

LAURA HUBER

**MONITORAMENTO DE POTROS POR ULTRASONOGRAFIA TORÁCICA,
CULTURA BACTERIOLÓGICA E PCR: DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO
SUBCLÍNICA POR *Rhodococcus equi***

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção de grau
de Mestre em Medicina Veterinária
Equina do Programa de Pós Graduação
em Medicina Animal: Equinos da
UFGRS.**

Orientador: Petra Garbade

Porto Alegre

Dezembro, 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Huber, Laura

MONITORAMENTO DE POTROS POR ULTRASSONOGRRAFIA
TORÁCICA, CULTIVO BACTERIOLÓGICO E PCR: DIAGNÓSTICO DE
INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Rhodococcus equi*. / Laura
Huber. -- 2016.

37 f.

Orientadora: Petra Garbade.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. *Rhodococcus equi*. 2. vapA. 3. PCR. 4.
ultrassonografia torácica. 5. infecção subclínica. I.
Garbade, Petra, orient. II. Título.

LAURA HUBER

**MONITORAMENTO DE POTROS POR ULTRASONOGRAFIA TORÁCICA,
CULTURA BACTERIOLÓGICA E PCR: DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO
SUBCLÍNICA POR *Rhodococcus equi***

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção de grau
de Mestre em Medicina Veterinária
Eqüina do Programa de Pós Graduação
em Medicina Animal: Equinos da
UFGRS.**

Orientador: Petra Garbade

Aprovado em 15 de Dezembro de 2016:

Petra Garbade (Presidente/Orientadora)

Eduardo Malschitzky (ULBRA)

Letícia Trevisan Gressler (UPF)

Roberta Pereira (UFSM)

Porto Alegre

Dezembro, 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal do Rio Grande do Sul e a minha orientadora Petra Garbade pela oportunidade concedida para aprendizado, pesquisa e aperfeiçoamento durante o cumprimento do Programa de Pós Graduação de Medicina Animal – Equinos.

Agradeço a equipe do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria, na qual obtive grau de Médica Veterinária, por ter aberto as portas para realização de todos os testes necessários para o cumprimento desse projeto de pesquisa.

Agradeço ao apoio e orientação dos professores Dr. Giguere e Dr. Cohen e da Dra. Sanz.

Agradeço em especial a Letícia Gressler, participante do projeto, pela inspiração e auxílio em todos os momentos para o sucesso dessa pesquisa; e a Matheus Rockenbach, pelo apoio não somente emocional durante todo esse período como também, auxílio indispensável no processo de coleta de amostras.

Agradeço a minha família, Joseane, Ivo e Guilherme Huber, pelo apoio incondicional, inspiração e motivação durante toda a minha vida.

E agradeço principalmente aos animais, razão única da minha dedicação a pesquisa e a medicina.

À minha família
Aos animais

RESUMO

MONITORAMENTO DE POTROS POR ULTRASSONOGRAFIA TORÁCICA, CULTIVO BACTERIOLÓGICO E PCR: DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO SUBCLÍNICA POR *Rhodococcus equi*.

AUTOR: Laura Huber

ORIENTADOR: Petra Garbade

Rhodococcus equi (*R. equi*), uma bactéria gram-positiva intracelular facultativa, é uma causa importante de pneumonia em potros com idade entre 3 semanas e 5 meses. A manifestação clínica mais comum da doença é a broncopneumonia piogranulomatosa com abscedação. Na pneumonia causada por *R. equi* os primeiros sinais clínicos podem não ser aparentes até que as alterações patológicas estejam bastante avançadas, por esse motivo, o diagnóstico precoce e acurado de potros com pneumonia por *R. equi* se torna fundamental. O diagnóstico definitivo baseia-se na detecção de *R. equi* na cultura bacteriológica e identificação molecular a partir da amostra de lavado traqueal; no entanto, essa técnica é invasiva, traz riscos para o animal e é relativamente cara. A ultrassonografia (US) para detecção precoce tem se tornado uma prática de rotina em muitas fazendas endêmicas para rodococose equina. Com o advento dessa prática de triagem, a forma mais identificada de pneumonia por *R. equi* tem sido a subclínica, onde os animais apresentam presença de alterações pulmonares mas não apresentam sinais clínicos da doença. Atualmente, *vapA* é o gene com função demonstrada na virulência. Identificação de *R. equi* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em amostras de fezes tem se mostrado efetivo para o reconhecimento precoce do agente. Ultrassonografia torácica e PCR das amostras de fezes e swab nasal foram realizadas em 22 potros desde as 3 até as 16 semanas de idade (intervalos de 15 dias) de 3 fazendas endêmicas de criação de cavalos no sul do Brasil para identificar a ocorrência de doença subclínica. A associação entre a ultrassonografia torácica e PCR das amostras de fezes possibilitaram a detecção de doença subclínica e identificação de pontos críticos de controle dessa doença. Considerando o fato de que 95.4% dos potros apresentaram doença subclínica e que nenhum deles desenvolveu a doença clínica demonstra que o tratamento desses casos não é justificável para a população analisada.

Palavras chave: *Rhodococcus equi*, ultrassonografia, PCR, *vap*

ABSTRACT

Monitoring foals by thoracic ultrasonography, bacterial culture and PCR: diagnostic of *Rhodococcus equi* subclinical pneumonia.

AUTHOR: Laura Huber

ADVISOR: Petra Garbade

Rhodococcus equi, a gram-positive facultative intracellular pathogen, is an important cause of pneumonia in foals between 3 weeks and 5 months of age. Pneumonia caused by *R. equi* is an insidious disease in which clinical signs may not be apparent until pathologic changes are well progressed. Because of the insidious progression of infection to severe clinical signs, early and accurate diagnosis of foals with *R. equi* pneumonia is important. Definitive diagnosis is based on *R. equi* detection by bacterial culture and molecular identification from tracheobronchial aspirate (TBA), this procedure is invasive, labor-intensive, requires skill, carries risks to foals, and is relatively expensive. The sequential thoracic ultrasonography (TUS) to early detection of the disease has been adopted as a screening method in many endemic farms; for this reason, subclinical disease has been the most frequently observed form. Nowadays, *vapA* is the only virulent gene identified. Fecal polymerase chain reaction (PCR) is a noninvasive technique with good diagnostic accuracy. Thoracic ultrasound screening (TUS) and PCR from fecal and nasal swab samples were performed in 22 foals from 3 to 16 weeks of age from 3 endemic farms at south of Brazil to identify the occurrence of *R. equi* subclinical disease. The association of TUS and fecal PCR detection of virulent *R. equi* provided a possibility of identification of critical points in disease control. Considering the fact that 95.4% of the foals showed evidence of subclinical disease and none of them developed any signs of clinical disease, the antibiotic treatment was not reasonable for the foals followed.

Key words: *Rhodococcus equi*, ultrasonography, PCR, *vap*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Rodococose:	9
1.2. Situação epidemiológica no Brasil:	9
1.3. Isolamento e caracterização genética:	10
1.4. Patogênese	10
1.5. Diagnóstico:	11
1.6. Prevenção	11
1.6.1. <i>Ultrassonografia torácica</i>	12
1.6.2. <i>PCR de amostra de fezes e swab nasal</i>	13
1.7. Tratamento dos casos subclínicos de infecção por <i>R. equi</i>	14
2. MANUSCRITO	16
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
4. CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. **Rodococose equina:**

Rhodococcus equi (*R. equi*) é uma bactéria oportunista gram-positiva, intracelular, facultativa e é a causa mais importante de pneumonia severa em potros, levando a sofrimento animal substancial e perdas econômicas. A doença clínica em potros é endêmica em algumas fazendas, esporádica em outras e não reconhecida em muitas (Giguere, et al, 2011), sendo que a morbidade pode chegar a até 40% (Cohen, et al, 2014). Cepas virulentas (positiva para o gene *vapA*) de *R. equi* estão associadas com broncopneumonia, linfangite ulcerativa, abscessos internos, diarreia e pleurite em potros (Van Der Kolk, et al, 1999). Fatores ambientais como temperatura, umidade, poeira, pH do solo podem influenciar no desenvolvimento da infecção (Martens, et al, 2000 e Meijer, et al, 2004). A expressão de *vapA* é termorregulada, ocorrendo entre 34 e 41°C e aumentando em condições de baixo pH (Takai, et al, 1994).

Nas fazendas onde a doença é endêmica, os custos associados com a morbidade e mortalidade podem ser muito elevados (Giguere, et al, 2011). A doença pode estar associada com diminuição das chances do cavalo competir em corridas quando adulto e também, fazendas que tem casos frequentes da doença, podem sofrer restrições comerciais (Ainsworth, et al, 1998).

1.2. **Situação epidemiológica no Brasil:**

De acordo com um estudo desenvolvido por Krewer (2008), em que foi realizada a caracterização genética do *R. equi* em amostras de fezes de potros e animais adultos em fazendas endêmicas localizadas no sul do Brasil, demonstrou a ocorrência de isolados positivos para *vapA* nas fezes dos animais. Esses achados não estavam associados com a ocorrência de sinais clínicos da doença. A identificação de isolados positivos para *vapA* ocorreu tanto em potros como em adultos saudáveis indicando que esses animais tem um importante papel na manutenção de cepas virulentas no ambiente.

Pesquisas sobre a ocorrência de *R. equi* virulento nas fazendas do Brasil já foram realizadas, no entanto, nenhuma pesquisa demonstrou associação com outros métodos de triagem para avaliação de taxa de doença subclínica em potros. Esse dado se tornaria muito importante em fazendas de ocorrência endêmica de

infecções por *R. equi* pelo fato de que esses animais subclínicos contribuem para a manutenção de cepas virulentas no ambiente.

1.3. Isolamento e caracterização genética:

A virulência do *R. equi* está associada a fatores como a cápsula polissacarídea, enzimas fosfolipase C e colesterol oxidase (fator *equi*). Entretanto, a presença da cápsula não é essencial para a sobrevivência do agente no ambiente (Sydor, et al, 2008). O fator de virulência mais relevante associado à infecção de potros por *R. equi* é a proteína conhecido como *virulent-associated protein (vapA)*, codificada pelo gene *vapA*, localizado em um plasmídio de virulência. (Byrne, et al, 2001). A importância do gene *vapA* na patogênese da infecção por *R. equi* e seu uso como um marcador epidemiológico de virulência é bem estabelecida (Costa, et al, 2006; Makrai, et al, 2002; Takai, et al, 1995; Takai, et al, 1997). A virulência do *R. equi* também está associada com a habilidade da bactéria de impedir a fusão fagossomo-lisossomo e multiplicar-se nos macrófagos, resistindo à remoção pelas defesas do organismo (Kanaly, 1993).

Ambos biotipos virulento e não virulento de *R. equi* tem sido identificados (Dawson, et al, 2010). Isolados virulentos contêm plasmídio de peso entre 85 e 90 kb e codificam a proteína associada a virulência *vapA* que é necessário para causar doença em potros. Os isolados virulentos podem ser identificados por detecção de gene *vapA* utilizando reação em cadeia de polimerase (PCR) (Sellon, et al, 2001). A amplificação de *vapA* por PCR deve ser realizada em conjunto com a cultura bacteriana, pois a PCR não permite a identificação de outros patógenos bacterianos e os testes de susceptibilidade in vitro dos isolados de *R. equi* (Giguere, et al, 2011).

1.4. Patogênese

A inalação de *R. equi* virulento é a rota principal de infecção pulmonar. O período de incubação após desafio intrabronquial experimental varia de 9 dias após administração de grande concentração do inoculo até 2-4 semanas após administração de concentrações mais baixas (Barton, et al, 1987 e Giguere, et al, 1999). A consolidação pulmonar pode ser detectada tão precocemente quando 3 dias após uma concentração alta administrada (Barton, et al, 1987). O período de incubação a campo não é conhecido e provavelmente depende de vários fatores incluindo o numero de bactéria virulenta no ar do ambiente, idade do potro,

mecanismos de defesa do hospedeiro (Giguere, et al, 1991). A ingestão do organismo é uma rota importante de exposição e também de imunização, mas raramente leva a pneumonia adquirida a menos que o potro seja submetido a múltiplas exposições de grande concentração de bactéria (Johson, et al, 1983). Evidencia epidemiológica sugere que a maioria dos potros de fazendas endêmicas se torne infectados nos primeiros dias de vida (Madison, et al, 1988). A idade média de diagnóstico da doença é aproximadamente aos 35-50 dias de vida na maior parte das fazendas endêmicas (Chaffin, et al 2011 e Giguere, et al, 2002), o que concorda com Madison (et al, 1998), considerando o período de incubação relativamente longo para desenvolvimento da doença. Em um estudo, potros de idades entre 3 e 13 dias foram mais suscetíveis a pneumonia por *R. equi* induzida experimentalmente do que potros com idades de 14 a 36 dias (Martens, et at, 1989). No entanto, em outro estudo, administração intra-traqueal de *R. equi* em 10 potros de idades entre 27-67 dias resultou em doença em todos os potros inclusive os recebendo desafio em baixas doses (Wada, et al, 1997).

1.5. Diagnóstico:

O diagnóstico definitivo da infecção por *R. equi* em potros com sinais de doença do trato respiratório inferior é baseado em cultura bacteriológica e amplificação do DNA por PCR de amostra de lavado traqueal em combinação com evidencia citológica de pneumonia séptica no fluido do mesmo (Giguere, 2011). O procedimento para coleta desse material é invasivo, trabalhoso, requer profissional qualificado e acarreta em riscos para o potro, além de ter um custo relativamente alto. Por essas razões, muitos veterinários evitam realizar a coleta lavado traqueal a campo e realizam apenas o diagnóstico presuntivo de pneumonia por *R. equi* com base no exame clínico e histórico. Portanto, se faz necessário um teste diagnóstico não-invasivo para detecção de pneumonia por *R. equi* (Shaw, et al, 2015).

1.6. Prevenção

Métodos de controle e prevenção incluem testes de triagem para detecção precoce de pneumonia causada por *R. equi*, manejo ambiental, quimioprofilaxia e prevenção utilizando imunidade passiva ou ativa (Giguere, et al, 2011).

O animal com pneumonia causada por *R. equi* pode não demonstrar sinais clínicos da doença até que as alterações patológicas já estejam muito avançadas

(Giguere, et al, 1997 e Prescott, et al, 1991). Conseqüentemente, a triagem para detecção de potros nos estágios precoces da doença promove melhores resultados terapêuticos, uma vez que a progressão avançada da doença esta associada com o mau prognostico (Giguere, et al, 2011). A doença subclínica já foi descrita após tanto infecção natural quanto experimental (Ardans, et al, 1986 e Martens, et al, 1989), onde observa-se potros com lesões pulmonares (consolidação pulmonar ou formação de abscessos) identificadas por ultrassonografia torácica, mas que não desenvolvem sinais clínicos de pneumonia (Shaw, et al, 2015).

Em geral, a incidência cumulativa de pneumonia atribuída a infecção por *R. equi* em fazendas nos EUA tem sido aproximadamente 10-20% do nascimento ao desmame (Cohen, et al, 2005 e Chaffin, 2003). Em contraste, a incidência cumulativa de potros com pneumonia subclínica em fazendas endêmicas é geralmente entre 30 e 60% (Giguere, et al, 2011). No entanto, muitos potros com evidencia de doença subclínica não vão desenvolver sinais clínicos de pneumonia (Shaw, et al, 2015), evidenciando que essas lesões se resolvem espontaneamente sem intervenção ou tratamento (Giguere, et al, 2011). Alguns estudos têm demonstrado que a implementação de triagem diminui as mortalidades de potros associadas à pneumonia por *R. equi* (Slovis, et al, 2005 e Prescott, et al, 1989). Portanto, na ausência de uma vacina eficaz para controle da doença, o método de triagem se faz extremamente útil para controle de infecções por *R. equi* em fazendas endêmicas (Giguere, et al, 2011). Uma variedade de métodos de triagem tem sido descrita, incluindo inspeção visual, monitoramento de temperatura retal, monitoramento de sinais clínicos de pneumonia, parâmetros hematológicos, sorologia, ultrassonografia ou radiografia torácica; com recomendação empírica de início do triagem com 3 semanas de idade (Cohen, et al, 2014).

1.6.1. Ultrassonografia torácica

Triagem utilizando a ultrassonografia torácica (UST) consiste em exames periódicos de potros entre 4 e 20 semanas de vida (Slovis, et al, 2005), podendo ser utilizado aparelho de ultrassom com transdutor linear de frequência entre 5.0 a 7.5MHz. Álcool isopropílico é aplicado no pêlo para proporcionar superfície de contato entre o transdutor e o paciente, reduzindo a interferência na imagem pela presença de ar (Ramirez, et al, 2004). O tórax deve ser examinado do plano dorsal para o ventral do 16º ao 3º espaço intercostal (Slovis, et al, 2005). Segundo Ramirez

(et al, 2004), os abscessos pulmonares são de tamanhos variáveis e podem estar localizados em qualquer parte do pulmão; esses são identificados no exame ultrassonográfico pela sua aparência cavitada; o seu centro pode ter aparência hipoecóica, isoecóica ou septada dependendo do tipo de fluido presente. As consolidações pulmonares são hipoecóicas ou há falta de eco normal na superfície do pulmão. A visualização das consolidações pulmonares ocorre pela substituição do ar alveolar por fluidos ou células, que produzem uma janela acústica.

Segundo Slovis (et al, 2005), a UST é uma modalidade diagnóstica prática, rápida, acurada e muito útil como método de triagem para *R. equi*. Esse mesmo autor relata que após realizar um estudo de uso de ultrassonografia torácica como método de triagem em potros de 4 a 16 semanas de idade com intervalos de 15 dias, as fazendas em que foi implementado esse método não apresentaram mortalidades e uma marcada redução de casos clínicos associados com infecção por *R. equi* pôde ser observada.

Ramirez (et al, 2004) cita as vantagens e desvantagens do uso de ultrassonografia torácica como método de triagem. As vantagens incluem: o procedimento pode ser realizado com bastante agilidade, a competência para realizar o teste pode ser rapidamente desenvolvida, os resultados estão imediatamente disponíveis, o procedimento pode ser ainda mais sensível que a radiologia para detecção de lesões em estágios precoces e os resultados são específicos para patologia pulmonar. As desvantagens incluem os custos para a fazenda de exames ultrassonográficos repetitivos, o aumento do manejo para restrição desses animais repetidamente, e o aumento de potros tratados por diagnóstico presuntivo de pneumonia por *R. equi* pelo aparente aumento de incidência cumulativa, aumentando os riscos de efeitos colaterais associados ao tratamento e desenvolvimento de resistência aos macrolídeos (Giguere, et al, 2007). Apesar disso, a ultrassonografia pulmonar, quando utilizada de maneira adequada, é uma importante ferramenta de controle de infecções por *R. equi* em fazendas endêmicas (Giguere, et al, 2011).

1.6.2. PCR de amostra de fezes e swab nasal

De acordo com Pusterla (et al, 2007), Sellon (et al 2001) e Hashikura (et al, 2000) a cultura bacteriológica e amplificação de DNA por PCR a partir de amostras de swab nasal não são sensíveis para o diagnóstico de pneumonia por *R. equi*.

Segundo Shaw (et al, 2015), PCR quantitativo de amostras de fezes é uma técnica não invasiva com boa acurácia diagnóstica, assim sendo uma potencial alternativa para uso de lavado broncoalveolar. Takai (et al, 1986), relatou que durante um estudo em 43 potros de duas fazendas diferentes no Japão, que a prevalência de *R. equi* nas fezes foi maior em fazendas endêmicas para a doença (94%; 16/17) do que as amostras de fazendas sem histórico de pneumonia por *R. equi* (73%; 19/26). Takai (1986), sugere, ainda, que a cultura quantitativa de amostras de fezes de potros em intervalos semanais é útil para diagnóstico precoce de infecções por *R. equi*, pois as concentrações de *R. equi* nas amostras de fezes aumentam ao mesmo tempo em que os sinais clínicos de doença respiratória aparecem em alguns casos.

É importante ressaltar que Madrigal (et al, 2016), durante um estudo sobre testes de triagem, detectou que a concentração média de cópias de *R. equi* virulento de fezes era 1 cópia de *vapA/g* de fezes; indicando que a PCR quantitativo não tinha nenhuma vantagem evidente sobre um teste qualitativo que somente verifica a presença ou não de *R. equi* virulento na amostra.

1.7. Tratamento dos casos subclínicos de infecção por *R. equi*

Ainda não se tem uma conclusão se o tratamento de todos os casos subclínicos é apropriado. Slovis (et al, 2005) ressalta que há especulações de que a diminuição de casos de pneumonia por *R. equi* pode ter sido devido ao tratamento de potros subclínicamente afetados, diminuindo a incubação do agente virulento nas fezes. No entanto, um estudo recente em uma fazenda endêmica demonstrou que muitos potros com lesões pulmonares subclínicas se recuperaram sem tratamento e que o tratamento dos animais subclínicos com azitromicina e rifampicina não acelerou a recuperação comparando com o placebo (Venner, et al, 2011). Esses resultados indicam que tratamento antimicrobiano realizado em todos os potros com pequenas lesões pulmonares subclínicas foram desnecessárias na fazenda. Estudos adicionais nesse sentido são necessários.

Diante do exposto acima, a seguir será apresentado um manuscrito abordando a ultrassonografia torácica e a análise de amostras de fezes e swab nasal por PCR convencional para detecção de doença subclínica e caracterização genética de *R. equi* em 22 potros provenientes de 3 fazendas endêmicas para pneumonia por *R.*

equi do Sul do Brasil. Esse manuscrito está em fase de preparação para submissão à publicação.

2. MANUSCRITO

Monitoring foals by thoracic ultrasonography, bacterial culture and PCR: diagnostic of *Rhodococcus equi* subclinical pneumonia.

L. Huber¹, L. T. Gressler², M. Sanz³, P. Garbade¹, A. Vargas⁴, B. Petri⁴.

(Artigo em **preparação** para publicação – Journal of Equine Veterinary Science)

¹Department of Equine Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

²Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade de Passo Fundo, Brazil.

³Washington State University, USA

⁴Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Universidade Federal de Santa Maria, Brazil.

Correspondence email: laura.huber16@hotmail.com

ABSTRACT

Pneumonia caused by *Rhodococcus equi* (*R. equi*) is an insidious disease in which clinical signs may not be apparent until pathologic changes are well progressed; early and accurate diagnosis of foals with *R. equi* pneumonia is important. Thoracic ultrasound screening (TUS) and polymerase chain reaction (PCR) from fecal and nasal swab samples were performed in 22 foals from 3 to 16 weeks of age from 3 endemic farms at south of Brazil to identify the occurrence of *R. equi* subclinical disease. The association of TUS and fecal PCR detection of virulent *R. equi* provided a possibility of identification of critical points in disease control. Considering the fact that 95.4% of the foals showed evidence of subclinical disease and none of them developed any signs of clinical disease, the antibiotic treatment was not reasonable for the foals followed.

1. INTRODUCTION

Rhodococcus equi (*R. equi*), a gram-positive facultative intracellular pathogen, is an important cause of pneumonia in foals between 3 weeks and 5 months of age (Slovis, et al, 2005). *R. equi* is a saprophytic inhabitant of soil and is widespread in the environment of horse-breeding farms (Takai, et al, 1991). Its associated clinical disease may be unrecognized or sporadic on some farms and enzootic and

devastating on others with morbidity rate sometimes exceeding 40% (Cohen, et al, 2014). Pneumonia caused by *R. equi* is an insidious disease in which clinical signs may not be apparent until pathologic changes are well progressed (Giguere, et al, 1997). Because of the insidious progression of infection to severe clinical signs, early and accurate diagnosis of *R. equi* pneumonia is crucial to foals recovery (Madrigal, et al, 2016).

The definitive diagnosis is based on *R. equi* detection by bacterial culture and molecular identification from tracheobronchial aspirate (TBA) in combination with cytological evidence of sepsis in the TBA from animals with clinical signs of pneumonia (Giguere, et al, 2011). Although the TBA importance to definitive diagnosis, this procedure is invasive, labor-intensive, requires skill, carries risks to foals, and is relatively expensive. For this reasons, many practitioners avoid performing the TBA in farm setting. In the other hand, fecal qPCR is a noninvasive technique with good diagnostic accuracy, making it a potential alternative to TBAs to confirm *R. equi* aetiology (Shaw, et al, 2015).

Currently, veterinary practitioners use several screening methods to identify foals that will develop *R. equi* pneumonia based on the rationale that early intervention will lead to greater therapeutic success and shorter duration of treatment (Madrigal, et al, 2016, Giguere, et al, 2011). The sequential thoracic ultrasonography (TUS) is a highly sensitive screening method used to detect peripheral lung abscesses (McCracken, et al, 2005), which may be detected in early stages of the *R. equi* pneumonia. It is the most widely adopted approach to detect abscesses in the periphery of the lung and it is easily performed in farms (Madrigal, et al, 2016).

R. equi pneumonia has been commonly reported in farms from Brazil, however its subclinical occurrence is unknown. Moreover, a screening test to evaluate the population has not been well tested. The main goal of this study is to identify the occurrence of *R. equi* subclinical disease in foals from 3 to 16 weeks of age in 3 endemic farms from Brazil, using TUS and conventional PCR from fecal and nasal swab samples. We also intended to isolate *R. equi* and genotypically characterize its virulence as well as to follow the development of the cases to determine the necessity of treatment of subclinical disease in the population studied.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Target population and data collection

This study was conducted in 22 randomly selected foals from three different breeding farms located in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. These farms were selected because they had a history of occurrence for *R. equi* infection based on medical records from 2000 to 2014. Client consent for foal inclusion was obtained, and the project was approved by the animal ethics committee of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil. The foals were examined at 3, 5, 7, 9 and 16 weeks of age. During the evaluation, a complete physical exam (including rectal temperature, heart rate, respiratory rate and pulmonary and cardiac auscultation) and bilateral thoracic ultrasound were performed. At the same time, fecal and nasal swab samples were collected from each foal. The foals were visually evaluated by distance daily.

2.2. Thoracic ultrasound exam:

Ultrasound was performed using minimal restraint as described before (Slovis et al 2005). Briefly, ethyl ethanol (70%) was applied over the pulmonary area bilaterally and the exam was performed using a 5MHz linear transducer. Based on the ultrasonographic evidences the lungs were classified as: without significant abnormalities, with evidence of pulmonary consolidation (ill-defined, hypoechoic regions with a hyper-echoic margin) or with pulmonary abscess (well-defined, hypoechoic nodules relative to the surrounding lung parenchyma) (Ramirez et al 2004). The affected areas were measured (largest diameter in mm) and the images were recorded.

2.3. Feces and nasal swabs sampling:

Fecal samples were collected directly from the rectum by digital palpation and stored in sterile containers at 2-8°C for transportation. Nasal swab samples (both nostrils) were taken by inserting sterile swabs (swab haste plastic sterile – Labor Import) deep into the nasal cavity previously cleaned with paper towels. Swabs were kept in semi-solid medium transport (CO CitotestLabware Manufacturing, Ltd.,

Jiangsu, China). All samples were kept at 2-8°C and were shipped to the Bacteriology Laboratory at the Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil within 48 hours after collection within 48 hours after collection. Thereafter samples were immediately processed and aliquots were kept at -20°C.

2.4. Bacterial analysis and conventional PCR:

The nasal swabs samples were streaked on agar plates containing 5% sheep blood for the selective isolation of *R. equi*, and fecal samples were streaked to nalidixic acidnovobiocin-actidione (cycloheximide)-potassium tellurite (NANAT) medium, as previously described by Woolcock (et al, 1979). The plates were incubated aerobically at 37 °C for 72 h. Bacterial colonies suggestive of *R. equi* were subcultured and phenotypically identified using standard procedures that included colony morphology, Gram staining, and CAMP testing (Quinn et al., 1994). For isolates phenotypically similar to *R. equi*, the DNA was extracted using the CTAB protocol (cetyltrimethyl ammonium bromide) preceded by digestion with proteinase K (20 mg/ml) for 60 minutes at 37 °C (Sambrook and Russell, 2001). The DNA templates were submitted to multiplex PCR targeting a region in the gene coding for 16S rRNA in *R. equi* (458 bp), and the virulence gene *vapA* (564 bp). The primers used were: genus/species-Forward (5'-GGT CTA ATA CCG GAT ATG AGC TCC TGT C) and Reverse (5'-CGC AAG CTT GGG GTT GAG CCC CAA) according to BELL et al. (1996), *vapA*-Forward (5'-ACA AGA CGG TTT CTA AGG CG) and Reverse (5'-TTG TGC CAG CTA CCA GAG CC) according to Monego et al. (2009).

3. RESULTS

3.1. Physical and ultrasonographic examination

Complete physical examination was performed in all the 22 foals at each predetermined time of samples collection. Heart rate and respiratory rate decreased progressively from the 3rd week to the 16th week. Rectal temperature remained constant through the evaluations (Figure 1). No abnormal findings on the pulmonary auscultation were observed during the study. The foals were visually evaluated daily

for signs of respiratory distress, apathy, inappetence, none of which observed in period of the study.

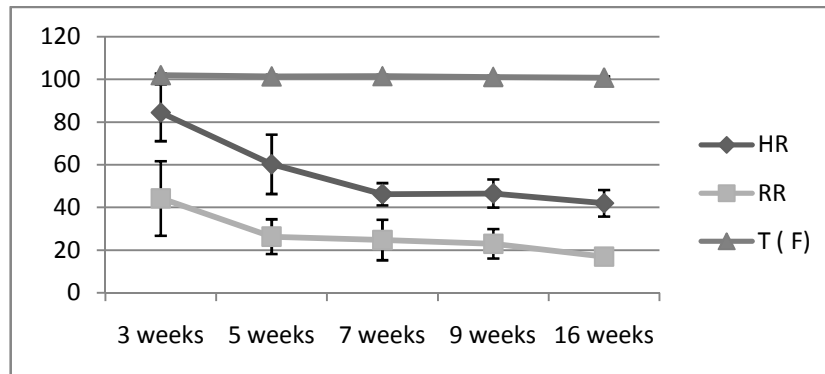


Figure 1: mean and standard deviation of heart rate, respiratory rate and temperature (°F) measured of all foals at the 3rd, 5th, 7th, 9th and 16th week.

Of the 22 foals evaluated, 21 (95.4%) developed subclinical disease characterized by presence of ultrasonographic abnormalities consistent with abscessation or consolidation but without signs of lower respiratory tract infection (ie fever, cough, nasal discharge, tachypnea, respiratory effort or distress). Five (22.7%) presented unilateral pulmonary abscessation (Figure 2). The foal number 15 had abscess on the left lung at 5th and 7th week measuring 11.3mm and 16.4mm of diameter respectively (Figure 2A). The foal number 16 had an abscess measuring 24.0mm of diameter on the left lung at 9th week that reduced to 5.0mm of diameter at the 16th week (Figure 2B). The foal number 18 presented abscess on the left lung at the 7th week measuring 11.0mm of diameter (Figure 2C); the foals number 20 and 21 had abscess on the right lung at the 5th week measuring 13.4mm and 11.8mm diameter, respectively (Figure 2D). All abscess resolved spontaneously within the study period.

The incidence of pulmonary consolidation and pulmonary abscess verified on the US examination increased at 5th (in 50% and 14% of the animals) and 7th (59% and 9%, respectively) week. The pulmonary abscesses were initially detected at 5th week and reduced in size on the following exams (Table 1).

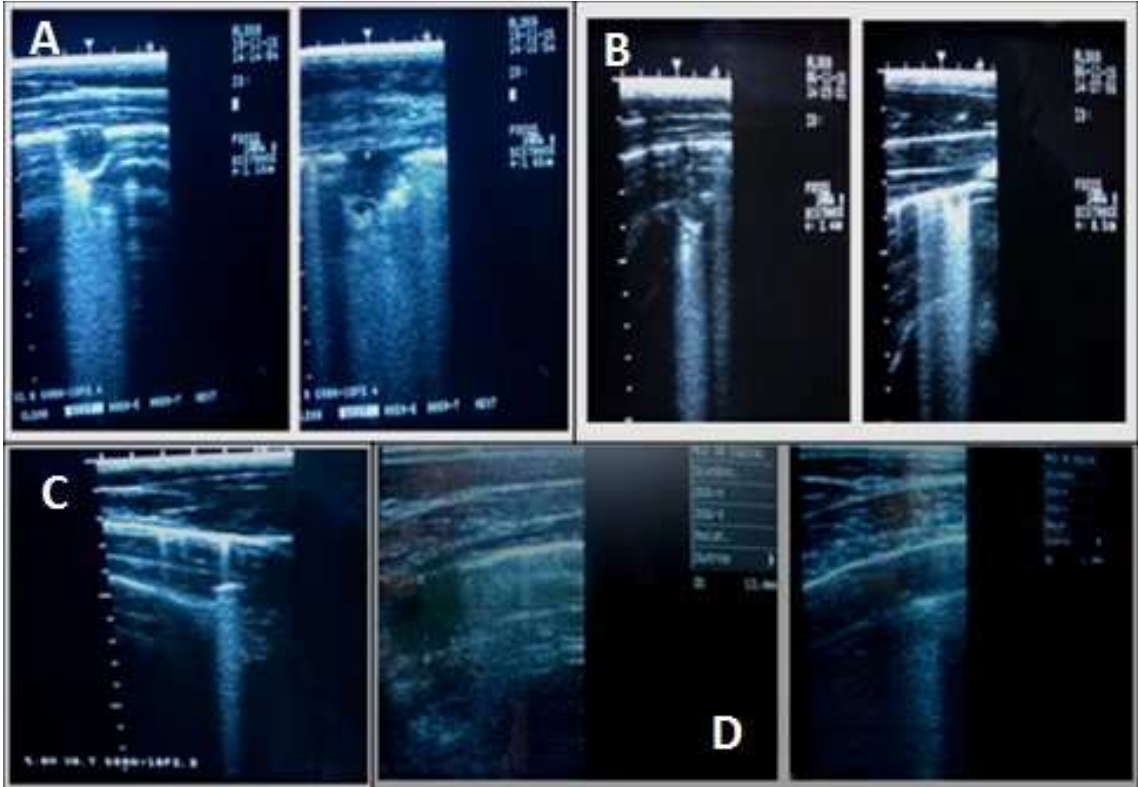


Figure 2: A - Foal number 15 presenting 11.3mm diameter abscess at 5th week and 16.5mm at 7th week. B - Foal number 16 presenting 24mm of diameter abscess at 9th week and 5mm at 16th week. C - Foal number 18 presenting abscess measuring 11.0mm of diameter at 7th week. D - Foals 20 and 21 presenting pulmonary abscess at 5th week measuring 13.4mm and 11.8mm diameter respectively.

3.2. Detection and characterization of *R. equi* from nasal swabs and fecal samples

R. equi *var* A could be detected on the samples (feces and nasal swabs) from twelve of the 22 foals (54.5%) (Table1). In nine of them (75%) virulent *R. equi* was isolated from exclusively feces samples, in two of them (16.66%) from both feces and nasal swab samples, and one (8.33%) from exclusively nasal swab samples. Of the 12 foals with *R. equi* *var* A positive samples, two had pulmonary abscess unilaterally that resolved completely on the following exams. All *R. equi* positive foals had some degree of pulmonary consolidation. Of the 10 foals that remained negative for virulent *R. equi*, 3 (30%) had pulmonary abscesses also unilaterally which completely resolved. Nine (90%) had pulmonary consolidation bilaterally. *R. equi* was verified in feces samples either at the same period (2 from the 12 positive cases), after (6 from the 12 positive cases) or before (3 from the 12 positive cases) the signs of pulmonary consolidation was found by TUS examination. Of the 5 foals with evidence of pulmonary abscess by TUS, in 75% (3/5) *R. equi* could not be identified on the fecal

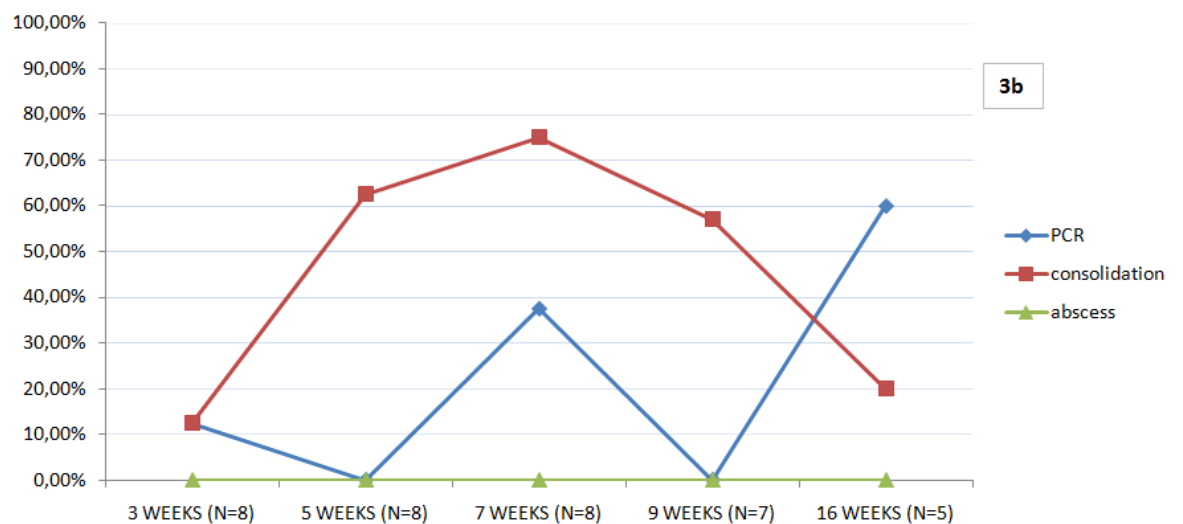
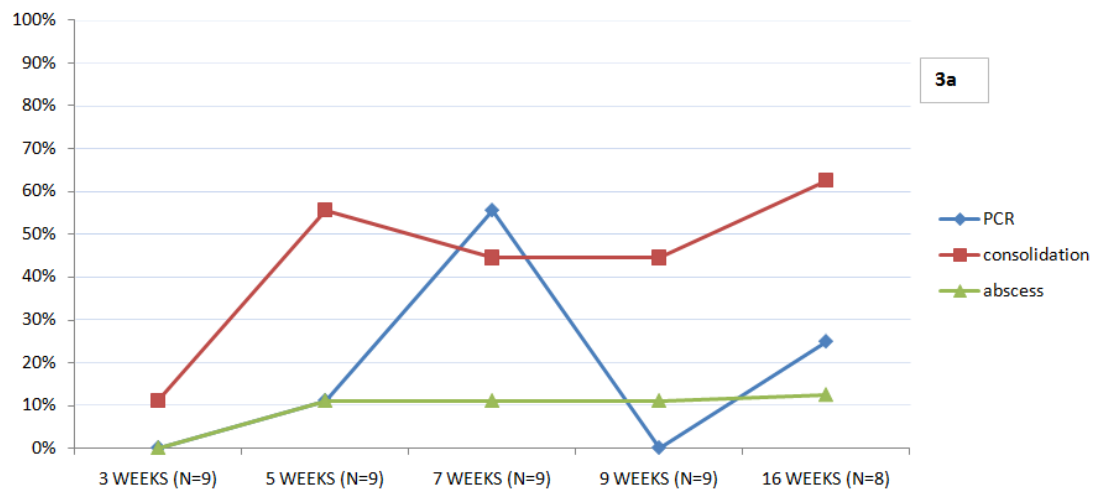
or nasal swab samples. One of the 3 *R. equi vap A* positive samples from nasal swab was indentified before its isolation from fecal samples. In this case, the evidence of pulmonary consolidation on the TUS exam appeared at the same period of *R. equi* detection. The number of samples positive for *R. equi* increased on the 7th week (40.9%) and later on the 16th week (33.33%).

Num.	Farm	A = 3 week				B = 5 week				C = 7 week				D = 9 week			E = 16 week		
		NS	F	US R L		NS	F	US R L		NS	F	US R L		NS	F	US R L		NS	F
1	A			0 0			0 0		+	0 1			1 1	+	1 0				
2	A			0 0			0 1			0 0			0 0						
3	A			0 0			0 0		+	0 0			0 0		1 1				
4	A			0 0			0 0			0 0			0 0		1 1				
5	B		+	0 0			1 1			1 1			1 0		0 0				
6	B			0 0			0 1			0 0			0 0						
7	B			0 0			1 1		+	1 1			0 0		+	1 1			
8	B			0 1			1 1		+	1 1			1 1		+	0 0			
9	B			0 0			0 0			1 1									
10	B			0 0			1 1			1 1			0 1		0 0				
11	B			0 0			0 0			0 0			0 0						
12	B			0 0			0 0		+	1 1			1 1	+	+	0 0			
13	A			0 1			1 1		+	1 1			0 0		1 1				
14	A			0 0			0 1		+	0 0			1 1		+	0 0			
15	A			0 0			1 2	+		1 2			1 0		1 1				
16	A			0 0			0 0			1 1			2 0		2 0				
17	A			0 0		+	1 1			0 0			0 0		0 0				
18	C			1 1		+	1 1			1 2			1 1						
19	C			1 0			0 0		+	1 0		+	0 0						
20	C			0 0			2 1			1 0			0 0		0 0				
21	C			0 1			2 1			1 1			0 1						
22	C			1 1			1 1			1 1			0 0		0 0				
N		22				22				22				21			15		

Table 1: Time of appearance of virulent *R. equi* on nasal swab (NS) and fecal samples (F). Ultrasonographic exam (US) showing time of appearance of consolidation (1), abscess (2) or no alterations found (0) on the right (R) and left(L) lung. The number of animals analyzed on each group is represented by N.

When analyzing the results by farm separately(Figure 3), Farm A (Figure 3a) presented the highest number of *R. equi vap A* positive at 7th week (55.5%), and pulmonary consolidation/pulmonary abscess appeared more frequently at 16th week (62.5% and 12.5%, respectively). Farm B (Figure 3b) presented the highest number of *R. equi* isolation at 16th week (60%) while pulmonary consolidations signs were

more evident at 7th week (75%). No signs of pulmonary abscess were seen in these animals. At farm C (Figure 3c), *R. equi* detection was between 5 and 9 weeks (20%) while the signs of pulmonary consolidation were observed more frequently between 3 and 7 weeks (80% at 3rd and 5th week and 100% at 7th week). Pulmonary abscess was identified more frequently at 5th week (40%).



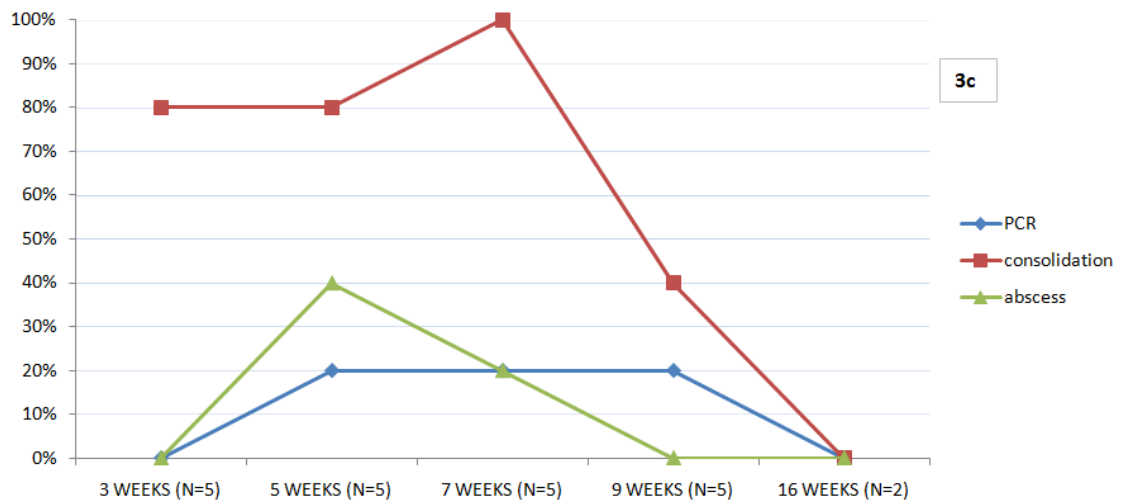


Figure 3: Presence of virulent *R. equi* on fecal samples (PCR), lung consolidation and lung abscess on Farm A (3a), Farm B (3b) and Farm C (3c) through examinations of the foals at 3, 5, 7, 9 and 16 weeks of age.

When comparing the findings between farms, *R. equi* identification was more frequently observed at the farm A (66.66%) while abscess cases were significantly important at farm C (60%). Presence of pulmonary consolidation identified by US examination was expressively high at all farms (100% at farm A and C and 87% at farm B) (Table 2).

FARM	vap A <i>R. equi</i>	Consolidation	Abscess
A	66.7%	100.0%	22.0%
B	50.0%	87.0%	0%
C	40.0%	100.0%	60.0%

Table 2: percentage of virulent *R. equi* on fecal samples and lung abscess and consolidation visualized by TUS on farms A, B and C, considering all foals and all exams.

4. DISCUSSION

In this study, TUS was performed on foals from 3 to 16 weeks (15 days intervals between evaluations) and subclinical disease was identified on 95.5% (21/22) of them, which agrees with statement from McCracken (et al, 2005) that TUS is a highly sensitive screening method used to detect peripheral lung abscesses in early stages of *R. equi* pneumonia. Foals with subclinical disease were considered those who presented lung alterations (consolidation or abscess formation) identified

by thoracic ultrasound but did not develop clinical signs of pneumonia according to Shaw (et al, 2015). None of the foals in this study developed clinical signs of *R. equi* pneumonia (ie fever, cough, nasal discharge, tachypnea, respiratory effort or distress, etc). High temperatures (between 102.2 and 103.8 °F) were not commonly observed and did not associate with any other clinical signs of pneumonia, being more related to environment conditions and capture stress. Heart and respiratory rate as well as rectal temperature decreased over time as a result of ageing of the foals and familiarization with handling (Piccione, et al, 2006 and Bernard and Barr, 2011). These findings agree with statement from Shaw (et al, 2015) that many foals with findings consistent with *R. equi* infection will not develop clinical signs. It was recently reported that among 270 foals at a large breeding farm in Texas, 80% (216/270) developed ultrasonographic evidence of pulmonary consolidations or abscess greater than 10mm in diameter; of these 216 foals, only 46 (21%) ultimately developed clinical signs of pneumonia (Chaffin, et al, 2013).

In the present study, the incidence of signs of pulmonary consolidation and pulmonary abscess increased at 5th (50% and 14% respectively) and 7th (59% and 9% respectively) week. The pulmonary abscesses started to be detected at 5th week and reduce in size on the following exams. Age-related deficiencies in *R. equi*-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL) activity have been documented in 3-week-old foals. Activity of CTLs is improved by 6 weeks of age and is similar to that of adult horses by 8 weeks (Giguere, et al, 2011). This improvement on the immunity of the foal may be one of the factors that contribute to abscess reduction in size and to nearly extinction by the 16th weeks.

Of the 5 foals with evidence of pulmonary abscess by TUS, in 75% (3/5) *R. equi* could not be identified on the fecal or nasal swab samples. In addition, 90% of the foals in which *R. equi* was not detected on the samples presented subclinical disease. These findings are in line with the conclusion reported by Madrigal et al. (2016). These authors reported that qPCR for *vapA* on serial fecal samples was not clinically useful to identify foals that will develop *R. equi* pneumonia. On the other hand, when analyzing each case separately, this study demonstrates that from the 12 foals with identified *R. equi vap A* on the samples, the detection of *R. equi* occurred before or at the same period as the signs of pulmonary consolidation could be seen by thoracic ultrasound in 42% (5/12) of the time. According to Takai (1986), quantitative culture of the feces of foals at weekly intervals has been advocated to

aid in early diagnosis of *R. equi* infections, because the fecal concentration of *R. equi* increased at the same time as clinical signs of respiratory disease appeared in some cases.

R. equi vap A was detected on the samples (feces and nasal swab) from twelve of the 22 foals (54.5%). In this study, only in 17% (2/12) of the foals, *R. equi* was isolated from both fecal and nasal swab samples and only 8% (1/12) was isolated exclusively from nasal swab samples. In 75% (9/12) of the foal, *R. equi* was isolated exclusively from fecal samples. The results from this study demonstrate that fecal samples may be more useful to detect virulent *R. equi* than nasal swab samples, agreeing with Pusterela (et al, 2007), Sellon (et al 2001) and Hashikura (et al, 2000) studies that show that bacterial culture and PCR amplification of nasal swabs are insensitive for diagnosis of *R. equi* pneumonia.

In a group of experimentally infected foals, all foals younger than 14 days old at the time of the infection developed terminal pneumonia but all foals older than 14 days of age at the time of infection developed pneumonia and recovered without treatment (Horowitz, et al, 2001). The fact that only in 4.54% (1/22) of the samples virulent *R. equi* was identified on the 3rd week could indicate that the animals in this study had contact with *R. equi* later than 2 weeks of life and why they didn't develop the clinical disease. Even that, in this project, Real Time PCR (RT-PCR) was not performed to identify the bacterial load in the fecal samples, Madrigal (et al, 2016) during a study on screening tests showed that the threshold concentration was essentially 1 copy of *vapA/g* of feces, indicating that quantitative PCR had no advantage over a qualitative test that simply detected the presence or absence of *vapA*.

Because ultrasonographic screening for early detection has become a routine practice at many farms endemic for pneumonia caused by *R. equi*, the most frequently recognized form of *R. equi* infection on those farms is a subclinical form in which foals develop sonographic evidence of peripheral pulmonary consolidation or abscessation without manifesting clinical signs (Venner, et al, 2011). On those farms, the cumulative frequency of sonographically visible areas of focal pulmonary consolidation or abscessation considerably exceeds the historical frequency of clinical pneumonia attributed to *R. equi* suggesting that many subclinical foals might spontaneously recover without treatment. In this study, 95.4% (21/22) of the foals developed subclinical disease, without clinical signs of *R. equi* pneumonia until 16

weeks of age, indicating that treatment for these subclinical cases is not justifiable. Moreover, it is important to highlight that mass antimicrobial treatment of subclinically affected foals is not without potential problems, including macrolide-associated hyperthermia and diarrhea (Stratton-Phelps et al., 2000) and selection of antimicrobial resistant strains (Giguere et al., 2010).

Herein the TUS was useful to early detection of subclinical *R. equi* pneumonia. The association with fecal PCR detection of virulent *R. equi*, provide a possibility of identification of critical points in disease control. Considering the results of this study, the foals were most likely submitted to higher concentration of *R. equi* after 3 weeks of age which could be one of the reasons none of them developed the clinical disease. Considering the fact that 95.4% of the foals showed evidence of subclinical disease and none of them developed any signs of clinical disease, the antibiotic treatment was not reasonable for the foals followed.

5. CONCLUSIONS

Finally, we consider this study valid since an analysis associating TUS and laboratory findings for detection of *R. equi* subclinical pneumonia was never performed in Brazil and our results are in line with the literature worldwide.

BIBLIOGRAPHY

- Bell, K.S., Philp, J.C., Christofi, N. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.23, n. 2, p. 72-74, 1996.
- Bernard W., Barr B. *Physical exam in equine pediatric medicine*. 2011 London: Manson Publishing.
- Cohen N.D. *Rhodococcus equi* Foal pneumonia. *Vet Clin Equine* 2014;30: 609-622.
- Chaffin M.K, Cohen N.D, Blodgett G.P, et al. Evaluation of ultrasonographic screening parameters for predicting subsequent onset of clinically apparent *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. In: Marr CM, editor. *Proceedings of the 59th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Lexington (KY): 2013. p. 268-9.

- Giguere S., Cohen N.D, Keith Chaffin M., Hines, S.A, Hondalus M.K, Prescott J.F, Slovis N.M. *Rhodococcus equi*: clinical manifestations, virulence, and immunity. *Journal of Veterinary Medicine* 2011;25:1221-1230.
- Giguere, S.; Prescot, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Veterinary Microbiology*, v.56, n.3/4, p.313-334, 1997.
- Giguere S., Lee R., Williams E., Cohen N.D., Chaffin M.K., Halbert N., Martens R.J., Franklin R.P., Clark C.C., Slovis N.M. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials of rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2010;237:74-81.
- Hashikura S., Higuchi T, Taharaguchi S, et al. Evaluation of nasotracheal aspiration as a diagnostic tool for *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Equine Vet J* 2000;32:560-564.
- Horowitz M.L., Cohen N.D., Takai S., et al. 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* 2001;15:171-175.
- Madrigal R.G, Shaw, S.D, Witkowski L.A, Sisson B.E, Blodgett G. P, Chaffin M.K, Cohen N. D. Use of serial quantitative PCR of the *vapA* Gene of *Rhodococcus equi* in feces for early detection of *R. equi* pneumonia in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016;30:664-670.
- McCracken J.L, Slovis N.M. Use of thoracic ultrasound for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia on endemic farms. Proc 2005 AAEP Annu Convention 2005;55:38–44.
- Monego, F., et al. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the *vap* gene family. *Current Microbiology*, v.58, p.399-403, 2009.
- Piccione, G., Costa, A., Fazio F., Grasso F., Coala G. Nitrogenous metabolism in Thoroughbred and Arabian foals from birth to Five months of age. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootectnia*. 2006;58: 525-529.
- Pusterla N., Wilson W.D, Mapes S, et al. Diagnostic evaluation of real-time PCR in the detection of *Rhodococcus equi* in faeces and nasopharyngeal swabs from foals with pneumonia. *Vet Rec* 2007;161:272-275.

- Ramirez S, Lester G.D, Roberts G.R. Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45(2): 172-176.
- Sambrook J, Russel D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. 2011. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanz M.G,Loynachan A., Horohov D. W. *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomized experimental challenge of neonatal foals. *Veterinary record*, 2016.
- Shaw S.D, Cohen N.D, Chaffin M.K, Blodgett G.P, Syndergaard M, Hurych D. Estimating the Sensitivity and Specificity of Real-Time Quantitative PCR of Fecal samples for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in foals. *Journal of Veterinary Medicine* 2015;29:1712-1717.
- Sellon D.C, Besser T.E, Vivrette S.L, et al. Comparision of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Clin Microbiol* 2001;38:1289-1293.
- Slovis NM, McCracken JL, Mundy G. How to use thoracic ultrasound to screen foals for *Rhodococcus equi* at affected farms. *Proc Am Assoc Equine Pract* 2005;51:274–278.
- Stratton-Phelps M., Wilson W.D., Gardner, I.A. Risk of adverse effects in pneumonic foals treated with erythromycin versus other antibiotics: 143 cases (1986-1996). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2000;217: 68-73.
- Takai S, Iimori S, Tsubaki S. Quantitative fecal culture for early diagnosis of *Corynebacterium (Rhodococcus) equi* enteritis in foals. *Can J Vet Res* 1986;50;479-484.
- Takai S. Ohbushi S, Koile K, et al. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. *J Clin Microbiol* 1991;29;2887-2889.
- WOOLCOCK, J. B., FARMER A.M.T., M. D. MUTIMER. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *J. Clin. Microbiol.* 1979;9;640-642.
- Venner M, Rodiger A, Laemmer M, et al. Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet J* 2011. In press.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A rodococose eqüina é uma doença presente nas fazendas de criação de equinos no mundo todo. As características de patogenia da rodococose tornam o controle dessa doença muito difícil, além de que ainda não existem métodos de prevenção 100% eficazes. Considerando a grande importância econômica e o impacto ao bem estar animal que as infecções por *Rhodococcus equi* causam na produção de equinos, o presente estudo procurou demonstrar maneiras práticas de identificação precoce da doença para auxiliar na sua prevenção e controle.

Apesar da relativamente pequena amostra de animais (22 potros) submetida a essa pesquisa, o estudo contou com uma boa variedade de dados devido ao constante acompanhamento desses animais desde as 3 até as 16 semanas de vida. Os resultados possibilitaram a identificação de uma elevada taxa (95.4%) de diagnóstico de doença subclínica não antes documentada nos rebanhos brasileiros. Esses resultados concordaram com a literatura anteriormente descrita, principalmente se tratando da taxa e dos períodos de aparecimento das evidências de doença subclínica.

Apesar de a PCR quantitativo não ter sido uma possibilidade de realização nesse estudo, os resultados obtidos com a PCR convencional foram aparentemente bastante fidedignos, pois concordaram com os resultados anteriormente descritos na literatura sobre os períodos de maior prevalência de isolamento de *R. equi* nas fezes. Além disso, conforme já revisado na literatura anteriormente, a concentração comumente isolada nas amostras de fezes, é 1 *vapA/g*, portanto a realização de PCR qualitativo fornece resultados tão fidedignos quanto o quantitativo.

A ultrassonografia torácica se mostrou uma técnica de triagem bastante prática e acurada na identificação de potros subclínicamente afetados e facilmente adaptável à rotina diária das fazendas. Como já revisado na literatura anteriormente, esse método de triagem, quando implementado em fazendas de ocorrência endêmica, pode diminuir os casos de mortalidade e morbidade por pneumonia causada por *R. equi*. Nesse estudo, a associação entre o emprego da ultrassonografia torácica e a avaliação dos resultados do isolamento e identificação genética do *R. equi* nas fezes trouxe informações valiosas sobre pontos críticos de controle da doença. Por exemplo, após realizar os testes de triagem, pudemos perceber que nas fazendas A e B houve um aumento nas taxas de *R. equi vapA*

positivos nas amostras na 16ª semana, que acreditamos que possa ser devido ao manejo de trazer as éguas e potros até a mangueira e/ou cocheira para alimentação; na fazenda C, notamos uma elevada taxa de aparecimento de abscessos pulmonares, e acreditamos que esses potros estejam sido submetidos a situações de superlotação, aumentando os riscos de contaminação por *R. equi* desses animais. Com essa análise é possível identificar os pontos mais críticos e modificar o manejo a fim de reduzir os riscos do desenvolvimento da doença clínica. Além disso, acreditamos que o acompanhamento dos potros mais afetados (com abscesso pulmonar evidente) possa identificar mais precocemente o desenvolvimento da doença clínica melhorando a resposta desse animal ao tratamento.

Nesse estudo, verificamos uma taxa de 100% de recuperação espontânea dos casos subclínicos, sem a necessidade de tratamento, concordando com os achados na literatura. No entanto, existem também especulações de que o tratamento de animais subclínicos seria benéfico para diminuir a contaminação ambiental causada pela manutenção de animais portadores assintomáticos de *R. equi* virulento.

4. CONCLUSÕES

- A rodococose eqüina é considerada endêmica em muitas regiões do Brasil e do mundo e métodos de identificação precoce e controle da doença são necessários para evitar as perdas econômicas e o sofrimento animal.
- No Brasil, não havia sido descrito na literatura casos de doença subclínica identificados por ultrassonografia torácica.
- A avaliação seqüencial dos dados de PCR obtidos de amostras de fezes juntamente com a avaliação clínica dos potros e ultrassonografia de tórax permitiu a identificação de infecção subclínica por *R. equi*. Além disso, foi possível a identificação dos pontos críticos de controle da doença. Esse reconhecimento possibilita o acompanhamento dos potros mais afetados para que a doença clínica, se ocorrer, possa ser identificada precocemente contribuindo para o sucesso do tratamento. As amostras de swab nasal não forneceram dados tão precisos,

portanto, não recomendamos a análises de amostras de swab nasal isoladamente como método de screening.

- O tratamento em massa dos casos subclínicos se torna injustificável na população analisada já que em 100% dos casos houve recuperação de forma espontânea.
- O estudo contribuiu para demonstrar formas simples e aplicáveis de investigação da doença nas fazendas endêmicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINSWORTH D.M., EICKER S.W., YEAGER A.E., et al. Associations between physical examinations, laboratory, and radiographic findings and outcome and subsequent racing performance of foals with *Rhodococcus equi* infection: 115 cases. *J Am Vet Med Assoc* 1998;231:510-515.

ARDANS A.A., HIETALA S.K., SPENSLEY M.S., et al. Studies of naturally occurring and experimental *Rhodococcus equi*. *Proc Am Associate Equine Pract* 1986;32:129-144.

BARTON M.D., EMBURY D.H. Studies of the pathogenesis of *Rhodococcus equi* infections in foals. *Aus Vet J* 1987;64:332-339

BYRNE, B.A.; PRESCOTT, J.F.; PALMER, G.H.; TAKAI, S.; NICHOLSON, V.M.; ALPERIN, D.C.; HINES S.A. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infect.Immun.*, 2001;69(2): 650656.

CHAFFIN M.K., COHEN N.D., MARTENS N.D., et al. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian throughbred farms. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:6152-6160.

CHAFFIN M.K., COHEN N.D., MARTENS R.J., et al. Evaluation of the efficacy of gallium maltolate for chemoprophylaxis against pneumonia caused by *Rhodococcus equi* infections in foals. *Am J Vet Res* 2011;72:945-957.

COHEN N.D., CHAFFIN M.K., MARTENS R.J. Control and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Compend Contin Educ Pract Vet* 2000;22:1062-1070.

COHEN N.D., O'CONNOR M.S., CHAFFIN M.K., et al. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc* 2005;226:404-414.

COSTA, M.M.;MACHADO, S.A.; KREWER, C.C.; ILHA, M.R.S; GRAÇA, D.L.; MATTOSGUARALDI, A.L.;VARGAS, A.C.V. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* in mice, isolated from environment, human and horse clinical samples. *Pesq. Vet. Bras.*, 2006;26, 167170.

DAWSON T.R.M.Y., HOROHOV, D.W., MEIER W.G., MUSCATELLO G. Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Vet Immunol Immunopathol* 2010;135:1-11.

GIGUERE S., COHEN N.D, KEITH CHAFFIN M., HINES, S.A, HONDALUS M.K, PRESCOTT J.F, SLOVIS N.M. *Rhodococcus equi*: clinical manifestations, virulence, and immunity. *Journal of Veterinary Medicine* 2011;25:1221-1230.

GIGUERE D., HONDALUS M.K., YAGER J.A., et al. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 1999;67:3548-3557.

GIGUERE S., GASKIN J.M., MILLER C., et al. Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *J Am Vet Med Assoc* 2002;220:59-63.

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 period) to age at onset and age at death of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia as evidence of perinatal infection. *J. Vet. Intern Med* 2001;15: 171-175.

KANALY, S.T.; HINES, S.A.; PALMER, S.A. Failure of pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* infection in CD4+ Tlymphocytedeficient transgenic mice. *Infect. Immun.* 1993;61.

KREWER C.C., SPRICIGO D.A., BOTTON S.A., COSTA M.M., SCHRANK I., VARGAS A.C. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in south of Brazil by multiplex PCR. *Braz J Microbiol* 2008;39.

MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; SEKIMOTO, R.; SASAKI, Y.; KAKUDA T.; TSUBAKI, S.; VARGA, J.; FODOR, L.; SOLYMOSI N.; MAJOR A. Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet. Microbiol.*, 2002;88, 377384.

MARTENS R.J., MARTENS J. G., FISKE R.A., et al. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Vet J* 1989;21:249-255.

MEIJER W.G., PRESCOTT J.F. *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 2004;35:383-396.

PRESCOTT J. F., MACHANGU R., KWIECIEN J., et al. Prevention of mortality due to *Rhodococcus equi* pneumonia on an endemically affected farm. *Can Vet J* 1989;30: 871-875.

PRESCOTT J.F. *Rhodococcus equi*: An animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1991;4:20-34

RAMIREZ S, LESTER G.D, ROBERTS G.R. Diagnostic contribution of thoracic ultrasonography in 17 foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Vet Radiol Ultrasound* 2004;45(2): 172-176.

SELLON D.C, BESSER T.E, VIVRETTE S.L, et al. Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Clin Microbiol* 2001;38:1289-1293.

SHAW S.D, COHEN N.D, CHAFFIN M.K, BLODGETT G.P, SYNDERGAARD M, HURYCH D. Estimating the Sensitivity and Specificity of Real-Time Quantitative PCR of Fecal samples for Diagnosis of *Rhodococcus equi* Pneumonia in foals. *Journal of Veterinary Medicine* 2015;29:1712-1717.

SYDOR T., VON BARGEN K., BECKEN U., SPUERCK S., NICHOLSON V.M., PRESCOTT J.F. & HAAS A. 2008. A mycolyl transferase mutant of *Rhodococcus equi* lacking capsule integrity is fully virulent. *Vet. Microbiol.* 128:327-341.

TAKAI S., TIMORI S., TSUBAKI S. Quantitative fecal culture for early diagnosis of *Rhodococcus equi* enteritis in foals, *Can J Vet Res* 1986;50:479-484.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OZAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKISAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15 to 17 Kilodalton antigens. *J. Clin. Microbiol.*, 1995;33, 1624-1627.

TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. *Vet. Microbiol.*, 1997;56,167-176.

VAN DER KOLK H., KRAUS H., Vink-Nooteboom M. *Rhodococcus equi* pneumonia in foal. *Equine Pract* 1999;21:6-9.

WADA R., KAMADA M., ANZAI T., et al. Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. *Vet Microbiol* 1997;56:301-312.

WOOLCOCK, J. B., FARMER A.M.T., M. D. MUTIMER. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. *J. Clin. Microbiol.* 1979;9:640-642.