UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBERÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA

MARCEL MONTELS TREVISANI

**Avaliação de uma nova estratégia vacinal para
a prevenção da Rodococose equina**

Ribeirão Preto
2011

MARCEL MONTELS TREVISANI

Avaliação de uma nova estratégia vacinal para a prevenção da Rodococose equina

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Gomes Soares

Ribeirão Preto
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Trevisani, Marcel Montels

Avaliação de uma nova estratégia vacinal para a prevenção da Rodococose equina. Ribeirão Preto, 2011.

83 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

Orientador: Soares, Sandro Gomes.

1. *Rhodococcus equi*. 2. *Salmonella enterica* Typhimurium. 3. Vacinas. 4. VAPs. 5. Potros.

Trabalho realizado no laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia do Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Apoio Financeiro: FAPESP e CNPq.

Dedico este trabalho . . .

À minha noiva Lilian, que esteve sempre presente, dando apoio e rezando pelo meu sucesso, sendo um incentivo crucial nos momentos de decisões e frustrações. Obrigado pela compreensão nos momentos de ausência, pela paciência, lealdade e amor.

Te amo muito

Aos meus pais que sempre torceram e incentivaram para que eu alcançasse cada vez mais os meus objetivos. Obrigado por me darem a benção da vida, pelos ensinamentos, apoio e incentivo nos momentos de dificuldade.

Amo muito vocês

À minha irmã por sua admiração e por estar sempre torcendo por mim.

Te amo

A toda a minha família, pelo carinho e incentivo à busca de objetivos cada vez mais altos, nos fazendo alcançar metas até então inimagináveis

Amo a todos

A todos aqueles que criticam, pois,

“Prefiro os que me criticam, porque me corrigem,
aos que me elogiam, porque me corrompem.”

Santo Agostinho

Agradecimentos

Ao Dr. Sandro Gomes Soares, meu orientador, registro aqui, minha eterna gratidão, pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, conselhos, paciência, disponibilidade e confiança.

À professora Dra. Maria Cristina Roque-Barreira pela disponibilidade do laboratório para a realização deste trabalho.

Aos professores da banca pela disponibilidade e colaboração.

À Ana Cristine S. Ferreira e Rosangela C. P. Mesquita, pela ajuda e orientação aos assuntos relacionados à secretaria.

À Maria Inês A. Castania, pela indispensável ajuda na esterilização dos materiais e a Lúcia M. L. da Silva, pela manutenção e limpeza do laboratório.

À Vani Maria A. Correa pela grande ajuda na orientação e montagem das lâminas histológicas.

Ao professor Dr. Amilton Antunes Barreira pela disponibilidade dos equipamentos que nos ajudaram na captação de imagens das lâminas histológicas.

Aos funcionários do biotério, Júlio A. Siqueira, Cristiane C. Padovan, Ednelson A. Mazzolo, Sávio H. F. Miranda e Rubens S. de Campos pela ajuda prestada no cuidado com os animais.

À Érica Vendrusculo, pela amizade e auxílio com as questões burocráticas.

A todos os colegas de laboratório, Sandra, Patrícia, Thiago, Rafael, Fernanda, Fernando, Fausto, Nerry, Marina Conrado, André, Marise, Vânia, Ana Cláudia, Ita, Marina Valente, Carla, Jeferson, Aline Sardinha, Camila, Livia, Fabrícia e Tati pela gostosa convivência diária.

Aos companheiros de pesquisa, Silvia, Aline Oliveira, Luciana, Helder, Carol, pela amizade e colaboração em todos os momentos.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

A FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

TREVISANI, M. M. **Avaliação de uma nova estratégia vacinal para a prevenção da Rodococose equina.** 2011. 83f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Infecções pulmonares de potros jovens por *Rhodococcus equi* resultam em grave pneumonia levando à morte um grande número de animais todos os anos. Até o momento não há nenhuma vacina aceita globalmente para a prevenção da rodococose equina. O único tratamento preconizado é baseado em antibioticoterapia, porém os protocolos clínicos são longos, de alto custo, com efeitos colaterais e tem favorecido a seleção de cepas resistentes aos antibióticos. Diversas estratégias no desenvolvimento de uma vacina segura e eficiente contra a rodococose foram propostas, porém, não induziram um efeito protetor considerável.

O principal fator de virulência do *R. equi* descrito e amplamente estudado é a proteína vapA, no entanto, outras proteínas localizadas na ilha de patogenicidade estão presentes em amostras de *R. equi* virulento extraídos de animais infectados. Trabalhos recentes têm demonstrado a presença do gene *vapG* em todas as cepas virulentas e este gene é altamente expresso quando a bactéria reside no interior de macrófagos, tornando-o um possível alvo vacinal. Nosso grupo já possui experiência prévia no uso de linhagem de *Salmonella enterica* Typhimurium atenuada carreando a proteína vapA. Baseado nos resultados positivos obtidos, foi construída uma linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressando a proteína vapG. A administração desta linhagem em camundongos foi capaz de induzir proteção contra *R. equi* virulento. Os resultados observados foram a colonização e persistência da *Salmonella* nos órgãos alvo, a redução da carga bacteriana de *R. equi*, e a indução de um perfil imune protetor semelhante ao observado em animais adultos resistentes. Observou-se o aumento da produção de IL-12p70 e IFN- γ , além da presença de níveis aumentados de IL-4 e a redução dos níveis de TNF- α . Observou-se também o aumento na subpopulação de células T auxiliares (CD4⁺) com perfil de memória, além de aumento na população de linfócitos B totais quando comparado aos grupos controles.

Este conjunto de resultados indica que a imunização com *Salmonella enterica* Typhimurium expressando a proteína vapG gera uma resposta imune celular eficiente tornando esta linhagem uma possível candidata a vetor vacinal. Além disso, sugere que outros antígenos do *R. equi* podem ser bons candidatos vacinais, além da proteína vapA em uso por diferentes grupos.

TREVISANI, M. M. **Evaluation of a new vaccine strategy for the prevention of equine rhodococosis.** 2011. 83f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Pulmonary infections in young foals by *Rhodococcus equi* result in severe pneumonia, leading to death a large number of animals every year. There is no globally accepted vaccine for the prevention of equine rhodococosis so far. To date, the only acceptable treatment is based on antibiotics, but the clinical protocols are long lasting, expensive, having side effects and favoring the emergence of drug resistant strains. Several strategies for developing a safe and effective vaccine against rhodococosis have been proposed, however, none has induced a significant protective effect.

The main virulence factor of *R. equi* described and extensively studied is the protein vapA, although other proteins encoded by genes in pathogenicity islands are detected in samples of virulent *R. equi*, isolated from infected animals. Recent works have demonstrated that the vapG gene is present in all virulent strains, and that this gene is highly expressed when bacteria reside within macrophages, making it a potential vaccine target. Our group has already been working with an attenuated *Salmonella enterica* Typhimurium strain expressing the VapA protein. Even though our results were very promising, we decided to construct a second vaccine strain expressing the VapG protein. Based on the positive results, it was constructed an attenuated strain of *S. enterica* Typhimurium χ 3987 expressing the vapG protein. Interestingly, the VapG-expressing strain induced protection against virulent *R. equi* in mouse model of infection. We could observe colonization and persistence of *Salmonella* vaccine cells in target organs, with reduction of bacterial loads of *R. equi* and induction of a protective immune profile similar to that seen in resistant adult animals. We could also observe increased production of IL-12p70 and IFN- γ in addition to the presence of increased levels of IL-4 and reduced levels of TNF- α . Moreover, we detected an increase in the subpopulation of T helper cells (CD4), with a profile of memory, as well as in the population of B lymphocytes, when compared to control groups.

This set of results shows that immunization with *Salmonella enterica* Typhimurium expressing the VapG protein raises an efficient cellular immune response, making this strain a potential candidate for vaccine vector. Furthermore, this work suggests that other *R. equi* antigens may be taken into account for vaccine construction, besides the VapA protein utilized in the majority of studies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Ensaio de Persistência	44
Figura 2: Ensaio de proteção contra <i>R. equi</i> virulento	46
Figura 3: Detecção de citocinas no baço de camundongos imunizados e imunizados /desafiados	48/49
Figura4: Frequência relativa total de linfócitos T CD4 ⁺ , T CD8 ⁺ e B (CD19 ⁺) em células esplênicas de animais imunizados	51
Figura 5: Frequência relativa total e parcial de linfócitos T com perfil de memória obtidas de animais imunizados e controles	53
Figura 6: Isotipagem dos anticorpos séricos antígeno-específicos em camundongos imunizados com <i>S. enterica</i> Typhimurium x3987 pYA3137vapG e <i>S. enterica</i> Typhimurium x3987 pYA3137vapA	55

LISTA DE ABREVIATURAS

- APTX: Antígeno total extraído da parede celular de *R. equi* – material rico em proteína vapA
- BHI: Caldo de Cérebro e Coração
- BSA: Albumina Sérica Bovina
- DO: Densidade Optica
- ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent Assay* (Ensaio imuno-enzimático)
- GALT: Tecido Linfóide Associado ao Trato Gastrointestinal
- H₂O₂: Peróxido de Oxigênio (Água Oxigenada)
- IFN-γ: Interferon-gamma
- Ig: Imunoglobulina
- IL: Interleucina
- LB: *Luria Broth*
- NK: Células *Natural killer*
- NO: Óxido Nítrico
- PBS: Solução salina tamponada em fosfato
- PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoride
- *R. equi* ATCC33701: cepa virulenta de *Rhodococcus equi*
- Th: Linfócito T auxiliar
- TLR: *Toll Like Receptor*
- TMB: 3, 3', 5' tetrametilbenzidina
- TNF: Fator de Necrose Tumoral
- CFU: *Colony-Forming Units* (Unidades Formadoras de Colônia)
- VAP: *Virulence-Associated Protein* (Proteína Associada à Virulência)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1 Mercado do Cavalo	15
2 <i>Rhodococcus equi</i>	15
2.1 Morfologia e identificação bioquímica do <i>Rhodococcus equi</i>	18
2.2 Tratamento e profilaxia das infecções por <i>R. equi</i>	19
2.3 Mecanismos de virulência	20
2.4 Imunidade frente ao <i>R. equi</i>	23
2.5 <i>R. equi</i> e vacinas	26
2.6 Desenvolvimento de vacinas	28
OBJETIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
1 Animais	34
2 Linhagens bacterianas	34
3 Cultivo e preparo de <i>S. enterica</i> Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137, pYA3137vapA ou pYA3137vapG	34
4 Cultivo, preparo e obtenção de suspensões de <i>R. equi</i>	35
5 Obtenção da fração antigênica APTX	36
5.1 – Cultivo e preparo da cepa virulenta de <i>R. equi</i>	36
5.2 – Extração de antígeno da parede de <i>R. equi</i> virulento	36
6 Imunização de camundongos com as linhagens vacinais de <i>S. enterica</i> Typhimurium	36
7 Coleta e processamento de sangue para detecção e quantificação de anticorpos séricos.....	37
8 Dosagem de citocinas	38
8.1 - Dosagem de IL-12p70	38
8.2 – Dosagem de TNF- α	39
8.3 – Dosagem de IFN- γ	40
8.4 – Dosagens de IL-4	40
9 Dosagem de citocinas nos órgãos de camundongos imunizados e imunizados/desafiados	40
10 Análise das populações celulares presentes no baço de animais imunizados com <i>S. enterica</i> Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG.....	41
11 Análise estatística	41

RESULTADOS	42
1 Avaliação da estabilidade (capacidade da linhagem vacinal recombinante de colonizar e persistir em órgãos linfóides)	43
2 “Clearance” bacteriano nos órgãos de camundongos BALB/c infectados com <i>R. equi</i>	45
3 Detecção e quantificação das citocinas presentes no órgão linfóide alvo de camundongos imunizados e imunizados / desafiados com <i>R. equi</i>	47
4 Avaliação das populações de células T auxiliares (CD4 ⁺), T citotóxicos (CD8 ⁺) e linfócitos B (CD19 ⁺) presentes no baço de animais imunizados	50
5 Avaliação das subpopulações de linfócitos T auxiliares (CD4 ⁺) e citotóxicos (CD8 ⁺) com fenótipo de memória	52
6 Avaliação dos anticorpos séricos	54
 DISCUSSÃO	 56
 CONCLUSÕES	 66
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 68

Introdução

1 Mercado do Cavalo

A criação de equinos no Brasil é uma atividade em constante crescimento e que apresenta números expressivos. O rebanho nacional é de 5,5 milhões de animais segundo o último censo agrícola do IBGE (2011), com uma movimentação anual de cerca de R\$ 7,3 bilhões de Reais (Lima *et al.*, 2011), gerando 642,5 mil empregos diretos e cerca de 2,6 milhões de empregos indiretos. Além disso, a receita brasileira com a exportação de cavalos vivos cresceu 769% entre 1996 e 2005. A indústria do cavalo ocupa uma posição de destaque nos países desenvolvidos e em muitos daqueles em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, que possui o quarto maior rebanho de equinos do mundo, perdendo apenas para Estados Unidos, China e México (FAOSTAT, 2011).

O aumento da criação de animais de alta *performance* é acompanhada pelo aumento das enfermidades, levando a prejuízos econômicos significativos para a atividade do setor (FAO, 2008). Dentre as enfermidades que afetam equinos, um grande número de doenças estão associadas ao aparelho respiratório, implicando em importantes perdas de performance, gastos significativos com o tratamento e, em alguns casos, levando os animais a óbito. As enfermidades respiratórias mais frequentes em equinos são as causadas por agentes virais ou bacterianos, como *Rhodococcus equi* (*R. equi*). *R. equi* está associado a altas taxas de morbidade e mortalidade em potros até o sexto mês de vida, causando prejuízos econômicos significativos (Chanter, 1997).

2 *Rhodococcus equi*

O *Rhodococcus equi* foi descrito pela primeira vez em 1923 por Magnusson

que o classificou como *Corynebacterium equi*, baseado em isolados de pulmão de potros com pneumonia piogranulomatosa (Magnusson, 1923). Em 1977 a cepa foi reclassificada como *Rhodococcus equi* (Goodfellow & Alderson, 1977) baseado em marcadores fenotípicos de cultura celular de gêneros já descritos na época e baseando-se em uma análise taxonômica comparativa. Por muito tempo a classificação da cepa de *Rhodococcus equi* como membro do gênero *Rhodococcus* foi tema de discussão (Gurtler *et al.*, 2004), até que recentemente análises de sequenciamento genômico confirmaram esta afiliação taxonômica encontrando alta similaridade do seu genoma comparado ao *Rhodococcus* sp. RHA1 (Vazquez Boland *et al.*, 2009).

Rhodococcus equi é descrito principalmente como um patógeno de potros entre 1 e 4 meses de vida causando abscessos pulmonares graves (Lavoie *et al.*, 1994), além de broncopneumonia piogranulomatosa, enterite ulcerativa e linfadenite supurativa (Giguère & Prescott, 1997). Recentemente o patógeno foi descrito como oportunista em humanos causando uma pneumonia necrosante (Rozsypal *et al.*, 2007) com abscessos pulmonares (Weinstock & Brown, 2002) e infecções sistêmicas muito semelhantes ao de equinos (Votava *et al.*, 1997), podendo-se isolar a bactéria de praticamente todos os tecidos ou fluidos do organismo (revisto por Weinstock & Brown, 2002). O patógeno é classificado como oportunista por estar principalmente associado a pacientes imunocomprometidos, seja através de infecção, como é o caso de pacientes HIV positivos; doenças, como o de pacientes com linfoma, insuficiência renal crônica, câncer de pulmão, leucemia, diabetes mellitus; ou condicionados através de tratamento a base de corticoterapia, quimioterapia, imunossupressores para o tratamento de transplantes ou neoplasias (Weinstock & Brown, 2002; Basilio-de-Oliveira *et al.*, 2005). O primeiro caso de

paciente infectado com *R. equi* descrito ocorreu em 1967, onde um homem com hepatite foi tratado com imunossupressor (Golub *et al.*, 1967). A partir deste, mais de 200 outros casos foram descritos, principalmente nos anos 80, com o crescimento logarítmico de indivíduos infectados pelo vírus HIV (Kamboj *et al.*, 2005). A mortalidade para estes pacientes chega a 55% dos casos (Bell *et al.*, 1998). Pacientes imunocompetentes raramente são infectados por *R. equi* (Bell *et al.*, 1998) e a taxa de mortalidade para estes indivíduos varia em torno de 11% dos casos (Cornish & Washington, 1999). Cepas de *R. equi* com perfil plasmidial semelhante foram encontradas em isolados de suínos e humanos, sugerindo que uma transmissão de origem alimentar poderia ser considerada (Makrai *et al.*, 2002, 2005, 2008).

A patologia é diagnosticada na maioria das vezes incorretamente ou muitas vezes não chega a ser diagnosticada, isto porque os microbiologistas classificam o *R. equi* como um difteróide não patogênico para humanos e os clínicos desconhecem seu potencial patogênico (Doig *et al.*, 1991). Além disso, o diagnóstico de infecção por *R. equi* é dificultado devido ao crescimento lento do bacilo e as suas similaridades com outros microorganismos (Garthwaite *et al.*, 2007).

A predominância de infecções pulmonares em potros entre 1 e 4 meses de idade sugere uma transmissão por via aérea causada principalmente através da inalação de solos contaminados com fezes, oriundas de potros infectados com *R. equi* (Takai *et al.*, 1997). O clima favorece a dispersão da cepa, havendo um aumento do número de casos no verão. Esta estação do ano favorece a multiplicação do microrganismo e a dispersão de partículas de poeira que beneficiam sua inalação (Takai *et al.*, 1997; Meijer & Prescott, 2004; Muscatello *et al.*, 2007). O *R. equi* é uma bactéria muito resistente a condições ambientais

extremas (Benoit *et al.*, 2000 e 2002), o que explica o fato deste patógeno ser mais abundante no lugar onde o homem cria cavalos por muitos anos (Wilson, 1997). O alto número de *R. equi* virulento disperso no ambiente torna a doença endêmica (Takai *et al.*, 1991; Takai *et al.*, 1997). A transmissão da pneumonia de potro para potro não está bem documentada ainda, entretanto, é possível isolar o *R. equi* e comprovar a presença de cepas viáveis exaladas pela respiração de potros doentes (Muscatello *et al.*, 2007).

2.1 Morfologia e identificação bioquímica do *Rhodococcus equi*

Rhodococcus equi é um microorganismo gram-positivo, aeróbico obrigatório, variando da forma de bacilo à forma cocóide nas primeiras 4 horas, dependendo das condições de cultivo. Após 24 horas de cultivo em meio líquido ou em ágar sangue assume somente a forma cocóide (Fuhrmann *et al.*, 1997). Possui cápsula polissacarídica e é parcialmente ácido resistente. As cepas de *R. equi* não possuem flagelo (Prescott, 1991), mas algumas cepas possuem *pili* ou apêndices (Yanagawa & Honda, 1976; Nordmann *et al.*, 1994). São caracteristicamente mucóides, irregulares, convalescentes, apresentando coloração róseo-salmão e amarelo após uma semana de crescimento (Prescott, 1991). É caracterizada bioquimicamente como catalase positiva, principalmente urease positiva e oxidase negativa com temperatura de crescimento ótimo entre 30 e 37°C (Prescott, 1991). Requerem nutrientes simples e obtém carbono de diferentes fontes (Prescott, 1991). Tem predileção por lipídios como fonte de carbono, o que é comprovado por sequenciamento onde foram identificados genes envolvidos no metabolismo de lipídios e não sendo encontrados genes envolvidos com o transporte de açúcar (Vazquez Boland *et al.*, 2009).

2.2 Tratamento e profilaxia das infecções por *R. equi*

A contaminação com *Rhodococcus equi* está relacionada aos locais onde os animais são mantidos ou manejados, portanto, o reconhecimento precoce da pneumonia, o isolamento e tratamento dos potros infectados, reduzem as perdas e previne a disseminação de organismos virulentos. Outras medidas de controle incluem a redução das partículas de poeira no ambiente dos potros por meio do aguçamento de passeios, remoção e compostagem de fezes, isolamento de potros que retornaram de criações onde a doença é endêmica e exame cuidadoso e regular de potros anoréxicos, febris ou com tosse para evidenciar doença respiratória (Prescott & Hoffman, 1993).

O principal tratamento empregado contra a rodococose é antibioticoterapia. Terapias utilizando uma combinação de antibióticos como a rifampicina e eritromicina tem se mostrado eficiente no tratamento, reduzindo a mortalidade de potros de 80% para 12% dos casos (Hillidge, 1987), porém, o tratamento prolongado e em larga escala em áreas endêmicas favorece a seleção de cepas resistentes a estas drogas (Giguère & Prescott, 1997). Um método bastante eficiente empregado no monitoramento e diagnóstico do rebanho de equinos em áreas endêmicas com pneumonia provocada por *R. equi* é a análise da concentração de glóbulos brancos (Giguère *et al.*, 2003), cultivo da bactéria extraída do lavado traqueal e caracterização do *R. equi* via PCR em tempo real (Giguère, 2011; Heidmann *et al.*, 2006). Porém, resultados positivos não significam necessariamente doença clínica, pois o animal pode estar apenas num estado de portador. Nesta fase, é importante o diagnóstico precoce, pois é possível isolar os animais infectados, diminuindo a disseminação do patógeno. Para o diagnóstico definitivo, devem ser sempre aliadas

à análise, a observação dos sinais clínicos dos animais (Giguère *et al.*, 2003).

2.3 Mecanismos de virulência

A virulência do *R. equi* está associada à sua capacidade de sobreviver e se replicar no interior de macrófagos. *R. equi* resiste à defesa imune inata mediado por macrófagos estabelecendo residência no meio intracelular do fagócito (Hondalus, 1997), por inibir a acidificação do fagolisossomo (Toyooka *et al.*, 2005). A doença progride e o parênquima pulmonar torna-se necrótico (Johnson *et al.*, 1983; Zink *et al.* 1986), e os brônquios e linfonodos mesentérico são afetados (Zink *et al.*, 1986; Yager, 1987).

Cavalos adultos raramente são suscetíveis (Hondalus, 1997), pois são capazes de desenvolver uma resposta imune protetora, além de uma rápida eliminação do patógeno quando re-exposto ao *R. equi* virulento (Lopez *et al.*, 2002). No entanto, a infecção por *R. equi* pode ser assintomática, pois o patógeno pode ser detectado e isolado de animais de corrida com problemas pulmonares (Fogarty, 2008).

Os prováveis fatores de virulência do *R. equi* são: capsula polissacarídica que inibe a fagocitose e sua subsequente lise no interior de macrófagos; produção das enzimas fosfolipase C e colesterol oxidase, com ação membranolítica combinada que pode ser letal para macrófagos entre outras células fagocíticas; ácidos micólicos da parede celular; e produtos codificados pelo plasmídio de virulência 85-90Kb (Hondalus, 1997; Garton *et al.*, 2002).

Os mecanismos de virulência do *R. equi* começaram a ser compreendidos a partir da década de 90 quando Takai *et al.* (1993) demonstraram a presença de um plasmídio de 85-90 Kb contendo o gene codificante do antígeno de 15-17 kDa (denominado vapA) em cepas de *R. equi* virulentos. Cepas contendo este gene que

causavam lesões em potros infectados também eram virulentas para camundongos, no entanto, cepas mutantes que não expressavam este antígeno eram avirulentas. Mais tarde, com a descoberta de novos genes codificados por plasmídios associados à virulência surgiu a seguinte classificação: cepa virulenta, que expressa antígeno de 15-17 kDa (vapA) codificado pelo plasmídio de virulência 85-90 kb, responsável por causar pneumonia grave em potros; *R. equi* com virulência intermediária, que expressa o antígeno de 20 kDa (vapB) codificado pelo plasmídio de 79-100 kb e *R. equi* avirulento, que não expressa antígenos reconhecidamente associados à virulência (Wada *et al.*, 1997; Takai *et al.*, 1995 e 1996). Análises sequenciais têm mostrado que os genes que codificam as proteínas vapA e vapB são providos de um plasmídio ancestral comum (Letek *et al.*, 2008).

A análise e caracterização dos plasmídios e antígenos associados à virulência (vap) da cepa ATCC33701 de *Rhodococcus equi*, esta associada a testes de patogenicidade em camundongos, que são de fundamental importância para a elucidação da patogenia causada por essa bactéria em equinos. A análise destes plasmídios revelou a presença de uma ilha de patogenicidade contendo sete genes associados à virulência, incluindo *vapA* (Takai *et al.*, 2000). Estes antígenos associados à virulência estão vinculados à inibição da fusão do fagossomo ao lisossomo, permitindo que esta bactéria sobreviva e se replique no interior de macrófagos (Hondalus & Mosser, 1994). Segundo os autores, estes genes *vap*, foram denominados *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* e *vapH*, e são codificados por um operon de 27,5 kb. Estudos sobre a expressão dos genes de *R. equi* demonstraram que apenas os genes da ilha de patogenicidade são diferencialmente transcritos, quando dentro de macrófagos equinos (Meijer & Prescott, 2004).

As proteínas *vapA* e *vapB* são consideradas isoformas. As linhagens

vapA⁺*vapB*⁻ tem sido associada à patogenicidade para equinos, enquanto *vapA*⁻*vapB*⁺ tem sido isolado de suínos e humanos infectados com *R. equi* (Takai *et al.*, 2000; Ocampo-Sosa *et al.*, 2007). Nenhum dos outros genes dessa família tem sua função plenamente compreendida ou caracterizada. Contudo, estudos têm demonstrado que esses genes têm expressão induzida durante as fases iniciais da fagocitose, o que pode indicar sua participação na resistência da bactéria à destruição no interior dos macrófagos (Rahman *et al.*, 2005).

Jain *et al.* (2003) construíram um mutante de *R. equi*, no qual o gene *vapA* foi deletado, tornando-o avirulento, já que este não conseguiu se replicar no interior de macrófagos e foi rapidamente eliminado em comparação às cepas selvagens de *R. equi*. Evidenciando assim, o papel da proteína *vapA* como um fator determinante de virulência.

Ao avaliar a expressão dos diferentes genes *vap*, foi demonstrado que a expressão máxima de *vapA* é induzida por temperatura superiores a 32°C, tendo seu pico de expressão à 37°C, baixo pH e baixos níveis de cátions divalentes como Fe²⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺ (Takai *et al.*, 1992, 1996; Benoit *et al.*, 2001, 2002; Jordan *et al.*, 2003; Ren & Prescott, 2003). Segundo Benoit *et al.* (2002), a síntese da proteína *vapA* é aumentada em condições de estresse oxidativo, pela exposição da bactéria a H₂O₂. Jacks *et al.* (2007) buscaram avaliar, além da expressão do gene *vapA*, os demais genes funcionalmente conhecidos, e ficou demonstrado também o aumento da expressão dos genes *vapD* e *vapG* *in vivo*, além de um aumento significativo na expressão de *vapG* em relação aos demais genes *vap* quando realizado o ensaio *in vitro*. Estes achados foram confirmados por Monego *et al.* (2009), que avaliaram por PCR multiplex, os genes associados à virulência. Para este estudo, foram obtidas amostras de 108 animais de 6 fazendas com histórico de infecção por *Rhodococcus*

equi nas cidades de Bajé, São Borja e Foz do Iguaçu no sul do Brasil. Como resultado, constatou-se que 100% das amostras colhidas de *R. equi* eram *vapA*, *vapD* e *vapG* positivas, 86,6% apresentavam o gene *vapF*, 76,6% *vapH*, 43,3% *vapC*, 36,6% *vapE* e nenhuma cepa continha o gene *vapB*. O perfil molecular mais frequente foi *vapA*, *D*, *F*, *G* e *H*, presente em 37,7% das cepas avaliadas.

2.4 Imunidade frente ao *R. equi*

Com relação à imunidade humoral, anticorpos específicos podem bloquear o início da infecção celular e alterar a rota pelo qual a bactéria entra no macrófago e/ou diminuir a habilidade da bactéria em inibir a acidificação do fagolisossomo (Speert, 1992; Toyooka *et al.*, 2005). Imunização passiva utilizando plasma hiperimune oriundo de animais adultos infectados tem sido aplicada comercialmente. Há relatos conflitantes indicando proteção contra a infecção por *Rhodococcus equi* (Martens *et al.*, 1989; Madigan *et al.*, 1991; Prescott *et al.*, 1997) ou diminuição da severidade da doença sem a diminuição da mortalidade dos potros (Caston *et al.*, 2006), ou que o tratamento foi completamente ineficiente (Hurley & Begg, 1995).

Foi demonstrado por Hooper *et al.* (2001) que a administração passiva de imunoglobulinas purificadas, provenientes de cavalos imunizados com antígeno enriquecido de *vapA*, protegeu potros contra o desafio experimental. Resultado semelhante já tinha sido observado por Fernandez *et al.* (1997), que administraram em camundongos IgG anti-*vapA* de éguas vacinadas com preparação enriquecida de *vapA* e constataram seu efeito protetor. Possivelmente, este efeito protetor está associado à capacidade dos anticorpos anti-*vapA* em opsonizar o *R. equi* (Becú *et al.*, 1997; Hooper *et al.*, 2001). Baseado nisto, foram feitas tentativas de imunização ativa de éguas (Madigan *et al.*, 1991) ou de potros (Prescott *et al.*, 1997) com

preparações enriquecidas com vapA, porém não levaram a geração de uma resposta imune eficiente na prevenção da rodococose. Esta falha pode estar relacionada à qualidade da preparação vacinal ou ao isotipo do anticorpo gerado pela vacinação (Meijer & Prescott, 2004). Diversos estudos em camundongos têm confirmado que a imunidade celular exerce papel central na proteção contra *R. equi*. Kanaly *et al.*, (1993 e 1996) demonstraram que camundongos BALB/c, ao serem infectados com *R. equi* virulento, desenvolveram uma resposta do padrão Th1 com progressivo controle da infecção. Quando os animais foram tratados com anti-IFN- γ , estes não conseguiram controlar a infecção e desenvolveram extensos granulomas pulmonares (Kanaly *et al.*, 1995). Estudos recentes têm ligado a secreção de IFN- γ à produção de anticorpos opsonizantes capazes de induzir proteção em equinos (Lopez *et al.*, 2002). Camundongos imunodeficientes (NUDE e SCID) são susceptíveis à pneumonia rodococócica, por incapacidade de realizar o “clearance” do *R. equi* no pulmão (Yager *et al.*, 1991). Nordmann *et al.* (1992) demonstraram que camundongos BALB/c depletados de linfócitos T CD4⁺ e / ou T CD8⁺, quando desafiados por via endovenosa com *R. equi* virulento, apresentaram um aumento significativo do número de bactérias no baço e no fígado, em comparação a animais não depletados. Desta forma, os autores concluíram que tanto células T CD4⁺, quanto T CD8⁺ são de grande importância no “clearance” do *R. equi*.

Cavalos adultos desafiados com *R. equi* virulento são capazes de realizar eficiente clearance pulmonar e apresentam um aumento do número de células T CD4⁺ e T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Hines *et al.*, 2003), seguido por um aumento significativo da expressão de RNA mensageiro (RNAm) para a citocina IL-4 (Jacks *et al.*, 2007). Há evidências de que a infecção de potros por *R. equi* resulte no desenvolvimento de uma ineficiente resposta imunitária de padrão Th2, acarretando

na morte do hospedeiro. Os detalhes não estão claros, mas é provável que a ilha de patogenicidade tenha papel crucial na modulação da resposta do hospedeiro (Meijer & Prescott, 2004). Breathnach *et al.* (2006) verificaram que potros recém-nascidos são incapazes de produzir IFN- γ , e ainda produzem grande quantidade de IL-10 (citocina de padrão Th2 e Treg com função antiinflamatória), favorecendo a persistência do patógeno (Sponseller *et al.*, 2009). No entanto, a expressão gênica e a produção de IFN- γ aumentam gradualmente durante os primeiros seis meses de vida, atingindo níveis semelhantes ao de cavalos adultos após um ano de vida. Assim, os autores sugerem que essa incapacidade de potros recém nascidos em montar uma resposta imune Th1 eficiente possa ser responsável pela maior susceptibilidade a patógenos intracelulares, como é o caso do *R. equi*. Porém, Jacks *et al.* (2007) demonstraram que potros infectados podem montar uma resposta imune com secreção de IFN- γ de maneira semelhante ao de cavalos adultos quando desafiados por via intrabronquial com *R. equi* virulento. Isto porque, quando avaliada a razão de IFN- γ / IL-4, houve uma significativa alta de IFN- γ em relação a IL-4 quando comparado a animais adultos.

A infecção experimental intrabronquial em potros (18 a 23 dias de idade), utilizando em um grupo a cepa virulenta (103⁺) e em outro a cepa avirulenta de *R. equi* (103⁻), causou em ambos os grupos, expressão similar de RNAm para IFN- γ e IL-12p35, enquanto apenas potros infectados com a cepa 103⁺ apresentaram um aumento significativo na expressão de RNAm para IL-1 β , IL-10, IL-12p40 e TNF- α nos tecidos pulmonares (Giguère *et al.*, 1999a).

Citocinas como IL-12, IFN- γ e TNF- α , quanto o óxido nítrico (NO), são de extrema importância no combate à rodococose, pois são os principais mediadores envolvidos na defesa contra a infecção (Darrah *et al.*, 2000 e 2004). A citocina IL-12

produzida na fase inicial da resposta imune inata é responsável pela diferenciação e ativação de linfócitos T CD4⁺ *naïve* em linfócitos T CD4⁺ efetores que passarão a secretar IL-2, IFN- γ e linfotoxinas. Além de aumentar a capacidade microbicida de macrófagos, o IFN- γ atua na ativação de linfócitos T CD8⁺, importante na eliminação de células infectadas por patógenos intracelulares e produção de citocinas.

Darrah *et al.* (2004) demonstraram que a infecção de macrófagos por *R. equi* ocorre através da interação da bactéria com *toll like receptor 2* (TLR2), seguido de rápida translocação do NF- κ B para o núcleo e da produção de NO e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-12. Verificaram ainda, que a proteína vapA purificada interage com TLR2, induzindo a maturação de células dendríticas e a produção de citocinas por macrófagos.

Martens *et al.* (2005) verificaram que neutrófilos também tem um importante papel na defesa contra rodococose, pois a deficiência dessa população celular resultou no aumento de bactérias nos órgãos de camundongos infectados, bem como o agravamento da doença.

2.5 *R. equi* e vacinas

Até o momento não há nenhuma vacina aceita globalmente para a prevenção da rodococose equina. Há uma vacina baseada em extrato de amostras de *R. equi* colhidas de animais adultos infectados, produzida e aprovada para uso apenas na Argentina. Entretanto, sua eficácia é questionável, não sendo aprovada por agências regulatórias de outros países, como o Brasil (Martins *et al.*, 2005).

A imunização utilizando o APTX (extrato da parede bacteriana de *R. equi* rico em vapA) em éguas e potros, induziram uma alta resposta imune humoral com alto título de anticorpos em éguas, porém, os potros imunizados obtiveram um pobre

título de anticorpos, o que foi postulado ser devido à imaturidade do seu sistema imune humoral (Prescott *et al.*, 1997). Segundo Becú (informação pessoal)¹, o procedimento de vacinação de potros utilizada por Prescott *et al.*, (1997) pode ter sido equivocado, pois anticorpos maternos transferidos passivamente via colostro podem ter bloqueado o antígeno. Assim, o autor preconiza que se vacinem apenas éguas ou apenas potros. Além disso, Becú (informação pessoal)¹ acredita que o protocolo de vacinação utilizado por Prescott *et al.* (1997), em potros com 20, 30 e 40 dias de idade, também não seja adequado, postulando que a vacinação de potros seja procedida nos dias 7 e 21 de idade. Esta vacinação possibilitaria que os animais desenvolvessem uma resposta imune celular em uma fase mais precoce, gerando, supostamente, melhores resultados.

Através de experimentos realizados por Hines *et al.* (2001) foi verificado uma intensa resposta proliferativa quando células provenientes do lavado bronquio-alveolar de cavalos adultos eram infectados com *R. equi* virulento por via intranasal e estimulados *in vitro* com o antígeno vapA. Desde então um alto investimento de esforços em torno de ensaios utilizando a proteína vapA tem sido realizados. Diversos estudos buscam avaliar o poder imunogênico da proteína vapA, para utilizá-los em ensaios vacinais (Fernandez *et al.*, 1997; Lopez *et al.*, 2002 e 2003). Haghighi & Prescott (2005) demonstraram pela primeira vez um aumento da imunidade proporcionado por uma resposta de padrão Th1 após a imunização de camundongos com uma vacina de DNA expressando a proteína vapA. Esforços no desenvolvimento de uma vacina segura utilizando a cepa atenuada de *R. equi* não tiveram sucesso (Pei *et al.*, 2007; Lopez *et al.*, 2008).

Resultados promissores foram alcançados por Oliveira *et al.* (2007)

¹ Informação verbal fornecida por Becú à Luciana C. Ferraz, em 1998

utilizando cepa de *Salmonella* carreando a proteína vapA como vetor vacinal, levando a resposta imune para um padrão Th1 resultando na proteção de camundongos BALB/c contra o desafio experimental com *R. equi* virulento.

Todos os trabalhos descritos na literatura buscando um efeito protetor contra o *R. equi* virulento tem preconizado a utilização de vapA como sendo a principal proteína determinante da virulência do *R. equi*. Sabe-se que vapA é indispensável para a virulência, porém, a expressão apenas dessa proteína da ilha de patogenicidade não é suficiente para a virulência da cepa (Giguère *et al.*, 1999b). Muito pouco se sabe sobre as demais proteínas contidas na ilha de patogenicidade. Trabalhos recentemente publicados demonstram um aumento na expressão de RNAm dos genes vapG e vapD quando infectam macrófagos equinos (Jacks *et al.*, 2007), além de estes genes estarem sempre presentes em cepas virulentas de *R. equi* colhidas em fazendas com histórico da doença (Monego *et al.*, 2009).

Recentemente Coulson *et al.* (2010) demonstraram que a proteína vapG é dispensável para a sobrevivência do *R. equi* no interior de macrófagos alveolares murinos, porém, pode ter função importante na propagação da bactéria em macrófagos alveolares equinos. Sendo assim, preparações vacinais baseadas em novos antígenos podem gerar uma resposta imune protetora e definir novos candidatos promissores a uma vacina para a prevenção da rodococose equina.

2.6 Desenvolvimento de vacinas

Durante o século 20, o aumento do entendimento da imunidade contra microrganismos causadores de doenças infecciosas levou ao desenvolvimento de novas vacinas e terapêuticos. Não só houve um aumento no número de vacinas desenvolvidas, como novas estratégias foram exploradas. Além das tradicionais

estratégias vacinais com o uso do agente patogênico morto ou atenuado, bem como o uso de antígenos de virulência (purificados ou recombinantes) - vacinas de subunidade, novas estratégias como peptídeos, vetores vivos atenuados e DNA estão em fase de pesquisa. Uma breve pesquisa pelo site clinicaltrials.gov (2011) resulta em dezenas de estudos clínicos de fase 2 utilizando peptídeos sintéticos como vacinas para os mais variados alvos (melanoma, câncer de ovário, hepatite B, leucemia, câncer cervical, alergia, asma). Para vacinas de DNA há mais de uma centena de estratégias em estudo clínico e para as mais variadas doenças, desde câncer a doenças infecciosas. Algumas dezenas de ensaios estão em fase IV, indicando uma proximidade de entrada no mercado. Utilizando a estratégia de vacinas vetorizadas há outros estudos, na sua maioria em fase 1 clínico.

Na área veterinária, o uso de vacinas vetorizadas já é uma realidade. Só no Brasil existem ao menos 6 vacinas deste tipo aprovadas pela CTNBIO (2011) para comercialização. Algumas destas vacinas, como as da linha VECTORMUNE® da empresa francesa CEVA especializada em saúde aviária, são de uso em espécie utilizada na cadeia alimentar.

Em nossos estudos, adotamos o uso da *Salmonella* Typhimurium como vetor para nossos antígenos vacinais. A utilização das linhagens de *Salmonella* no desenvolvimento de vacinas vetorizadas dá-se por serem bons carreadores de antígenos heterólogos para o sistema imune de mamíferos (Mollenkopf, *et al.*, 2001), devido à capacidade de estimular o tecido linfóide associado ao intestino (GALT) e invadir órgãos e tecidos mais profundos, induzindo uma resposta imune específica celular, humoral e de mucosa (Kauffmann *et al.*, 2001; Dougan *et al.*, 1987; Chatfield *et al.*, 1994; Pascual *et al.*, 1997; Sirard *et al.*, 1999) sem causar lesões ao hospedeiro (Hormaeche, 1991; Guillobel *et al.*, 2000; Hoiseth & Stocker, 1981;

Cárdenas *et al.*, 1994; Chatfield *et al.*, 1992). Consequentemente, a *Salmonella* tem sido considerada um dos melhores vetores vacinais (Kotton & Hohmann, 2004).

Após a inoculação por via oral, linhagens de *Salmonella enterica* aderem e invadem células da mucosa intestinal, preferencialmente as células M, atingindo sítios linfóides das placas de Peyer (PP) (Carter & Collins, 1974; Jones *et al.* 1994; Huang *et al.*, 2000). Nesses sites anatômicos, a *Salmonella enterica* é capaz de persistir e replicar-se, servindo como fonte de estímulo constante, sendo degradado e apresentados antígenos que induzem a resposta imune celular (Clarck *et al.*, 2000 e 2001; Gebert, 1997; Jepson & Clarck, 2001; Kraehenbuhl & Neutra, 2000). A cepa bacteriana frequentemente reside em macrófagos (Eckmann & Kagnoff, 2001) que migram também para órgãos como baço, fígado e linfonodos regionais.

Linhagens virulentas de *Salmonella enterica* podem ser atenuadas através de mutações em genes necessários à sobrevivência e crescimento *in vivo*. Estas mutações que atenuam a virulência não impedem que a bactéria cause uma infecção transitória sem gravidade, mas as tornam capazes de ativar o sistema imune (Cárdenas & Clements, 1992).

A estratégia de mutar genes através de engenharia genética com o intuito de atenuar a virulência da bactéria também pode ser aplicado para deletar genes necessários à sobrevivência da bactéria na natureza. Por essa estratégia, a bactéria somente sobreviverá se incorporar um plasmídio que contenha o gene deletado, onde, neste mesmo plasmídio, acrescentamos o gene que codifica a proteína heteróloga de interesse. A essa estratégia é dado o nome de sistema letal balanceado. Através do sistema letal balanceado é possível resolver problemas de instabilidade ou perda do plasmídio pela ausência de pressão seletiva por antibióticos.

Objetivos

Neste trabalho, buscamos avaliar a resposta *in vivo* à construção vacinal baseada em *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 carreando a proteína vapG. Para tanto, as seguintes etapas foram delineadas;

- 1) Avaliar se a linhagem vacinal de *Salmonella* carreando a proteína vapG é estável, sendo capaz de colonizar e persistir em órgãos linfóides de camundongos BALB/c oralmente imunizados.
- 2) Avaliar os efeitos protetores da imunização com a linhagem vacinal de *Salmonella* carreando o antígeno vapG no curso da infecção experimental por *R. equi* em camundongos BALB/c.
- 3) Caracterizar a resposta imune humoral e celular de camundongos imunizados.

Materiais e Métodos

1 Animais

Para os experimentos contidos neste trabalho, foram utilizados camundongos isogênicos BALB/c fêmeas, entre 6 e 8 semanas de idade, provenientes do biotério de criação de animais isogênicos da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto (USP).

2 Linhagens bacterianas

Em todos os ensaios de imunização foi utilizada a linhagem bacteriana *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 transformada com os plasmídios pYA3137, pYA3137vapA e pYA3137vapG, construído e gentilmente fornecido pela empresa Invent Biotecnologia Ltda.

Durante todo o trabalho a *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 transformada com o plasmídio pYA3137vapA foi denominada vapA+, a *S. enterica* Typhimurium χ 3987 transformada com o plasmídio pYA3137vapG foi denominada vapG+ e a *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 foi denominada como controle.

Para o desafio dos animais foi utilizada cepa virulenta de *Rhodococcus equi* obtida junto a ATCC (*American Type Culture Collection*) registrada como ATCC33701.

3 Cultivo e preparo de *S. enterica* Typhimurium contendo os plasmídios pYA3137, pYA3137vapA ou pYA3137vapG

O cultivo e preparo das linhagens transformadas foi realizado conforme descrito por Covone *et al.* (1998). Resumidamente, as linhagens de *S. enterica*

Typhimurium foram inoculadas em 10 mL de meio LB (Acumedia) acrescido de glicose na concentração de 0,1% e incubadas sem agitação, por 12 horas a 37°C. Em seguida, 700 µL de cada cultura foram transferidas para 20 mL de meio LB com a mesma modificação. Estas novas culturas foram incubadas a 37°C sob agitação constante (200 RPM) até atingir a densidade óptica (DO) de 0,7 a um comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas por 15 minutos a 2000 g, os sobrenadantes foram desprezados e as células ressuspensas em 20 mL de PBS. O procedimento foi repetido duas vezes. Foram feitas diluições seriadas da última ressuspensão e as diluições dos tubos 10^{-7} , 10^{-8} e 10^{-9} foram plaqueadas em triplicata em ágar MacConkey para determinar o número de colônias (UFC/mL) na cultura e, assim, confirmar o inoculo utilizado na imunização dos camundongos.

4 Cultivo e preparo de suspensões de *R. equi* para infecção de camundongos

Inicialmente foi feito um inoculo de *R. equi* em 250 mL de meio BHI (*brain heart infusion*). Em seguida, a cultura foi mantida por 66 horas a 37°C sob agitação a 100 rpm. Foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm até atingir uma leitura igual a 1,3. Obtida a absorbância desejada, o material foi centrifugado a 2000 g, 4°C e lavado com PBS. O sedimento foi ressuspendido em 1 mL de PBS e a suspensão de *R. equi* foi diluída seriadamente (10^{-1} a 10^{-9}). Posteriormente, 100 µL das diluições 10^{-7} a 10^{-9} foram semeadas em placas de petri contendo ágar BHI. Após 48 horas de incubação a 37°C, foi feita a contagem das colônias e o número de bactérias na amostra foi estimado.

5 Obtenção da fração antigênica APTX

5.1 – Cultivo e preparo da cepa virulenta de *R. equi*

Seguiu-se o mesmo procedimento de cultivo adotado para a preparação dos inóculos para o protocolo de desafio dos animais. Após a ressuspensão do sedimento em 1 mL de PBS, o material foi dividido em alíquotas de 50 mg (peso seco aproximado) que foram estocadas a -20°C para posterior obtenção do antígeno de parede de *R. equi*.

5.2 – Extração de antígeno da parede de *R. equi* virulento

O APTX foi obtido através da incubação das alíquotas de 50 mg do sedimento bacteriano com Triton X-114 (Sigma) a 2% em PBS e 1 mM de PMSF (Sigma), sob agitação por 12 horas a 4°C. Após a incubação, o material foi centrifugado a 12000 g por 15 minutos. O sobrenadante recuperado foi incubado com sacarose 6% (Merck) por 10 minutos a 37°C. O material foi centrifugado novamente e o procedimento repetido por duas vezes. Em seguida o material foi centrifugado e o sedimento incubado *overnight* a -20°C com acetona (Merck). O precipitado, recuperado por centrifugação, foi estocado a -20°C para posterior utilização na dosagem de anticorpos.

6 Imunização de camundongos com as linhagens vacinais de *S. enterica* Typhimurium

O protocolo de imunização adotado foi o inóculo nos dias 0 e 15 de aproximadamente 1×10^9 UFC de *Salmonella* ressuspensos em 200 µL de PBS, dados por via oral, com auxílio de uma agulha para gavagem. Em alguns protocolos

foi realizado o desafio experimental com cepa virulenta de *R. equi* no dia 30. Para tanto, foram inoculados aproximadamente 4×10^6 UFC por via endovenosa, via plexo ocular. De acordo com o protocolo experimental os grupos foram divididos em animais tratados com a linhagem de *salmonella* experimental (vapG+), tendo como controles negativos animais imunizados com linhagem controle ou apenas tratados com PBS. Como controles positivos foram utilizados animais imunizados com linhagem de *Salmonella* vapA+. Os animais foram avaliados cinco dias após o desafio com *R. equi*.

7 Coleta e processamento de sangue para detecção e quantificação de anticorpos séricos

A coleta de sangue foi realizada antes da primeira imunização para obtenção do soro pré-imune e 15 dias após a segunda imunização para obtenção do soro imune (teste). Em cada ponto da amostragem foram coletados soros de pelo menos 4 camundongos por grupo experimental. A coleta foi realizada via plexo ocular e obteve-se aproximadamente 500 μ L de sangue de cada animal. Para obtenção do soro, o sangue total foi mantido por 30 minutos a 37°C e após este período, mantido por 30 minutos a 4°C, sendo então centrifugado por 15 minutos a 1000 g. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante foi armazenado a -20°C para posterior determinação do título de anticorpos.

O ensaio por ELISA foi realizado para detecção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para os antígenos de *R. equi*, no soro de camundongos imunizados. Para tanto, placas de poliestireno de 96 poços (NUNC, Inc.) foram incubadas com a preparação antigênica APTX (descrito no item 5), na concentração final de 1 μ g por poço. A diluição foi feita em tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,6 (100 μ L /

poço). Após 24 horas de incubação a 4°C, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e incubadas com 200 µL / poço de solução de bloqueio (PBS-T contendo gelatina a 3%) por uma hora a 37°C. Em seguida, as placas foram lavadas e incubadas com 100 µL das amostras de soros em diferentes diluições (1:30 a 1:480) na solução de bloqueio, por 2 horas a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com anticorpos de cabra anti-IgG1 ou anti-IgG2a de camundongo, conjugados à peroxidase (Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:5000 em PBS-T-gelatina 1%. Após 1 hora de incubação a 37°C, os poços foram novamente lavados, sendo a reação antígeno-anticorpo revelada pela adição de 100 µL / poço de tetrametilbenzidina (TMB / Pierce), na concentração sugerida pelo fabricante. A reação foi bloqueada pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 M (Merck) e a leitura foi realizada 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

8 Dosagem de citocinas

A dosagem de citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando o sistema OptEIA™SET: Mouse (Pharmingen, San Diego, CA, USA). As concentrações de cada citocina nos sobrenadantes foram calculadas utilizando-se a curva de regressão linear, a partir da curva padrão realizada para as respectivas citocinas.

8.1 - Dosagem de IL-12p70

Placas para ELISA de alta afinidade (Coming Costar Europe Badhoevedorp, the Netherlands) foram sensibilizadas com 100 µL / poço de anticorpo monoclonal anti-IL-12p70, diluídos 1:250 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6,

conforme instrução do fabricante, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T) e incubadas com uma solução de PBS acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (Sigma) (solução de bloqueio) durante 1 hora à temperatura ambiente. Aos poços das placas, foram adicionados em duplicata as citocinas recombinantes (curva padrão iniciada na concentração 4000 pg / mL) e as amostras. Seguiu-se a incubação à temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T e foram adicionados os anticorpos secundários biotinilados (anticorpo de detecção) específicos para a citocina, diluídos 1:250, que haviam sido pré-incubados por 15 minutos com avidina conjugada a peroxidase. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 hora. Após a última lavagem foi adicionado o revelador tetrametilbenzidina (TMB / Pierce). As reações foram bloqueadas após 20 minutos com ácido sulfúrico 2 M e a leitura realizada a 450 nm em leitor de microplacas (Power Wave X – Bio Tek Instruments, INC).

8.2 – Dosagem de TNF- α

Para a dosagem de TNF- α foi adotado o protocolo semelhante ao utilizado para a dosagem de IL-12p70, com exceção da etapa referente ao anticorpo de detecção. O anticorpo anti-TNF- α biotinilado, diluído 1:500, foi adicionado à placa e incubado durante 1 hora à temperatura ambiente.

Após as lavagens, adicionou-se avidina conjugada a peroxidase (1:250) por mais 30 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. Seguiu-se então novo ciclo de lavagem e a reatividade foi determinada como descrito no item 7.1.

8.3 – Dosagem de IFN- γ

Para a dosagem de IFN- γ as placas de poliestireno de alta afinidade (Corning Costar Europe Badhoevedorp, The Netherlands) foram sensibilizadas com 100 μ L / poço de anticorpo de captura anti-IFN- γ , diluído 1:2000 em tampão carbonato-bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, conforme instruções do fabricante, seguindo-se incubação por 24 horas a 4°C. A concentração de IFN- γ murino recombinante foi de 2000 pg / mL. O anticorpo anti-IFN- γ biotilado (anticorpo de detecção) foi diluído 1:250.

8.4 – Dosagens de IL-4

A dosagem de IL-4 foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo descrito anteriormente. A curva padrão de citocina recombinante foi iniciada na concentração de 500 pg / mL.

9 Dosagem de citocinas nos órgãos de camundongos imunizados e imunizados-desafiados

Para a realização deste ensaio, grupos de 5 animais foram submetidos à eutanásia nos dias 30 e 35 após a primeira imunização, de acordo com o protocolo experimental. Os órgãos (baço e fígado) foram colhidos, pesados, diluídos em 1 mL de PBS estéril contendo inibidor enzimático (Boehringer Mannheim) e divulsionados em homogenizador elétrico (04728-00/OMNI Mixer Homogeneizer Systems). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 250 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante estocado a -20°C para posterior dosagem de citocinas (descrito no item 7).

10 Análise das populações celulares presentes no baço de animais imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 vapG

Células provenientes do baço de camundongos previamente imunizados com *Salmonella* vapG+, controle ou PBS, foram colhidas 15 dias após a segunda imunização e incubadas com marcadores de superfície para análise por citometria de fluxo. Em resumo, as células esplênicas de cada animal (n=4 / grupo) foram ressuspensas em PBS, de maneira a se obter uma concentração final de 1×10^7 células / mL, e divididas em tubos apropriados para leitura em citometro. Após centrifugação, as células foram ressuspensas com 100 μ L de PBS contendo anticorpo anti-CD16 / CD32 (Fc blockTM), clone 2.4G2, a fim de se evitar ligações inespecíficas. Após incubação por 30 minutos a 4°C, as células foram incubadas por mais 40 minutos com anticorpos anti-CD19, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 e/ou anti-CD62L, marcados com ficoetrina-PE ou com isocianato fluoresceína-FITC (Caltag / Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), diluídos em PBS / BSA (Sigma). Finalmente, as células foram lavadas e fixadas com PBS contendo 1% de formol a 37°C e analisadas por citometria de fluxo em facsort (Guava EasyCyte Mini Base System, Billerica, MA, USA). Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Guava (Guava Express Pro Software, versão 4.2).

11 Análise estatística.

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os valores foram comparados usando o teste Tukey após análise de variância com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados

1 Avaliação da estabilidade (capacidade da linhagem vacinal recombinante de colonizar e persistir em órgãos linfóides).

No intuito de avaliarmos se a linhagem vacinal recombinante *S. enterica* Typhimurium pYA3137*vapG* era estável *in vivo* e capaz de colonizar e persistir nos órgão linfóides alvo (baço e fígado), utilizamos como referência a linhagem vacinal *S. enterica* Typhimurium pYA3137*vapA* construída e avaliada por Oliveira *et al.* (2007). Para este experimento, foram montados 3 grupos experimentais com cinco camundongos em cada onde foram avaliados os seguintes inóculos: *S. enterica* Typhimurium pYA3137, *S. enterica* Typhimurium pYA3137*vapA* e *S. enterica* Typhimurium pYA3137*vapG*. Observou-se (figura 1) que as construções contendo as proteínas heterólogas foram estáveis *in vivo* e capazes de colonizar de maneira semelhante o baço e o fígado dos animais tratados.

Figura 1: Ensaio de Persistência. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral, nos dias 0 e 15, com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (controle), *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (vapA+) e *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapG (vapG+). No dia 30 após a primeira imunização, os animais foram submetidos à eutanásia para a retirada do baço (A) e fígado (B). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão e é representativo de três experimentos distintos.

2 “Clearance” bacteriano nos órgãos de camundongos BALB/c infectados com *R. equi*

Neste ensaio, camundongos BALB/c previamente imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG e *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA foram infectados, por via endovenosa, com 4×10^6 UFC / mL da cepa virulenta ATCC33701 de *R. equi* 30 dias após a primeira imunização. Grupos de cinco animais foram submetidos à eutanásia cinco dias após o desafio experimental com a cepa virulenta de *R. equi* e avaliou-se o “clearance” bacteriano no baço e fígado destes animais através da contagem de unidades formadoras de colônia por grama de órgão (UFC / g). Como controles, foram utilizados órgãos de camundongos inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 ou com PBS e submetidos ao mesmo protocolo de desafio e quantificação de UFC. Foi observado (Figura 2) que os animais imunizados com a linhagem de *Salmonella* vapG+ foram capazes de reduzir a carga bacteriana de maneira semelhante à linhagem de *Salmonella* vapA+.

Figura 2: Ensaio de proteção contra *R. equi* virulento. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral, nos dias 0 e 15, com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (controle), *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapA (vapA+), *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapG (vapG+) e PBS. Quinze dias após a segunda imunização, os animais foram submetidos ao desafio experimental por via endovenosa com 4×10^6 UFC / mL da cepa virulenta ATCC33701 de *R. equi*. Cinco dias após o desafio experimental, os animais foram submetidos à eutanásia e o baço (**A**) e fígado (**B**) colhidos para análise. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão e o resultado é representativo de três experimentos distintos. * $p < 0,05$ significativo em relação aos grupos inoculados com a cepa controle e PBS (teste de Tukey).

3 Detecção e quantificação das citocinas presentes em órgão linfóide alvo de camundongos imunizados e imunizados / desafiados com *R. equi*.

Para avaliarmos o perfil de citocinas induzido pela imunização com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados no dia 0 e no dia 15. No 30º dia, cinco animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia para análise e cinco animais foram desafiados por via endovenosa com a cepa virulenta ATCC33701 de *R. equi*, sendo estes animais, submetidos à eutanásia cinco dias após o desafio. Foram colhidos o baço dos animais para detecção das seguintes citocinas; IL-12p70 (figura 3 **A** e **B**), IFN- γ (figura 3 **C** e **D**), TNF- α (figura 3 **E** e **F**) e IL-4 (figura 3 **G** e **H**). As figuras A, C, E e G representam os resultados obtidos dos animais imunizados e as figuras B, D, F e H dos animais imunizados e desafiados com a cepa virulenta de *R. equi*. Os animais imunizados com a linhagem vapG+ foram capazes de montar uma resposta imune com aumento da produção de IL-12p70 e IFN- γ . Observou-se também um aumento da produção de IL-4. Com relação à produção de TNF- α , observamos um aumento significativo da produção desta citocina nos animais dos grupos controle após o desafio com *R. equi*. No entanto, os animais imunizados com a linhagem de *Salmonella* vapG+ mantiveram os níveis de TNF- α .

Figura 3: Detecção de citocinas no baço de camundongos imunizados e imunizados/desafiados. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral com 200 μ L (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium pYA3137vapG, *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (controle) ou PBS nos dias 0 e 15. Quinze dias após a segunda imunização, cinco animais foram submetidos à eutanásia para a coleta dos baços para dosagem das citocinas: IL-12p70 (A), IFN- γ (C), TNF- α (E) e IL-4 (G). Quinze dias após a segunda imunização, outros cinco animais foram desafiados por via endovenosa com 4×10^6 UFC com *R. equi* virulento e submetidos à eutanásia cinco dias após o desafio para a coleta dos baços para dosagem das citocinas: IL-12p70 (B), IFN- γ (D), TNF- α (F) e IL-4 (H). Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão e o resultado é representativo de dois experimentos independentes. $p < 0,05$ é significativo em relação ao grupo de animais inoculados com *S. enterica* Typhimurium χ_{3987} pYA3137 (teste de Tukey).

4 Avaliação das populações de células T auxiliares (CD4⁺), T citotóxicas (CD8⁺) e linfócitos B (CD19⁺) presentes no baço de animais imunizados.

Visando avaliar a frequência de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B (CD19⁺) em células esplênicas de camundongos imunizados e controles, efetuamos a análise de marcadores de superfície por citometria de fluxo. Grupos de animais Balb/c foram imunizados nos dias 0 e 15 com as linhagens de *Salmonella* controle ou vapG⁺ ou tratados com PBS. Os animais foram submetidos à eutanásia e o baço colhido para processamento. Foi observado (figura 4) aumento significativo apenas do percentual total de células B.

Figura 4: Frequência relativa total de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B (CD19⁺) em células esplênicas de animais imunizados. Células esplênicas (1×10^7 cél. / mL) provenientes de camundongos previamente imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 *vapG* (vapG+) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium pYA3137 (controle) ou com PBS obtidas 15 dias após a segunda imunização foram incubadas com anticorpos anti-CD3 / anti-CD4 (**A**), anti-CD3 / anti-CD8 (**B**) e anti-CD19 (**C**) e, posteriormente, fixadas em formalina 10%. A avaliação da porcentagem de células positivas para cada um dos marcadores foi realizada por citometria de fluxo. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão de quatro animais por grupo e é representativo de dois experimentos independentes.

5 Avaliação das subpopulações de linfócitos T auxiliares (CD4⁺) e citotóxicos (CD8⁺) com fenótipo de memória

Caracterizou-se por citometria de fluxo a frequência relativa total de linfócitos T com perfil de memória (CD3⁺CD44^{high}CD62L⁺) (figura 5A), e as subpopulações de linfócitos T auxiliares com perfil de memória (CD3⁺CD4⁺CD44^{high}CD62L⁺) (figura 5B) e linfócitos T citotóxicos com perfil de memória (CD3⁺CD8⁺CD44^{high}CD62L⁺) em células esplênicas dos camundongos imunizados nos dias 0 e 15 com as linhagens vapG⁺ e controle e tratados com PBS. Observou-se um aumento significativo das diferentes subpopulações de linfócitos T com perfil de memória no grupo de animais imunizados com *Salmonella* vapG⁺.

Figura 5: Frequência relativa total e parcial de linfócitos T com perfil de memória obtidos de animais imunizados e controles. Células esplênicas (1×10^7 cél. / mL) provenientes de camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137vapG (vapG+) e de camundongos controles inoculados com *S. enterica* Typhimurium $\chi 3987$ pYA3137 (controle) ou com PBS, obtidos 15 dias após a segunda imunização, foram incubadas com anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD44 e anti-CD62L e fixadas com formalina 10%. A avaliação da porcentagem de células positivas para os marcadores foi determinada por citometria de fluxo. A porcentagem de células T totais com perfil de memória é demonstrado na figura 5A, a subpopulação de células T auxiliares com perfil de memória é demonstrado na figura 5B e a subpopulação de células T citotóxicas com perfil de memória é

demonstrado na figura 5C. Cada barra representa a média $\pm$ erro padrão e o resultado é representativo de dois experimentos independentes.

6 Avaliação dos anticorpos séricos

Aqui duas perguntas precisavam ser respondidas. Primeiro, a vacina vapG+ é capaz de induzir uma resposta humoral contra o antígeno vapG? Segundo, já que há um grau de homologia estrutural entre vapG e vapA, haveria reação cruzada entre os anticorpos produzidos pelas diferentes construções vacinais, vapA+ e vapG+? Assim, camundongos foram imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG (vapG+), *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG (vapA+), *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (controle) ou tratados com PBS. Quinze dias após a segunda imunização, o soro dos animais foi colhido para a realização de ensaio por ELISA para detecção dos anticorpos específicos.

As tentativas de fazer um ELISA para detectar vapG foram frustradas. No APTX (extrato rico em vapA) não há presença de vapG e o extrato de *R. equi* total resulta em um forte “background” no ELISA, provavelmente devido a reações cruzadas com outras bactérias e o fato de não utilizarmos animais SPF. Ao longo deste ano foram feitas algumas tentativas de produzir o antígeno recombinante, mas ainda não tivemos sucesso na clonagem e expressão. As amostras de soro foram guardadas para posterior análise quando da produção do recombinante.

Com relação à avaliação da reação cruzada com a proteína vapA, utilizamos a preparação de APTX como antígeno. Foram verificadas a presença de anticorpos específicos das subclasses IgG1 e IgG2a. Animais imunizados com a vacina vapA+ foram capazes de produzir anticorpos específicos de ambas as subclasses (figura

6). Tanto os animais controle, quanto os animais imunizados com vapG+ não foram capazes de produzir anticorpos contra a proteína vapA, sugerindo não haver reação cruzada entre os antígenos.

Figura 6: Isotipagem dos anticorpos séricos antígeno-específicos em camundongos imunizados com *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG e *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA. Camundongos BALB/c foram inoculados por via oral nos dias 0 e 15 com 200 μ L de (1×10^9 UFC) de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapG (vapG) ou (1×10^9 UFC) *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137vapA (vapA), ou (1×10^9 UFC) *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 (controle) ou PBS. No dia 15 após a segunda imunização, o sangue dos animais foram coletados e os soros (diluição 1:240) foram ensaiados por ELISA, utilizando-se microplacas sensibilizadas com antígeno total de parede de *R. equi* (APTX - 1 μ g / mL). As barras representam a média $\pm$ SD do soro obtido de 5 animais, isoladamente, feito em duplicata.

Discussão

Muitos autores preconizam a proteína vapA como o principal fator de virulência do *R. equi* (Jain *et al.*, 2003). Embora a proteína vapA seja necessária, somente esta, não é suficiente para a virulência da cepa (Giguère *et al.*, 1999b). Muitos trabalhos ressaltam sua importância como imunógeno, pois acredita-se que a ativação de uma resposta específica direcionada a esta proteína, induza proteção ou amenize a severidade da doença (Lopez *et al.*, 2003; Taouji *et al.*, 2004). Procedimentos experimentais de imunização que utilizam peptídeos sintéticos representativos de epítomos vapA (Taouji *et al.*, 2004), bem como a administração de vacinas de DNA expressando o gene *vapA* (Haghighi & Prescott, 2005; Mealey *et al.*, 2007), resultaram em resposta específica com variados graus de proteção.

Linhagens atenuadas de *Salmonella enterica* são bons carreadores de proteínas heterólogas para células imunológicas de mamíferos, capazes de induzir uma resposta protetora tanto contra *Salmonella sp.*, quanto para o patógeno doador do antígeno (Sirard *et al.*, 1999). Oliveira *et al.* (2007 e 2010) demonstraram que a administração oral de *Salmonella enterica* Typhimurium carreando a proteína vapA, foi capaz de induzir uma resposta imune protetora em camundongos BALB/c através da indução de um padrão de resposta do tipo Th1. Resposta semelhante foi observada quando a vacina foi aplicada por via nasal em dose única (Soares *et al.* e Cardoso *et al.*, manuscritos em preparação).

Apesar do sucesso no uso da proteína vapA como antígeno vacinal, outras proteínas presentes na ilha de patogenicidade devem ser avaliadas. Monego *et al.* (2009) demonstraram que a proteína vapG estava presente em todas as cepas de *R. equi* colhidas em fazendas com histórico da doença e Jacks *et al.* (2007) demonstraram que esta proteína é altamente expressa tanto *in vitro* quanto *in vivo* ao infectarem células do pulmão de potros. Baseado nestes trabalhos, a empresa

Invent Biotecnologia Ltda isolou o gene *vapG* da cepa virulenta de *R. equi* ATCC33701 e clonou esse gene no plasmídio pYA3137, pertencente ao sistema letal balanceado *asd*. Resultados preliminares haviam indicado o potencial uso desta cepa como candidata a vacina para a prevenção da rodococose equina. Esta linhagem construída pela empresa Invent Biotecnologia Ltda, nos foi gentilmente cedida para a avaliação e ensaios de proteção *in vivo*, descritos neste trabalho.

A imunização de camundongos BALB/c com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium χ 3987 pYA3137 *vapG*, mostrou-se estável *in vivo*, sendo capaz de colonizar e persistir em seus órgãos linfóides alvo (baço e fígado) como demonstrado. A capacidade de invadir e persistir nos órgãos alvo parece ser condição essencial para o estímulo adequado da resposta imune (Oliveira *et al.*, 2007). Frente ao desafio experimental com dose subletal de *R. equi* virulento, houve um eficiente *clearance* bacteriano equiparado à cepa vacinal construída por Oliveira *et al.* (2007) expressando a proteína *vapA*, e em relação aos controles. Foi observada uma redução de pouco mais de um log na carga bacteriana de *R. equi*, três dias após a infecção de animais vacinados. Estes resultados demonstraram que a imunização oral com a linhagem atenuada de *S. enterica* Typhimurium expressando a proteína *vapG*, conferiu proteção frente ao desafio com *R. equi* virulento em modelo murino de infecção e fundamentaram nossa busca em avaliar o perfil de resposta imune específica para *R. equi* desencadeada pelo processo de vacinação.

É consenso que uma vacina para prevenção da rodococose equina precisa estimular, além de uma resposta humoral, uma eficiente resposta celular mediada por linfócitos T (Hines *et al.*, 1997). Dados obtidos de animais adultos, naturalmente resistentes à infecção, e estudos realizados em modelos murinos têm sugerido que

a resistência ao *R. equi* é principalmente mediada por linfócitos T e dependente da produção de IFN- γ (Kanaly *et al.*, 1996; Hines *et al.*, 2003).

As atividades desencadeadas pelas citocinas de padrão Th1 são cruciais para a eliminação de patógenos intracelulares, tais como o *R. equi* (Kasuga-Aoki *et al.*, 1999). O IL-12, liberado pela atividade de células dendríticas e macrófagos, induzem a diferenciação de células Th0 em Th1. Por sua vez, células Th1 liberam IFN- γ que promove as atividades efectoras de macrófagos, tais como a produção de óxido nítrico e radicais livres de oxigênio, essenciais para a eliminação de patógenos localizados no ambiente intracelular. Os resultados obtidos com a vacina de *Salmonella* expressando o antígeno vapG, demonstram que os animais só imunizados e aqueles imunizados e desafiados com cepa virulenta de *R. equi* foram capazes de produzir níveis aumentados das citocinas IL-12 e IFN- γ em relação aos grupos controle. Estes resultados sugerem a indução de uma modulação de resposta Th1 por parte da vacina vapG+. Resultados semelhantes foram obtidos por Oliveira *et al.* (2010) utilizando a vacina *Salmonella* vapA+ por via oral e por Soares *et al.* (manuscrito em preparação) utilizando a mesma vacina por via nasal.

Apesar de uma detecção significativamente aumentada das citocinas IL-12 e IFN- γ , foi detectado no baço dos animais um aumento significativo da citocina IL-4, tanto nos animais somente imunizados, quanto naqueles imunizados e desafiados. Resultados semelhantes foram observados com a vacina *Salmonella* vapA+ apenas quando inoculada por via nasal (Soares *et al.*, manuscrito em preparação). A IL-4 é uma citocina induzida sob condições polarizadas para o padrão Th2, mas também produzida de forma constitutiva por células NKT, basófilos, eosinófilos e mastócitos (Grogan *et al.*, 2001; Stetson *et al.*, 2003; Voehringer *et al.*, 2004; Gessner *et al.*, 2005). Até o momento não fomos capazes de identificar a população celular

responsável pela alta secreção de IL-4, ou mesmo, se a alta secreção desta citocina tem um papel fundamental na proteção demonstrada frente ao desafio experimental em murinos, sendo esta avaliação, tema de estudos futuros. O aumento da secreção de IFN- γ por células T já foi associado ao *clearance* pulmonar eficiente em cavalos infectados com *R. equi* virulento (Lopez *et al.*, 2002). Porém, o estudo de Ryan *et al.* (2009) avaliando o processo infeccioso utilizando cavalos adultos e potros, demonstraram uma alta produção de IL-4 em ambos, sendo que no animal adulto (resistente à infecção) a produção desta citocina é ainda mais elevada em relação ao potro. Estes resultados sugerem a necessidade de um estudo mais aprofundado para saber se há algum papel importante para esta citocina na modulação de resposta contra o *R. equi*.

A associação TNF- α / IFN- γ é necessária para limitar a replicação e promover o *clearance* do *R. equi* virulento (Nordmann *et al.*, 1993; Kanaly *et al.*, 1995 e 1996). O TNF- α exerce um papel fundamental na atividade microbicida contra vários patógenos (Flynn *et al.*, 1995; Langermans & Van Furth, 1994), inclusive contra *R. equi* (Kasuga-Aoki *et al.*, 1999), e sabe-se que esta citocina tem atividade pró-inflamatória (Criscione e St Clair, 2002) e que a secreção exacerbada está associada com a várias patologias autoimunes (Abuzakouk *et al.*, 2002). Desta forma, a produção moderada de TNF- α é de extrema importância para prevenir lesões teciduais. Giguère *et al.* (1999a) demonstraram que, a eliminação da infecção pulmonar de *R. equi* avirulento está associado à diminuição progressiva de RNAm para TNF- α . Ao avaliarmos a produção de TNF- α no baço, observamos um aumento significativo da secreção desta citocina em relação aos controles nos animais apenas imunizados. Para nossa surpresa, após o desafio com *R. equi* estes níveis permaneceram estáveis nos animais imunizados com *Salmonella* vapG+, mas os

animais controle apresentaram um aumento de 5 a 10 vezes. No caso do grupo controle *Salmonella* esta produção exacerbou os níveis detectados no grupo *Salmonella* vapG+. Resultados semelhantes foram observados por Oliveira *et al.* (2010), imunizando camundongos pela via oral com *Salmonella* vapA+, e Soares *et al.* (manuscrito em preparação), imunizando por via nasal com a mesma linhagem vacinal. Em ambos os casos observou-se uma redução da lesão de tecido nos grupos imunizados *Salmonella* vapA+. Estes resultados sugerem um controle da produção de TNF- α , de maneira tal que possa favorecer a eliminação eficiente do patógeno intracelular, sem comprometer a integridade dos órgãos infectados.

Como discutido anteriormente, a linhagem vacinal foi estável e capaz de persistir e colonizar no baço de camundongos BALB/c estimulando uma resposta imune protetora. Há observações prévias de que o processo de imunização com linhagens vacinais de *Salmonella* carreando antígenos heterólogos estimulam a proliferação de T CD4⁺ e T CD8⁺ efetoras, capazes de combater a infecção causada pelo patógeno virulento doador do antígeno (Shiau *et al.*, 2005). Ao avaliarmos a frequência relativa de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ totais presentes no baço de animais previamente imunizados, não observamos diferenças significativas entre os grupos, no entanto, a população de linfócitos CD19⁺ (células B) aumentou significativamente nos animais imunizados com *Salmonella* vapG+. Estímulos prolongados e de forma efetiva, levam a um alto grau de ativação das subpopulações celulares T auxiliares (CD4⁺) e T citotóxicos (CD8⁺), ao ponto de uma pequena subpopulação passar a expressar ligantes em sua superfície celular que promovem sua sobrevivência. Estas subpopulações de memória são caracterizadas através da expressão dos marcadores fenotípicos CD44 e CD62L e com base nestes marcadores são ainda subdivididas em duas subpopulações, memória

efetora e memória central. Ambos marcadores estão presentes em ambas subpopulações de memória, o que as diferencia, é a quantidade de ligantes expresso na superfície celular, sendo atribuível a subpopulação de linfócitos T de memória efetora a expressão de $CD44^{high}CD62L^{low}$ e à subpopulação de linfócitos T de memória central a expressão de $CD44^{high}CD62L^{high}$. Como a geração de células de memória é um pré requisito para uma boa vacina, buscamos avaliar a geração de células com perfil de memória presentes no baço de animais vacinados, e verificamos agora um aumento na frequência total de células T presentes no baço. Analisando as subpopulações, observamos um aumento na frequência das subpopulações de células T auxiliares ($CD4^{+}$) e T citotóxicos ($CD8^{+}$) com perfil de memória ($CD44^{high}CD62L^{+}$) em relação aos controles. Aqui não foi caracterizado o perfil das células de memória, central ou efetora.

Trabalhos prévios em camundongos e cavalos demonstram que tanto linfócitos T auxiliares ($CD4^{+}$), quanto T citotóxicos ($CD8^{+}$) exercem um papel importante no *clearance* do *R. equi* (Nordmann *et al.*, 1992; Hines *et al.*, 2001 e 2003). Hines *et al.* (1997) verificaram que linfócitos T $CD4^{+}$ e T $CD8^{+}$ poderiam ser responsáveis pelo *clearance* no pulmão de camundongos. Contudo, células T $CD4^{+}$ já bastariam para exercer tal efeito, através da secreção de IFN- γ . IFN- γ secretado por células T $CD4^{+}$, como discutido anteriormente, é necessário para a ativação de macrófagos, mas também atua na ativação de células B $CD19^{+}$ que passam a secretar anticorpos opsonizantes de alta afinidade.

O aumento do número de linfócitos T auxiliares ($CD4^{+}$) com perfil de memória e de células B sugere que a resposta imune protetora contra *R. equi* seja desencadeada pela ação conjunta de mecanismos da imunidade celular associada à atividade opsonizante de anticorpos com consequente fixação e ativação do sistema

complemento por via clássica. Experimentos utilizando como protocolo a transferência passiva de anticorpos têm fornecido evidências de que estes possuem papel importante na prevenção do desenvolvimento de pneumonia causada por *R. equi* (Giguère *et al.*, 2002; Madigan *et al.*, 1991; Martens *et al.*, 1989). Estudos realizados por Hietala & Ardands (1987) demonstraram que através da opsonização do *R. equi* com anticorpos específicos, há elevação dos níveis de fusão do fagossomo ao lisossomo, aumentando significativamente a morte de *R. equi* por macrófagos alveolares.

Com relação à produção de anticorpos específicos contra a proteína vapG, até o momento não conseguimos realizar os ensaios necessários devido à indisponibilidade de antígeno para execução do ELISA. A produção de antígeno vapG recombinante está em andamento e esperamos em breve poder realizar estes ensaios. Entretanto, como a descrição de homologia entre as diferentes proteínas vap da ilha de patogenicidade do *R. equi* (Takai *et al.*, 2000), realizamos ensaio de ELISA utilizando o antígeno APTX, rico em vapA. Nossos ensaios demonstraram que no soro obtido de camundongos imunizados com *Salmonella* vapG+ não há níveis detectáveis de anticorpos contra a proteína vapA, sugerindo não haver reação cruzada entre os antígenos. Tal resultado abre perspectivas para, uma vez tendo sucesso no desenvolvimento de vacina comercial usando o antígeno vapG, utilizar o antígeno vapA como controle para detecção de animais infectados por *R. equi*, sem o risco de obter falsos positivos pela vacina.

O grande desafio para o desenvolvimento de uma vacina eficaz para *Rhodococcus equi* em potros está no fato de que seu protocolo de imunização desejavelmente deve ter início no primeiro dia de vida. O momento exato que o animal entra em contato com a bactéria e quanto tempo leva para o aparecimento

dos primeiros sinais ainda é uma grande questão a ser respondida. Com base em dados obtidos em recentes investigações epidemiológicas, diferentes pesquisadores sugerem que os potros que desenvolvem pneumonia por *R. equi* são infectados durante os primeiros dias de vida, ainda que os sinais clínicos não se manifestam antes dos 30 a 60 dias de vida (Slovis, 2004). Ainda é apenas uma hipótese a questão dos potros serem suscetíveis à pneumonia por *R. equi* devido a uma deficiência de citocinas ao nascimento (Breathnach *et al.*, 2006) e que são infectados no primeiro dia de vida (Horowitz *et al.*, 2001). Porém está claro que potros podem ser infectados a qualquer momento do primeiro mês de vida (Hooper-McGrevy & Prescott, 2001) e que são capazes de montar uma resposta imune efetiva contra o *R. equi* às três semanas de vida quando imunizados por via oral (Hooper-McGrevy *et al.*, 2005). Além disso, segundo Jacks *et al.* (2007), alguns potros podem se mostrar imunocompetentes e podem montar uma resposta imune contra as proteínas associadas à virulência semelhante a cavalos adultos. Entretanto, a estratégia de vacinação adotada deve levar em consideração os efeitos inibitórios da imunidade materna transferida via colostro.

Nossos estudos com *Salmonella* carreando o antígeno vapA tem demonstrado o potencial uso desta vacina na imunização de potros nos primeiros dias de vida, com o estímulo adequado da resposta imune e a redução de sinais clínicos de infecção por *R. equi*. O sucesso do estabelecimento de um protocolo vacinal com a proteína vapG abrirá novas perspectivas. Primeiro, demonstramos que outros antígenos de virulência presentes na ilha de patogenicidade podem ser bons candidatos ao desenvolvimento de vacinas, além do antígeno vapA amplamente estudado por diferentes grupos de pesquisa. Segundo, o antígeno vapA é o melhor candidato ao desenvolvimento de kits de diagnóstico do *R. equi*, tendo em vista a

alta produção de anticorpos específicos pelos animais infectados. Assim, o uso de antígenos vacinais que não promovam reação cruzada são mais atrativos comercialmente.

Conclusões

- 1) A construção vacinal *Salmonella enterica* Typhimurium χ 3987 carreando a proteína vapG é capaz de colonizar e persistir no baço e fígado dos animais imunizados, demonstrando sua estabilidade;
- 2) *Salmonella* atenuada carreando a proteína vapG foi capaz de reduzir a carga bacteriana de *Rhodococcus equi* sugerindo ser este um importante antígeno para composição vacinal;
- 3) A nova construção vacinal foi capaz de induzir um perfil protetor semelhante ao observado em animais adultos resistentes com o aumento da produção de IL-12p-70 e IFN- γ , além da presença de níveis elevados de IL-4. Assim como a manutenção de níveis adequados de TNF- α ;
- 4) *Salmonella* atenuada carreando a proteína vapG foi capaz de induzir o aumento de células CD4+ e CD8+ com perfil de memória.
- 5) *Salmonella* atenuada carreando a proteína vapG induziu o aumento de células B, porém a demonstração da presença de anticorpos específicos depende da produção de vapG recombinante.

Referências Bibliográficas

- ABUZAKOUK, M.; FEIGHERY, C.; JACKSON, J. Tumor necrosis factor blocking agents: a new therapeutic modality for inflammatory disorders. **Br. J. Biomed. Sci.** v. 59, n.3, p.173-9, 2002.
- BASILIO-DE-OLIVEIRA, C. A.; VALLE, H. A.; GUIMARÃES, C. A.; MOREIRA, V. G. Infecção por *Rhodococcus equi* associada à malacoplaquia em pacientes HIV - positivo; relato de caso e revisão da literatura. **Pulmão.** v. 14, p.162-9, 2005.
- BECÚ, T.; POLLEDO, G.; GASKIN, J. M. Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 193-204, 1997.
- BELL, K. S.; Philp, J. C.; AW DW & CHRISTOFI, N. A Review - The genus *Rhodococcus*. **J. Appl. Microbiol.** v. 85, p. 195–210, 1998.
- BENOIT, S.; TAOUJI, S.; BENACHOUR, A. & HARTKE, A. Resistance of *Rhodococcus equi* to acid pH. **Int. J. Food Microbiol.** v. 55, p. 295–298, 2000.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFFRAY, Y. & HARTKE, A. Induction of vap genes encoded by the virulence plasmid of *Rhodococcus equi* during acid tolerance response. **Res. Microbiol.** v. 152, p. 439–449, 2001.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFFRAY, Y. & HARTKE, A. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.** v. 70, p. 3768–3776, 2002.
- BREATHNACH, C. C.; STURGILL-WRIGHT, T.; STILTNER, J. L.; ADAMS A. A.; LUNN, D. P; HOROHOV, D. W. Foals are interferon gamma-deficient at birth. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 112, p. 199-209, 2006.
- CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J. D.; Oral immunization using live attenuated *Salmonella ssp* as carriers of foreign antigens. **Clin. Microbiol. Ver.** v. 5, p. 328-342, 1992.
- CÁRDENAS, L.; DASGUPTA, U.; CLEMENTS, J. D. Influence of strain viability and antigen dose on the use of attenuated mutants of *Salmonella* as vaccine carrier. **Vaccine.** v. 12, p. 833-840, 1994.

- CARTER, P. B.; COLLINS, F. M. The route of enteric infection in normal mice. **J. Exp. Med.** v. 139, p. 1189-1203, 1974.
- CASTON, S. S.; MCCLURE, S. R.; MARTENS, R. J.; CHAFFIN, M. K.; MILES, K. G.; GRIFFITH, R. W. & COHEN, N. D. Effect of hyperimmune plasma on the severity of pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in experimentally infected foals. **Vet. Ther.** v. 7, p. 361–375, 2006.
- CHANTER, N. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 110-109, 1997.
- CHATFIELD, S. N.; CHARLES, I. G.; MAKOFF, A. J.; OXER, M. D.; DOUGAN, G.; PICKARD, D.; SLATER, D.; FAIRWEATHER, N. F. Use of the nirB promoter to direct the stable expression of heterologous antigens in *Salmonella* oral vaccine strains: development of a single-dose oral tetanus vaccine. **Bio. Technol.** v. 10, p. 888-92, 1992.
- CHATFIELD, S.; ROBERTS, M.; LI, J.; STARNES, A.; DOUGAN, G. The use of live attenuated *Salmonella* for oral vaccination. **Dev. Biol. Stand.** v. 82, p. 35-42, 1994.
- CLARCK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Lectin-Mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Ad. Drug Deliv. Rev.** v. 43, p. 207-223, 2000.
- CLARCK, M. A.; JEPSON, M. A.; HIRST, B. H. Exploiting M cells for drug and vaccine delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 50, p. 81-106, 2001.
- Clinicaltrials.gov. Disponível em : <<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/search.>> Acesso em 10 Fev. 2011.
- CORNISH, N.; WASHINGTON, J. A. *Rhodococcus equi* infections: clinical factures and laboratory diagnosis. **Curr. Clin. Top. Infect. Dis.** v. 19, p. 198-215, 1999.
- COULSON, G. B.; AGARWAL, S.; HONDALUS, M. K. Characterization of the Role of the Pathogenicity Island and *vapG* in the Virulence of the Intracellular Actinomycete Pathogen *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity.** v. 78, n. 8, p. 3323-3334, 2010.

- COVONE, M. G.; BROCCHI, M.; PALLA, E.; SILVEIRA, W. D.; RAPPUOLI, R.; GALEOTTI, C. L. Levels of expression and immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains expressing *Escherichia coli* mutant heat-labile enterotoxin. **Infect. Immun.** v.66, p. 224-231, 1998.
- CRISCIONE, L. G.; ST CLAIR, E. W. Tumor necrosis factor-alpha antagonists for the treatment of rheumatic diseases. **Curr. Opin. Rheumatol.** v. 14, n. 13, p. 204-211, 2002.
- CTNBIO. Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Disponível em: <<http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/12483.html>> Acesso: 10 Fev. 2011.
- 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. **Infect. Immun.** v. 68, p. 3587–3593, 2000.
- DARRAH, P. A.; MONACO, M. C.; JAIN, S.; HONDALUS, M. K.; GOLENBOCK, D. T.; MOSSER, D. M. Innate immune responses to *Rhodococcus equi*. **J. immunol.** v. 173, n. 3, p. 1914-1924, 2004.
- DOIG, C., GILL M. J. & CHURCH, D. L. *Rhodococcus equi* – an easily missed opportunistic pathogen. **Scand. J. Infect. Dis.** v. 23, p. 1–6. 1991.
- DOUGAN, G.; HORMAECHE, C. E.; MASKELL, D. J. Live oral *Salmonella* vaccines: potential use of attenuated strains as carriers of heterologous antigens to the immune system. **Parasite Immunol.** v. 9, p. 151-160, 1987.
- ECKMANN, L.; KAGNOFF, M. F. Cytokines in host defense against *Salmonella*. **Microbes Infect.** v. 3, p. 1191-1200, 2001.
- FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://www.fao.org/>> Acesso em: 20 Jan. 2008.
- FAOSTAT - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Dados de pesquisa baseado no ano de 2008. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/DesktopDefault.aspx?PageID=573&lang=en#ancor>> Acesso em: 07 Fev. 2011.

- FERNANDEZ, S. A.; PRESCOTT, F. J.; NICHOLSON, M. V. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (VapA) enriched antigens. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 187-192, 1997.
- FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity.** v. 2, n. 6, p. 561-572, 1995.
- FOGARTY, U. *Rhodococcus equi* in adult animals. **Proceedings of the 4th Havemeyer Workshop on Rhodococcus equi**, Edinburgh 13–16, p. 64, 2008.
- FUHRMANN, C.; SOEDARMANTO, I. & LAMMLER, C. Studies on the rod–coccus life cycle of *Rhodococcus equi*. **Zbl. Vet. Med.** v. 44, p. 287–294, 1997.
- GARTHWAITE, E. A.; BORDER, D. J.; JONES, C. H.; WORTH, D. P. *Rhodococcus equi* infection during treatment of a c-ANCA positive vasculitis: a case report. **Rheumatol. Int.** v. 27, n. 3, p. 285-287, 2007.
- GARTON, N. J.; GILLERON, M.; BRANDO, T. *et al.* A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*. Structure and effect on macrophage cytokine production. **Biol. Chem.** v. 277, p. 31722–31733, 2002.
- GEBERT, A. The role of M cells in the protection of mucosal membranes. **Histochem. Cell Biol.** v. 108, p. 455-470, 1997.
- GESSNER, A.; MOHRS, K.; MOHRS, M. Mast cells, basophils, and eosinophils acquire constitutive IL-4 and IL-13 transcripts during lineage differentiation that are sufficient for rapid cytokine production. **J. Immunol.** v. 174, p. 1063-1072, 2005.
- GIGUÈRE, S. & PRESCOTT J. F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 313–334, 1997.
- GIGUÈRE, S.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. **Infect. immun.** v. 67, n. 10, p. 5041-5047, 1999 (a).

- GIGUÈRE, S.; HONDALUS, M. K.; YAGER, J. A.; DARRAH, P.; MOSSER, M. D.; PRESCOTT, F. J. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. **Infect. Immun.** v. 67, n. 7, p. 3548-3557, 1999 (b).
- GIGUÈRE, S. *Rhodococcus equi* infections. Recent Advances in Equine Neonatal Care (WILKINS, P. A. & PALMER, J. E., eds). **International Veterinary Information Service**. Disponível em:
<http://www.ivis.org/advances/Neonatology_Wilkins/giguere_rhodococcus/ivis.pdf>
> Acesso em: 07 Fev. 2011.
- GIGUÈRE, S.; GASKIN, J. M.; BOWMAN, J. L. Evaluation of a commercially available hiperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **J. Am. Vet. Assoc.** v. 220, p. 59-63, 2002.
- GIGUÈRE, S.; HERNANDEZ, J.; GASKIN, J. M.; MILLER, C. & BOWMAN, J. L. Evaluation of white blood cell concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 222, p. 775–781, 2003.
- GOLUB, B.; FALK, G. & SPINK, W. W. Lung abscess due to *Corynebacterium equi*. Report of first human infection. **Ann. Intern. Med.** v. 66, p. 1174–1177, 1967.
- GOODFELLOW, M. & ALDERSON, G. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the “rhodochrous” complex. **J. Gen. Microbiol.** v. 100, p. 99–122, 1977.
- GROGAN, J. L.; MOHRS, M.; HARMON, B.; LACY, D. A.; SEDAT, J. W.; LOCKSLEY, R. M. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cells subset. **Immunity**, v. 14, p. 205-215, 2001.
- GUILLOBEL, H. C. R.; CARINHANHA, J. I.; CÁRDENAS, L.; CLEMENTS, J. D.; DE ALMEIDA, D. F.; FERREIRA, L. C. Adjuvant activity of a nontoxic mutant of *Escherichia coli* heat-able enterotoxin on systemic and mucosal immune responses elicited against a heterologous antigen carried by a live *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine strain. **Infect. Immun.** v. 68, n. 7, p. 4349-4353, 2000.

- GURTLE, V.; MAYALL, B. C. & SEVIOUR, R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? **FEMS Microbiol. Rev.** 28, p. 377–403, 2004.
- HAGHIGHI, H. R.; PRESCOTT, J. F. Assessment in mice of *vapA*-DNA vaccination against *Rhodococcus equi* infection. **Vet. Immun. Immunopath.** v. 104, p. 215–225, 2005.
- HEIDMANN, P.; MADIGAN, J. & WATSON, J. *Rhodococcus equi* pneumonia: clinical findings, diagnosis, treatment and prevention. **Clin. Tech. Equine Pract.** v. 5, 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. **Vet. Microbiol.** v. 14, p. 307–320, 1987.
- HILLIDGE, C. J. Use of erythromycin-rifampin combination in treatment of *Rhodococcus equi* pneumonia. **Vet. Microbiol.** v. 14, p. 337–342, 1987.
- HINES, S. A.; KANALY, S. T.; BYRNE, B. A.; PALMER, G. H. Immunity to *Rhodococcus equi*. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 177–185, 1997.
- HINES, T. M.; PAASCH, M. K.; ALPERIN, C. D.; PALMER, H. G.; WESTHOFF, C. N.; HINES, A. S. Immunity to *Rhodococcus equi*; antigen-specific recall responses in the lungs of adult horses. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 79, p. 101–113, 2001.
- HINES, S. A.; STONE, D. M.; HINES, M. T.; ALPERIN, D. C.; KNOWLES, D. P.; NORTON, L. K.; HAMILTON, M. J.; DAVIS, W. C.; MCGUIRE, T. C. Clearance of virulent but not avirulent *Rhodococcus equi* from the lungs of adult horses is associated with intracytoplasmic gamma interferon production by CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 10, p. 208–215, 2003.
- HOISETH, S. K.; STOCKER, B. A. D. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccine. **Nature.** v. 291, n. 5812, p. 238–239, 1981.
- HONDALUS, M. K. & MOSSER, D. M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. **Infect. Immun.** v. 62, p. 4167–4175, 1994.

- HONDALUS, M. K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 257–268, 1997.
- HOOPER, M.; GIGUÈRE, S.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Evaluation of equine immunoglobulin specific for *R. equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v. 62, p. 1307-1313, 2001.
- HOOPER-McGREVY, K. E. & PRESCOTT, J. F. Is fatal *Rhodococcus equi* pneumonia of foals only an infection acquired by the perinate? **J. Vet. Intern. Med.** v. 15, p. 169-170, 2001.
- HOOPER-McGREVY, K. E.; WILKIE, B. N.; PRESCOTT, J. F. Virulence-associated protein-specific serum immunoglobulin G-isotype expression in young foals protected against *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization with virulent *R. equi*. **Vaccine**, v. 23, p. 5760-5767, 2005.
- HORMAECHE, C. E. Live attenuated *Salmonella* vaccines and their potential as oral combined vaccines carrying heterologous antigens. **J. Immunol. Methods.** v. 142, n. 1, p. 113-120, 1991.
- HOROWITZ, M. L.; COHEN, N. D.; TAKAI, S.; BECU, T; CHAFFIN, M. K.; CHU, K. K.; MAGDESIAN, K. G.; MARTENS, R. J. Application of Sartwell's model (lognormal distribution of incubation periods) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. **J. Vet. Intern. Med.** v. 15, p. 171-175, 2001.
- HUANG, Y.; HAJISHENGALLIS, G.; MICHALEK, M. S. Construction and characterization of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium clone expressing a salivary adhesin of *Streptococcus* mutants under control of the anaerobically inducible nirB promoter. **Infect. Immun.** v. 68, n. 3, p. 1549-1556, 2000.
- HURLEY, J. R. & BEGG, A. P. Failure of hyperimmune plasma to prevent pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. **Aust. Vet. J.** 72: 418–420, 1995.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. Produção da pecuária municipal. Brasil, 2009. Disponível em:

<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2009/ppm2009.pdf>>
Acesso em 07 Fev. 2011.

- JACKS, S.; GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F. In Vivo Expression of and Cell-Mediated Immune Responses to the Plasmid-Encoded Virulence-Associated Proteins of *Rhodococcus equi* in Foals. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 4, p. 369–374, 2007.
- JAIN, S.; BLOOM, B. R. & HONDALUS, M. K. Deletion of vapA encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. **Mol. Microbiol.** v. 50, p. 115–128, 2003.
- JEPSON, M. A. CLARCK, M. A. The role of M cells in *Salmonella* infection. **Microbes Infect.** v. 3, p. 1183-1190, 2001.
- JOHNSON, J. A.; PRESCOTT, J. F. & MARKHAM, R. J. The pathology of experimental *Corynebacterium equi* infection in foals following intrabronchial challenge. **Vet. Pathol.** v. 20, p. 440–449, 1983.
- JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. S. *enterica* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying epithelial M cells of the Peyer's-patches. **J. Exp. Med.** v. 180, p. 15-23, 1994.
- JORDAN, M. C.; HARRINGTON, J. R.; COHEN, N. D.; TSOLIS, R. M.; DANGOTT, L. J.; WEINBERG, E. D. & MARTENS, R. J. Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence-associated protein A. **Am. J. Vet. Res.** v. 64, p. 1337–1346, 2003.
- KAMBOJ, M.; KALRA, A. & KAK, V. *Rhodococcus equi* brain abscess in a patient without HIV. **J. Clin. Pathol.** v. 58, p. 423–425, 2005.
- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ T-lymphocyte-deficient transgenic mice. **Infect. Immun.** v. 61, 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. **Infect. Immun.** v. 63, p. 3037–3041, 1995.

- KANALY, S. T.; HINES, S. A.; PALMER, G. H. Transfer of a CD4⁺ Th1 cell line to nude mice effects clearance of *Rhodococcus equi* from the lung. **Infect. Immun.** v. 64, p. 1126–1132, 1996.
- KASUGA-AOKI, H.; TAKAI, S.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; MADARAME, H.; NAKANES, A. Tumor necrosis factor and interferon- γ are required in host resistance against virulent *Rhodococcus equi* infection in mice: cytokine production depends on the virulence levels of *R. equi*. **Immunol.** v. 96, p. 122-127, 1999.
- KAUFFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology; lessons learned from *Salmonella*. **Microbes Infect.** v. 3, p. 1177-1181, 2001.
- KOTTON, C. N.; HOHMANN, E. L. Enteric pathogens as vaccine vectors for foreign antigen delivery. **Infect. Immun.** v. 72, p. 5535–5547. 2004.
- KRAEHENBUHL, J. P.; NEUTRA, M. R. Epithelial M cells: differentiation and function. **Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.** v. 16, p. 301-332, 2000.
- LANGERMANS, J. A. M.; VAN FURTH R. Cytokines and the host defense against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium. **Biotherapy.** v. 7, p. 169-178, 1994.
- LAVOIE, J. P.; FISET, L. & LAVERTY, S. Review of 40 cases of lung abscesses in foals and adult horses. **Equine Vet. J.** v. 26, p. 348–352, 1994.
- LETEK, M., OCAMPO-SOSA, A., SANDERS, M. *et al.* Evolution of the *Rhodococcus equi* vap pathogenicity island seen through comparison of host associated vapA and vapB virulence plasmids. **J. Bacteriol.** v.190, p. 5797–5805, 2008.
- LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. Estudo complexo do agronegócio cavalo. **CEPEA/ESALQ/USP**. Piracicaba, 2006. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_completo.pdf> Acesso em: 07 Fev. 2011.
- LOPEZ, A. M.; HINES, M. T.; PALMER, G. H.; ALPERIN, D. C.; HINES, S. A. Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v. 9, n. 6, p. 1270-1276, 2002.

- LOPEZ, A. M.; HINES, M. T.; PALMER, G. H.; KNOWLES, D. P.; ALPERIN, D. C.; *et al.* Analysis of anamnestic immune responses in adult horses and priming in neonates induced by a DNA vaccine expressing the vapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine** v. 21, p 3815–3825, 2003
- LOPEZ, A. M.; TOWNSEND, H. G. G; ALLEN, A. L.; HONDALUS, M. K. Safety and immunogenicity of a live-attenuated auxotrophic candidate vaccine against the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Vaccine**. v. 26, p. 998-1009, 2008.
- MADIGAN, J. E.; HIETALA, S. & MULLER, N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. **J. Reprod. Fertil.** v. 44 (suppl), p. 571–578, 1991.
- MAGNUSSON, H. *Corynebacterium equi*: infectious pneumonia in foals: a new pathogen of pus in the horse. **Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd** v. 50, p. 22–37, 1923.
- MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M. *et al.* Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. **Vet. Microbiol.** v. 88, p. 377–384, 2002.
- MAKRAI, L.; TAKAYAMA, S.; DENES, B. *et al.* Characterization of virulence plasmids and serotyping of *Rhodococcus equi* isolates from submaxillary lymph nodes of pigs in Hungary. **J. Clin. Microbiol.** v. 43, p. 1246–1250, 2005.
- MAKRAI, L.; KOBAYASHI, A., MATSUOKA, M. *et al.* Isolation and characterization of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). **Vet. Microbiol.** v. 131, p. 318–323, 2008.
- MARTENS, R. J.; MARTENS, J. G.; FISKE, R. A. & HIETALA, S. K. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. **Equine Vet. J.** v. 21, p. 249–255, 1989.
- 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*. **Infect. Immun.** v. 73, p. 7040–7042, 2005.

- MARTINS, CARLA BRAGA; BONESSO, MARIA ANTONIETA; MANDRÁ LIMA, MARCELO; COLBACHINI FERRAZ, LUCIANA; NETO, JOSÉ CORRÊA DE LACERDA; MACHADO, ROSÂNGELA ZACARIAS. Ensaio imunoenzimático indireto (ELISA) para detecção de anticorpos anti-*Rhodococcus equi* em potros. **Cienc. Rural** v.35, n. 3, Santa Maria, May/June, 2005.
- MEALEY, R. H.; STONE, D. M.; HINES, M. T.; ALPERIN, D. C.; LITTKE, M. H.; LEIB, S. R.; LEACH, S. E.; HINE, S. A. Experimental *Rhodococcus equi* and equine infectious anemia virus DNA vaccination in adult and neonatal horses: Effect of IL-12, dose, and route. **Vaccine**. v. 25, p. 7582-7597, 2007.
- MEIJER, W. G. & PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*. **Vet. Res.** v. 35, p. 383–396, 2004.
- MOLLENKOPF, H. J.; TRIEBKORN, D. G.; ANDERSEN, P.; HESS, J.; KAUFMANN, S. H. E.; Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella* Typhimurium vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. **Vaccine**. v. 19, p. 4028-4035, 2001.
- 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 **Curr. Microbiol.** v. 58, p. 399–403, 2009.
- MUSCATELLO, G.; LEADON, D. P.; KLAYT, M. *et al.* *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’. **Equine Vet. J.** v. 39, p. 470–478, 2007.
- NORDMANN, P.; ROUVEIX, E.; GUENOUNOU, M. & NICOLAS, M. H. Pulmonary abscess due to a rifampin and fluoroquinolone resistant *Rhodococcus equi* strain in a HIV infected patient. **Eur. J. Clin. Microbiol.** v. 11, p. 557–558, 1992.
- NORDMANN, P.; RONCO, E.; GENOUNOU, M. Involvement of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in host defense against *Rhodococcus equi*. **J. Infect. Dis.** v. 167, p. 1456, 1993.
- NORDMANN, P.; KELLER, M.; ESPINASSE, F. & RONCO, E. Correlation between antibiotic resistance, phage-like particle presence, and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 32, p.377–383, 1994.

- OCAMPO-SOSA, A. A.; LEWIS, D. A.; NAVAS, J. *et al.* Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on traA, vapA, and vapB virulence plasmid markers. **J. Infect. Dis.** v. 196, p. 763–769, 2007.
- OLIVEIRA, A. F.; FERRAZ, L. C.; BROCCHI, M. & ROQUE-BARREIRA, M. C. Oral administration of a live attenuated *Salmonella* vaccine strain expressing the VapA protein induces protection against infection by *Rhodococcus equi*. **Microbes Infect.** v. 9, p. 382–390, 2007.
- OLIVEIRA, A. F.; RUAS, L. P.; CARDOSO, S. A.; SOARES, S. G.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Vaccination of Mice with Salmonella Expressing VapA: Mucosal and Systemic Th1 Responses Provide Protection against *Rhodococcus equi* Infection **Plos One**. v.5, p 1-12, 2010.
- PASCUAL, D. W.; POWELL, R. J.; LEWIS, G. K. HONE, D. M. Oral bacterial vaccine vectors for delivery of subunit and nucleic vaccines to the organized lymphoid tissue of the intestine. **Behring-Inst. Mitt.** v. 98, p. 143-152, 1997.
- PEI, Y.; NICHOLSON, V.; WOODS, K. & PRESCOTT, J. F. Immunization by intrabronchial administration to 1-week-old foals of an unmarked double gene disruption strain of *Rhodococcus equi* strain 1031. **Vet. Microbiol.** v. 125, p. 100–110, 2007.
- PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clin. Microbiol. Rev** 4, p. 20–34, 1991.
- PRESCOTT, J. F.; HOFFMAN, J. F. *Rhodococcus equi*. Veterinary Clinics of North America. **Equine Practice**, v. 9, n. 2, p. 375-385, 1993.
- PRESCOTT, J. F.; NICHOLSON, V. M.; PATTERSON, M. C.; ZANDONA MELEIRO, M. C.; CATERINO DE ARAUJO, A.; YAGER, J. A. & HOLMES, M. A. Use of *Rhodococcus equi* virulence-associated protein for immunization of foals against *R. equi* pneumonia. **Am. J. Vet. Res.** v. 58, p. 356–359, 1997.
- RAHMAN, T.; PEREIRA, V.; PRESCOTT, F. J. In vitro and intra-macrophage gene expression by *Rhodococcus equi* strain 103. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 131-140, 2005.

- REN, J. & PRESCOTT, J. F. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Vet. Microbiol.** v. 94, p. 167–182, 2003.
- ROZSYPAL, H.; ASTER, V.; STAHIKOVÁ, B.; Serologic responses to *Rhodococcus equi* infection in subjects infected with human immunodeficiency virus (HIV). **Cas. Lek. Cesk.** v. 146, n. 2, p. 163-167, 2007.
- RYAN, C.; GIGUÈRE, S.; HAGEN, J.; HARTNETT, C; KALYUZHNY, A. Effect of age and mitogen on the frequency of interleukin-4 and interferon gamma secreting cells in foals and adult horses as assessed by an equine-specific ELISPOT assay. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 133, p. 66-71, 2010.
- SHIAU, A. L.; CHEN, C. C.; YO YT; CHU CY; WANG SY; *et al.* Enhancement of humoral and cellular immune responses by an oral *Salmonella choleraesuis* vaccine expressing porcine prothymosin alpha. **Vaccine** v. 23, p. 5563–5571, 2005.
- SIRARD, J. C.; NIEDERGANG, F.; KRAEHENBUHL, J. P. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. **Immunol. Rev.** v. 171, p. 5-26, 1999.
- Slovits, N. M. *Rhodococcus equi* pneumonia update. **Equine Disease Quartely**, v. 13, n. 3, 2004.
- SPEERT, D. P.; Macrophages in bacterial infection, In: Lewis C. E., McGee J. O. **The machophage. Oxford: Oxford University Press.** p. 215-263, 1992.
- SPONSELLER, B. A.; MACEDO, M. M. A.; CLARK, S. K.; GALLUP, J. M.; JONES, D. E. Activation of peripheral blood monocytes results in more robust production of IL-10 in neonatal foals compared to adult horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology** v. 127, p. 167–173, 2009.
- STETSON, D. B.; MOHRS, M.; REINHARDT, R. L.; BARON, J. L., WANG, Z. E.; GAPIN, L.; KRONENBERG, M.; LOCKSLEY, R. M. Constitutive cytokine mRNAs Mark natural killer (NK) and NKT cells poised for rapid effector function. **J. Exp. Med.** v. 198, p. 1069-1076, 2003.

- TAKAI, S.; OHBUSHI, S.; KOIKE, K.; TSUBAKI, S.; OISHI, H. & KAMADA, M. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. **J. Clin. Microbiol.** v. 29, p. 2887–2889, 1991.
- 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. **Infect. Immun.** v. 60, p. 2995–2997, 1992.
- TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T.; *et al.* Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. **J. Clin. Microbiol.** v. 31, p. 1726–1729, 1993.
- TAKAI, S.; IMAI, Y.; FUKUNAGA, N.; *et al.* Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. **J. Infect. Dis.** v. 172, p. 1306–1311, 1995.
- TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; KAMISAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y. & TSUBAKI, S. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. **Microbiol. Immunol.** v. 40, p. 591–594, 1996.
- TAKAI, S.; TAKEDA, K.; NAKANO, Y. *et al.* Emergence of rifampin resistant *Rhodococcus equi* in an infected foal. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, p. 1904–1908, 1997.
- TAKAI, S.; HINES, S. A.; SEKIZAKI, T.; NICHOLSON, V. M.; ALPERIN, D. A.; OSAKI, M.; TAKAMATSU, D.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, K.; OGINO, N.; KAKUDA, T.; DAN, H.; PRESCOTT, S. J. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6840-6847, 2000.
- TAOUJI, S.; NOMURA, I.; GIGUÈRE, S.; TOMOMITSU, S.; KAKUDA, T.; GANNE, V.; TAKAI, S. Immunogenicity of synthetic peptides representing linear B-cell epitopes of vapA of *Rhodococcus equi*. **Vaccine.** v. 12, n. 22 (9-10), p. 1114-1123, 2004.
- TOYOOKA, K.; TAKAI, S. & KIRIKAE, T. *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. **J. Med. Microbiol.** v. 54, p. 1007–1015, 2005.

- VAZQUEZ BOLAND, J. A.; PRESCOTT, J. F.; MEIJER, W. G.; LEADON, D. P. & HINES, S. A. Havemeyer workshop report: *Rhodococcus equi* comes of age. **Equine Vet. J.** v. 41, p. 93–95, 2009.
- VOEHRINGER, D.; SHINKAI, K.; LOCKSLEY, R. M. Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. **Immunity**, v. 20, p. 267-277, 2004.
- VOTAVA, M.; SKALKA, B.; TEJKALOVA, R. *Rhodococcus equi* – a newly recognized opportunistic pathogen in man. **Epidemiol. Microbiol. Immunol.** v. 46, p. 58-66, 1997.
- WADA, R.; KAMADA, M.; ANZAI, T.; NAKANISHI, A.; KANEMARU, T.; TAKAI, S. & TSUBAKI, S. Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. **Vet. Microbiol.** v. 56, p. 301–312, 1997.
- WEINSTOCK, D. M. & BROWN, A. E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clin. Infect. Dis.** v. 34, p. 1379-1385, 2002.
- WILSON, D. W.; Foal pneumonia. In: ROBINSON E. N. **Curr. Ther. Equine Medicine. 4. Ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company.** p. 612-619, 1997.
- YAGER, J. A. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Vet. Microbiol.** v. 14, p. 225–232, 1987.
- YAGER, J. A.; PRESCOTT, C. A.; KRAMAR, D. P.; HANNAH, H.; BALSON, G. A.; *et al.* The effect of experimental infection with *Rhodococcus equi* on immunodeficient mice. **Vet. Microbiol.** v. 28, p. 363–376. 1991.
- YANAGAWA, R. & HONDA, E. Presence of pili in species of human and animal parasites and pathogens of the genus *Corynebacterium*. **Infect. Immun.** v. 13, p. 1293–1295, 1976.
- ZINK, M. C.; YAGER, J. A. & SMART, N. L. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958–1984: a review of 131 cases. **Can. Vet. J.** v. 27, p. 213–217, 1986.