião associado à pneumonia (PRECOTT, 1991). No caso de bovinos, conforme constatado durante uma campanha de erradicação da tuberculose bovina na Austrália, a infecção por *R. equi* pode mimetizar as lesões de tuberculose (MCKENZIE; DONALD, 1979).

Apesar de raros, os casos de infecção por *R. equi*, tanto em felinos como em caninos, têm sido relatados com frequência crescente e cursam, sobretudo com lesões extrapulmonares (FAIRLEY; FARILEY, 1998; TAKAI et al. 2003). Em dromedários (*Camelus dromedarius*) foi constatada infecção disseminada em indivíduos adultos com lesões caseosas (KINNE et al., 2010) semelhantes às encontradas em uma lhama (*Lama glama*) adulta com linfadenite necrótica (HONG; DONAHUE, 1995).

Outras espécies com relatos raros ou esporádicos incluem bubalinos com mastites e piometras; foca do Baikal (*Pusa sibirica*) com abscessos pulmonares e linfadenite (BAUWENS et al, 1987); sagui-de-cabeça-branca (*Saguinus oedipus*) com broncopneumonia piogranulomatosa; coala (*Phascolarctos cinereus*) com rinite purulenta e pneumonia; crocodilianos com bacteremia fulminante, entre outros (PRESCOTT, 1991).

Em seres humanos a infecção por *R. equi* é rara, mas adquiriu reputação como importante agente causador de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos (PRESCOTT, 1991; WEINSTOCK; BROWN, 2002). A emergência do micro-organismo em medicina humana está claramente associada com a infecção pelo vírus HIV, porém outros fatores são reconhecidos, como a concorrência de tumores hemolinfáticos, transplantes renais, corticoterapia, entre outros (PRESCOTT, 1991).

### 2.3. Ecologia e epidemiologia

A relação natural existente entre *R. equi*, os animais hospedeiros e o solo foi sugerida em investigações com animais de vida livre na África e na Ásia. Os resultados sugeriram que o micro-organismo estava presente no trato digestório de equídeos e outros herbívoros selvagens, bem como no seu ambiente, sem causar doença. Em algumas ocasiões o micro-organismo estava ausente e, em outras, não exibiu seu fator de virulência (TAKAI et al., 2004a,b). Animais domésticos também podem ser portadores de *R. equi*, como pode ser constatado nas fezes de equinos e bovinos, nos linfonodos submandibulares de suínos, assim como no solo de instalações de criação (TAKAI; TSUBAKI, 1985)

A ocorrência da doença em potros é endêmica em algumas propriedades e esporádica em outras e varia entre zero e 100% dos animais nascidos em uma temporada. Em propriedades endêmicas a porcentagem de potros afetados pode variar de 13% a 25%, enquanto a letalidade fica entre zero e 30% (HINES, 2007). Aparentemente, tal discrepância ocorre devido a diferenças na concentração de potros na propriedade, ao manejo realizado e a fatores ambientais, como temperatura, excesso de poeira, pH do solo, assim como uma alta proporção de amostras virulentas de *R. equi* no local (MEIJER; PRESCOTT, 2004).

O uso prolongado de determinada área para a cria de potros aumenta a contaminação por *R. equi*, devido ao fornecimento progressivo de nutrientes necessários a seu crescimento. Além disso, as temperaturas da temporada de parição são as mais elevadas do ano e propiciam o incremento na proliferação do agente. Finalmente, o intestino de potros entre 8 e 12 semanas de idade fornece condições mais propícias para o crescimento de *R. equi* quando comparado ao ambiente altamente anaeróbio do intestino de equinos adultos, fazendo com que os potros sejam os maiores disseminadores do agente no ambiente (TAKAI et al., 1986; PRESCOTT, 1987).

A concentração de equinos na propriedade correlaciona-se com a contaminação ambiental, pois as fezes contêm o micro-organismo e fornecem os ácidos orgânicos voláteis que potencializam seu crescimento no solo (MEIJER; PRESCOTT, 2004). Verões secos e quentes, sobretudo em piquetes com escassa cobertura vegetal, apresentam as condições adequadas para *R. equi* multiplicar-se e disseminar-se com a poeira (MEIJER; PRESCOTT, 2004, QUINN et al., 2011). Em humanos descreve-se,

também, maior ocorrência em trabalhadores rurais envolvidos com criação de animais ou com manejo de seus dejetos (PRESCOTT, 1991).

Experimentalmente a detecção de amostras virulentas de *R. equi* é 17,3 vezes maior no ar empoeirado de estábulos quando comparado ao ar de ambientes externos de clima temperado e úmido, o que comprova que a inalação é o principal meio de infecção pulmonar (MUSCATELLO et al., 2006). Foi comprovado também o contágio do agente por aerossóis provenientes do trato respiratório de potros com ou sem sinais clínicos (MUSCATELLO et al., 2007).

Na infecção oral com pequenas doses, pode haver colonização entérica sem sinais clínicos e, a partir de dois a três meses de idade a estimulação linfocitária confere resistência ao agente em equinos adultos (HONDALUS, 1997; JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983b). O ciclo fecal-oral de *R. equi* implica na contaminação progressiva e insidiosa do ambiente, que é irrelevante enquanto o organismo permanece no solo, incapaz de ser inalado (MUSCATELLO et al., 2007).

A população de potros determina contaminação de escala muito superior à de equinos adultos, uma vez que excretam entre 1000 e 10000 unidades formadoras de colônias (ufc) de *R. equi* por grama de fezes, com 10% a 40% das colônias compostas por micro-organismo virulentos, frente à excreção de 100 a 1000 ufc/g de fezes com menos de 10% de colônias virulentas pelos equinos adultos. Potros com pneumonia por *R. equi* podem eliminar  $10^8$  ufc do agente por grama de fezes sendo até 80% da amostra virulenta (MUSCATELLO et al., 2007).

No que diz respeito aos fatores intrínsecos ao hospedeiro que o tornam suscetível à infecção, foram realizadas investigações com resultados pouco definitivos, como a subpopulação de linfócitos que predomina em animais afetados e não afetados (HINES, 2007). Aparentemente a proporção menor que 3.0 na relação de linfócitos CD4/CD8 e menor contagem de neutrófilos segmentados determina maior suscetibilidade à infecção (CHAFFIN et al., 2004).

Em um experimento, potros enfermos possuíam maior concentração absoluta e relativa de linfócitos B quando comparados com animais sãos de mesma idade (FLAMINIO; RUSH; SCHUMAN, 1999). Outro trabalho demonstrou que a infecção por Herpesvírus Equino tipo 2 (EHV-2) também pode predispor potros à infecção pulmonar por *R. equi* (NORDENGRAHN, 1996).

## 2.4. Patogenia e patogenicidade

Em 1991, a descoberta de um antígeno expresso por um gene plasmidial de *R. equi* revolucionou a concepção da doença. A existência do antígeno, uma proteína de superfície de 15 a 17 kDa, demonstrou ser determinante de patogenicidade em camundongos e potros. Investigações a respeito da expressão antigênica revelaram que a mesma era maximizada em pH baixo (6,5) em temperaturas mais elevadas (34° a 41°C) e impedida em temperaturas mais baixas (25° a 32°) (TAKAI et al., 1991a; TAKAI et al., 1991b; TAKAI et al., 1992; MEIJER; PRESCOTT, 2004).

O antígeno descoberto na ocasião recebeu posteriormente a denominação de VapA, da sigla inglesa para proteína virulência-associada (TAN et al., 1995). O gene homônimo *VapA* é responsável pela sua expressão e é considerado, juntamente com o plasmídeo que o porta, altamente associado com a doença em potros. Outros antígenos expressos por genes da mesma família foram identificados desde então, totalizando nove, identificados pelas letras A até I (MONEGO et al., 2009). Os genes *VapA* e *VapB* são auto-excludentes, porém os demais (C, D, E, F, G e H) podem combinar-se de diferentes maneiras entre si, normalmente acompanhados por *VapA* ou *VapB* na mesma amostra (MONEGO, 2008; MONEGO et al, 2009).

A expressão diferenciada de genes reflete-se no grau de virulência das amostras, conforme testado em camundongos. *R. equi* portador do antígeno VapA, isolado com frequência em amostras de equinos, apresenta o maior índice de virulência testado por bioensaio. As amostras isoladas em linfonodos de suínos com ou sem linfadenite caseosa, por outro lado, portam o antígeno VapB, de virulência intermediária em aproximadamente 60% dos casos, sendo negativas para VapB e VapA nos restantes (MONEGO, 2009; PATE et al, 2004; TAKAI, et al., 1996a; TKACHUK-SAAD; PRESCOTT, 1991). Em humanos há registros de isolamento de amostras contendo tanto VapA como VapB ou mesmo sem qualquer gene de virulência (BYRNE et al., 2001; MONEGO, 2009; TAKAI, 1994; TAKAI, 1996; TAKAI et al., 2002).

A proteína VapA, codificada pelo plasmídeo de mesmo nome, confere ao micro-organismo a propriedade de sobreviver e proliferar no interior de macrófagos alveolares (GIGUÈRE et al., 1999; HONDALUS; MOSSER, 1994). Com o avanço da doença, há destruição do parênquima pulmonar com persistência de macrófagos intra-lesionais repletos de *R. equi* (HONDALUS, 1997). Na mucosa entérica, em placas de Peyer e

demais agregados linfoides, há macrófagos contendo *R. equi* em meio à reação piogranulomatosa e necrose linfoide (BROWN; BAKER; BARKER, 2007).

Foi demonstrado experimentalmente que na opsonização com anticorpos anticapsulares, houve aumento significativo da fusão fagolisossomal com eliminação das bactérias em macrófagos alveolares. Além disso, foi comprovado que os macrófagos de equinos não expostos foram capazes de fagocitar, mas não eliminar as bactérias infectantes em seis horas, em mais de 65% dos casos. Por outro lado, potros sensibilizados pelo micro-organismo foram capazes de eliminar mais de 95% da carga infectante no mesmo período. Ainda o mesmo experimento demonstrou que fatores derivados de linfócitos sensibilizados foram responsáveis pelo aumento de 50% da atividade em macrófagos não expostos ao micro-organismo, e de 100% em macrófagos expostos (HIETALA; ARDANS, 1987).

Há infiltrado de numerosas células inflamatórias com numerosos macrófagos, culminando com a formação de granuloma. Apesar do efeito benéfico de conter o agente, a reação granulomatosa age de forma possibilita a perpetuação da infecção e disseminação para hospedeiros suscetíveis (FLYNN; CHAN, 2005).

Compatível com sua classificação junto a bactérias dos gêneros *Mycobacterium* e *Brucella*, que são patógenos intra-celulares, *R. equi* é suscetível à fagocitose por células polimorfonucleares, entretanto, sua residência no interior de fagossomos de macrófagos impede o acesso de componentes do sistema imune, como proteínas do sistema complemento e anticorpos (ELLENBERGER; KAEBERLE; ROTH, 1984).

A partir dos pulmões o agente pode ganhar acesso ao trato gastrintestinal pela deglutição de secreção respiratória contaminada. Aproximadamente metade dos casos de pneumonia por *R. equi* cursa com enterocolite ulcerativa, enquanto que lesões entéricas sem lesões pulmonares ocorrem com pouca frequência (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a; ZINK; YAGER; SMART, 1986).

A infecção da mucosa entérica tem origem nas placas de Peyer e demais agregados linfoides entéricos por meio das células M e ocasiona reação piogranulomatosa dos agregados da mucosa e de linfonodos mesentéricos (GELBERG, 2012; HONDALUS, 1997). Em casos com lesões entéricas, existe uma correlação direta entre a carga infecciosa e o desenvolvimento de enterite piogranulomatosa, pois a reprodução experimental da infecção entérica necessita inoculação oral repetida (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983b).

*R. equi* também pode disseminar-se por via septicêmica para outros locais, ocasionando serosites, osteomielites, artrites sépticas, abscessos renais, hipópio e outras lesões. Alguns casos de linfangite ulcerativa, celulite piogranulomatosa e abscessos subcutâneos estão relacionados com migração transcutânea de *Strongyloides westeri* (HINES, 2007; GIGUÈRE; PRESCOTT 1997). Placentites e abortos também são descritos na espécie, porém com frequência pouco representativa da ubiquidade do organismo no ambiente (SZEREDI, 2006).

A polissinovite asséptica é uma lesão decorrente de reação imunomediada que pode ser constatada em aproximadamente um terço dos casos, especialmente nas articulações túbio-társica e fêmuro-túbio-patelar. A resposta inflamatória observada consiste em infiltrado linfo-plasmocitário com efusão abundante intra-articular. Há nesses casos marcação da porção Fc de anticorpos equinos na região perivascular da membrana sinovial em exame de imunofluorescência (SWEENEY; SWEENEY; DIVERS, 1987; GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Enquadram-se na mesma categoria patogênica, os casos de uveíte imunomediada (CHAFFIN; MARTENS, 1997; HEIDMANN; MADIGAN; WATSON, 2006).

### **2.5. Coinfecção por *Pneumocystis* sp. e *Rhodococcus equi***

A infecção por *Pneumocystis* sp. é uma das causas de pneumonia intersticial em medicina veterinária em que há dano alveolar com perda de função da unidade alveolo-capilar. Em equinos a infecção é considerada rara e está relacionada, na maior parte dos casos com potros árabes acometidos por imunodeficiência combinada severa ou com potros recebendo tratamentos imunossupressivos, normalmente associada com infecção por adenovírus ou bactérias oportunistas (PERRON LEPAGE; GERBER; SUTER, 1999).

Há também menção de *Rhodococcus equi* como agente imunossupressor envolvido na ocorrência de pneumonia micótica por *Pneumocystis* sp. (PERRON LEPAGE; GERBER; SUTER, 1999). Entretanto não está esclarecido qual a frequência em que os agentes estão associados em doenças respiratórias de potros, embora se saiba em diferentes espécies de animais que a infecção pelo fungo está associada com diversos outros eventos imunossupressivos, como demodicose e cinomose em cães e síndrome respiratória e reprodutiva suína e circovirose em suínos (CASWELL; WILIAMS, 2007).

Mais de dez por cento dos humanos alberga *Pneumocystis* sp., que se torna um patógeno oportunista quando a imunidade do indivíduo é comprometida. A infecção ocorre associada com outras enfermidades, como nocardiose, actinomicose, aspergilose, criptococose e infecção por citomegalovírus, assim como vários tipos de leucemia. Crianças prematuras, pacientes debilitados ou recebendo terapia imunossupressiva e, sobretudo pessoas com síndrome da imunodeficiência adquirida são candidatos a sofrer de criptococose (RENSBURG, 2004).

Existe a suspeita de que animais, especialmente os cães possam servir de reservatório da infecção por *Pneumocystis* sp. para humanos, que é contraída por inalação do agente por um indivíduo suscetível a partir de um hospedeiro acometido (RENSBURG, 2004).

Em medicina veterinária a enfermidade causada por *Pneumocystis* sp. pode ter apresentação insidiosa e curso lento, porém eventualmente pode ocorrer de forma súbita. Os principais sinais são tosse não produtiva, taquipneia, dispneia e taquicardia, além de ligeira elevação de temperatura, leucocitose e leve eosinofilia (RENSBURG, 2004).

Macroscopicamente os pulmões de potros acometidos por pneumocistose apresentam-se firmes, vermelho-escuros e úmidos. As alterações das paredes alveolares derivam da proliferação de pneumócitos tipo 2 e a luz alveolar há deposição de fluido celular acidófilo. O fluido de edema com acúmulo de núcleos cariorréticos, neutrófilos e células gigantes preenchendo os alvéolos dá origem ao aspecto de favos de mel observado na microscopia (LONG, 2007).

Impregnação das paredes císticas por prata com métodos como a coloração de prata metenamina de Gomori pode auxiliar no diagnóstico histológico, assim como o uso do ácido peródico de Schiff, que acentua o aspecto espumoso intra-alveolar derivado da coloração das paredes do micro-organismo espaçadas pelo exsudato de permeio (RENSBURG, 2004).

## **2.6. Imunidade**

Se por um lado a consecução de uma exposição a *R. equi* é determinada pela dose e virulência do inoculo, por outro a resposta imune do hospedeiro merece a mesma atenção. Partindo da premissa que virtualmente todos os potros são expostos ao agente e que a maioria não desenvolve sinais clínicos, somado ao fato que equinos adultos

possuem imunidade protetora, surge a questão de qual o mecanismo imunológico que permite aos animais sublevar a infecção e tornarem-se imunes (HINES, 2007).

É importante a compreensão de que se o macrófago não ativado representa a residência para *R. equi*, a forma ativada é decisiva para a eliminação do micro-organismo. A produção de interferon gama por linfócitos Th1 e seu papel chave no incremento respiratório e produção de radicais de oxigênio e nitrogênio por macrófagos, demonstra a necessidade de interações celulares complexas no combate efetivo ao agente (DARRAH et al., 2000). Neutrófilos cumprem um papel importante na eliminação precoce do micro-organismo como comprovado experimentalmente em camundongos com deficiência induzida de neutrófilos que apresentaram concentração bacteriana e severidade da doença aumentadas (MARTENS et al., 2005).

A resposta mediada por anticorpos é considerada peça chave no combate à infecção bacteriana do trato respiratório de potros, havendo menção à deficiência de imunoglobulinas gerada pelo atraso na aquisição de resposta ativa após o declínio dos níveis de anticorpos maternos (PARADIS, 2006). A evidenciação de anticorpos ao antígeno de virulência de *R. equi* na maioria dos potros aos três meses de vida reforça o papel da imunidade adquirida (TAKAI et al., 1996b).

Plasma hiperimune é capaz de prevenir ou reduzir a severidade das lesões induzidas por *R. equi* em potros infectados natural ou experimentalmente segundo diversas pesquisas (HINES, 2007). O colostro de éguas vacinadas para *R. equi*, por sua vez, não confere proteção de mesma ordem que o plasma hiperimune, provavelmente devido à ausência de diversos componentes plasmáticos da resposta imune, como proteínas do sistema complemento (PERKINS et al., 2001).

A resposta celular é indubitavelmente importante na eliminação de patógenos intra-celulares como *R. equi*, sobretudo linfócitos T CD4+, como comprovado experimentalmente. Camundongos transgênicos deficientes em linfócitos T CD8+ foram capazes de eliminar a infecção, ao passo que aqueles deficientes em linfócitos T CD4+ foram incapazes de eliminá-la (KANALY; HINES; PALMER, 1993). O que não destitui de importância a atividade de linfócitos T CD8+ em associação com os demais componentes celulares, já que, à semelhança do que ocorre com *Mycobacterium tuberculosis*, esse grupo de linfócitos realiza a lise dos macrófagos infectados (CANADAY et al., 2001)

Analisando mais profundamente as células e os mediadores envolvidos na infecção, constatou-se que a sub-população Th1 dos linfócitos T CD4+ secreta interferon



gama, ativador de macrófagos e é efetiva em eliminar a infecção. Enquanto Th2, secretor de IL-4 promove a formação de granuloma com predomínio de eosinófilos e é incapaz de eliminar o agente (KANALY; HINES; PALMER, 1995).

## 2.7. Sinais clínicos em equinos

Em potros, a forma de apresentação mais frequente consiste em broncopneumonia supurativa crônica com massiva abscedação acompanhada de linfadenite supurativa (GIGUÈRE; PRESCOTT 1997; ZINK; YAGER; SMART, 1986). Na prática clínica, o abundante exsudato muco-purulento nas vias respiratórias confere à respiração o estertor característico referido como “chocalhar” em inglês (MUSCATELLO, 2007). Em casos crônicos pode haver tosse, respiração laboriosa e crepitação húmida à ausculta, por vezes associados com falha no desenvolvimento e, frequentemente sem sinais de febre (RADOSTITS et al., 2005).

A difusão lenta da lesão associada com a capacidade do animal em compensar a progressiva perda de área pulmonar viável dificulta o diagnóstico precoce da infecção pulmonar. Em estágios precoces sinais brandos de taquipnéia e febre muitas vezes não se fazem notar, o que permite que a enfermidade progrida, gerando um quadro crônico agudizado, com sinais e lesões severas (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Em casos com curso agudo os potros podem ser encontrados mortos ou com dispneia intensa e febre alta. Tais casos possuem prognóstico reservado (HINES, 2007).

Junto com a infecção por *R. equi*, as enfermidades respiratórias mais frequentes em potros a partir de um mês incluem a “doença do trato respiratório indiferenciada”, a infecção por *Pneumocystis* sp.e a “pneumonia broncointersticial atípica” (PARADIS, 2006). Além disso a infecção por *R. equi* pode vir acompanhada de outros patógenos, como *Pneumocystis* sp.(HINES, 2007). Na espécie equina a pneumonia por esse eucarioto, quando não associada com casos de imunodeficiência combinada da raça árabe, concorre com infecção por outros agentes em metade dos casos (PARADIS, 2002).

Nos casos de infecção entérica, os sinais clínicos podem incluir febre, depressão, anorexia, perda de peso, cólica e diarreia (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997; ZINK; YAGER; SMART, 1986). Obstrução linfática severa do trato gastrintestinal, associada com aumento da concentração proteica do fluido peritoneal e hipoproteinemia, podem desencadear ascite e conferir ao potro abdômen de aspecto pendular. O prognóstico

nesses casos é desfavorável, devido à extensa colite e linfadenite piogranulomatosas (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Claudicação leve e andar enrijecido podem ser indicativos de polissinovite reativa, no entanto, muitos casos não apresentam qualquer alteração de marcha e pouca efusão articular. Embora com frequência seja clinicamente pouco expressiva, a lesão ocorre em muitos animais com infecção pulmonar por *R. equi*, e sua constatação em potros entre um e seis meses é altamente indicativa da infecção pelo micro-organismo (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997; RIBEIRO et al., 2002).

Clinicamente, o grau de claudicação distingue artrite séptica da forma imunomediada, já que a primeira normalmente mostra-se mais acentuada. Casos de osteomielite por *R. equi* também podem cursar com claudicação e aumento de volume local, eventualmente ocasionando artrite séptica ou celulite por contiguidade. Sinais precoces de osteomielite vertebral, por sua vez, podem restringir-se a febre, letargia, andar rígido, relutância em se mover e resistência à palpação. O diagnóstico da lesão, no entanto, muitas vezes só ocorre quando há invasão do espaço epidural com compressão da medula ou nervos (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Em um estudo sobre apresentação clínico patológica extra-pulmonar da infecção por *R. equi*, de 61 animais selecionados com a enfermidade, observou-se polissinovite reativa em 30%, linfadenite abdominal em 28%, diarreia em 21%, tiflíte ou enterocolite em 16%, abscessos periféricos em 15%, uveíte ou queratouveíte em 11%, linfadenite mediastínica em 10%, hipertermia decorrente do uso de eritromicina e rifampicina em 10%, osteomielite e sinovite séptica, ambas em 6,5%, piogranuloma hepático e peritonite, ambas em 5% (CHAFFIN; MARTENS, 1997).

Com menos de 3% cada, foram vistos no mesmo estudo anemia hemolítica imuno-mediada, pericardite, efusão pleural, empiema de bolsas guturais, acometimento neurológico, laringite piogranulomatosa, dermatite piogranulomatosa, sinusite séptica, eflúvio, pielonefrite, hiperlipemia e trombocitopenia imunomediada (CHAFFIN; MARTENS, 1997). Além desses, são relatados casos de linfangite ulcerativa, celulite piogranulomatosa, abscessos subcutâneos, panoftalmite, nefrite e abscessos renais (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Em equinos adultos, embora seja rara, a enfermidade pode sobrevir com apresentação clínica semelhante à descrita em potros, envolvendo pulmões, cólon e linfonodos associados, ou, com menor frequência, infecção de ferimentos (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). Foi sugerido que em casos letais de infecção por *R. equi* em

equinos adultos, haja imunodeficiência semelhante ao que ocorre em humanos (ZINK; YAGER; SMART, 1986). Em um caso de septicemia e pneumonia abscedativa em um equino adulto foi constatada imunodeficiência combinada de origem desconhecida (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Diversos casos de aborto equino com isolamento de *R. equi* de pulmões e estômagos de fetos, assim como de vias de parição de éguas em período pós-parto são descritos. No entanto, o agente não é considerado uma causa comum de aborto nessa espécie e nem há correlação entre a infecção genital da mãe com infecção do potro (ZINK; YAGER; SMART, 1986). À semelhança do que ocorre em potros, a infecção fetal é ocasionada por amostras de *R. equi* portadoras VapA que incita resposta inflamatória piogranulomatosa a partir dos seis meses de gestação (SZEREDI et al., 2006). Placentite piogranulomatosa associada com lesões fetais também já foi descrita em infecções por *R. equi* (PATERSON-KANE; DONAHUE; HARRISON, 2002). Em um estudo com 343 casos de aborto equino, apenas em dois foi constatado *R. equi* como agente causal (SZEREDI et al., 2006).

O primeiro caso de aborto equino com isolamento de *R. equi* acompanhado de lesões características de pneumonia piogranulomatosa demonstra de maneira definitiva o papel do micro-organismo como causa de aborto. A constatação do agente exclusivamente em pulmões e estômago do feto sugere que o líquido amniótico seja a provável porta de entrada. Embora essa propriedade não apresentasse outros casos concomitantes da enfermidade, anos antes a égua fora acometida. Com isso soma-se à hipótese de infecção trans-cervical a possibilidade de um nódulo remanescente da doença clínica ter servido de abrigo para o micro-organismo até o momento da gestação (FITZGERALD; YAMINI, 1995).

Diagnóstico diferencial da apresentação pulmonar deve incluir pneumonia intersticial de causa viral ou indeterminada, imunodeficiência combinada de potros árabes, infecção respiratória por *Streptococcus zooepidemicus*, pneumonia parasitária por migração de larvas de *Parascaris equorum* e pneumonia por *Pneumocystis* sp. (RADOSTITIS et al., 2007). Causas de diarreia em equinos da mesma faixa etária esperada para *R. equi* são parasitismo por ciatostomíneos, infecção por *Salmonella* spp. e diarreia induzida por antimicrobianos (PIEREZAN et al., 2009a; RADOSTITIS et al., 2007). A sinovite asséptica associada a lesões pulmonares de *R. equi* deve ser diferenciada de sinovites sépticas por *S. zooepidemicus*, *Salmonella* spp., do próprio *R. equi* entre outras bactérias (RADOSTITIS et al., 2007).

O prognóstico desportivo para animais acometidos que se recuperam da infecção é de diminuição da chance de competir em relação à população geral. Entretanto o desempenho dos animais quando adultos é similar para animais que contraíram infecção pulmonar por *R. equi* enquanto jovens comparado com os que não contraíram (RADOSTIS et al., 2007).

## 2.8. Diagnóstico

O diagnóstico precoce é preconizado para o sucesso no tratamento da infecção por *R. equi*, que não é responsivo aos antimicrobianos utilizados no combate de outros agentes causadores de pneumonia. Além disso, é importante reduzir o estresse da manipulação excessiva ao exame clínico, para evitar a queda de imunidade predisponha os potros à pneumonia (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011a,b).

Contagem completa de células sanguíneas, concentração de fibrinogênio e proteínas plasmáticas devem ser realizados sempre que haja suspeita de pneumonia por *R. equi*. Radiografia e testes sorológicos auxiliam na detecção de lesões pulmonares e na discriminação da enfermidade, respectivamente. O diagnóstico clínico definitivo, entretanto é firmado por meio de exame citológico e cultivo bacteriano de secreção respiratória (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Há evidência experimental de que entre as diferentes causas de pneumonia abscedativa em potros, a que demonstra aumento mais expressivo na concentração de fibrinogênio plasmático e de leucócitos totais é a causada por *R. equi*. Com raras exceções, a hiperfibrinogenemia é o achado mais consistente, além disso, neutrofilia com ou sem monocitose também são frequentes. A sobreposição de resultados, entretanto, tornam esses exames pouco definitivos para animais individuais (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Em relação aos exames hematológicos, a concentração de leucócitos acima de 13000 células por  $\mu\text{L}$  possui sensibilidade de 95% e especificidade de 61% para pneumonia por *R. equi*. A concentração plasmática de fibrinogênio é menos útil na detecção de pneumonia por *R. equi*, e possui 91% de sensibilidade e 51% de especificidade quando a concentração é de 400 mg/dL, enquanto que com valores de 600 mg/dL a sensibilidade é de 38% e a especificidade de 96% (RADOSTITS et al., 2007). Além disso, o nível de amiloide A sérico foi citado como parâmetro útil para determinação de melhora no tratamento para *R. equi*, por responder mais prontamente que os demais parâmetros (HULTÉN; DEMMERS, 2002).

A contagem de células sanguíneas totais permite simultaneamente a avaliação do estado de hidratação e do estado imunitário do animal. Linfopenia persistente, de menos que  $1,0 \times 10^9$  linfócitos por litro de sangue, especialmente em potros árabes, pode ser indicativo de imunodeficiência combinada equina e requer mais exames para firmar o diagnóstico. Também é citado que trombocitose pode estar associada com infecção por *R. equi*, porém a informação não se repete na literatura (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Testes sorológicos, como a imunodifusão radial e o ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) possuem valor limitado para a detecção da infecção clínica, uma vez que os anticorpos estão difundidos na população equina e não representam necessariamente enfermidade (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011a,b). Apesar da baixa sensibilidade e especificidade dos exames sorológicos para *R. equi*, a detecção dos níveis populacionais de anticorpos podem fornecer dados importantes sobre o nível de exposição de uma propriedade. Entretanto para o diagnóstico individual os exames podem resultar em sobre-estimação de diagnósticos positivos, e, ao mesmo tempo um retardo no diagnóstico de casos verdadeiros (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). O exame de imunodifusão em ágar gel (AGID), utilizado como teste de triagem de rebanhos demonstrou sensibilidade de 62,5 % e especificidade de 75,9% (SELLON et al., 2001).

Radiografia torácica pode ser útil na determinação da severidade e na avaliação da resposta ao tratamento. Padrão alveolar evidenciado, caracterizado por áreas mal definidas de consolidação focal, são as alterações radiográficas mais frequentes. Áreas nodulares mais bem definidas, por vezes com cavitação central, são indicativas de abscedação, que deve ser diferenciada de pneumonia abscedativa por outros agentes, como *Streptococcus zooepidemicus*, especialmente em potros com mais de três meses de idade (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Linfadenopatia mediastinal, evidenciada radiograficamente por nodulações que deslocam a traqueia dorsalmente, pode ser útil na determinação prognóstica, já que consiste em um achado frequente em animais que não se recuperam. Embora as alterações radiológicas tendam a ser mais severas em potros que evoluem para a morte, há casos em que lesões acentuadas são vistas em animais que se recuperam e, portanto, a radiografia não deve ser utilizada como único critério para a realização de eutanásia (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Em um estudo comparativo entre métodos de diagnóstico de pneumonia causada por *R. equi* e por outros agentes, avaliou-se a sensibilidade e especificidade de exame

clínico, microbiológico, radiológico e hematológico. Foi concluído que, embora com alguma sobreposição de resultados, o exame clínico revela que potros com pneumonia por *R. equi* são mais jovens e possuem taquipneia marcada (LECLERE et al., 2011).

Outras conclusões do mesmo estudo apontam que a radiologia possui sensibilidade de 71% e especificidade de 85%, enquanto o cultivo bacteriano do lavado traqueal demonstrou ser altamente específico (91%), mas pouco sensível (35%) para infecção por *R. equi*. Junto desse, a contagem de leucócitos com valores maiores que 20000 células/ $\mu$ L possui 86% de especificidade e a concentração de fibrinogênio plasmático maior que 700 mg/dL possui 92% de especificidade, demonstram-se altamente sugestivos de infecção por *R. equi* em potros com pneumonia e que justificam intervenção com antimicrobianos (LECLERE et al., 2011).

Apesar das múltiplas ferramentas de diagnóstico atualmente reconhecidas, o isolamento bacteriano a partir de aspirados traqueobronquiais mantém o status de diagnóstico padrão ouro na infecção por *R. equi*. Mesmo frente a testes mais avançados, como a reação da polimerase em cadeia (PCR) do gene de virulência VapA e da imunofluorescência indireta para o antígeno de 15 a 17 kDa, em um trabalho houve melhor sensibilidade detecção de *R. equi* por isolamento do aspirado traqueobronquial (ANZAI et al., 1997).

Por outro lado estudos mais recentes com amostras de fluido traqueal tem revelado sensibilidade da PCR de 100%, muito superior ao valor de 57,1% para a sensibilidade do cultivo bacteriano. A especificidade, porém não demonstra diferença considerável entre os dois métodos, sendo de 90,6% para a PCR e de 93% para o cultivo bacteriano (SELLON et al., 2001).

Provavelmente a sensibilidade da PCR do fluido traqueal seja superior em decorrência dos casos em que o cultivo bacteriano não é viável, devido à utilização de antimicrobianos ou ao crescimento de outras bactérias patogênicas. Além disso, há casos em que a especificidade da PCR também pode ser superior, já que a mesma é capaz de discriminar entre amostras virulentas e avirulentas do agente (SELLON et al., 2001). O uso de PCR quantitativo também tem demonstrado qualidades desejáveis, como a análise de amostras altamente contaminadas, como fezes ou solo e a quantificação simultânea do micro-organismo (HARRINGTON et al., 2005).

Exames clínicos diários podem ser uma ferramenta importante para o controle das manifestações clínicas de *R. equi*, pois a detecção precoce de sinais característicos

permite a realização de exames complementares em tempo hábil e tratamento com maior índice de sucesso (DEPRÁ et al., 2001; GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

A decisão de realizar exames clínicos diários, entretanto, deve ser tomada com cautela, pois manipulação intensa dos potros pode acarretar em queda de imunidade e predisposição a pneumonias (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011a,b). Um esquema de exames clínicos completos com ausculta torácica duas vezes por semana demonstrou ser eficiente em realizar diagnóstico precoce e prevenir mortalidade em uma propriedade endêmica (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

O diagnóstico *post mortem* pode ser firmado com o achado de lesões macro e microscópicas características e amparado por exame bacteriológico das amostras. O uso de imuno-histoquímica anti-*R. equi* com anticorpos policlonais ou monoclonais pode elucidar casos em que o cultivo bacteriano não tenha sido conclusivo, pois não há coloração histoquímica conclusiva para a demonstração da bactéria nos tecidos, sendo a coloração de Gram e a de Ziehl-Neelsen apenas auxiliares no diagnóstico (MARIOTTI et al., 2000).

## **2.9. Achados patológicos**

A lesão pulmonar mais constante de infecção por *R. equi* consiste em consolidação das porções crânio-ventrais, que pode estender-se à todo o órgão em casos severos. Inicialmente os pulmões podem ter o peso triplicado e conter múltiplos nódulos de 1 a 10 cm de diâmetro, brancacentos, firmes com distribuição multifocal a coalescente. Com a evolução, o centro dos nódulos torna-se friável com caseificação ou liquefação. As porções internodulares do pulmão estão mais vermelhas e firmes, correspondendo a atelectasia (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a; CASWELL; WILIAMS, 2007).

O aspecto microscópico das lesões pulmonares contraria a descrição usual das lesões de broncopneumonia supurativa com formação de abscessos. Em verdade os nódulos encontrados nos pulmões possuem infiltrado predominantemente piogranulomatoso, em que se pode constatar células gigantes e inúmeros macrófagos degenerados contendo bactérias intracitoplasmáticas e com frequência carecem de cápsula de tecido conjuntivo que caracteriza um abscesso (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a; CASWELL; WILIAMS, 2007).

Os linfonodos brônquicos apresentam-se edematosos e aumentados em mais de cinco vezes com superfície de corte de aspecto mosqueado de vermelho e creme, com

áreas focais de liquefação (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a). O aspecto liquefeito dos linfonodos, de fato decorre da necrose caseosa e o infiltrado, inicialmente encontrado nos seios subcapsulares e paracórtex, é composto majoritariamente de macrófagos e células gigantes contendo grandes quantidades de bactérias intracitoplasmáticas, associado a edema e histiocitose de seio medular (CASWELL; WILIAMS, 2007; JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a).

Pequenas úlceras avermelhadas de até 1 ou 2 cm, recobertas por fibrina com a periferia elevada constituem as lesões típicas da mucosa do cólon e ceco. Histologicamente há infiltrado piogranulomatoso e necrose associados a centros linfoides, ocasionando elevação focal da mucosa com ulceração central. A submucosa adjacente pode estar edematosa e, na forma crônica pode haver obliteração da luz de vasos linfáticos por macrófagos e eventuais células gigantes contendo bactérias intracitoplasmáticas. Os capilares da submucosa, por sua vez, encontram-se repletos de leucócitos intra-luminais (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a; BROWN; BAKER; BARKER, 2007).

A forma abdominal da enfermidade por vezes pode manifestar-se exclusivamente como linfadenite mesentérica, em que os linfonodos se encontram aumentados, pálidos e com áreas de necrose. Em casos extremos, as lesões nos linfonodos mesentéricos podem fazer lembrar abscessos com aderências às paredes intestinais, devido ao aumento acentuado associado com massiva necrose caseosa ou liquefativa (CASWELL; WILIAMS, 2007).

À exceção das lesões reativas, como observadas em polissinovites imunomediadas, em que há infiltrado linfoplasmocitário, as lesões ocasionadas pela bactéria são basicamente as mesmas em qualquer tecido. Desta forma, as lesões incitadas por *R. equi* em equinos, sejam elas artrites sépticas, osteomielites, linfangites, entre outras, serão compostas de infiltrado piogranulomatoso com bactérias no citoplasma de macrófagos associado a áreas de necrose caseosa (PRESCOTT et al., 1991).

## **2.10. Tratamento**

A resistência natural testada *in vitro* a agentes antimicrobianos como cefalotina (97%) e penicilina (83%) fornece por si só um dado importante na escolha da terapia. A suscetibilidade *in vitro* de *R. equi* também é conhecida para diversos agentes, como sulfametoxazol e trimetoprima (88%), tetraciclina (87%), cloranfenicol (83%), porém é



pouco elucidativa sobre a aplicabilidade em animais vivos, como é o caso da gentamicina, que apesar da atividade antimicrobiana efetiva em testes *in vitro*, demonstra baixo sucesso no tratamento de casos clínicos (SWEENEY; SWEENEY; DIVERS, 1987).

O fato de *R. equi* consistir em um patógeno intra-celular facultativo que incita a formação de piogranulomas, revela o motivo que o antimicrobiano possua boa penetração tecidual e em macrófagos, assim como atividade em pH relativamente baixo (HINES, 2007). Fármacos que preenchem tais requisitos e de concentração mínima inibitória satisfatória podem ser combinados para obter-se atividade sinérgica, como é o caso da combinação de eritromicina e rifampicina (SWEENEY; SWEENEY; DIVERS, 1987).

A atividade de outras drogas como azitromicina e claritromicina tanto *in vitro* como em prática clínica demonstra bons resultados quando comparado com outras já conhecidas, como eritromicina (JACKS; GIGUÈRE; NGUYEN, 2003; HINES, 2007). Possivelmente devido a estabilidade química e biodisponibilidade superiores nas duas primeiras drogas (HINES, 2007).

A aquisição de resistência mais acelerada no uso de antimicrobianos como eritromicina e especialmente rifampicina, justifica o uso de azitromicina, claritromicina como alternativas terapêuticas. A resistência à eritromicina e rifampicina é adquirida com maior velocidade, sobretudo quando as drogas são utilizadas como monoterapia, somado ao fato de haver resistência cruzada entre antimicrobianos macrolídios. Além da resistência, outras possíveis limitações podem opor-se ao tratamento com macrolídios e rifampicina, como a ocorrência de diarreia ou custos excessivos (HINES, 2007).

Peculiaridades em cada caso exigirão tratamentos adicionais, como um terceiro antimicrobiano em casos de coinfeção por outro agente com diferente suscetibilidade e tratamento de suporte que inclua nutrição e hidratação adequadas, além de ambiente fresco e ventilado. Broncodilatadores e oxigenoterapia também são indicadas em casos com comprometimento respiratório severo. Anti-inflamatórios não esteroidais devem ser administrados com cautela visando diminuição da febre, melhora do estado geral e do apetite. Terapia local deverá ser utilizada em casos com acometimento extra-pulmonar (HINES, 2007).

## 2.11. Prevenção

Medidas que acarretem em redução da carga de infecção e da disseminação do agente no ambiente demonstram ser benéficas na diminuição da incidência da enfermidade em estabelecimentos endêmicos (DEPRÁ et al., 2001). O que implica em reduzir a contaminação por fezes de equinos no ambiente, já que as mesmas possuem os requisitos para o crescimento acelerado do micro-organismo (HUGHES; SULAIMAN, 1987).

Tais mudanças de manejo traduzem-se em diminuição da densidade populacional de reprodutoras, diminuição dos teores de poeira no ar, antecipação dos partos para o início da temporada, visando à obtenção de uma população de potros com maior maturidade imunológica à época em que haja maiores temperaturas e maiores níveis de poeira no ambiente. O aumento da cobertura vegetal dos potreiros e locais de trânsito dos animais possui o efeito de reduzir o teor de poeira do ar e prover bem estar às éguas e potros (DEPRÁ et al., 2001).

A detecção precoce e isolamento de potros com infecção clínica é importante na diminuição das perdas, prevenção da disseminação e redução das perdas econômicas em propriedades enzoóticas (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997). As sugestões de formas de abordagem clínica são sugeridas no tópico de diagnóstico.

A aplicação de plasma hiperimune por via intra-venosa pode conferir proteção aos potros, embora a idade ideal para realização do procedimento seja variável entre propriedades. Imunização ativa dos potros, por sua vez, é uma área que grande concentração de esforços no sentido de criar linhagens atenuadas de *R. equi*, uso de bacilo de Calmette-Guérin (BCG) recombinante que expresse o antígeno VapA, entre outras (HINES, 2007).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Aspectos clínicos e epidemiológicos**

Foram estudados vinte casos de rodococose diagnosticados no Setor de Patologia Veterinária da UFRGS (SPV – UFRGS) entre janeiro de 1997 até janeiro de 2013.

As informações clínicas foram disponibilizadas pelos veterinários que atenderam cada caso. Realizou-se, também, visita a um estabelecimento de criação de equinos onde a doença é endêmica para a obtenção de dados clínico-epidemiológicos e observação das instalações.

Coletaram-se oito amostras de solo de diferentes locais da propriedade. As amostras foram congeladas e posteriormente encaminhadas para a realização de exame bacteriológico seletivo para crescimento de *R. equi*. Em uma etapa posterior remeteu-se a amostra para aplicação da Reação em Cadeia da Polimerase para a identificação do gene de virulência.

#### **3.2. Patologia macroscópica**

Nas necropsias foram coletados e fixados em solução de formalina a 10%, fragmentos de pulmões, coração, estômago, intestino delgado, ceco, cólon, fígado, rins, bexiga, encéfalo, músculo esquelético globos oculares, cápsulas articulares, medula espinhal, pele e ossos.

Para cultura microbiana foram utilizados suabes estéreis em lesões planas ou expostas e aspiração com seringa para nódulos de conteúdo liquefeito e líquido sinovial ou nódulos intactos de pulmões e linfonodos.

As amostras foram remetidas imediatamente ou foram conservadas em refrigeração para exame bacteriológico no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Procedimento semelhante foi adotado para remessa de material para exame micológico no Setor de Micologia Veterinária da UFRGS.

#### **3.3. Bacteriologia**

As amostras coletadas foram submetidas a cultivo bacteriano aeróbio e microaeróbio em meio ágar sangue e suplementado com 5% de sangue ovino e ágar MacConkey. As amostras de casos clínicos foram incubadas a 37°C durante 24 a 120

horas. As amostras de solo foram cultivadas em meio seletivo modificado para crescimento de *Rhodococcus equi*, de acordo com a técnica descrita por Makrai et al., 2005.

Realizou-se a identificação bacteriana através da observação macroscópica das colônias e da morfologia microscópica. Foram realizados os seguintes testes bioquímicos para confirmação da espécie do micro-organismo: detecção das enzimas catalase, teste da oxidase, teste da oxidação e fermentação (OF), redução de nitrato, hidrólise da uréia, fermentação de carboidratos e teste de CAMP, que identifica a produção de fator *equi*, determinante de hemólise sinérgica com bactérias produtoras de esfingomielinase (QUINN et al., 2011; SILVA et al., 2012).

### **3.4. Estudo molecular (PCR)**

Amostras de isolados de *R. equi* de três casos clínicos dos anos 2011 e 2012, todos provenientes da propriedade investigada e uma amostra isolada do solo desse estabelecimento foram remetidas ao Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria para realização de exame de Reação em Cadeia da Polimerase para o gene de virulência *VapA*.

### **3.5. Histopatologia**

Após fixação em solução formalina a 10% por aproximadamente 24 horas, o material coletado durante a necropsia foi processado rotineiramente e corado pela técnica de hematoxilina e eosina (HE). Empregou-se a técnica de Brown-Hopps para evidenciação e determinação de Gram das bactérias em tecidos com lesão piogranulomatosa. Em casos com suspeita de lesão micótica foi realizada a coloração de prata metenamina de Grocott (PROPHET et al., 1992). Analisaram-se e registraram-se as alterações histológicas de todas as amostras coletadas em exame de necropsia.

### **3.6. Imuno-histoquímica (IHQ)**

Análise imuno-histoquímica para *R. equi* e *Pneumocystes* sp. foi realizada em todos os pulmões dos animais acometidos, mesmo quando não se constatou lesão macroscópica ou microscópica sugestiva de infecção pulmonar pelos agentes. Exame de IHQ para *R. equi* nos linfonodos, intestinos, ossos e articulações com lesão piogranulomatosa, assim como em articulações com inflamação linfo-plasmocitária e nos olhos com deposição de fibrina.

Para IHQ anti-*R. equi* utilizou-se como controle positivo o pulmão de um potro com lesões piogranulomatosas típicas e isolamento bacteriano de *R. equi*. Para teste de reação cruzada empregou-se uma amostra de rim de um equino com glomerulonefrite neutrofílica em que foi isolado *Actinobacillus equuli* ssp. *haemolyticus*. Na IHQ para *Pneumocystis* sp. foi utilizado como controle positivo o pulmão de um suíno com pneumonia intersticial por circovírus e *Pneumocystis* sp.

Desses tecidos selecionados foram realizados cortes histológicos de 5µm de espessura, sobre lâminas positivadas (Starfrost Sakura®). O anticorpo primário policlonal utilizado para detecção de *R. equi* foi produzido pelo Laboratório de Imunologia do Centro de Biotecnologia da UFRGS a partir da inoculação do antígeno de cepa ATCC de *R. equi* em coelhos. Para o teste imuno-histoquímico anti-*Pneumocystis* sp. utilizou-se o anticorpo comercial *Pneumocystis carinii* (3F6): sc-57980 (Santa Cruz Biotechnology®).

Após serem secadas verticalmente em temperatura ambiente, as lâminas foram aquecidas em estufa a 60° C por 3 a 4 horas. Em seguida foram desparafinadas em xilol, hidratadas em soluções decrescentes de álcool etílico e lavadas em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio a 10% em metanol por 20 minutos em temperatura ambiente.

Para a recuperação antigênica os cortes da IHQ anti-*Pneumocystis* sp. foram tratados com tripsina a 0,1% diluída em solução de tampão fosfato salina (PBS) por quinze minutos a 37°C, em câmara úmida. Em seguida as lâminas foram imersas em solução de tampão citrato pH 6,0 e aquecidas em banho maria por 40 minutos a 96°C. Enquanto que as lâminas de IHQ anti-*R. equi* foram imersas em solução de tampão citrato pH 6,0 e aquecidas em micro-ondas, em três ciclos de cinco minutos, sendo adicionada a solução de tampão citrato para completar o volume, quando necessário, entre os intervalos dos ciclos. Ao final, as lâminas foram deixadas resfriando em temperatura ambiente, por aproximadamente 20 a 30 minutos, imersas no tampão.

Para a redução das ligações inespecíficas, os cortes foram tratados com leite desnatado (Molico®) a 5% diluído em água destilada durante 20 minutos à temperatura ambiente. Os anticorpos primários de *R. equi* e *Pneumocystis* sp. foram diluídos em PBS na concentração de 1:1000 e de 1:50, respectivamente. Em seguida foram aplicados nos cortes por 14 a 16 horas (*overnight*) a 4 °C, em câmara úmida.

Posteriormente, utilizou-se anticorpo secundário biotinalado e solução streptavidina conjugada a peroxidase (kit LSAB-HRP, K0690, Dako®) por 20 minutos

cada, a temperatura ambiente. As lâminas eram então submetidas a uma solução reveladora, que consistia no cromógeno 3,3-diaminobenzidina (kit DAB, K3468, Dako<sup>®</sup>) para IHQ de *R. equi* e no cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC, K3469, Dako<sup>®</sup>) para *Pneumocystis* sp.. Após cada etapa as lâminas foram lavadas três vezes com água destilada. Para IHQ de *R. equi* fez-se contracoloração com hematoxilina de Harris por 20 segundos e lavagem em água corrente por 1-2 minutos, em seguida as lâminas foram desidratadas em graduações crescentes de álcool, clarificadas em xilol e montadas com Entellan (Merck<sup>®</sup>). Para IHQ de *Pneumocystis* sp. realizou-se contracoloração com hematoxilina de Mayer por 20-30 segundos, lavagem em água corrente e montagem da lâmina em meio aquoso (Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium, S1964, Dako<sup>®</sup>).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Epidemiologia

Os casos analisados nesse trabalho foram submetidos à necropsia no SPV – UFRGS a partir do ano de 1997 e eram provenientes de estabelecimentos de criação de equinos do município de Porto Alegre. Dentre os vinte potros encaminhados para exame *post mortem* no período de estudo, dezessete pertenciam a uma propriedade onde a doença era endêmica. Na temporada em que ocorreu o surto, foram necropsiados oito potros do estabelecimento entre o mês de novembro de 2010 e abril de 2011, somados a três casos no ano de 2012. Os demais casos provenientes dessa propriedade ocorreram de forma isolada, com no máximo dois óbitos em um ano. Todas as necropsias foram realizadas entre os meses de novembro e abril, com exceção de uma, realizada em agosto.

Os potros da propriedade com o maior número de casos eram das raças Brasileiro de Hipismo, Holsteiner ou suas cruzas, sendo, por vezes, produtos de transferência de embrião em éguas Percherão. Dos três animais restantes, cada um pertencia a uma propriedade distinta, dois dos quais eram da raça Quarto de Milha e um da raça Manga Larga Marchador. Foram afetados machos e fêmeas na mesma proporção e nenhum dos animais era castrado devido à idade. Os dados referentes à raça, sexo e idade, assim como data de realização da necropsia estão representados na **Tabela 1**.

**Tabela 1:** Dados gerais dos equinos necropsiados pelo Setor de Patologia Veterinária da UFRGS acometidos por *Rhodococcus equi*.

<b>Caso</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Data da necropsia</b>
<b>01</b>	Quarto de Milha	fêmea	2 meses	12/01/1997
<b>02</b>	NI*	macho	2 meses	30/12/2004
<b>03</b>	NI	macho	3 meses	24/03/2005
<b>04</b>	NI	fêmea	1 mês e 15 dias	09/01/2006
<b>05</b>	NI	fêmea	1 mês	03/02/2007
<b>06</b>	NI	fêmea	2 meses e 15 dias	26/04/2007
<b>07</b>	Quarto de Milha	macho	2 meses	27/08/2007
<b>08</b>	NI	fêmea	1 mês e 15 dias	28/11/2012
<b>09</b>	Manga Larga Marchador	macho	2 meses e 15 dias	14/04/2010
<b>10</b>	Holsteiner	fêmea	1 mês e 15 dias	05/11/2010
<b>11</b>	NI	macho	2 meses	22/11/2010
<b>12</b>	Holsteiner	macho	1 mês	27/12/2010
<b>13</b>	Holsteiner	macho	2 meses e 10 dias	04/02/2011
<b>14</b>	Brasileiro de Hipismo	fêmea	2 meses e 15 dias	21/02/2011
<b>15</b>	Brasileiro de Hipismo	macho	2 meses	05/04/2011
<b>16</b>	Holsteiner	fêmea	1 mês e 22 dias	12/04/2011
<b>17</b>	Holsteiner	macho	2 meses e 21 dias	29/04/2011
<b>18</b>	Holsteiner	fêmea	2 meses	03/03/2012
<b>19</b>	NI	fêmea	1 mês e 10 dias	12/12/2012
<b>20</b>	NI	macho	2 meses	18/12/2012

\* NI: Não informado.

A propriedade com o maior número de casos localizada na Zona Sul de Porto Alegre foi visitada no final de abril de 2011 com finalidade de coletar dados e esclarecer o motivo da alta ocorrência de casos clínicos de infecção por *R. equi* em potros pelo segundo ano consecutivo. Dentre 35 potros nascidos na temporada, 25 desenvolveram sinais de infecção por *R. equi*. Oito desses casos clínicos culminaram em morte nos anos de 2010 e 2011 e três no ano de 2012 e foram encaminhados ao SPV – UFRGS. A população de equinos adultos não apresentou problemas sanitários relacionados.

Dedicado à cria de potros e atividades hípicas, a propriedade possuía 62 hectares de área, 45 dos quais ocupados com animais, realizava em média, historicamente, 12 partos por temporada, com desmame aos seis meses. Nos últimos seis anos, fêmeas prenhes de outras propriedades eram introduzidas, quando foi observada a emergência de casos de rodococose. Nessa temporada foram introduzidas cinco fêmeas prenhes na propriedade. Segundo o veterinário, exame de imunodifusão em ágar gel revelou níveis altos de anticorpos para *R. equi* nas éguas introduzidas e níveis baixos nas fêmeas da propriedade.

Antes do aparecimento da doença os partos eram realizados com assistência em baias de parição. Após os primeiros casos da doença, há seis anos, os partos começaram a ser realizados em piquetes, ocorrendo casos esporádicos de animais com sinais, que, em geral, apresentavam boa resposta ao tratamento convencional a base de azitromicina e sulfa/trimetoprim por cerca de 15 dias.

Com a previsão do aumento do número de partições, na temporada de 2010-2011 as éguas receberam duas doses de vacina comercial (Rhodovac®), a primeira aos 45 dias pré-parto e a segunda aos 15 dias. Os cinco primeiros potros da temporada não apresentaram sinais de rodococose. Os vinte potros subsequentes apresentaram hipertermia, aumento de fibrinogênio plasmático, leucocitose ou outras alterações sugestivas de infecção por *R. equi*.

Como medida de prevenção de novas ocorrências, os partos passaram a ser realizados em baias individuais, para minimizar a exposição dos potros ao ambiente excessivamente contaminado. O tratamento a base de azitromicina nos animais acometidos passou a não surtir o efeito desejado, havendo agravamento com desenvolvimento de sinais respiratórios em fases avançadas da enfermidade. Devido à baixa eficácia do produto convencional, foi empregada eritromicina associada a rifampicina e, posteriormente claritromicina. Mesmo com a adoção dos novos



princípios, os tratamentos tendiam a ser mais prolongados do que nas ocorrências da doença em outros anos.

#### 4.2. Sinais clínicos

Dez potros apresentaram hipertermia com amplitude de 40,5 a 44,0°C. Normalmente a febre esteve presente intercorrente com os demais sinais, apresentando-se crônica em casos de longa evolução. Fibrinogênio plasmático estava aumentado em quatro casos. Em três casos havia fraqueza, depressão e inapetência.

Sinais respiratórios foram referidos em dez casos e consistiram em secreção nasal, tosse ou dispneia severa. O curso variou de mais de três semanas até um dia. Em cinco casos foi mencionado aumento de volume articular, sobretudo das articulações tíbio-társicas. Apenas um caso apresentou claudicação do membro afetado. Em dois casos houve paralisia dos membros pélvicos (casos 11 e 12).

Em três casos havia opacidade da câmara anterior. Um potro, no entanto, estava aparentemente cego, mas não exibia opacidade ocular. No dia do óbito o mesmo apresentou fraqueza extrema, andar em círculos, cambaleio e pressão da cabeça.

Três casos cursaram com diarreia, um dos quais por aproximadamente duas semanas. Em três casos foi relatado subdesenvolvimento e ou baixo peso desde o nascimento. Apenas dois animais não apresentaram qualquer sinal clínico de doença prévia. Em todos os casos foi instituído tratamento para *R. equi*, exceto os casos de morte súbita.

#### 4.3. Achados de necropsia

O estado corporal dos potros à necropsia foi classificado em bom, regular e ruim de acordo com o aspecto visual externo da carcaça. Três animais apresentavam estado corporal ruim (casos 6, 11 e 20), sete apresentavam estado corporal regular e, dez estado corporal bom (**Figura 1**). Cinco casos apresentaram aumento de volume em articulações apendiculares, sobretudo das articulações tibio-társicas, mas também da articulação femuro-tíbio-patelar e cárpica.



**Figura 1. Infecção por *R. equi* em potros:** equino Holsteiner, fêmea, dois meses, em bom estado corporal (caso 18).

Em três casos havia fluído articular abundante, amarelado, translúcido e de viscosidade diminuída (casos 12, 18 e 20, **Figura 2**). O caso 13 apresentava fluído articular aumentado e hemorrágico (**Figura 3**) e hemorragias sistêmicas. O caso 14 possuía aumento de volume na face medial da articulação tíbio-társica do membro pélvico direito e acentuado espessamento de cápsula articular com fístula de aproximadamente 5 cm de diâmetro e conteúdo friável e avermelhada (**Figura 4**).



**Figura 2. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação cárpica com aumento do líquido sinovial, coloração amarelada e perda de viscosidade (caso 18).



**Figura 3. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação tíbio-társica com aumento da quantidade de líquido sinovial de aspecto sanguinolento (caso 13).

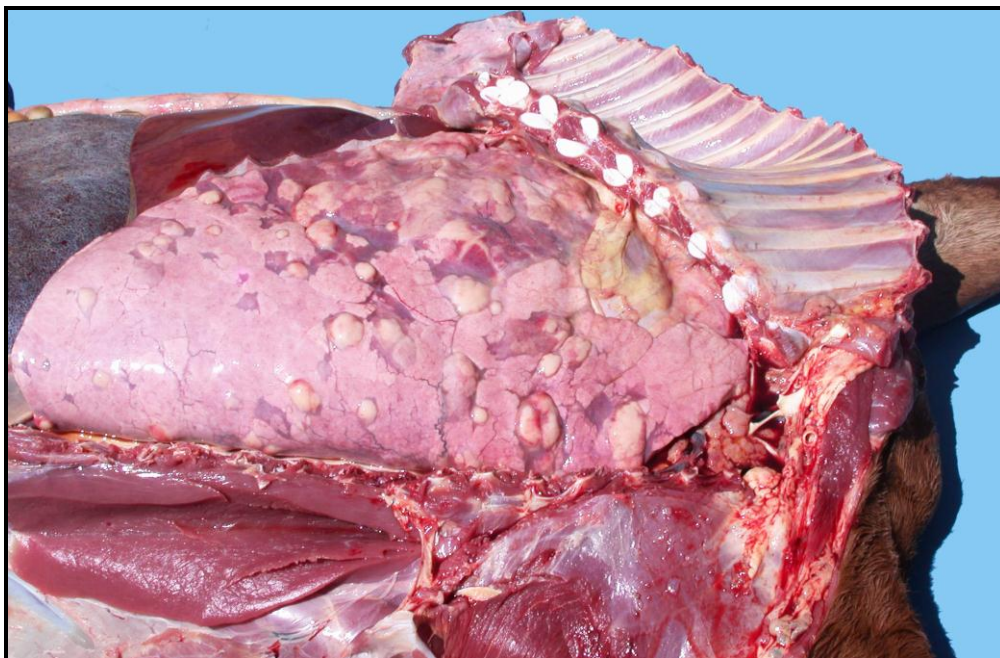


**Figura 4. Infecção por *R. equi* em potros:** articulação tíbio-társica aumentada e fistulada com intensa fibrose e material caseoso (caso 14).

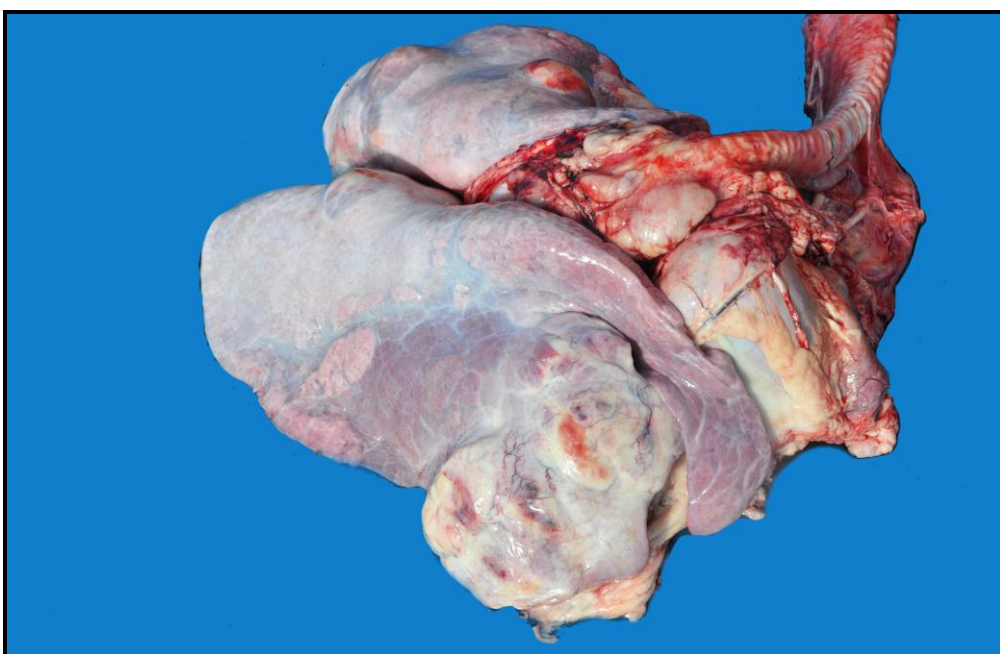
Os pulmões apresentaram lesões em 19 equinos. Observou-se nódulos de coloração amarelada de alguns milímetros a 10 cm de diâmetro, com distribuição focal a multifocal a coalescente (**Figuras 5 e 6**). O tamanho e a distribuição dos nódulos estão representados na **Tabela 2**. Embora as áreas de consolidação pulmonar iniciassem na



região crânio-ventral, os nódulos distribuíam-se de forma aleatória por todos os lobos. Um potro apresentou lesões osteo-articulares sem envolvimento do sistema respiratório (caso 14).



**Figura 5. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com nódulos amarelados de 1 a 5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente (caso 05).

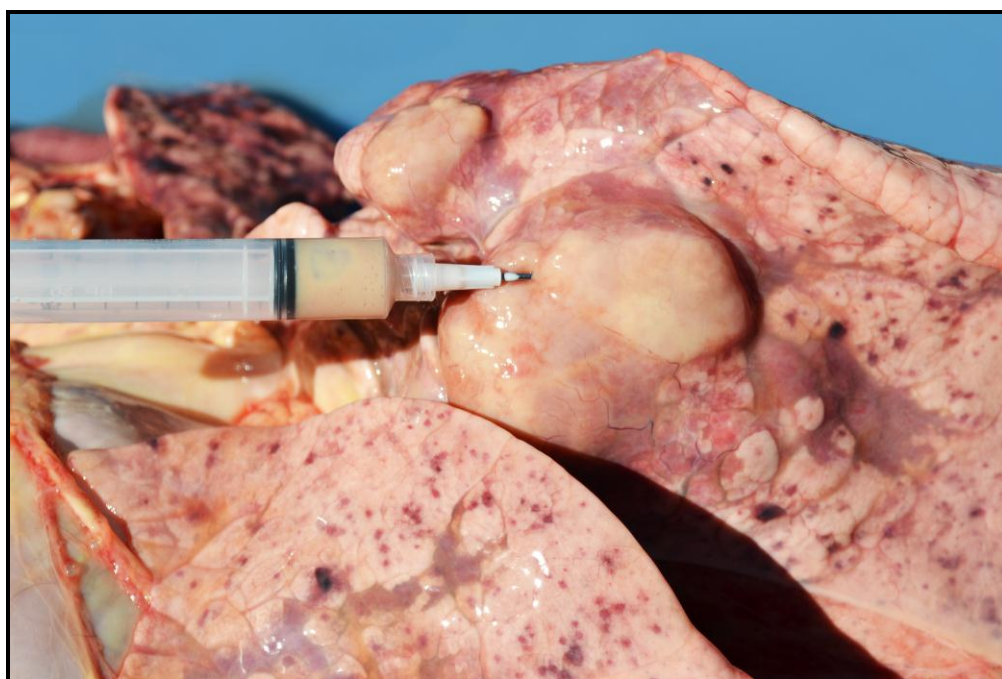


**Figura 6. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com nódulos amarelados de 3 a 10 cm de diâmetro, com distribuição multifocal e área de coalescência em porção crânio-ventral (caso 18). Linfonodo traqueobrônquico moderadamente aumentado.

O conteúdo dos nódulos pulmonares apresentava-se caseoso a liquefeito (**Figuras 7 e 8**), por vezes encapsulados, enquanto outros possuíam periferia indistinta em meio à consolidação (**Figura 9**). Eventualmente constatou-se halos hiperêmicos bem demarcados. Consolidação crânio-ventral, caracterizada por consistência cárnea e coloração avermelhada foi constatada com variados graus de intensidade.

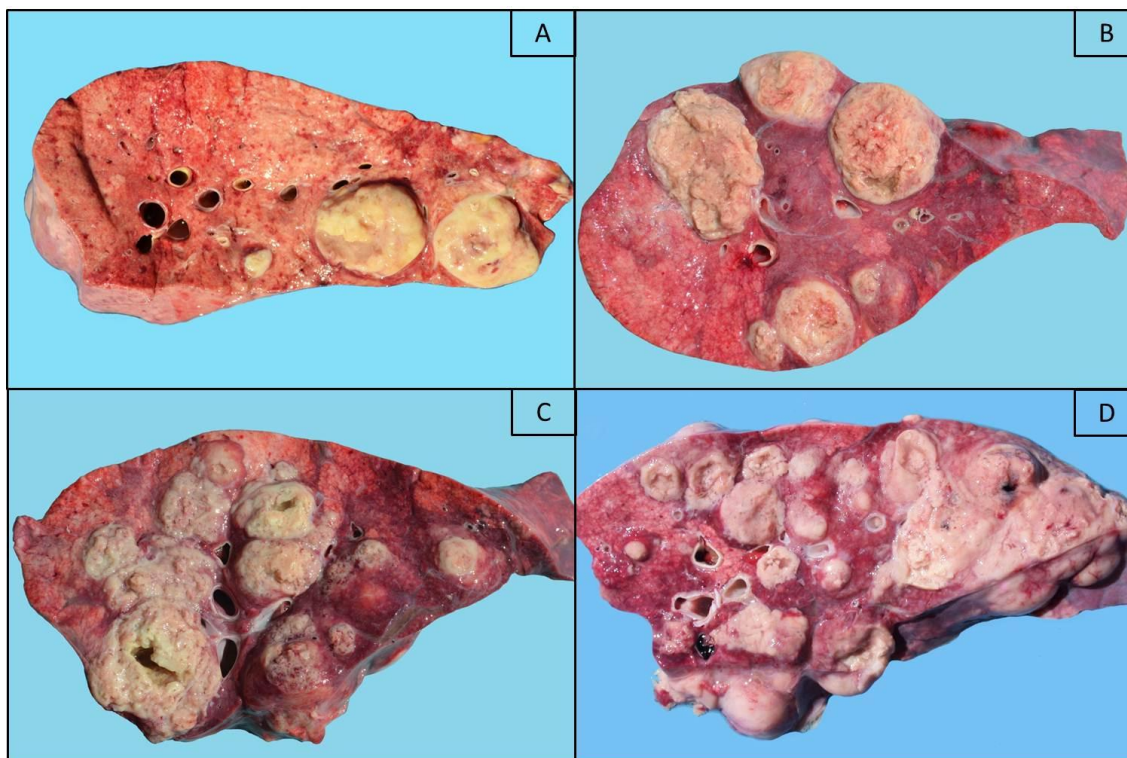


**Figura 7. Infecção por *R. equi* em potros: pulmão com nódulo de consistência firme e aspecto caseoso em superfície de corte.**



**Figura 8. Infecção por *R. equi* em potros: pulmão com nódulo de consistência flutuante e conteúdo liquefeito.**





**Figura 9. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte de pulmões demonstrando múltiplos nódulos amarelados com diferentes distribuições: **A)** distribuição multifocal com nódulos bem delimitados e sem consolidação internodular. **B)** distribuição multifocal com nódulos bem delimitados, região internodular consolidada e com edema de septos interlobulares. **C)** distribuição multifocal a coalescente em porção mediastinal; região internodular consolidada e com edema de septos interlobulares. **D)** distribuição multifocal a coalescente em porção ventral; região internodular consolidada.

Não colapamento pulmonar difuso, caracterizado por com impressões das costelas, consistência firme e aumento do peso do órgão, foi observado em um caso, juntamente com consolidação crânio-ventral e formação de nódulo delimitado (caso 20, **Figura 10 e 11**). O mesmo potro apresentou derrame pleural discreto de coloração amarelada e pleura visceral opaca. Ambas as bolsas gutorais do potro apresentavam-se timpanizadas.

Outro potro que ao exame externo exibia secreção purulenta na cavidade oral, apresentava exsudato purulento na luz de traqueia, brônquios e bolsas gutorais, além de fibras vegetais na luz de brônquios (caso 01). A cavidade torácica apresentava grande quantidade de líquido sero-hemorrágico com grumos de pus e fibrina e múltiplas aderências na cavidade pleural. Além disso, havia nos pulmões hemorragias petequiais e sufusões.

Em outro potro observou-se hemorragias petequiais e equimóticas com distribuição difusa nos pulmões (caso 13, **Figura 12**). Havia também hifema do globo

ocular direito, hemartrose na articulação t bio-társica esquerda e múltiplas hemorragias e edema no tecido subcutâneo, musculatura esquelética dos membros, cabeça e pescoço (Figura 13).

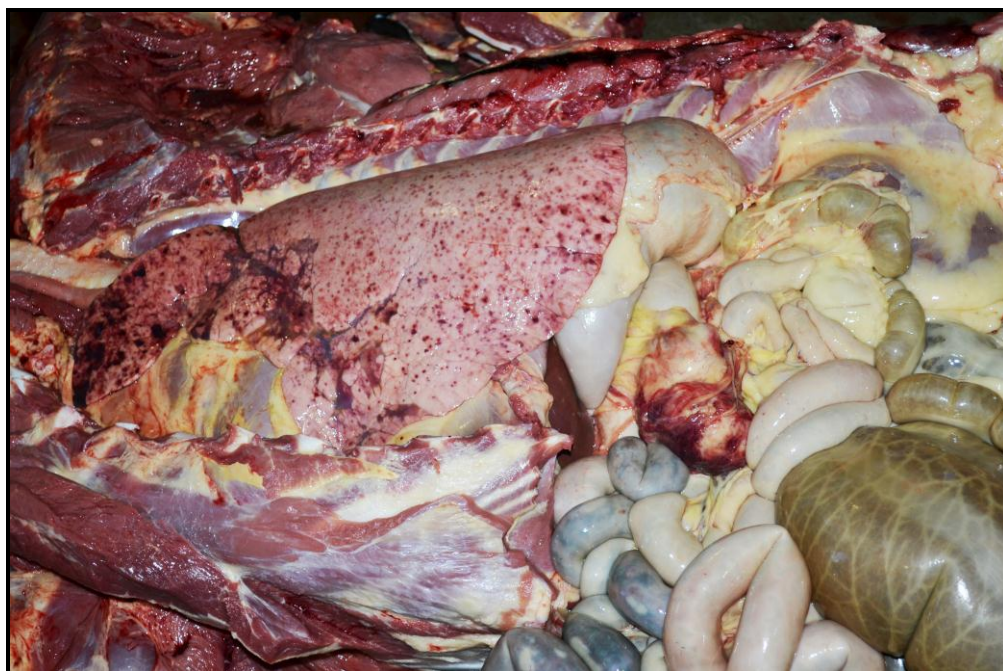


**Figura 10. Infec o por *R. equi* em potros:** pulmões não colabados, pesados, com impressões das costela e consistência firme (caso 20).



**Figura 11. Infec o por *R. equi* em potros:** pulmões não colabados com nódulo focal de aproximadamente 7 cm de diâmetro sobre a incisura cardíaca do lobo cranial direito; porão cranial consolidada e com nodula es amareladas pouco delimitadas entremeadas. Superfície pleural opacificada na porão dorsal dos lobos diafragmáticos (caso 20).





**Figura 12. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmões com hemorragia multifocal a coalescente (caso 13).



**Figura 13. Infecção por *R. equi* em potros:** hemorragia e edema difusos na musculatura esquelética e tecido subcutâneo.

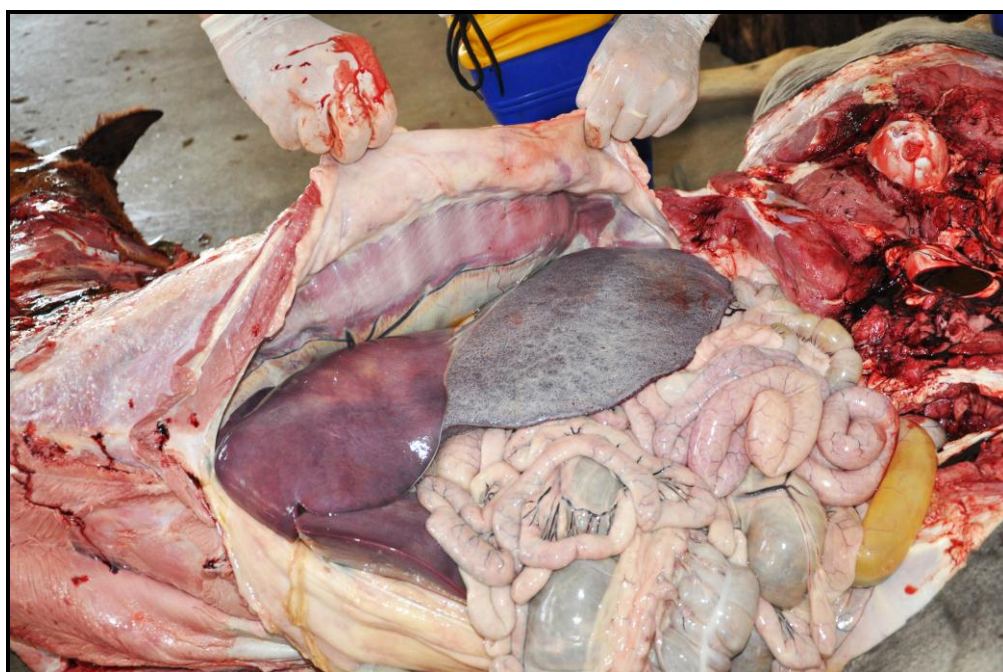
Em dois casos havia deposição de material grumoso amarelado na câmara anterior dos globos oculares (casos 07 e 20, **Figura 14**). Um terceiro caso apresentava material grumoso associado com sangue na câmara anterior (caso 12).





**Figura 14. Infecção por *R. equi* em potros: câmara anterior com deposição de material grumoso amarelado.**

Em um caso havia pneumotórax acentuado com projeção do diafragma para a cavidade abdominal (caso 18, **Figura 15**), originado de uma lesão sub-pleural, evidenciada pela formação de uma bolha de gás de cerca de 10 cm de diâmetro (**Figura 16 e 17**) com aderências fibrinosas a lobos pulmonares adjacentes e líquido espesso, acastanhado e turvo em quantidade moderada na cavidade torácica.

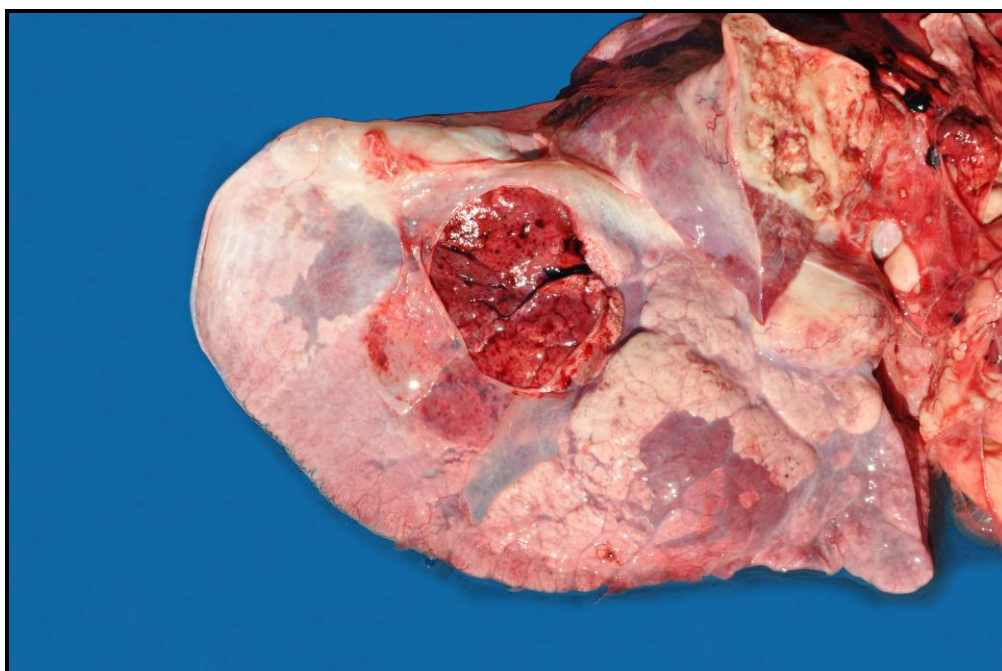


**Figura 15. Infecção por *R. equi* em potros: diafragma abaulado, pneumotórax (caso 18).**





**Figura 16. Infecção por *R. equi* em potros: bolha de gás sob a pleura do lobo diafragmático esquerdo (caso 18)**



**Figura 17. Infecção por *R. equi* em potros: pulmões com o parênquima exposto sob a área de enfisema (caso 18).**

Um potro apresentou, na mucosa na traqueia, ligeiras elevações ulceradas de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro de distribuição difusa, por vezes coalescente (**Figura 18**).

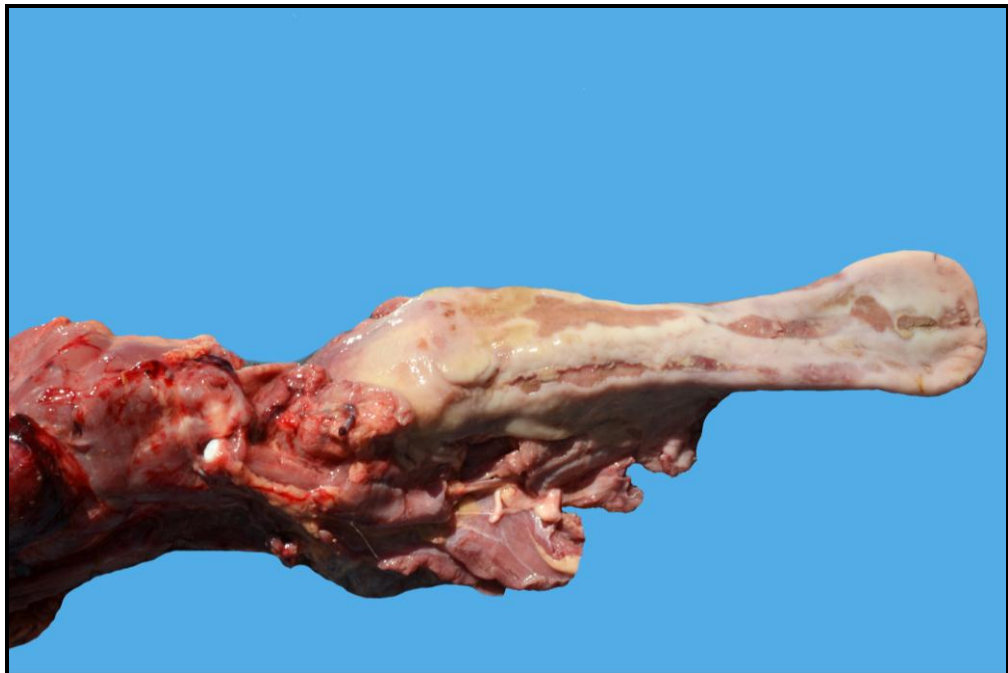


**Figura 18. Infecção por *R. equi* em potros:** traqueia com nódulos amarelados, por vezes ulcerados, com cerca de 0,5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente (caso 03).

Nos casos 06 e 17 se constatou lesões de candidíase na língua e no esôfago, caracterizada por erosões da mucosa com formação de placas esbranquiçadas de cerca de 3 mm de espessura na superfície. No caso 06 envolvia também a porção aglandular do estômago. No caso 17 havia leve hiperemia e formação de membrana amarelada na mucosa do esôfago (**Figura 19**), extensas áreas de ulceração na língua (**Figura 20**), além de hiperemia e formação de placas esbranquiçadas em múltiplas úlceras de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro na traqueia.



**Figura 19. Infecção por *R. equi* em potros:** mucosa esofágica hiperêmica com formação de membrana amarelada e friável na superfície (caso 17).



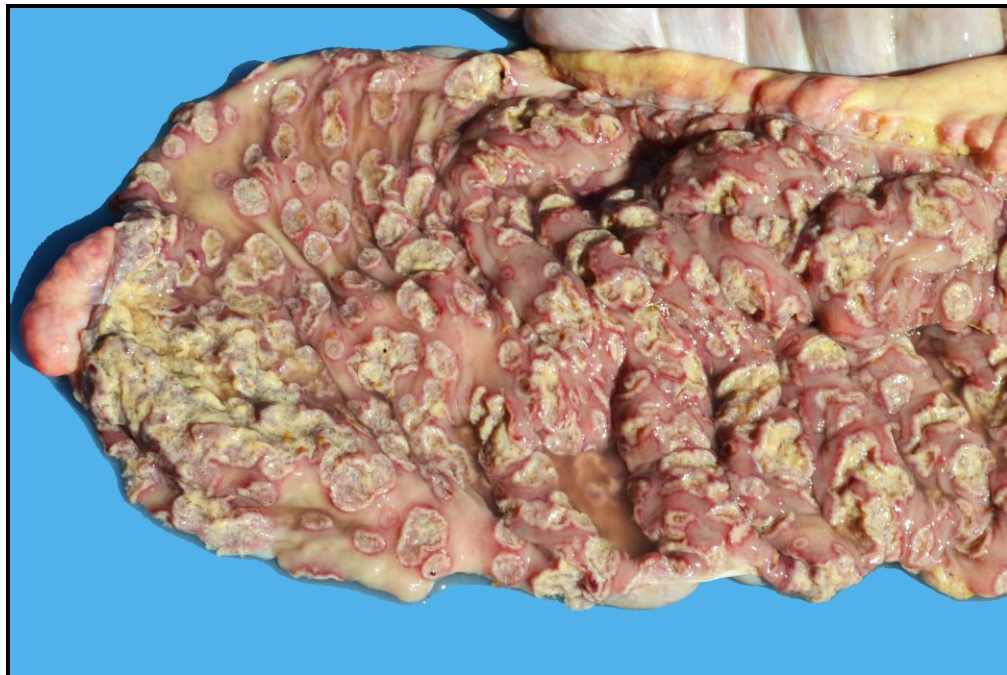
**Figura 20. Infecção por *R. equi* em potros:** língua com superfícies dorsal e lateral com extensas úlceras lineares profundas (caso 17).

Tiflocolite ulcerativa foi observada em cinco casos. O caso 06 apresentava ulcerações irregulares, pouco delimitadas em meio à mucosa acentuadamente edematosa. O caso 17 apresentava ulcerações coalescentes recobertas por delgada membrana de fibrina e circundadas por halos hiperêmicos (**Figuras 21 e 23**). O caso 18



apresentava áreas elevadas e bem delimitadas com centro ulcerado de 0,5 a 2 cm de diâmetro com distribuição esparsa (**Figura 22**). O caso 11 possuía áreas elevadas e delimitadas por vezes ulceradas e com halos hiperêmicos de 1,0 cm de diâmetro de distribuição difusa e mucosa edematosa. O caso 10 possuía áreas elevadas e delimitadas de aproximadamente 0,1 cm de diâmetro de distribuição difusa e mucosas ceco-cólicas avermelhadas.

No caso 13 havia erosões e ulcerações da mucosa do terço final do intestino delgado com conteúdo sanguinolento livre na luz, além de aumento acentuado de linfonodos mesentéricos com material caseoso a liquefeito e extensas áreas de aderência ao fígado, ao pâncreas e ao cólon maior.



**Figura 21. Infecção por *R. equi* em potros:** ceco, mucosa com úlceras irregulares multifocais a coalescentes com periferia hiperêmica e deposição de fibrina na superfície (caso 17).



**Figura 22. Infecção por *R. equi* em potros:** cólon, mucosa com áreas elevadas e bem delimitadas de 0,5 a 2 cm de diâmetro com centro ulcerado (caso 18).

Dez potros apresentaram linfadenite, sendo cinco casos com envolvimento de linfonodos traqueobrônquicos e oito casos com envolvimento de linfonodos mesentéricos. Os linfonodos estavam aumentados e com conteúdo liquefeito a caseoso (**Figura 6**). Havia casos em que os linfonodos cecais e colônicos eram os mais acometidos (**Figuras 23, 24 e 25**) e outros cujos linfonodos mesentéricos apresentavam-se fusionados.

Em dois casos havia também evidenciação dos vasos linfáticos na serosa intestinal (casos 06 e 16, **Figura 19**). Em ambos os animais constatou-se intenso edema da parede de ceco e cólon. Entretanto, edema de cólon também pôde ser observado em um caso sem constatação de lesão ulcerativa da mucosa ou evidenciação dos vasos linfáticos, mas com severo acometimento de linfonodos mesentéricos, em que os mesmos estavam aumentados, fusionados e com centro caseoso (caso 20).

Transudação peritoneal intensa de fluído amarelado opaco com grande quantidade de fibrina foi observada no caso descrito anteriormente. O montante de líquido atingiu tal nível de pressão na cavidade abdominal que promoveu a projeção de uma bolsa de peritônio através do anel umbilical, que se salientou externamente à semelhança de uma hérnia umbilical preenchida unicamente por transudato.



**Figura 23. Infecção por *R. equi* em potros:** linfonodos cecais e colônicos acentuadamente aumentados e hiperêmicos; mucosa do ceco com úlceras irregulares multifocais a coalescentes recobertas por fibrina (caso 17).



**Figura 24. Infecção por *R. equi* em potros:** linfonodos cecais e colônicos acentuadamente aumentados (caso 06).





**Figura 25. Infecção por *R. equi* em potros:** linfonodos cecais acentuadamente aumentados; superfície serosa de ceco e cólon com evidência dos vasos linfáticos; superfície mucosa com edema intenso e úlceras multifocais de contorno irregular pouco delimitadas (caso 06).

Outras alterações observadas em cavidade abdominal ou trato digestório sem associação direta com a infecção incluíam, em um caso, exsudato peritoneal em quantidade moderada associado com invaginação jejuno-ileal, de aproximadamente 35 cm, com necrose, hemorragia e congestão acentuada do segmento (caso 01). Um segundo caso apresentou hérnia inguinal esquerda contendo segmento de intestino delgado de 15 cm de extensão sem alterações circulatórias (caso 09). Em outro potro observou-se hiperemia acentuada da mucosa do intestino delgado e conteúdo liquefeito ao longo do intestino delgado e grosso com edema da parede e moderada quantidade de fibrina sobre a mucosa (caso 19).

Lesões ósseas foram observadas em três casos. No caso 11, a segunda vértebra lombar estava com o corpo preenchido por material caseoso amarelado e consistência óssea reduzida, além disso, a medula espinhal adjacente estava comprimida (**Figura 26**). No caso 14 havia nódulo de 20 cm de diâmetro na lateral do pescoço, imediatamente caudal ao ramo esquerdo da mandíbula (**Figura 27**). A lesão consistia em um grande abscesso repleto de líquido acastanhado com destruição da asa esquerda do atlas (**Figuras 28 e 29**).

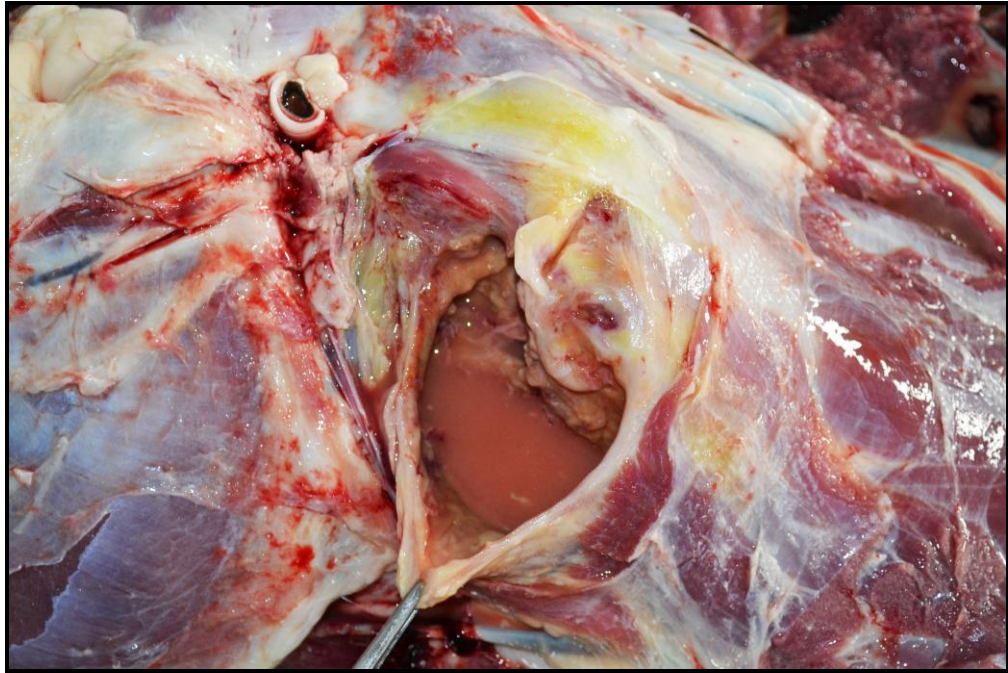




**Figura 26. Infecção por *R. equi* em potros:** coluna vertebral com segunda vértebra lombar de coloração amarelada e consistência friável em superfície de corte; canal medular invadido por material liquefeito e medula espinhal comprimida.



**Figura 27. Infecção por *R. equi* em potros:** potro com aumento cervical delimitado, imediatamente caudal ao ramo esquerdo da mandíbula de consistência macia e contorno esférico (caso 14).



**Figura 28. Infecção por *R. equi* em potros:** abscesso de aproximadamente 20 cm de diâmetro com cápsula incisada, exibindo líquido acastanhado no interior (caso 14).



**Figura 29. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte transversal do atlas exibindo aspecto esbranquiçado e friável da asa esquerda com destruição óssea e formação de cápsula de tecido conjuntivo na região ventrolateral (caso 14).

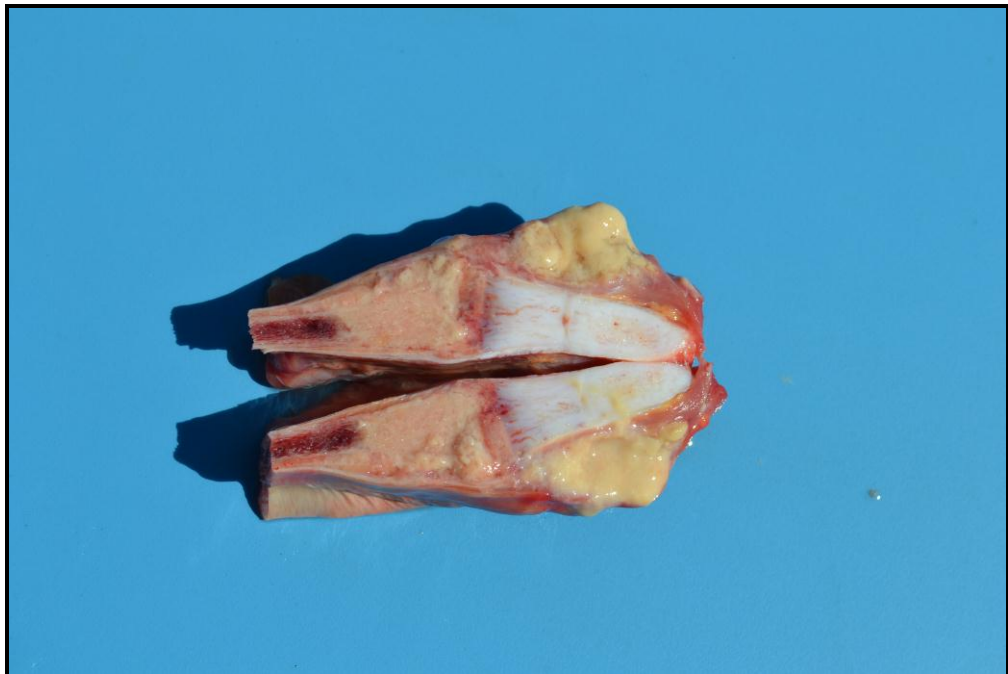
No caso 17 havia lesão nodular de cerca de 5 cm de diâmetro com aproximadamente 0,5 cm de elevação na superfície pleural da junção costo-condral da



terceira costela esquerda, que apresentava perda da consistência e material caseoso amarelado no córtex e medula (**Figuras 30 e 31**).



**Figura 30. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície pleural da junção costo-condral da terceira costela esquerda com nódulo de cerca de 5 cm de diâmetro e aproximadamente 0,5 cm de elevação (caso 17)



**Figura 31. Infecção por *R. equi* em potros:** superfície de corte da extremidade esternal da terceira costela esquerda: medular de coloração amarelada e consistência friável. Periferia amarelada e liquefeita.

**Tabela 2:** Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi*.

Caso	Lesões do trato respiratório e cavidade torácica	Lesões extrapulmonares
01	<b>Pulmões:</b> múltiplos nódulos; áreas multifocais de edema e congestão com hemorragias petequiais e sufusivas. <b>Traqueia e brônquios:</b> exsudato purulento e fibras vegetais em pequenos brônquios. <b>Cavidade torácica:</b> grande quantidade de líquido sero-hemorrágico com grumos de pus e fibrina. Aderências pleurais multifocais.	<b>Cavidade abdominal:</b> hidroperitônio moderado. <b>Intestino delgado:</b> invaginação jejuno-ileal de aproximadamente 35 cm com necrose hemorragia e congestão acentuadas.. <b>Bolsas guturais:</b> discreta quantidade de exsudato purulento
02	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 2 a 4 cm de diâmetro com distribuição multifocal esparsa, por vezes pouco delimitados.	<b>Rins:</b> manchados de vermelho e branco. <b>Baço:</b> aumentado.
03	<b>Pulmões:</b> poucos nódulos esparsos com cerca de 4 cm de diâmetro e edema de septos interlobulares. <b>Traqueia:</b> mucosa com úlceras de aproximadamente 1 a 5 mm de diâmetro, de periferia brancacenta e elevada com distribuição multifocal coalescente.	<b>Baço:</b> aumentado.
04	<b>Pulmões:</b> poucos nódulos de 2 a 5 cm de diâmetro com distribuição multifocal esparsa e hemorragias petequiais periféricas.	S/A*
05	<b>Pulmões:</b> grande quantidade de nódulos de 1 a 5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente especialmente na porção crânio-ventral, alguns com halos hiperêmicos.	<b>Linfonodos mesentéricos e traqueobrônquicos:</b> aumentados e liquefeitos.

**Tabela 2** - Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi* (Continuação).

<b>Caso</b>	<b>Lesões do trato respiratório e cavidade torácica</b>	<b>Lesões extrapulmonares</b>
<b>06</b>	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 1 a 5 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente alguns com halos hiperêmicos.	<b>Linfonodos cecais e colônicos:</b> acentuadamente aumentados e liquefeitos. <b>Ceco e cólon:</b> edema intenso, mucosa ulcerada e evidenciação de vasos linfáticos na serosa. <b>Língua, esôfago e estômago:</b> úlceras recobertas por fibrina.
<b>07</b>	<b>Pulmões:</b> poucos nódulos de 2 a 3 cm de diâmetro com distribuição multifocal esparsa, pesados e de coloração vermelha.	<b>Olhos:</b> câmara anterior com material fibrinoso. <b>Linfonodos mesentéricos:</b> aumentados.
<b>08</b>	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 1 a 4 cm de diâmetro com distribuição multifocal esparsa apresentando halos hiperêmicos.	<b>Intestino delgado:</b> grande quantidade de petéquias em diferentes segmentos.
<b>09</b>	<b>Pulmões:</b> um nódulo de 3 a 4 cm de diâmetro em cada um dos lobos diafragmáticos, consolidação crânio-ventral.	<b>Linfonodos traqueobrônquicos:</b> nódulo liquefeito de 4 a 5 cm de diâmetro. <b>Hérnia inguinal</b> com intrusão de segmento de intestino delgado com 15 cm de extensão sem alterações circulatórias.
<b>10</b>	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 2 a 3 cm de diâmetro com distribuição multifocal. <b>Cavidade torácica:</b> pequena quantidade de líquido translúcido amarelado.	<b>Cólon e ceco:</b> mucosa avermelhada com nodulações brancacentas de aproximadamente 0,1 cm, distribuídas por toda a extensão da mucosa.
<b>11</b>	<b>Pulmões:</b> poucos nódulos esparsos com cerca de 2 a 3 cm de diâmetro e consolidação crânio-ventral.	<b>Cólon e ceco:</b> mucosa com nódulos de até 1,0 cm de diâmetro, por vezes ulcerados. <b>Linfonodos cólicos:</b> moderadamente aumentados. <b>Segunda vértebra lombar:</b> destruição óssea com substituição por material caseoso infiltrando o canal medular.

**Tabela 2** - Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi* (Continuação).

<b>Caso</b>	<b>Lesões do trato respiratório e cavidade torácica</b>	<b>Lesões extrapulmonares</b>
<b>12</b>	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 1 a 7 cm de diâmetro bem delimitados com distribuição multifocal esparsa e extensa consolidação crânio-ventral.	<b>Articulações femuro-tíbio-patelares e tíbio-társicas:</b> aumento de volume e perda da viscosidade do líquido sinovial. <b>Olhos:</b> câmara anterior com sangue e material fibrinoso.
<b>13</b>	<b>Pulmões:</b> poucos nódulos esparsos de 4 a 5 cm de diâmetro, hemorragias petequiais disseminadas.	<b>Tecido subcutâneo, musculatura esquelética, serosa vesical:</b> extensas áreas multifocais de hemorragia. <b>Olho direito:</b> hifema. <b>Articulações tibio-társicas:</b> moderado aumento de volume e perda da viscosidade do líquido sinovial de cor vermelha. <b>Linfonodos hepáticos e mesentéricos:</b> acentuadamente aumentados, com material caseoso e áreas de aderência ao fígado, pâncreas e segmentos do cólon maior. <b>Linfonodo traqueobrônquicos:</b> aumento moderado. <b>Intestino delgado:</b> terço final com erosões e ulcerações da mucosa e conteúdo sanguinolento.
<b>14</b>	S/A*	<b>Coluna vertebral cervical:</b> nódulo de conteúdo liquefeito acastanhado com aproximadamente 20 cm de diâmetro com destruição da asa do atlas. <b>Articulação tíbio-társica direita:</b> fibrose de cápsula articular com fístula e conteúdo castanho friável.
<b>15</b>	<b>Pulmões:</b> grande quantidade de nódulos de 3 a 10 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente com halos hiperêmicos, lobos crânio-ventrais massivamente consolidados. <b>Cavidade torácica:</b> líquido translúcido amarelado em moderada quantidade.	<b>Estômago:</b> porção aglandular extensamente ulcerada.

**Tabela 2** - Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi* (Continuação).

Caso	Lesões do trato respiratório e cavidade torácica	Lesões extrapulmonares
16	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 2 a 7 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente especialmente na porção crânio-ventral.	<b>Linfonodos mesentéricos:</b> ligeiramente aumentados e com liquefação central. <b>Cólon:</b> mucosa com pregas espessadas e vermelhas.
17	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 1 a 10 cm de diâmetro com distribuição multifocal a coalescente, evidenciação de septos interlobulares e áreas de atelectasia. <b>Traquéia:</b> mucosa com leve hiperemia e múltiplas úlceras de 0,2 a 0,5 cm de diâmetro. <b>Cavidade torácica:</b> nódulo de 5 cm de diâmetro salientando-se sobre a superfície pleural da junção costo-condral da segunda costela esquerda.	<b>Língua:</b> epitélio com extensas áreas ulceradas. <b>Esôfago:</b> mucosa com leve hiperemia e deposição de fibrina. <b>Estômago:</b> porção aglandular com múltiplas úlceras de 0,5 a 1 cm de diâmetro. <b>Linfonodos colônicos e cecais:</b> acentuadamente aumentados, hiperêmicos, firmes e com conteúdo caseoso. <b>Cólon e ceco:</b> mucosa com múltiplas úlceras de 0,5 cm de diâmetro recobertas por fibrina e com bordos elevados. Serosa com vasos linfáticos evidentes. <b>Intestino delgado:</b> grande quantidade de <i>Parascaris</i> sp. na luz. <b>Parede torácica:</b> nódulo de 5 cm de diâmetro com destruição da extremidade esternal da 3ª costela esquerda.
18	<b>Pulmões:</b> moderada quantidade de nódulos de 3 a 10 cm de diâmetro de distribuição multifocal a coalescente, sobretudo em lobo crânio-ventral direito e acessório; áreas atelectásicas periféricas; lobo diafragmático esquerdo com coleção de ar sob a pleura visceral em área de aproximadamente 10 cm de diâmetro, aderências fibrinosas focais. <b>Cavidade torácica:</b> pneumotórax acentuado e quantidade moderada de líquido espesso vermelho-acastanhado turvo.	<b>Linfonodos traqueobrônquicos:</b> moderadamente aumentados com exsudato caseoso. <b>Cólon maior:</b> mucosa com nódulos umbilicados de 0,3 a 1,0 cm de diâmetro. <b>Articulação cárpica:</b> líquido sinovial aumentado, amarelado e menos viscoso.

**Tabela 2** - Alterações macroscópicas em potros acometidos por *Rhodococcus equi* (Continuação).

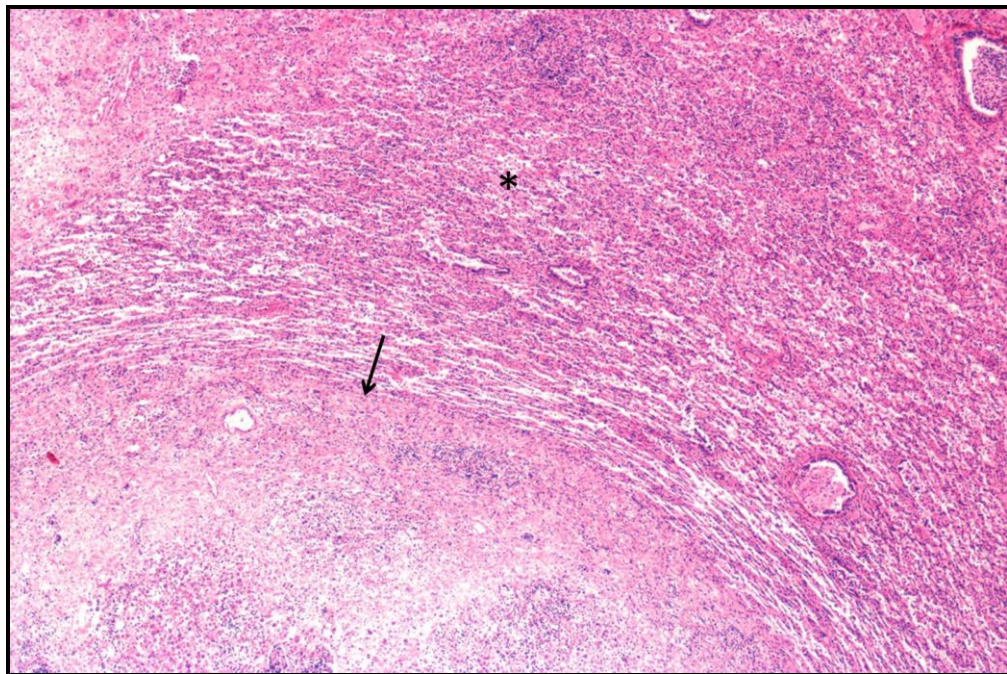
Caso	Lesões do trato respiratório e cavidade torácica	Lesões extrapulmonares
19	<b>Pulmões:</b> um nódulo de 2 cm de diâmetro em lobo diafragmático direito. Restante do parênquima não colapsado e congesto. <b>Cavidade torácica:</b> hidrotórax discreto (300 ml).	<b>Intestino delgado:</b> congestão acentuada da mucosa. <b>Linfonodos mesentéricos e colônicos:</b> moderadamente aumentados e congestos. <b>Cólon:</b> conteúdo liquefeito no lúmen, com hiperemia acentuada da mucosa, edema da parede e moderada quantidade de fibrina sobre a mucosa. <b>Ceco:</b> conteúdo intestinal líquido de coloração amarelada e mucosa hiperêmica. <b>Estômago:</b> mucosa congesta. <b>Fígado:</b> moderadamente congesto.
20	<b>Pulmões:</b> um nódulo de 7 cm de diâmetro bem delimitado sobre a incisura cardíaca do pulmão esquerdo e múltiplos nódulos pouco delimitados coalescentes nos lobos crânio-ventrais. Restante de ambos os pulmões não colapsados, com impressão das costelas, de consistência cárnea difusa e superfície pleural com aspecto opaco.	<b>Mesentério:</b> nódulo de 8x6x5 cm, superfície de corte esbranquiçada de consistência firme apresentando septos. <b>Olhos:</b> material fibrinoso ocupando a câmara anterior. <b>Articulações dos membros:</b> acentuado aumento de do líquido sinovial com perda de viscosidade. <b>Cavidade abdominal:</b> moderada quantidade de líquido amarelado opaco com abundantes filamentos de fibrina. <b>Estômago:</b> erosões lineares na porção glandular, hiperqueratose discreta. <b>Coração:</b> atrofia gelatinosa da gordura do epicárdio, aurícula direita com placas esbranquiçadas (mineralização) na superfície epicárdica. Endocárdio parietal e valvular do ventrículo esquerdo com placas esbranquiçadas quebradiças (mineralização).

\*S/A: sem alterações.

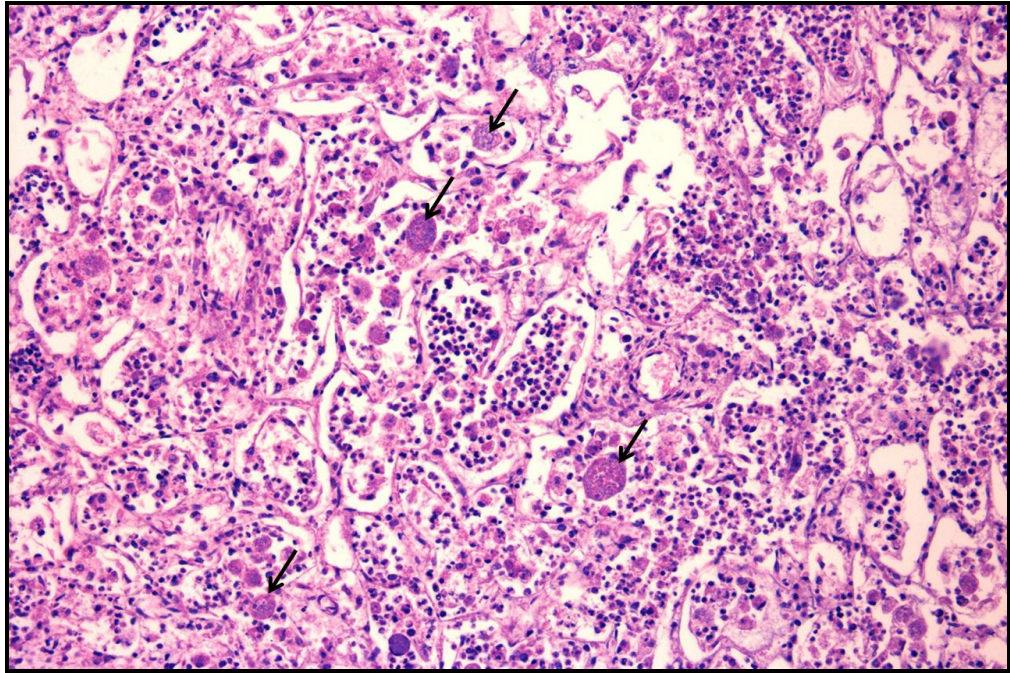


#### 4.4. Histopatologia

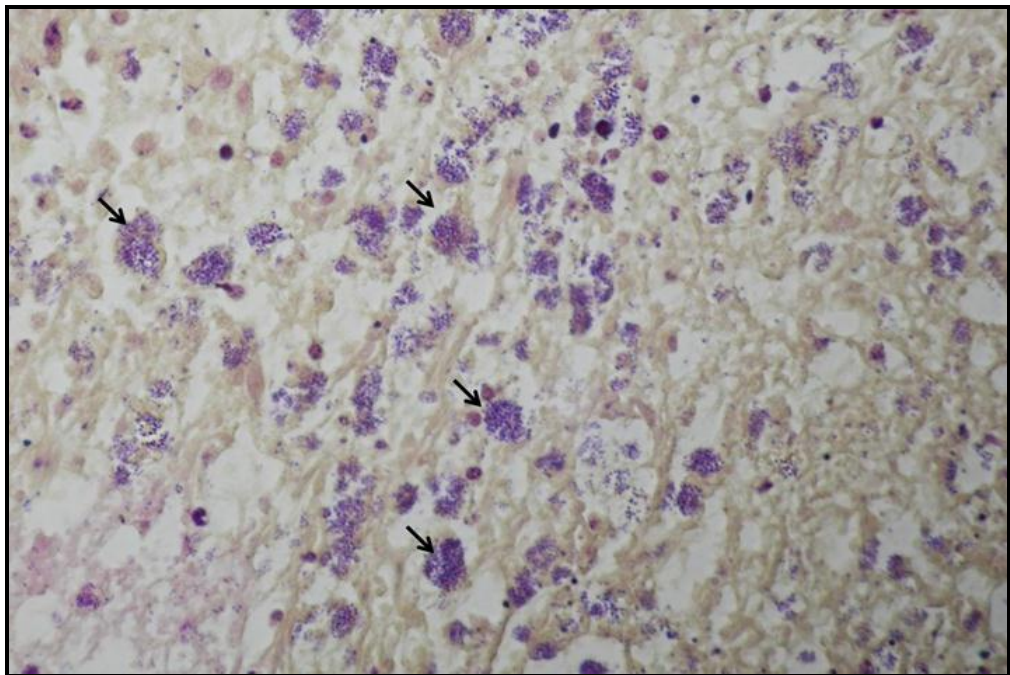
Os nódulos multifocais a coalescentes apresentavam, microscopicamente, extensas áreas de necrose com infiltrado piogranulomatoso (**Figura 32**) composto por abundantes neutrófilos, macrófagos e células gigantes do tipo Langhans e de corpo estranho. Muitas vezes as células fagocitárias continham pequenos cocos intracitoplasmáticas visíveis em coloração de HE (**Figura 33**). A coloração de Brown-Hopps revelou marcação Gram positiva das bactérias (**Figura 34**). Frequentemente as células fagocitárias também continham neutrófilos e outras células degeneradas em profusão no citoplasma (**Figura 35**). As áreas eram circundadas por tecido conjuntivo.



**Figura 32. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com extensa área de necrose com infiltrado piogranulomatoso focal (seta); área adjacente com atelectasia e abundante infiltrado de neutrófilos e macrófagos (\*). Hematoxilina e eosina (HE), obj. 4x.

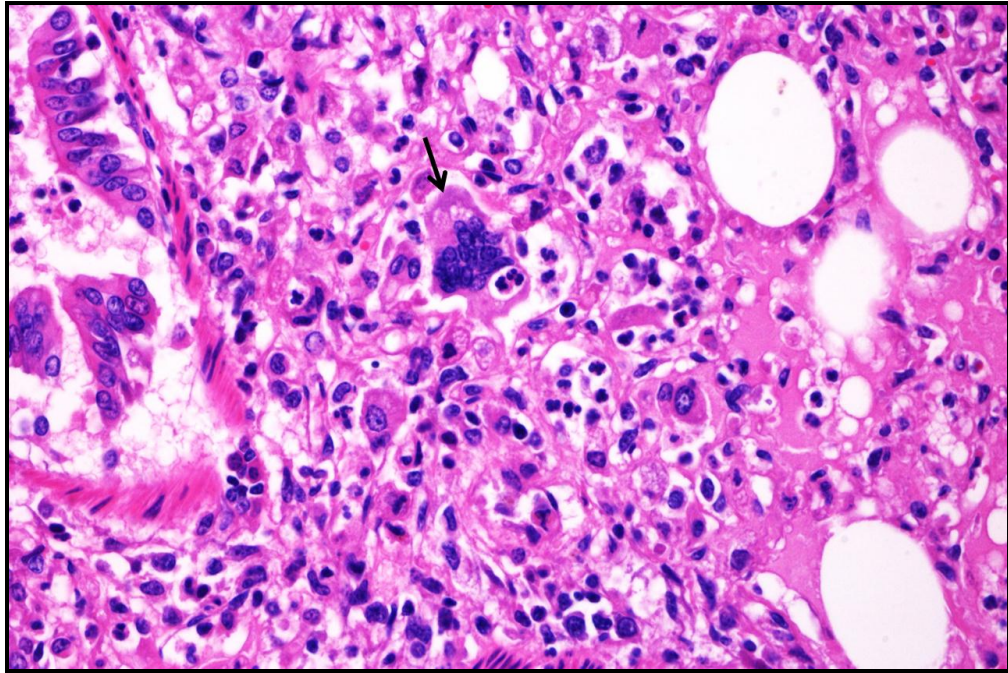


**Figura 33. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com abundante infiltrado piogranulomatoso composto por neutrófilos e macrófagos com citoplasma repleto de bactérias (setas) HE, obj. 20x.



**Figura 34. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com inúmeros macrófagos contendo pequenos cocos Gram positivos (setas). Coloração de Brown-Hopps, obj. 40x.



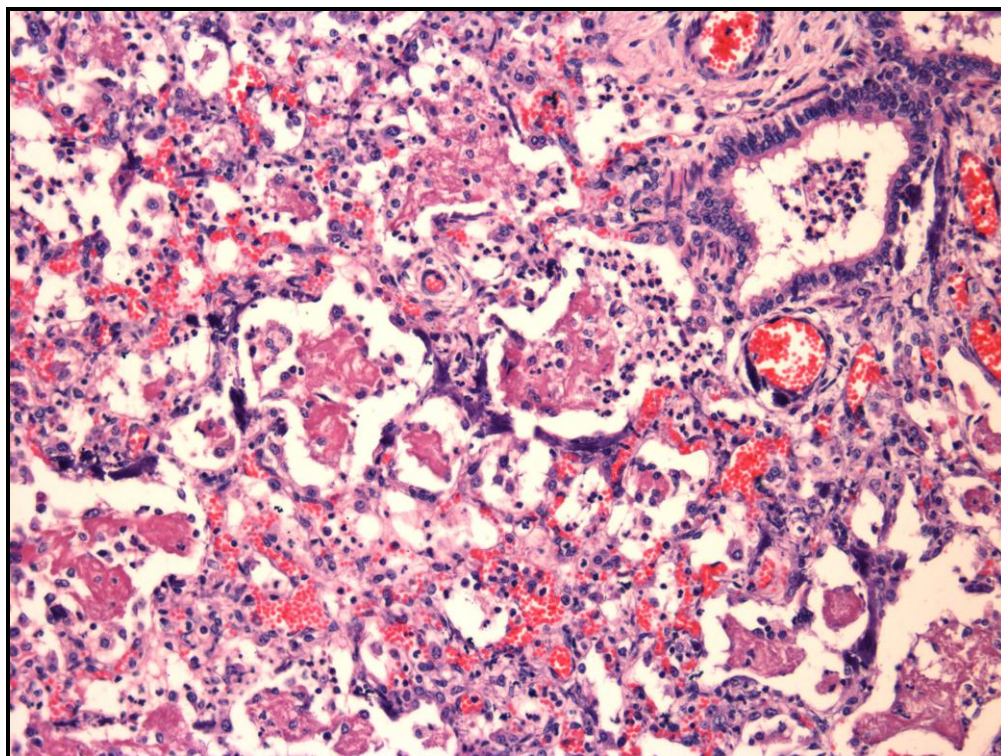


**Figura 35. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com infiltrado piogranulomatoso com célula gigante tipo corpo estranho. Observa-se células degeneradas no citoplasma da célula fagocitária (seta) HE, obj. 40x.

No parênquima pulmonar externo aos nódulos também havia infiltrado de neutrófilos, macrófagos e células gigantes na luz de alvéolos, brônquios e bronquíolos, caracterizando uma broncopneumonia piogranulomatosa. Os capilares alveolares apresentavam grande quantidade de neutrófilos e trombos de fibrina, mas apenas dois casos apresentaram infartos.

Edema de septos interlobulares, atelectasia, congestão, edema alveolar com variável quantidade de fibrina e eventual formação de membranas hialinas foram achados em diferentes graus. Havia espessamento de paredes alveolares em cinco casos (casos 4, 5, 12, 17 e 20) decorrente da proliferação de pneumócitos tipo 2 e, ou da infiltração de macrófagos.

No caso 20, além do espessamento havia calcificação difusa de septos alveolares e de parede de artérias (**Figura 36**). Também foi observado mineralização difusa de fibras colágenas do endocárdio ventricular e epicárdio da aurícula, além de mineralização multifocal do miocárdio com infiltrado inflamatório predominado por macrófagos.



**Figura 36. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com espessamento e mineralização de septos alveolares com infiltrado predominantemente neutrofílico e intensa deposição de fibrina intra-alveolar. HE, obj. 20x.

No caso 3 constatou-se, na mucosa e submucosa da traqueia, infiltrado piogranulomatoso multifocal com macrófagos com grande quantidade de bactérias intra-citoplasmáticas e ulceração superficial.

Na traqueia e esôfago do caso 17, assim como no estômago do caso 06, havia necrose multifocal da mucosa com infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico, deposição de fibrina e debris celulares, em associação com leveduras e hifas coradas pela prata metenamina de Grocott, compatíveis com *Candida* sp.

Nos casos com acometimento de ceco e cólon havia infiltrado piogranulomatoso composto por numerosos neutrófilos, macrófagos e células gigantes contendo grandes quantidades de bactérias intra-citoplasmáticas com ulceração focal da mucosa, associado à agregados linfáticos da submucosa. Os vasos linfáticos da submucosa e serosa, também se apresentavam repletos de neutrófilos, macrófagos e células gigantes por vezes contendo bactérias intra-citoplasmáticas. Da mesma forma, os linfonodos colônicos, cecais e mesentéricos que demonstravam-se macroscopicamente aumentados, liquefeitos ou caseosos possuíam infiltrado piogranulomatoso e extensa necrose central.

O caso 19 apresentava, no intestino grosso, necrose superficial da mucosa com colônias bacterianas e escassos filamentos de fibrina. Nas criptas e glândulas de Lieberkühn havia neutrófilos degenerados na luz (abscesso de criptas), neutrófilos entre as células epiteliais, edema e hiperemia marcada da submucosa e congestão acentuada do intestino delgado. O caso recebeu diagnóstico morfológico de colite fibrino-necrótica.

Os casos 7 e 20 apresentaram deposição de fibrina na câmara anterior dos globos oculares, o caso 12 apresentava fibrina associada com hemácias e o caso 13, grande quantidade de hemácias.

Os casos 12, 13 18 e 20 apresentaram, nas articulações, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e intensa proliferação das células de revestimento sinovial, por vezes contendo necrose. O caso 13 apresentava também intensa hemorragia em meio ao tecido conjuntivo fibroso da cápsula articular. O caso 20 apresentava também produção de matriz mixomatosa. O caso 14 apresentava intensa proliferação de tecido conjuntivo fibroso com abundante infiltrado piogranulomatoso contendo macrófagos com inúmeras bactérias.

No caso 14, a primeira vértebra cervical apresentava extensa necrose e infiltrado piogranulomatoso com macrófagos contendo miríades bacterianas, circundado por tecido conjuntivo fibroso e destruição óssea. No caso 11, a segunda vértebra lombar apresentava destruição óssea com infiltrado piogranulomatoso que se estendia ao espaço epidural. A medula espinhal adjacente apresentava acentuada degeneração Walleriana e gliose. O caso 17 apresentava, na costela, infiltrado piogranulomatoso e destruição óssea com envolvimento da musculatura intercostal adjacente.

Outros órgãos apresentavam grande quantidade de neutrófilos e trombos de fibrina intravasculares, sobretudo os sinusoides hepáticos e vasos meningeanos.

#### **4.5. Exames microbiológicos**

O exame bacteriológico revelou crescimento de *Rhodococcus equi* em quinze entre vinte casos. Nos demais houve crescimento de micro-organismos contaminantes ou ausência de crescimento bacteriano.

No caso 14 houve crescimento de *R. equi* do abscesso de vértebra cervical e da articulação tíbio-társica direita. No caso 20 também houve isolamento de *R. equi* de líquido sinovial. Nas demais amostras de líquido sinovial não houve crescimento

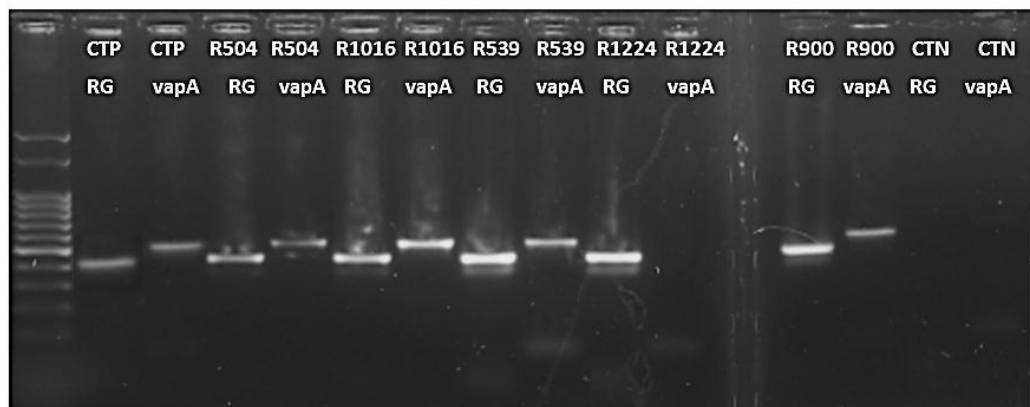
bacteriano. O exame bacteriológico do solo da propriedade endêmica revelou crescimento de *R. equi* na amostra do piquete de suplementação dos potros. Nos casos 17 e 19 também houve isolamento de *Salmonella* sp. de amostras intestinais.

O isolado de *R. equi* do caso 16 revelou resistência a azitromicina e eritromicina. Ambos os antimicrobianos são considerados de eleição para tratamento de *R. equi* e foram empregados em casos de rodococose na propriedade. Outros oito princípios foram testados e obtiveram resultado satisfatório em inibir o crescimento bacteriano.

Nos casos 06 e 17 obteve-se isolamento de *Candida albicans* das mucosa esofágica e lingual. Também houve isolamento de *Aspergillus fumigatus* em amostra pulmonar, lingual e esofágica, além de *Cladosporium* sp. em amostra pulmonar do caso 06, porém, devido à ausência de estruturas e lesões microscópicas compatíveis com os micro-organismos a constatação em exame micológico foi interpretada como contaminação.

#### 4.6. PCR

Os isolados de *R. equi* de lesões piogranulomatosas dos casos 15, 17 e 18 foram todas positivas para o gene de virulência *VapA* em exame de PCR. O isolado de solo do piquete de suplementação alimentar dos potros, por outro lado, não revelou o mesmo gene (**Figura37**).



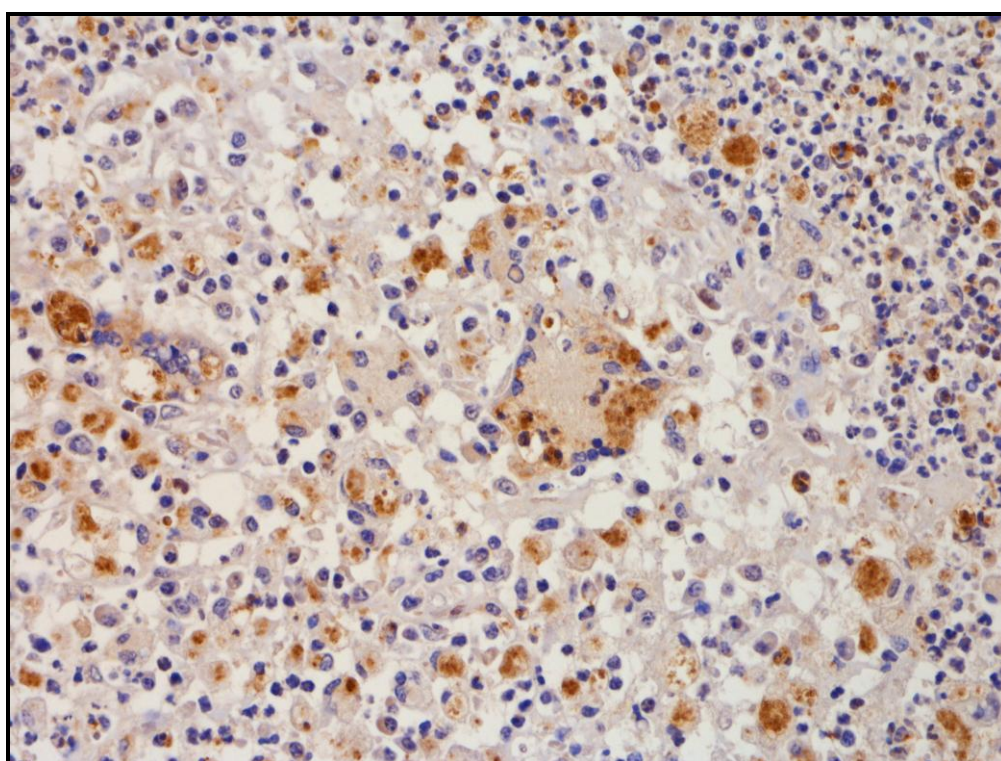
**Figura 37. Infecção por *R. equi* em potros:** PCR para identificação do gênero *Rhodococcus* e do gene de virulência *VapA*. **RG:** marcador do gênero. **VapA:** marcador do gene de virulência. **CTP:** controle positivo; **CTN:** controle negativo; **R504:** caso 15; **R539:** caso 17; **R1016:** caso 18; **R1224:** amostra de solo. **R900:** amostra anatomopatológica não incluída no estudo. Observar as bandas de RG e VapA nos controles positivos e a ausência das mesmas nos controles negativos. As amostras de isolamentos de casos clínicos foram todas positivas para os marcadores RG e VapA. A amostra de solo foi positiva apenas para RG, mas não para o marcador de virulência VapA.



#### 4.7. Exames imuno-histoquímicos

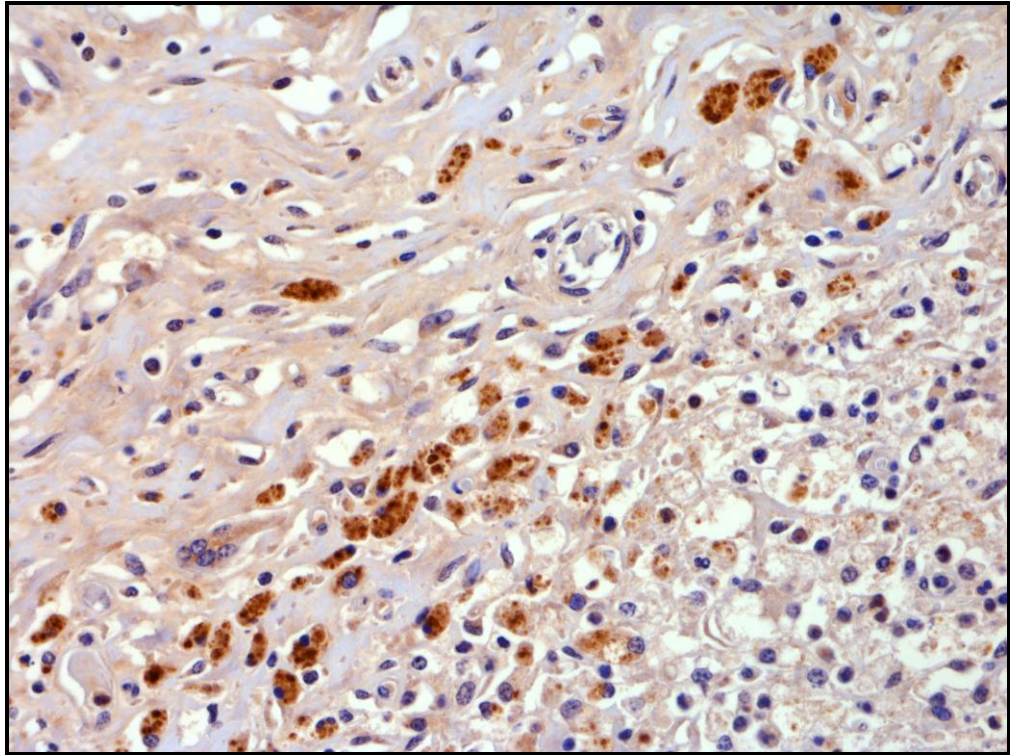
IHQ para *R. equi* revelou o agente no interior de macrófagos e células gigantes dos dezenove potros com pneumonia piogranulomatosa (**Figura 38 e 39**). O controle de reação cruzada não apresentou marcação.

As lesões piogranulomatosas extra-pulmonares, como de vértebras, costela, traqueia e intestinos (**Figura 40**) foram positivas na IHQ para *R. equi*. Os linfonodos foram positivos em três dos nove casos testados, Todos os olhos e cápsulas articulares com lesão linfoplasmocitária foram negativos.

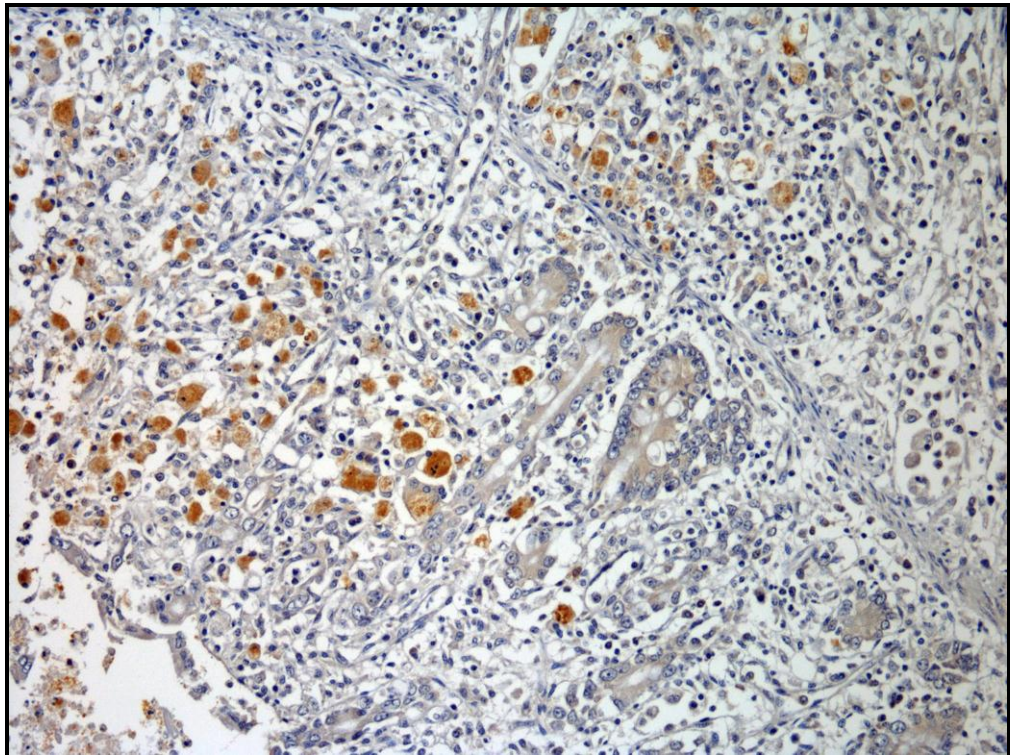


**Figura 38. Infecção por *R. equi* em potros: pulmão, marcação de bactérias no interior de macrófagos e células gigantes. Imuno-histoquímica anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 40x**





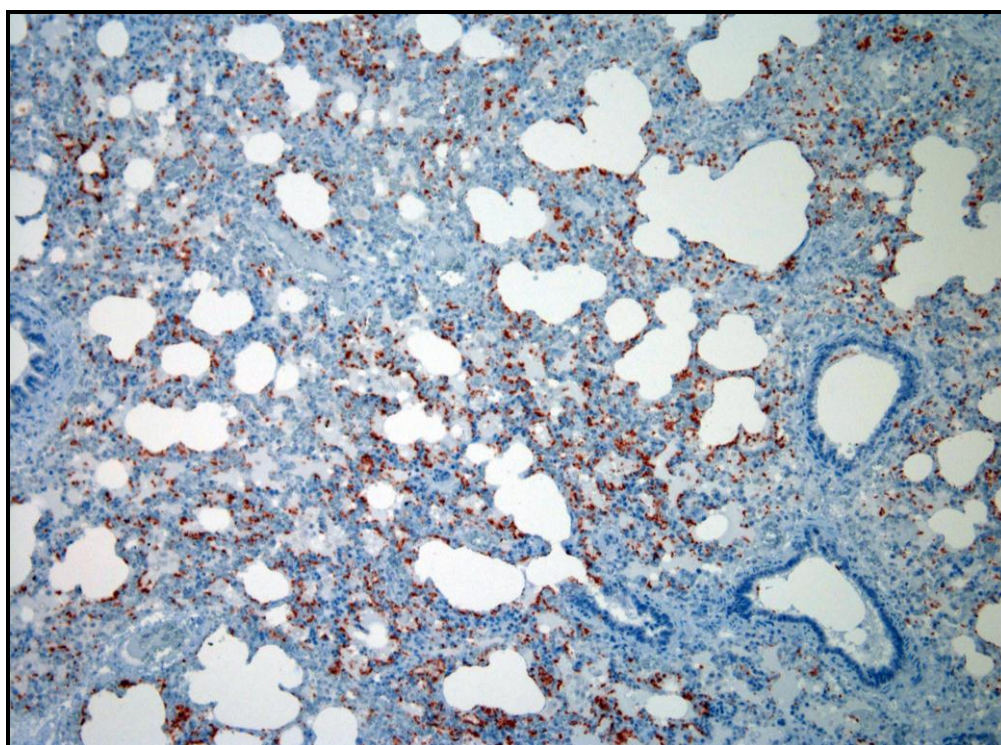
**Figura 39. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão, marcação de bactérias em macrófagos e células gigantes na periferia da lesão piogranulomatosa. IHQ anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 40x



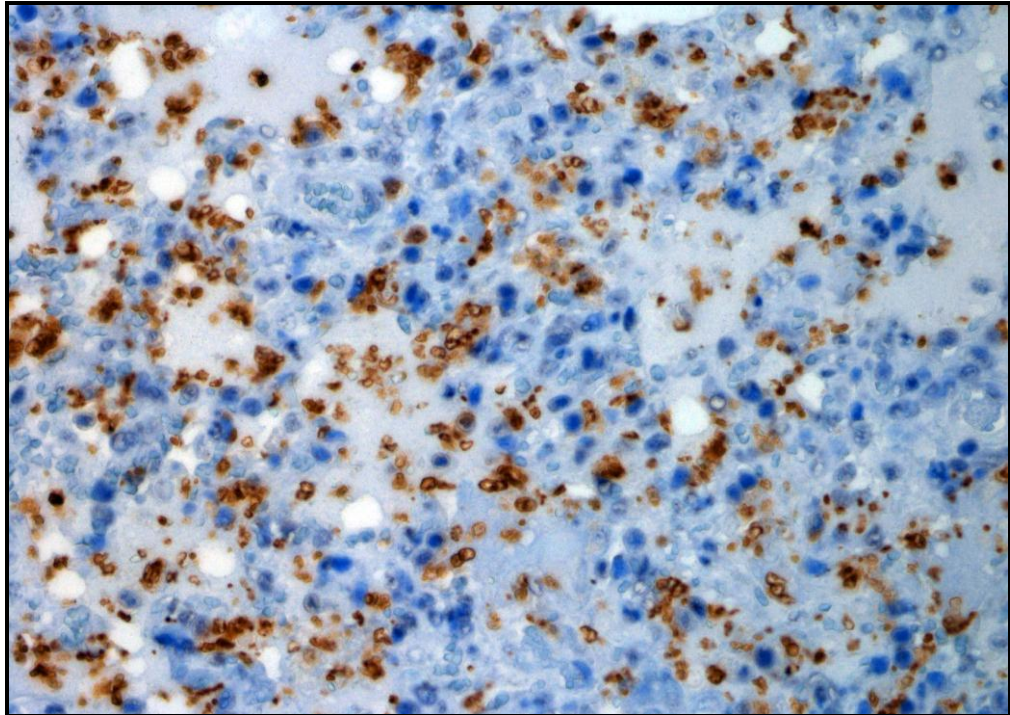
**Figura 40. Infecção por *R. equi* em potros:** intestino grosso com marcação de bactérias em macrófagos na mucosa e submucosa. IHQ anti-*Rhodococcus equi* pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno DAB, obj. 20x



Apesar de não haver casos com lesões microscópicas ou macroscópicas sugestivas de *Pneumocystis* sp., o exame imuno-histoquímico revelou treze casos positivos para o agente (**Figura 41 e 42**). Um dos quais com marcação difusa acentuada tanto em septos quanto na luz alveolar e outro com marcação acentuada e distribuição multifocal a coalescente. Cinco casos apresentaram marcação multifocal moderada e os seis restantes com marcação multifocal discreta.



**Figura 41. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com marcação positiva de estruturas ovais de aproximadamente 4 a 8  $\mu\text{m}$ , sobretudo em septos alveolares. Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp. pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno AEC, obj. 20x



**Figura 42. Infecção por *R. equi* em potros:** pulmão com marcação positiva de estruturas ovais de aproximadamente 4 a 8  $\mu\text{m}$ , tanto em septos alveolares como no interior de alvéolos. Imuno-histoquímica anti-*Pneumocystis* sp.pelo método biotina-estreptavidina ligada à peroxidase. Cromógeno AEC, obj. 40x.

**Tabela 3:** Intensidade e distribuição de marcação de *Pneumocystis* sp. em exame imuno-histoquímico de pulmões de potros acometidos por *Rhodococcus equi*.

<b>Caso</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Distribuição</b>
<b>01</b>	-	-
<b>02</b>	-	-
<b>03</b>	++	Multifocal
<b>04</b>	+	Multifocal
<b>05</b>	+	Multifocal
<b>06</b>	-	-
<b>07</b>	++	Multifocal
<b>08</b>	-	-
<b>09</b>	+++	Difusa
<b>10</b>	++	Multifocal
<b>11</b>	-	-
<b>12</b>	-	-
<b>13</b>	-	-
<b>14</b>	++	Multifocal
<b>15</b>	+	Multifocal
<b>16</b>	++	Multifocal
<b>17</b>	+++	Multifocal a coalescente
<b>18</b>	+	Multifocal
<b>19</b>	+	Multifocal
<b>20</b>	++	Multifocal

Marcação discreta: +; moderada: ++; acentuada: +++; sem marcação: -

## 5. DISCUSSÃO

Os dados epidemiológicos dos potros da propriedade endêmica demonstram que a rodococose ocorria esporadicamente até a introdução de novas éguas no grupo de parição. O aumento da densidade populacional de potros, assim como o perfil imune e microbiotas diferenciadas das fêmeas introduzidas e das residentes podem ter relação com a epidemia ocorrida.

Os intestinos de equinos são o hábitat natural de *R. equi* e as fezes desses animais fornecem o substrato para sobrevivência e multiplicação no ambiente, portanto a concentração aumentada de equinos poderia promover o incremento da contaminação ambiental pelo micro-organismo (HUGHES; SULAIMAN, 1987). A vacinação das fêmeas não surtiu efeito desejado de deter a infecção dos potros, provavelmente devido ao baixo desempenho da imunidade passiva frente a *R. equi* constatado previamente (DEPRÁ et al., 2001).

O piquete de suplementação dos potros da propriedade visitada apresentou a única amostra ambiental com isolamento de *R. equi*, possivelmente devido à alta concentração de animais no pico de eliminação da bactéria (PRESCOTT, 1987). Takai (1997) sugere a busca de amostras virulentas de *R. equi* em ambientes de criação como um marcador de endemicidade da doença, porém a ausência do gene de virulência *VapA* na amostra isolada do solo, demonstra que nem toda a população bacteriana ambiental é dotada de patogenicidade, ao contrário do que se pôde constatar nas amostras das lesões, que invariavelmente possuíam o gene de virulência.

A idade média dos animais acometidos e a época do ano coincidem com o que é mencionado pela literatura (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997), e não se constatou predileção por sexo. Todos os animais acometidos pertenciam a estabelecimentos de criação intensiva, denotando maior ocorrência da enfermidade em ambientes mais povoados frente a criações mais rústicas, em que os animais são criados de forma extensiva, com acesso a áreas abertas, com maior cobertura vegetal e menor possibilidade de contágio por interação direta.

Os achados macroscópicos são característicos da infecção respiratória e dificilmente estão ausentes em potros acometidos. A lesão mais encontrada à necropsia consistia em nódulos amarelados com distribuição multifocal aleatória por vezes coalescente e com superfície de corte caseosa ou liquefeito, de aspecto semelhante a

abscessos. Um dos animais deste trabalho, no entanto, não possuía lesões pulmonares e, possivelmente, a via para o desenvolvimento das lesões é hematogena.

As lesões extrapulmonares mais constantes apresentavam-se como nódulos ulcerados na superfície mucosa do ceco e cólon, que estiveram presentes em 25% dos casos, proporção bastante aquém dos 50% mencionados pela literatura (ZINK; YAGER; SMART, 1986). A disseminação do micro-organismo para o trato gastrointestinal é consequência da deglutição de exsudato respiratório contendo macrófagos carregados de bactérias (HONDALUS, 1997). A lesão constatada na traqueia de um potro presumivelmente também tenha origem na expectoração do organismo proveniente de lesões pulmonares.

Disseminação hematogena de *R. equi* esteve associada com a ocorrência das lesões osteo-articulares em três casos. Dois animais apresentaram osteomielite vertebral e um terceiro em uma costela. Devido à ausência de contiguidade com lesões em outros órgãos, fica clara a contribuição da septicemia em locais que estão isolados por outras vias de acesso. Em um caso com lesão vertebral e no caso com lesão na costela havia lesão pulmonar associada que poderia esclarecer a entrada do agente no organismo. O segundo caso com lesão vertebral possuía lesão séptica da articulação tíbio-társica direta, porém não possuía lesões pulmonares ou intestinais que pudessem servir de porta de entrada para o micro-organismo.

Sinais neurológicos estiveram presentes no potro com lesão de vértebra lombar devido à perda de consistência óssea e consequente compressão do segmento medular adjacente. O segundo caso, com osteomielite em vértebra cervical não manifestou sinais de compressão medular, apesar da exuberância da lesão, mas manifestou claudicação em decorrência da lesão articular tíbio-társica. Casos de osteomielite vertebral por *R. equi* são bem documentados e tem sido sugerido que a frequência esteja aumentando (MORRESEY; GARRETT; CARTER, 2011; HINES, 2007). O caso com osteomielite da costela não demonstrou qualquer sinal clínico relacionado à lesão.

A confirmação da artrite séptica por *R. equi* em IHQ e bacteriologia no caso 14, esteve de acordo com os sinais clínicos e achados patológicos, que revelaram infiltrado piogranulomatoso e claudicação. O caso 20 mostra-se controverso devido ao isolamento de *R. equi* do líquido articular, apesar dos sinais clínico e achados patológicos pouco indicativo de artrite séptica.

Polissinovite reativa, caracterizada por aumento de volume de múltiplas articulações com acúmulo de líquido sinovial pouco viscoso é ocasionada por



mecanismo imunomediado e foi constatada em 15% dos casos, correspondendo a uma proporção bem inferior àquela observada em outros estudos, com aproximadamente um terço dos casos (CASWELL; WILIAMS, 2007). Foram considerados casos de sinovite reativa aqueles com aumento de volume articular, contendo infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e proliferação de células do revestimento sinovial, que não possuíam isolamento bacteriano. Clinicamente esses animais apresentavam mero aumento de volume articular, sem dor ou claudicação.

O caso 13, entretanto, em decorrência da coloração vermelha do líquido sinovial e da constatação de hemorragia na cápsula articular em exame microscópico sugere que o aumento de volume articular seja decorrente de uma hemartrose sobreposta à artrite reativa, visto que o potro possuía diátese hemorrágica e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário com proliferação das células de revestimento sinovial.

As causas das hemorragias disseminadas nesse caso não foram esclarecidas, porém algumas hipóteses podem ser aventadas. A púrpura hemorrágica guarda algumas semelhanças macroscópicas com o caso e já foi mencionada como uma eventual complicação da infecção por *R. equi*, entretanto microscopicamente não há degeneração vascular apreciável (PUSTERLA et al., 2003). Coagulação intravascular disseminada é mencionada em um potro inoculado experimentalmente com *R. equi* por via intrabronquial. O motivo para a ocorrência do evento nesse caso também não pode ser desvendada, pois não houve isolamento de *Salmonella* spp. da carcaça do animal e os autores consideram pouco provável que septicemia por *R. equi* pudesse ser a causa, porém não a descartam (JOHNSON, PRESCOTT, MARKHAM; 1983a).

A patogenia da ampla calcificação pulmonar, da parede de artérias e do endocárdio no caso 20 permanece especulativa. Uma causa sugerida para a deposição de cálcio em tecidos moles é a hipercalcemia determinada pela produção desregulada de vitamina D<sub>3</sub> ativa por macrófagos em doenças granulomatosas, como constatado em casos de paratuberculose e tuberculose bovina (BARROS; SOARES; GIMENENO, 2006; DRIEMEIER et al. 1999). Entretanto, não condiz com a ótima condição corporal do animal a frequente correlação entre a mineralização da íntima de vasos e doenças caquetizantes, nem mesmo com uma alteração degenerativa da senilidade (DRIEMEIER et al. 1999).

Embora as lesões pulmonares fossem intensas na maioria dos animais, poucos casos apresentaram sinais respiratórios acentuados. A apresentação clínica aguda em

uma doença crônica se deve à evolução lenta das lesões combinada à capacidade pulmonar compensatória dos animais (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Também não houve, em muitos casos, perda de condição corporal acentuada. Quando constatada, esteve mais associada com tiflocolite piogranulomatosa ou linfadenite mesentérica, presumivelmente devido à má absorção e perda de proteínas no fluído peritoneal (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

A lesão desencadeada por *Rhodococcus equi* nos pulmões de potros está fortemente associada com sua capacidade de sobrevivência e proliferação intracelular e apresenta-se na forma de piogranulomas contendo inúmeros neutrófilos e macrófagos carregados de bactérias intracitoplasmáticas, além de células gigantes portando bactérias e fagocitando debris celulares. Além disso, a formação de cápsula de tecido conjuntivo é variável nas lesões piogranulomatosas, diferente do que se observa em abscessos pulmonares (JOHNSON; PRESCOTT; MARKHAM, 1983a).

As lesões microscópicas extra-pulmonares possuíam as mesmas características básicas de infiltração piogranulomatosa com amplas áreas de necrose caseosa. Nas superfícies mucosas, as lesões associavam-se, sobretudo, com agregados linfóides, determinando a elevação focal da mucosa com ulceração central do epitélio e, frequentemente invasão dos vasos linfáticos por infiltrado inflamatório piogranulomatoso acentuado. A drenagem linfática do trato gastrintestinal representa a via de acesso de *R. equi* aos linfonodos mesentéricos e, provavelmente de outros locais.

Dentre os exames complementares empregados para a detecção de *R. equi*, a bacteriologia demonstrou sucesso no isolamento do agente em 75% dos casos analisados, ao passo que o exame imuno-histoquímico foi capaz de evidenciar o agente em 100% dos casos. A IHQ, portanto, demonstra ser exame altamente sensível, provavelmente devido à grande quantidade de bactérias no interior de células fagocitárias.

A técnica IHQ supera o exame bacteriológico em situações em que a contaminação da amostra com bactérias ambientais impede o crescimento de *R. equi*, assim como em coletas realizadas a campo, em que não haja meios disponíveis para conservação das amostras para exame bacteriológico. O recurso também pode ser útil em estudos retrospectivos em que se faça uso de tecidos fixados e embebidos em parafina.

A marcação IHQ do micro-organismo, no entanto apresentou intensidades diferentes dependendo do órgão analisado. Enquanto as lesões pulmonares, intestinais e

ósseas foram intensamente marcadas em todos os casos, os linfonodos, sem uma razão conhecida, foram positivos em um terço dos casos, ainda que apresentassem lesão piogranulomatosa com profusão de macrófagos contendo bactérias intracitoplasmáticas. Diante disso, os linfonodos são pouco recomendáveis para a marcação do agente.

A aquisição de resistência a azitromicina e a eritromicina, constatada pela prática clínica e pelos testes de sensibilidade a antimicrobianos foi fator complicador do combate ao agente. O retardo na eliminação da infecção ocasiona, a um tempo o agravamento do estado de saúde dos animais em tratamento, além de prolongar a eliminação de bactérias patogênicas e resistentes a antimicrobianos no ambiente. O tratamento a base de eritromicina por via oral pode ocasionar diarreia em potros e mesmo septicemia por *Salmonella* spp em casos extremos (GIGUÈRE PRESCOTT, 1997), o que pode explicar os casos de salmonelose descritos neste trabalho.

As causas para a ocorrência de salmonelose associada com infecção por *R. equi* podem ser os fatores de risco semelhantes para ambas as enfermidades, como a elevada temperatura ambiental, a idade dos animais entre outros. Por outro lado a ocorrência de estresse relacionado ao manejo, tratamento antimicrobiano, diarreia e outros podem desencadear a manifestação clínica da salmonelose, ou aumentar sua eliminação ambiental (TRAUB-DARGATZ; BESSER, 2007). Esses eventos são mencionados com frequência no histórico de animais com infecção por *R. equi*

Além das enterites por *Salmonella* spp., estiveram presentes coinfeções ou infecções secundárias por outros agentes, como a candidíase do trato digestório superior em dois casos e a infecção pulmonar por *Pneumocystis* sp., constatada por exame imunohistoquímico em treze casos. Ambos os agentes são considerados oportunistas e, no caso de *C. albicans*, o crescimento é estimulado por mudanças de microbiota devido ao uso de antimicrobianos, antiinflamatórios ou condições de estresse social. Enquanto *Pneumocystis* sp. costuma ser constatado em casos de imunodeficiência congênita ou adquirida (CASWELL; WILLIAMS, 2007).

*Pneumocystis* sp. é responsável por pneumonias em potros e a pesquisa do agente foi realizada devido à sua associação conhecida com outros agentes como *R. equi* (PARADIS, 2006). Os exames macroscópicos e histológicos dos pulmões, no entanto, não forneceram subsídios para suspeita do agente e possivelmente o micro-organismo tenha sido mascarado na coloração de HE pela sobreposição de estruturas, como fibrina na luz alveolar e debris celulares no interior de macrófagos. Por outro lado, cabe ressaltar que o caso 14 não possuía lesões pulmonares macroscópicas ou microscópicas

e o exame imuno-histoquímico revelou *Pneumocystis* sp.. Essa constatação pode ser interpretada como uma infecção em período prévio a qualquer manifestação clínica e patológica ou a existência de casos com apresentação subclínica. Além disso, não houve correlação entre o espessamento de septos alveolares e a constatação de *Pneumocystis* sp. em exame imuno-histoquímico. Os cinco potros com espessamento de paredes alveolares apresentaram marcação IHQ para o fungo variando de acentuada com distribuição multifocal a coalescente (caso 17), passando por moderada (caso 20) e discreta (casos 4 e 5) com distribuição multifocal e um caso sem marcação (caso 12).

Diante da verificação de infecção por *Pneumocystis* sp. associado em alta proporção a *R. equi*, ainda necessita maiores investigações. Além disso, a associação de *Pneumocystis* sp. com outros patógenos em equinos, e mesmo seu papel como agente primário de pneumonia na espécie no Brasil ainda não estão bem esclarecidos. Da mesma forma, agentes virais poderiam representar uma infecção primária que possibilitasse o estabelecimento da infecção por *R. equi*, como é sugerido para o Herpesvírus Equino tipo 2 e poderiam auxiliar a desvendar os espessamentos de septos alveolares constatados em cinco animais deste trabalho (NORDENGRÄHN, 1996). As causas conhecidas de pneumonia intersticial em equinos, no entanto, necessitam extensa investigação, abrangendo uma gama variada de agentes infecciosos, tóxicos e alérgicos (BUERGELT et al., 1986; PRESCOTT et al., 1991).

## 6. CONCLUSÕES

A lesão mais frequente nos casos descritos é a broncopneumonia piogranulomatosa com formação de nódulos caseosos de diferentes tamanhos e distribuições.

As lesões extra-pulmonares mais frequentes são linfadenites traqueobrônquica e mesentérica e tiflocolites ulcerativas.

Osteomielites e artrites sépticas demonstram a importância da disseminação hematogena do agente.

Manifestações associadas com reação imunomediada ocorreram em diversos casos sob forma de sinovites e uveítes assépticas.

Os casos de candidíase e de salmonelose ressaltam o efeito imunossupressor da infecção por *R. equi* e o desequilíbrio da microbiota desencadeado por antimicrobianos.

A co-infecção por *Pneumocystis* sp. em elevada proporção de casos também indica a atividade imunossupressora de *R. equi*.

O isolamento de *R. equi* no solo do piquete de suplementação dos potros pode indicar alta contaminação ambiental associada com altas concentrações de potros.

O exame imuno-histoquímico demonstra sensibilidade e especificidades satisfatórias no diagnóstico *post mortem* da infecção por *R. equi*. Os linfonodos mostram-se pouco adequados para a aplicação do método.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANZAI, T.; WADA, R.; NAKANISHI, A.; KAMADA, M.; TAKAI, S.; SHINDO, Y.; TSUBAKI, S. Comparison of tracheal aspiration with other tests for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 335-345, 1997.
- BARROS, S. S. ; SOARES, M. P.; GIMENO, E. J. Macrophages and giant cell proliferation associated with bone protein synthesis and calcification in the trachea and bronchi of rabbits intoxicated with *Solanum glaucophyllum*. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 4, p. 494-499, 2006.
- BARTON, M.D. Ecology of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 65-76, 1984.
- BAUWENS, L.; VAN DYCK, E.; DE MEURICHY, W; PIOT, P.; *Corynebacterium equi* pneumonia in three baikal seals (*Pusa sibirica*) **Aquatic Mammals**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 1987.
- BROWN, C.C.; BAKER, D.C.; BARKER, I.K. Alimentary system. In: MAXIE, M.G. (ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5<sup>th</sup>, vol. 2, St. Louis: Elsevier, cap. 5, p. 3-296, 2007.
- BUERGELT, C. D.; HINES, S. A.; CANTOR, G.; STIRK, A.; WILSON, J. H. A retrospective study of proliferative interstitial lung disease of horses in florida. **Veterinary Pathology**, v. 23, n. 6, p. 750-756, 1986.
- 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.
- CASWELL, J.L.; WILLIAMS, K.J. Respiratory system. In: MAXIE, M.G. (ed.). **Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals**, 5<sup>th</sup> Ed, vol. 2, St. Louis: Elsevier, cap. 5, p. 524-650, 2007.
- CANADAY, D. H.; WILKINSON, R. J.; LI, Q.; HARDING, C. V.; SILVER, R. F.; BOOM, W. H. CD4+ and CD8+ T Cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 5, p. 2734-2742, 2001.
- CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J.; EDWARDS, R. F.; NEVILL, M.; SMITH III, 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, n. 1-2, p. 33-48, 2004.
- CHAFFIN, M. K. & MARTENS, R. J. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: retrospective study of 61 cases (1988-1996). **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 79-80, 1997.

- DARRAH, P. A.; HONDALUS, M. K.; CHEN, Q.; ISCHIROPOULOS, H.; MOSSER, D. M. 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.
- DAVIS, W. P.; STEFICEK, B. A.; WATSON, G. L.; YAMINI, B.; MADARAME, H. ; TAKAI, S.; RENDER, J. A. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 336–339, 1999.
- DEPRÁ, N.M.; VINOCUR, M.; FIGUEIRÓ, G.M.; FIALHO, S.S.; BRASS, K.E.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Monitoramento da infecção por *Rhodococcus equi* em potros puro sangue de corrida. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 29, n. 1, p. 25-35, 2001.
- DRIEMEIER, D.; CRUZ, C. E. F.; GOMES, M. J. P.; CORBELLINI, L. G.; LORETTI, A. P.; COLODEL, E. M. Aspectos clínicos e patológicos da paratuberculose em bovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 3-4, p. 109-115, 1999.
- ELLENBERGER, M. A.; KAEBERLE, M.L.; ROTH, J.A. Effect of *Rhodococcus equi* on equine polymorphonuclear leukocyte function. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 7, n. 3-4, p. 315-324, 1984.
- FAIRLEY, R.A. & FAIRLEY, N.M. *Rhodococcus equi* infection of cats. **Veterinary Dermatology**, v. 10, n. 1, p. 43-46, 1999.
- FITZGERALD, S. D. & YAMINI, B. Rhodococcal abortion and pneumonia in an equine fetus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 7, n. 1, p. 157-158, 1995.
- FLAMINIO, M.J.B.F.; RUSH, B.R.; SHUMAN, W. Peripheral blood lymphocyte subpopulations and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 206–212, 1999.
- FLYNN, J. L. & CHAN, J. What's good for the host is good for the bug. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 98-102, 2005.
- GELBERG, H.B. Alimentary system and the peritoneum, omentum, mesenterium and peritoneal cavity. In: MCGAVIN, D.; ZACHARY, J.F. (eds.). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**, 5<sup>th</sup> Ed., St. Louis: Elsevier Mosby, cap. 7, p. 323-404, 2012.
- GIGUÈRE, S.; HONDALUS, M. K.; YAGER, J. A.; DARRAH, P.; MOSSER, D. M.; PRESCOTT, J. F. Role of the 85-Kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 7, p. 3548–3557, 1999.

- 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.
- GOETHALS, K. ; VEREECKE, D.; JAZIRI, M.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Leafy gall formation by *Rhodococcus fascians*. **Annual Review of Phytopathology**, v. 39, p. 27–52, 2001.
- GOODFELLOW, M & ALDERSON, G. The Actinomycete-genus *Rhodococcus* : a home for the *rhodochrous*' complex. **Journal of General Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 99-122, 1977.
- HARRINGTON, J.R.; GOLDING, M.C.; MARTENS, R.J.; HALBERT, N.D.; COHEN, N.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.
- HEIDMANN, P.; MADIGAN, J. E.; WATSON, J.L. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. **Clinical techniques in equine practice**, v. 5, n. 3, p. 203-210, 2006.
- HIETALA, S.K. & ARDANS, A.A. Interaction of *Rhodococcus equi* with phagocytic cells from *R. equi*-exposed and Non-exposed foals. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 307-320, (1987).
- HINES, M.T. *Rhodococcus equi*. In: SELTON, D. C.; LONG. M.T. (eds.) **Equine Infectious Diseases**, St. Louis: Saunders Elsevier, cap. 32, p. 281-295, 2007.
- HONDALUS, M. K. *Rhodococcus equi*: pathogenesis and virulence. **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 43, p. 71-78, 1997.
- 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.
- HONG, C.B. & DONAHUE, J. M. *Rhodococcus equi*-associated necrotizing lymphadenitis in a llama. **Journal of Comparative Pathology**, v. 113, n. 1, p. 85-88, 1995.
- HUGHES, K.L. & SULAIMAN, I. The ecology of *Rhodococcus equi* and physicochemical influences on growth. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 241-250, 1987.
- HULTÉN, C. & DEMMER, S. Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 7, p. 693-698, 2002.
- JACKS, S. S.; GIGUÈRE, S.; NGUYEN, A. In vitro susceptibilities of *Rhodococcus equi* and other common equine pathogens to azithromycin, clarithromycin, and 20 other antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 1742–1745, 2003.

- JOHNSON, J. A.; PRESCOTT, J. F.; MARKHAM, R. J. F. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 4, p. 440-449, 1983a.
- JOHNSON, J. A.; PRESCOTT, J. F.; MARKHAM, R. J. F. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intragastric challenge. **Veterinary Pathology**, v. 20, n. 4, p. 450-459, 1983b.
- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. 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. Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 8, p. 3037-3041, 1995.
- KINNE, J.; MADARAME, H.; TAKAI, S.; JOSE, S.; WERNERY, U. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in dromedary camels (*Camelus dromedarius*). **Veterinary Microbiology**, v. 149, n. 1-2, p. 269-272, 2010.
- KOMIJN, R. E.; WISSELINK, H. J.; RIJSMAN, V.M.C.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; BAKKER, D.; ZIJDERVELD, F.G.; EGER, T.; WAGENAAR, J.A.; PUTIRULAN, F.F.; URLINGS, B.A.P. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 120, n. 3-4, p. 352-357, 2007.
- LAZZARI, A.; VARGAS, A. C.; DUTRA, V.; PEDROZO, A.F., WEISS, L. H. N.; FERREIRA, G. L. Soroepidemiologia de *Rhodococcus equi* em equinos da região de Bagé, RS, pelo teste de inibição da hemólise sinérgica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 3-4, p.117-122, 1997.
- LÉGUILLETTE, R.; ROY, M.F.; LAVOIE, J.P. Foal Pneumonia. In: LEKEUX, P. (ed). **Equine Respiratory Diseases**. International Veterinary Information Service, Ithaca, 13p., 2002.
- LECLERE, M.; MAGDESIAN, K. G.; KASS, P.H.; PUSTERLA, N.; RHODES, D.M. Comparison of the clinical, microbiological, radiological and haematological features of foals with pneumonia caused by *Rhodococcus equi* and other bacteria. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 1, p. 109-112, 2011.
- MAKRAI, L.; FODOR, L.; VENDÉG, I.; SZIGETI, G.; DÉNES, B.; REICZIEGEL, 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, 2005.
- MARIOTTI, F.; CUTERI, V.; TAKAI, S.; RENZONI, G.; PASCUCI, L.; VITELLOZZI, G. Immunohistochemical detection of virulence-associated

- Rhodococcus equi* antigens in pulmonary and intestinal lesions in horses. **Journal of Comparative Pathology**, v. 123, n. 2-3, p. 186-189, 2000.
- MARTENS, R. J.; COHEN, N. D.; JONES, S. L.; MOORE, T.A.; EDWARDS, J. F. Protective role of neutrophils in mice experimentally infected with *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 10, p. 7040–7042, 2005.
- MCKENZIE R. A. & DONALD, B. A. Lymphadenitis in cattle associated with *Corynebacterium equi*: a problem in bovine tuberculosis diagnosis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 89, n. 1, p. 31-38, 1979.
- MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v. 35, n. 4, p. 383–396, 2004.
- MONEGO, F. **Caracterização molecular de *Rhodococcus equi* de potros pela PCR multiplex dos genes da família vap**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, 49 p., 2008.
- MONEGO, F.; MABONI, F.; KREWER, C.; VARGAS, A.; COSTA, M.; LORETO, E. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the vap gene family. **Current Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 399–403, 2009.
- MORRESEY, P. R.; GARRETT, K. S.; CARTER, D. *Rhodococcus equi* occipital bone osteomyelitis, septic arthritis and meningitis in a neurological foal. **Equine Veterinary Education**, v. 23, n. 8, p. 398-402, 2011.
- MUSCATELLO, G.; GERBAUD, S.; KENNEDY, C.; GILKERSON, J. R.; BUCKLEY, T. ; KLAY, M.; LEADON D. P.; BROWNING G. F. Comparison of concentrations of *Rhodococcus equi* and virulent *R. equi* in air of stables and paddocks on horse breeding farms in a temperate climate. **Equine Veterinary Journal**, v. 38, n. 3, p. 263-265, 2006.
- MUSCATELLO, G. ; LEADON, D. P.; KLAY, M.; OCAMPO-SOSA, A.; LEWIS, D. A.; FOGARTY, U.; BUCKLEY, T.; GILKERSON, J. R. ; MEIJER, W. G. ; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. **Equine Veterinary Journal**, v. 39, n. 5, p. 470-478, 2007.
- NORDENGRAHN, A.; RUSVAI, M.; MERZA, M.; EKSTRIJM, J.; MOREIN, B.; BELA, S. Equine herpesvirus type 2 (EHV-2) as a predisposing factor for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: prevention of the bifactorial disease with EHV-2 immunostimulating complexes. **Veterinary Microbiology**, v. 51, n. 1-2, p. 55-68, 1996.
- PARADIS, M.R. Pneumonias em potros. In: SMITH, B.P. **Medicina Interna de Grandes Animais**, 3ª. Ed. Barueri,SP: Manole, p. 496-499, 2006.
- PATE, M.; ZDOVC, I.; PIRŠ, T.; KRT, B.; OCEPEK, M. Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of



- swine lymph nodes in Slovenia. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 52, n. 2, p. 143–150, 2004.
- PATTERSON-KANE, J. C.; DONAHUE, J. M.; HARRISON, L. R. Placentitis, fetal pneumonia, and abortion due to *Rhodococcus equi* infection in a thoroughbred. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, n. 2, p. 157–159, 2002.
- PERKINS, G. A. ; YEAGER, A.; ERB, H. N.; NYDAM, D. V.; DIVERS, T.J.; BOWMAN, J.L. 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, 2001.
- PERRON LEPAGE, M.F.; GERBER, V.; SUTER, M. M. A case of interstitial pneumonia associated with *Pneumocystis carinii* in a foal. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 6, p. 621-624, 1999.
- PIEREZAN, F.; RISSI, D.R.; FILHO, J.C.O.; LUCENA, R.B.; TOCHETTO, C.; FLORES, M.M.; ROSA, F.B.; BARROS, C.S.L. Enterite granulomatosa associada a larvas de ciatostomíneos em eqüinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 382-386, 2009a.
- PIEREZAN, F.; RISSI, D.R.; RECH, R. R.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; BARROS, C.S.L. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 eqüinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 3, p. 275-280, 2009b.
- PORTO, A.C.R.C.; FERNANDES, W. R.; BARREIRA, M.C.R. *Rhodococcus equi* parte 2 - imunologia e profilaxia. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2151-2158, 2011a.
- PORTO, A.C.R.C.; FERNANDES, W. R.; BARREIRA, M.C.R. *Rhodococcus equi* parte 1 - epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2143-2150, 2011b.
- PRESCOTT, J.F. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infection in horses. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 211-214, 1987.
- PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 1, p. 20-34, 1991.
- PRESCOTT, J. F.; WILCOCK, B. P.; CARMAN, P. S.; HOFFMAN, A. M. Sporadic, severe bronchointerstitial pneumonia of foals. **Canadian Veterinary Journal**, v. 32, n. 7, p. 421-425, 1991.
- PROPHET, E. B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. **Laboratory Methods in Histotechnology**. 1<sup>st</sup> Ed., Washington, D.C.: American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, 279p. 1992.

- PUSTERLA, N.; WATSON, J. L.; AFFOLTER, V. K.; MAGDESIAN, K. G.; WILSON, W. D.; CARLSON, G. R. Purpura haemorrhagica in 53 horses. **Veterinary Record**, v. 153, n. 4, p. 118-121, 2003.
- QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; LEONARD, F.C.; FITZPATRICK, E.S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P.J. *Rhodococcus equi*. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**, 2<sup>a</sup>. Ed., West Sussex: Wiley-Blackwell Ltd., Cap. 18, p. 213 – 216, 2011.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. Diseases associated with bacteria 1. In: \_\_\_\_\_. **Veterinary Medicine**, 10<sup>th</sup> Ed., London: Saunders Elsevier, cap. 16, p. 765-815, 2007.
- RENSBURG, I.B.J. Pneumocistosis. In: COETZER, J.A.W. & TUSTIN, R.C. **Infectious Diseases of Livestock**, 2<sup>nd</sup>. Ed., Cape Town: Oxford University Press Southern Africa, v. 3, cap. 210, p. 2137-2139, 2004.
- RIBEIRO, M.G.; JUNIOR, G. N.; JUNIOR, J.G.D.; PAES, A.C.; MEGID, J.; GONÇALVES, R. C.; JUNIOR, F. F. S. Polissinovite auto-imune por *Rhodococcus equi* em potro, secundária à enterocolite. **Revista de Educação Continuada – Conselho Regional de Medicina Veterinária – SP**, v. 5, n. 2, p. 206-214. 2002.
- SANTOS, A. S.; RAYMUNDO, D. L.; BEZERRA JÚNIOR, P.S.; PAVARINI, S. P ; SONNE, L. ; BERCHT, B. S ; SNEL, G.G.M ; GOMES, M.J.P ; DRIEMEIER, D. . Infecção por *Rhodococcus equi* em um caprino Boer. In: **Anais do XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária**, Campo Grande, 2007.
- SELLON, D. C.; BESSER, T. E.; VIVRETTE, S. L.; MCCONNICO, R. S. Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 4, p. 1289–1293, 2001.
- SILVA, P.; SANTOS, A.C.B.; SATO, D.N.; SILVA, J.O.; MEDEIROS, M.I.C.; CARNEIRO, A.M.M.; LEITE, S.R.A.; LEITE, C.Q.F. Phenotypic and genotypic characterization of *Rhodococcus equi* isolated from sputum. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 409–415, 2012.
- SWEENEY, C.R.; SWEENEY, R.W.; DIVERS, T.J. *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 329-336, 1987.
- SZEREDI, L. ; MOLNÁR, T.; GLÁVITS, R.; TAKAI, S. ; MAKRAI, L.; DÉNES, B.; DEL PIERO, F. Two cases of equine abortion caused by *Rhodococcus equi*. **Veterinary Pathology**, v. 43, n. 2, p. 208-211, 2006.
- TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 167-176, 1997.

- TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCHIAI, S.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 1034–1037, 1996a.
- TAKAI, S.; HIDAKA, D.; FUJII, M.; SHINDOH, Y.; MURATA, T.; NAKANISHI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; KAMADA, M. Serum antibody responses of foals to virulence-associated 15 to 17-kilodalton antigens of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 52, n. 1-2, p. 63-71, 1996b.
- TAKAI, S.; HIGUCHI, T.; MATSUKURA, S.; TAMADA, Y.; NISHIO, Y.; MORISHITA, T.; FUJII, M.; HIDAKA, D.; FURUGOHR, J.; KARASAWA, T.; SHODA, M.; AKITA, O.; OGAWA, K.; HARA, M.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HAGIWARA, S.; SENBA, H. Some epidemiological aspects of *Rhodococcus equi* infection in foals in japan: a review of 108 cases in 1992–1998. **Journal of Equine Science**, v. 11, n. 1, p. 7-14, 2000.
- TAKAI, S.; IIE, M.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence-associated 15- to 17-Kilodalton antigens in *Rhodococcus equi*: temperature-dependent expression and location of the antigens. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 7, p. 2995-2997, 1992.
- TAKAI, S.; KOIKE, K.; OHBUSHI, S.; IZUMI, C.; TSUBAKI, S. Identification of 15- to 17-Kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 439-443, 1991.
- TAKAI, S.; MARTENS, R. J.; JULIAN, A.; RIBEIRO, M. G.; FARIAS, M. R.; SASAKI, Y.; INUZUKA, K.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; PRESCOTT, J.F. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4468–4470, 2003.
- TAKAI, S.; OHKURA, H.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S. Quantitative aspects of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 794-796, 1986.
- TAKAI, S.; SASAKI, Y.; IKEDA, T.; UCHIDA, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 457-460, 1994.
- TAKAI, S.; SEKIZAKI, T.; OZAWA, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15- to 17-Kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 11, p. 4056-4060, 1991.
- TAKAI, S., SENGEE, S., MADARAME, H., HATORI, F., YASUOKA, K., OCHIREL, E., SASAKI, Y., KAKUDA, T., TSUBAKI, S., BANDI, N., SODNOMDARJAA, R. The absence of *Rhodococcus equi* in mongolian horses. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 6, p. 611-613, 2004a.
- TAKAI, S.; SYAKALIMA, M.; YASUDA, J.; SASAKI, Y.; TSUTSUMI, H.; MIYGAWA, E.; WADA, K.; KAKUDA T.; TSUBAKI, S.; SUGIMOTO, C.

Isolation of *Rhodococcus equi* from the feces of indigenous animals and soil from the Lower Zambezi National Park and Lochinvar National Park, Zambia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, n.6, p.743-746, 2004b.

- TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; 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* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 1, p. 52–55, 2002.
- TAKAI, S. & TSUBAKI, S. The incidence of *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in domestic animals and soil. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v. 47, n. 3, p. 493-496, 1985.
- 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.
- TKACHUK-SAAD, O.; PRESCOTT, J. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2696-2700, 1991.
- TRAUB-DARGATZ, J.L.; BESSER, T.E. Salmonellosis. In: SELLON, D. C.; LONG, M.T. (eds.) **Equine Infectious Diseases**, St. Louis: Saunders Elsevier, cap. 38, p. 331-345, 2007.
- VENGUST, M.; STÄMPFLI, H.; PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi* pleuropneumonia in an adult horse. **Canadian Veterinary Journal**, v. 43, n. 9, p. 706–708, 2002.
- WEINSTOCK, D. M. & BROWN, A.E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 34, n. 10, p. 1379-1385, 2002.
- YAGER, J.A. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 14, n. 3, p. 225-232, 1987.
- ZINK, M. C.; YAGER, J. A.; SMART, N. L. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958-1984: a review of 131 cases. **Canadian Veterinary Journal**, v. 27, n. 5, p. 213-217, 1986.