

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTUDIO DE LA CINÉTICA EN SANGRE DE INMUNOGLOBULINAS
ESPECÍFICAS CONTRA *RHODOCOCCLUS EQUI* ADMINISTRADAS
COMO INMUNIDAD PASIVA EN POTRILLOS SANGRE PURA DE
CARRERA**

Por

Martina CARRIQUIRY OBES

**TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener
el título de Doctor en Ciencias
Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria**

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:

Dra. Jacqueline Maisonnave

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Fernando Perdigón

Tercer miembro:

Dr. Nicholas Bimson

Cuarto miembro (Co-tutor):

Dr. Fernando Vila

Fecha

_____6/10/2016_____

Autores:

Martina Carriquiry Obes

AGRADECIMIENTOS

Investigar sobre la prevención de *Rhodococcus equi* ha sido un gran desafío. Fueron muchos meses dedicados al estudio durante los cuales siempre pude contar con el apoyo de mi familia y mis amigos. Les agradezco infinitamente por ese apoyo brindado.

Quiero agradecer particularmente a María Inés Carrriquiry, Carolina Hirigoyen, Valentina Quagliotti y Pedro Otegui por la ayuda y el tiempo dedicado.

Agradezco a mi tutor el Dr. Fernando Perdigón quien me cedió el plasma, uno de los materiales fundamentales en esta investigación, y dedicó parte de su tiempo y conocimientos para guiarme y ayudarme con el desarrollo de la tesis.

Otro agradecimiento a mi co-tutor el Dr. Fernando Vila por la ayuda indispensable en el análisis estadístico y en la redacción.

Un agradecimiento al Dr. Carlos Soto quien me ayudó con el permiso requerido para experimentar en animales.

Agradezco especialmente al Haras y a la Dra. Florencia Graglia por hacer posible la realización de la investigación en el lugar. Agradezco a todo el personal del Haras y a mi compañera de pasantía Victoria Hernández que me ayudaron en la parte práctica de la investigación con una excelente disposición.

Un agradecimiento especial para el Dr. Teótimo Becú y la Dra. Mariana Giorgi quienes me recibieron cálidamente en la clínica brindándome una variedad de conceptos y puntos de vista nuevos.

Agradezco al personal de Biblioteca quienes me ayudaron con la búsqueda de material y con los formatos requeridos.

Por último, pero no menos importante, agradezco especialmente a Laboratorios Microsules por el particular interés y el apoyo económico brindado que hizo posible llevar a cabo esta investigación.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
1 Resumen.....	7
2 Summary	7
3 Introducción	8
4 Revisión bibliográfica	9
4.1 Etiología y epidemiología.....	9
4.2 Enfermedad clínica	10
4.2.1 Enfermedad pulmonar	11
4.2.2 Desórdenes extra pulmonares (DEPs).....	12
4.3 Patogenia y virulencia.....	13
4.4 Aspectos inmunológicos en el control de la infección por <i>Rhodococcus equi</i>	16
4.4.1 Inmunidad humoral.....	16
4.4.2 Inmunidad innata	18
4.4.3 Inmunidad adquirida mediada por células	20
4.5 Diagnóstico	21
4.6 Tratamiento y pronóstico	23
4.7 Control y prevención	25
4.7.1 Monitoreo para identificar los infectados de forma temprana.....	25
4.7.2 Manejo del entorno	27
4.7.3 Quimioprofilaxis	27
4.7.4 No utilizar antibióticos como profilaxis.....	28
4.7.5 Inmunización activa del potrillo	28
4.7.6 Inmunización pasiva del potrillo	29
4.7.6.1 Inmunización pasiva vía calostro	29
4.7.6.2 Inmunización pasiva vía plasma hiperinmune.....	30
5 Hipótesis.....	35
6 Objetivos	35
6.1 Objetivo general	35
6.2 Objetivos particulares.....	35
7 Material y métodos	36
7.1 Material	36

7.1.1	Predio dónde se realizó la investigación.....	36
7.1.2	Material biológico	36
7.1.3	Material no biológico	36
7.2	Método	37
7.2.1	Obtención de plasma hiperinmune.....	37
7.2.2	Selección de potrillos	37
7.2.3	Administración de plasma hiperinmune.....	38
7.2.4	Obtención de muestras plasmáticas de los potrillos.	39
7.2.5	Registro de datos de los potrillos.....	39
7.2.6	Determinación de niveles de inmunoglobulinas anti- <i>Rhodococcus equi</i> en el plasma de los potrillos.	40
7.2.7	Eliminación de residuos.	40
7.2.8	Análisis estadístico.	41
8	Resultados	42
9	Discusión	44
10	Conclusiones.....	47
11	Referencias.....	48
12	Anexo - Análisis de frecuencias (χ^2)	58

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Posología de los antibióticos frecuentemente utilizados para tratar la infección por <i>R. equi</i> en potrillos.....	23
Tabla 2. Resumen de datos y supuestos para seleccionar el volumen administrado.....	39
Tabla 3. Frecuencias de muestras positivas, negativas y no analizadas mediante el ELISA indirecto de las muestras plasmáticas de los potrillos problema. Para cada muestra n=20.....	42
Figura 1. Necropsia de un potrillo con neumonía por <i>R. equi</i> muy avanzada. Se observa hepatización y extensa abscedación del pulmón. No se observan zonas de parénquima pulmonar normal.....	11
Figura 2. Esquema mostrando la tendencia en la maduración de las vacuolas fagocíticas en un macrófago según la vía de entrada del <i>R. equi</i> virulento. Lado izquierdo: Receptores mediante los que se favorece la multiplicación de los <i>R. equi</i> y la necrosis del macrófago. Lado derecho: Receptor mediante el cual se favorece la muerte de los <i>R. equi</i> y la presentación de antígenos.....	14
Figura 3. Concentración de los isotipos IgGa, IgGb e IgG (T) en caballos adultos (izquierda) y potrillos hasta las 9 semanas de edad (derecha).....	18
Figura 4. Cultivo puro de <i>R. equi</i> . Se observan colonias irregulares, semitransparentes, brillantes y muy mucosas.....	22
Figura 5. Ecografías torácicas observándose abscesos pulmonares de diferentes diámetros.	26
Figura 6. Gráfica relacionando la variabilidad de la concentración de IgG contra la vapA entre lotes de plasmas hiperinmunes comerciales (1, 2 y 3) y la variabilidad observada en el plasma de los potrillos luego de su administración.....	33
Figura 7. Frecuencias de positivos y negativos en las muestras M0 (día), M1 (días) y M50 (días) de los potrillos problema. Se adjudicó el valor negativo a las M0 (día) no medidas cuando la M1 (día) fue negativo. Para cada muestra n=19.....	43
Figura 8. Frecuencias de positivos y negativos en las muestras M0 (días), M1 (días), M10 (días), M20 (días), M30 (días), M40 (días) y M50 (días). Para cada muestra n=2 excepto M30 (días) donde n=3.....	43

1 Resumen

Rhodococcus equi (*R.equi*) es la causa más común de neumonía en potrillos de 3 semanas a 5 meses de edad. No existe una vacuna comercial para potrillos contra *R.equi* por lo que la administración de plasma hiperinmune (HIP) específico para *R.equi* ha sido una medida de prevención común en los establecimientos donde la enfermedad se presenta de forma endémica. La eficacia del HIP es controversial y en los últimos años se ha adjudicado la disparidad en los resultados a la variabilidad de los HIP comerciales. El mecanismo de protección asociado al HIP no es claro y se ha propuesto la difusión de los anticuerpos a las vías aéreas como un mecanismo probable. El objetivo de este estudio consistió en evaluar la cinética en sangre de las inmunoglobulinas (Igs) específicas contra *R.equi* administradas mediante HIP. Se administró HIP intravenoso a 20 potrillos de 27 ± 2 días de edad y 5 potrillos fueron usados como control. La concentración de Igs específicas contra *R.equi* en el plasma de los potrillos fue evaluada mediante un ELISA indirecto cuantitativo. La mayoría de los potrillos no presentaron Igs específicas contra *R.equi* apreciables a las 24 horas y 50 días luego de administrado el HIP. En conclusión, los anticuerpos del HIP difunden extravascularmente poco después de su administración lo que podría ser un mecanismo importante asociado al efecto protector del HIP.

2 Summary

Rhodococcus equi (*R.equi*) is the most common cause of pneumonia in foals from 3 weeks to 5 months old. Since a commercial vaccine for foals is not available against *R.equi*, the use of *R. equi* specific hyperimmune plasma (HIP) has been a common preventative measure used in farms where the disease is endemic. The efficacy of HIP has been controversial and in the last few years the disparity in the results has been attributed to the variability between the commercially available HIP. While the mechanism of protection associated with HIP administration is not fully understood, the diffusion of antibodies into the airways was proposed. The objective of this study was to evaluate the permanence of the *R.equi* specific immunoglobulins (Igs) administered by transfusion of HIP in the foal's plasma. Twenty foals were given intravenous HIP at 27 ± 2 days of age while 5 remained as controls. *R.equi* specific Igs in the foal's plasma were evaluated using a quantitative indirect ELISA. Most foals showed non detectable *R.equi* specific Igs 24 hours or 50 days after HIP administration. In conclusion, antibodies present in HIP diffuse extravascularly shortly after HIP administration and this might be an important mechanism of protection associated with HIP.

3 Introducción

La neumonía es una causa común de enfermedad y una de las principales causas de muerte en los potrillos. *Rhodococcus equi* (*R.equi*) es el agente etiológico más común en neumonías de potrillos de 3 semanas a 5 meses de vida. Es responsable de importantes pérdidas económicas en la industria de cría equina a nivel mundial. Se ha estimado que es la causa del 3% de las muertes de potrillos en el mundo y se la relaciona a la cría intensiva de equinos. (Carla Giles y col., 2016; Gressler y col., 2015; Johns, 2013).

En Uruguay, 2011, se reportó una existencia de 425 mil equinos representando el segundo puesto en cuanto a la relación de habitantes por caballo en el mundo. Se reportaron aproximadamente 100 establecimientos registrados para la cría comercial de caballos deportivos, siendo el enduro la sección que presentó mayor proyección a seguir creciendo por las oportunidades que se presentaron para la exportación de animales. Estos establecimientos comerciales representan los de mayor densidad de equinos, y la concentración de animales sigue aumentando debido al valor agrícola de las tierras. La neumonía por *R.equi* es reconocida en el país y se cree que su incidencia va en aumento debido a la intensificación de la cría.(Ferrari y col., 2011)

Actualmente no existe una vacuna comercial efectiva que proteja a los potrillos de la neumonía por *R.equi* y, el tratamiento masivo de los potrillos con antibióticos es desmotivador con serios efectos a largo término. Por esta razón los Haras con neumonía por *R.equi* enzoótica adquieren medidas preventivas y muchos se basan en la administración de plasma hiperinmune (HIP). (Cesar y col., 2016).

La eficacia del HIP en controlar la enfermedad en infecciones naturales o experimentales ha sido controvertida a lo largo de los años. La falta de correlación positiva en la concentración de inmunoglobulinas (Igs) específicas contra *R.equi* entre el HIP y los potrillos receptores no está totalmente clara. Sin embargo, se ha demostrado una gran variabilidad en el contenido de IgG específicas contra *R.equi* de los HIP y, ha sido demostrada como uno de los factores principales en la controversia de los resultados sobre la eficacia del HIP como protector, con consecuencias clínicas y financieras importantes. Además, Sanz y col. (2014) demostraron que el coeficiente de variación de Igs específicas contra *R.equi* observada entre los HIP persiste en los potrillos receptores de ese HIP. En base a esto hemos propuesto que la falta de correlación entre la concentración de Igs específicas contra *R.equi* en el HIP y en el plasma de los potrillos receptores de ese HIP puede ser influido por esta variabilidad. En este estudio proponemos que podremos estimar parámetros que permitan optimizar el uso del HIP si existe una correlación entre la concentración de Igs en el HIP y la concentración de Igs en el plasma de los potrillos receptores a las 24 horas de administrado el HIP.(Cesar y col., 2016; Sanz y col., 2014).

4 Revisión bibliográfica

4.1 Etiología y epidemiología

El género *Rhodococcus* pertenece a la familia *Nocardiaceae*, suborden corynebacterineae, orden *Actinomycetales*. Se posiciona además, dentro de un único orden denominado *Mycolata*, junto a los géneros *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Corynebacterium* entre otros. La característica distintiva de este grupo es que contienen ácido micólico en su pared celular, un tipo de ácido graso de cadena larga, hecho de significancia epidemiológica debido a que posee un rol en la sobrevivencia de la bacteria bajo condiciones extremas. (Hines, 2013; Von Bargen y Haas, 2009).

Los *Rhodococcus* incluyen especies simbióticas y patógenas, tanto para las plantas como para los animales. Entre las patógenas se encuentra *R.equi*, siendo el que posee mayor potencial patógeno para los animales y el Hombre. Estudios taxonómicos actuales respaldados por estudios genómicos han sugerido que *R.equi* debería pertenecer a un género propio, *Prescottella*, pero esto aún está en debate. (Jones y col. 2013; Von Bargen y Haas, 2009)

Rhodococcus equi es una bacteria intracelular facultativa, es un patógeno primario del tracto respiratorio bajo de los potrillos, un saprófito facultativo del intestino de los equinos y un habitante del suelo. Presenta distribución mundial con una amplia diseminación en establecimientos de cría equina. Los herbívoros son portadores pasivos de *R.equi* en sus intestinos, y las cepas virulentas son capaces de colonizar el intestino de los potrillos y multiplicarse. Debido a esto, los potrillos infectados son considerados la principal fuente de infección diseminando grandes cantidades de *R.equi* virulento en sus heces hasta los 3 meses de vida. Bajo condiciones adecuadas *R.equi* puede multiplicarse en el suelo, particularmente en suelos con heces equinas que proveen ácidos orgánicos para el crecimiento. El crecimiento óptimo de *R.equi* es entre los 30°C y 37°C con un pH entre 8,5 y 10 y, puede sobrevivir en condiciones extremas de temperatura y pH durante 12 meses. El pH alcalino óptimo es similar al de la materia fecal. Igualmente, *R.equi* presenta la capacidad de codificar ureasas y amidasas que mediante la liberación de amoníaco favorecen el crecimiento en entornos ácidos. (Hines, 2013; Letek y col., 2010; Rusca Correa Porto y col., 2011).

R.equi es un cocobacilo gram positivo, inmóvil, no esporulado. A diferencia de los *Rhodococcus* del ambiente que son estrictamente aerobios, *R.equi* presenta una nitrato reductasa (NarGHIJ) y una reductasa de óxido nítrico (REQ03280) que potencialmente lo equipan para una respiración anaeróbica vía desnitrificación, útil para la sobrevivencia en entornos microaeróbicos. (Letek y col., 2010).

La neumonía por *R.equi* se reconoce mundialmente en potrillos menores a 6 meses de edad. Infrecuentemente causa infección en caballos adultos, siendo los casos reportados asociados a inmunosupresión. *R.equi* ha sido aislado de una variedad de especies incluyendo gatos, perros, suidos y vacunos pero la enfermedad clínica no es común y la infección suele ser localizada. Hoy en día se considera al *R.equi* un patógeno importante en Humanos inmunocomprometidos, particularmente aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En el Humano produce una neumonía similar a la tuberculosis con alta tasa de mortalidad. (Hines, 2013; Letek y col., 2010).

Los potrillos están expuestos a *R. equi* desde el nacimiento. La inhalación de partículas conteniendo *R. equi* virulento es la principal vía de infección pulmonar. A pesar que la ingestión es una vía común de exposición no resulta en enfermedad pulmonar. La ingestión de grandes cantidades de *R. equi* virulento puede resultar en linfadenitis mesentérica y tiflocolitis con multiplicación en la materia fecal del intestino contribuyendo a la diseminación en el ambiente. (Letek y col., 2010; Vázquez-Boland y col., 2010).

La incidencia y prevalencia de neumonía por *R. equi* es estacional, aumentando en primavera y verano. Esto se corresponde con la presencia de individuos susceptibles que se enfrentan a una mayor cantidad de patógenos en forma de aerosol. Según Muscatello (2012) la incidencia va en aumento, posiblemente por una intensificación en el manejo reproductivo y el cambio climático. (Muscatello, 2012; Dawson y col. 2010; Kanaly y col. 1995).

La prevalencia de la enfermedad clínica por *R. equi* es muy variable entre los Haras y varía año a año en el mismo establecimiento. Puede ser un problema endémico en algunos establecimientos, con incidencias de hasta 13 a 25% y mortalidad de hasta 50%. Sin embargo, puede ocurrir esporádicamente o nunca haber sido registrado en otros. Esto suele ser explicado por las diferencias en la densidad de animales, el manejo del establecimiento, factores ambientales y características del suelo. (Crowley y col., 2016; Carla Giles y col., 2016; Hines, 2013; Lazzari y col., 1997; Muscatello, 2012; Rusca Correa Porto y col., 2011).

4.2 Enfermedad clínica

Mediante el uso de la ultrasonografía se ha determinado que la forma más común de infección por *R. equi* es la abscedación pulmonar periférica o la consolidación pulmonar sin signos clínicos. La frecuencia acumulativa de los hallazgos ultrasonográficos excede la frecuencia acumulativa de la neumonía clínica en los establecimientos. Esto sugiere que muchos potrillos infectados se recuperan espontáneamente sin necesidad de tratamiento. La incidencia acumulativa de potrillos con abscesos pulmonares evidenciados por ultrasonografía en predios endémicos es de 29 a 64%, pudiendo llegar a 92%. En contraste, la incidencia acumulativa de la enfermedad clínica es de 5 a 25% en los Haras endémicos. (Giguère y col., 2011; Venner y col., 2012).

Cuando la enfermedad clínica se desarrolla suele ser de naturaleza insidiosa y ocurre en potrillos de 3 semanas a 6 meses de edad, siendo lo más usual antes de los 4 meses de edad. La enfermedad respiratoria es la que se observa con mayor frecuencia a pesar que otros sistemas también se afectan, tanto independiente como en conjunto a la enfermedad pulmonar. (Cohen, 2012a; Hines, 2013).

Los signos clínicos generales asociados a enfermedad por *R. equi* incluyen fiebre leve, letargia, pérdida de estado corporal y disminución del apetito. Si bien la enfermedad tiene un carácter crónico, una pequeña proporción de los potrillos desarrolla los síntomas de forma aguda y con mal pronóstico a pesar de un tratamiento intensivo. Estos potrillos son encontrados muy descompensados, con distrés respiratorio agudo, mucha fiebre o muertos. En la necropsia, esta forma aguda se caracteriza por una neumonía intersticial con lesiones miliares piogranulomatosas difusas en el pulmón. (Johns, 2013; Muscatello, 2012; Vázquez-Bolandab y col., 2013).

4.2.1 Enfermedad pulmonar

La manifestación más usual de la infección por *R. equi* es una bronconeumonía piogranulomatosa crónica con abscedación, asociada a linfadenitis supurativa (Figura 1). (Hines, 2013).

Los signos clínicos iniciales son inespecíficos e inconsistentes. Suele estar asociado a hipertermia, taquipnea, intolerancia al ejercicio y depresión, pudiendo o no, estar asociado a tos y descarga nasal. Con el progreso del cuadro clínico puede haber anorexia, decúbito, respiración abdominal y cianosis. (Rusca Correa Porto y col., 2011).

Las alteraciones en la auscultación son variables. Cuando se auscultan suele ser en la zona cráneo-ventral, pero no se correlaciona a la severidad de la neumonía. Cuando hay abscesos grandes o gran consolidación pulmonar los ruidos pueden estar disminuidos, al igual que cuando hay efusión pleural, pero esta última no ha sido relacionada a infección por *R. equi*. (Hines, 2013).



Figura 1. Necropsia de un potrillo con neumonía por *R. equi* muy avanzada. Se observa hepatización y extensa abscedación del pulmón. No se observan zonas de parénquima pulmonar normal. Fuente: Dani, 2013.

4.2.2 Desórdenes extra pulmonares (DEPs)

Se han asociado a la infección por *R. equi* una gran variedad de desórdenes extra-pulmonares (DEPs). Se desarrollan como sitios de infección extrapulmonar o como una consecuencia de reacciones inmunomediadas. (Cohen, 2012a; Hines, 2013).

La presencia de DEPs es usual. En un estudio el 74% de los casos presentó al menos un DEP. Pueden ocurrir de manera concomitante o independiente a la neumonía, ser únicos o múltiples y ser subclínicos o clínicos, pudiendo algunos ser la primera manifestación clínica de la infección por *R. equi*. (Cohen, 2012a).

La presencia de DEPs puede complicar y alargar el tratamiento y se ha asociado a un pronóstico más bajo. Un estudio reportó un 43% de sobrevivencia en casos que presentaban DEPs a diferencia de un 82% en casos que no los presentaban. Los signos clínicos en los casos de DEPs dependen del sistema afectado, al igual que su tratamiento. (Johns, 2013).

Entre las infecciones extra pulmonares, la enfermedad abdominal es la más común. Los cólicos y las diarreas son los signos predominantes cuando ésta se presenta, asociados a tiflocolitis ulcerativa por la ingesta de grandes cantidades de la bacteria. También se han reportado abscesos abdominales (los DEPs de peor pronóstico), peritonitis y adherencias. Algunos potrillos pueden desarrollar ascitis por la inflamación granulomatosa extensiva de la mucosa y submucosa del colon. En un estudio se observó que el 50% de los casos de bronconeumonía también presentaban lesiones intestinales, pero solo un 4% presentaba lesión abdominal sin bronconeumonía. Además se observó que de los que tenían lesiones abdominales sólo un 38% presentaba signos clínicos de enfermedad abdominal. (Hines, 2013; Rusca Correa Porto y col., 2011).

Entre los DEPs inmunomediados, la sinovitis aséptica ha sido documentada en aproximadamente un tercio de los casos de infección por *R. equi* y puede ser una manifestación temprana de la enfermedad. Se presenta como una efusión variable en una o más estructuras sinoviales sin claudicación o muy leve si existe. Típicamente son varias las articulaciones afectadas, tratándose de una polisinovitis aséptica. Las articulaciones más frecuentemente afectadas son la tarso-crural y fémoropatelar, seguidas por el carpo y el nudo. La patogenia de la polisinovitis no está clara, se cree que se da a consecuencia de la deposición de inmunocomplejos en las membranas articulares lo que conduce a una sinovitis reactiva. (Hines, 2013; Rusca Correa Porto y col., 2011).

La artritis y osteomielitis sépticas han sido observadas con mucho menos frecuencia. Se distinguen clínicamente de las sinovitis asépticas por el grado de claudicación y que varios casos se dan junto a una celulitis. Se han registrado casos de osteomielitis vertebral a causa de *R. equi*, los signos iniciales suelen ser inespecíficos y muchas veces el diagnóstico no se consigue hasta que la infección alcanza el espacio epidural y aparecen signos de compresión espinal o nerviosa como ataxia, parálisis o síndrome de cauda equina. (Hines, 2013).

En adición a las infecciones extrapulmonares ya mencionadas se han descrito linfadenopatías periféricas, abscesos en casi todos los tejidos incluyendo el cerebro, panofthalmitis, hipopión, pericarditis, endocarditis, nefritis, hepatitis, colangitis, empiema de bolsas guturales, miositis, sinusitis, estomatitis, onfalitis, pleuritis, piómetra, linfangitis, dermatitis y celulitis secundarias a heridas. Raras veces se aisló

del pulmón de fetos abortados, placenta y, del útero de yeguas infértiles. (Hines, 2013; Szeredi y col., 2006).

Han sido observados otros DEPs asociados a reacciones inmunomediadas. Las más reportadas luego de las sinovitis inmunomediadas son, las anemias hemolíticas inmunomediadas y las uveítis inmunomediadas. (Hines, 2013; Vázquez-Boland y col., 2013).

4.3 Patogenia y virulencia

Varios estudios utilizando la infección experimental de potrillos han revelado que la infección por la vía respiratoria es la que resulta en la enfermedad pulmonar, mientras que la inoculación intragástrica de grandes volúmenes de microorganismos no induce las típicas lesiones pulmonares. (Felippe Flaminio, 2010).

Una vez que el *R. equi* es inhalado es atrapado por células fagocíticas alveolares en el pulmón. La multiplicación de *R. equi* virulento ocurre en el macrófago dentro de la vacuola fagocítica. Durante el establecimiento de la infección la replicación de *R. equi* virulento resulta citotóxica y conduce a la muerte por necrosis de los macrófagos infectados, lo que desencadena una cascada de signos proinflamatorios. Se desarrolla una hiper celularidad donde los alvéolos y bronquiolos terminales se infiltran con neutrófilos, macrófagos y células gigantes que subsecuentemente progresa a la inflamación piogranulomatosa y necrosis con destrucción del parénquima pulmonar. Los *R. equi* virulentos comienzan a replicarse en los macrófagos de 6 a 12 hrs luego de la infección y afectan la viabilidad de los macrófagos a las 48 hrs posteriores. (Felippe Flaminio, 2010; Vázquez-Boland y col., 2013).

La infectividad del *R. equi* es restringida a las células de la línea monocito-macrófago. La estrategia para sobrevivir intracelularmente la poseen solamente las cepas virulentas de *R. equi* que lo logran interfiriendo en la maduración de los fagosomas en el macrófago. (Von Bargen y col., 2009).

La fagocitosis de los *R. equi* por los macrófagos se ve incrementada por el complemento e involucra el receptor Mac-1 (un receptor del complemento CR3). El lipoarabinomano (LAM), un componente de membrana del *R. equi*, puede unirse al receptor de manosa entrando al macrófago vía este receptor o, favorecer la deposición de la fracción C3b del complemento sobre la superficie celular y la entrada al macrófago mediante Mac-1. Estas vías de entrada esquivan la entrada mediante el receptor FcR y tienen un rol importante sobre la sobrevivencia del *R. equi* dentro del macrófago. Normalmente la entrada por el receptor FcR mediante la opsonización con anticuerpos específicos resulta en la activación del macrófago. Esta activación involucra la secreción de mediadores proinflamatorios, aumento de la fusión fagosoma-lisosoma y un aumento en la eliminación del *R. equi* intracelular mediante los intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno. (Garton y col., 2002; Vázquez-Boland y col., 2010)

El mecanismo de sobrevivencia intracelular del *R. equi* involucra la manipulación de la vía endosomal - lisosomal del macrófago (Figura 2). La replicación del *R. equi* ocurre dentro de una vacuola modificada (vacuola contenedora de *R. equi* [RCV]). La maduración temprana de la RCV es normal, presentando los típicos marcadores de endosomas tempranos. Sin embargo, la maduración a estados tardíos no presenta

todos los marcadores correspondientes a un endosoma tardío. Presenta LAMPs y Rab7 pero en ausencia de ATPasas vacuolares (bomba de protones vacuolares) y los marcadores lisosomales b-galactosidasa y catepsina D. Esto sugiere que el *R.equi* establece y mantiene una vacuola segura para su sobrevivencia y replicación previniendo que las RCV se acidifiquen (el pH se mantiene en 6,5) y se fusionen a los lisosomas.(Vázquez-Boland y col., 2010).

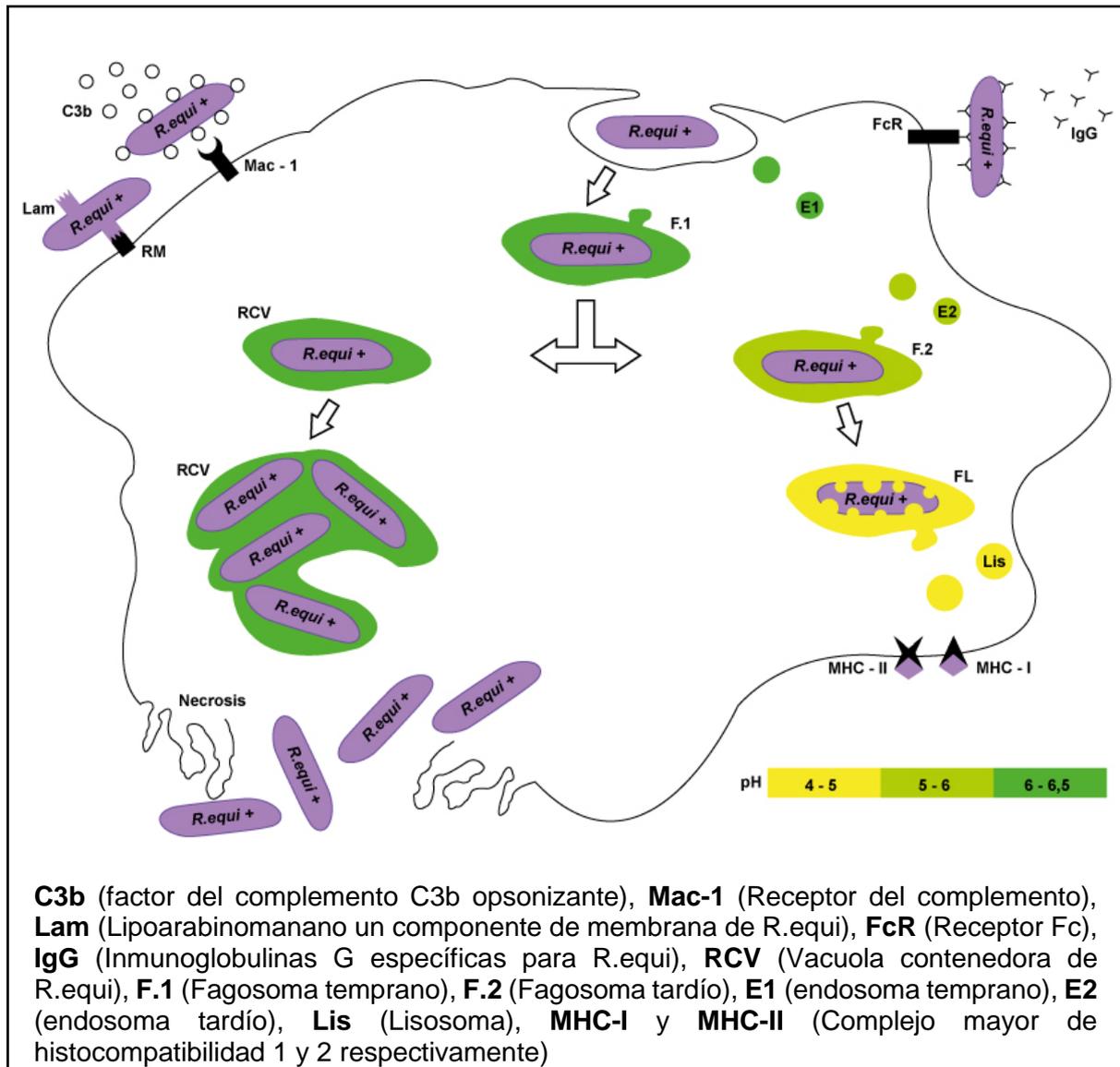


Figura 2. Esquema mostrando la tendencia en la maduración de las vacuolas fagocíticas en un macrófago según la vía de entrada del *R.equi* virulento. Lado izquierdo: Receptores mediante los que se favorece la multiplicación de los *R.equi* y la necrosis del macrófago. Lado derecho: Receptor mediante el cual se favorece la muerte de los *R.equi* y la presentación de antígenos. Datos adaptados de Vázquez-Boland y col., 2010 y Von Bargen y col. (2009).

Los mecanismos moleculares involucrados en la patogenia no se conocen en su totalidad. La habilidad de evitar la maduración del fagosoma y eventualmente matar la célula hospedera por necrosis, ha sido asociada a la presencia de una isla patogénica (PAI) localizada en un plásmido conjugativo grande de 80-90 kb aproximadamente. (Coulson y col., 2010; Takai y col., 1991).

La PAI codifica una familia de 7 proteínas asociadas a la virulencia (vap), entre otras proteínas, que son únicas del *R. equi*. Entre las vap, la vapA es la única localizada en la superficie celular y con un rol en la virulencia claro: evitar la maduración del fagosoma. La vap A es una lipoproteína de superficie muy inmunógena y su expresión es regulada por la combinación de signos del entorno, entre ellos la temperatura y el pH, siendo la expresión máxima entre 34-41°C con un pH de 5. Estas características sugieren que la expresión de VapA se ve favorecida en el ambiente intracelular del hospedador. Los aislados de bacterias a partir de potrillos infectados presentan el plásmido de la virulencia y expresan Vap A constantemente, pero no es así en los aislados de otras especies o cepas del ambiente. (Coulson y col., 2010; Kakuda y col., 2014; Vázquez-Bolandab y col., 2013; Von Bargen col., 2009; Wang y col., 2014).

Se conocen otras dos funciones de la PAI asociadas a la virulencia, la modulación del crecimiento intracelular por el gen “intracellular growth A” (IcgA) y la regulación de la expresión de genes cromosómicos y de la PAI por los reguladores transcripcionales “virulence región R” (virR) y “virulence región S” (virS). Estos tres genes junto a otros dos están bajo la regulación de un operón virR (virR- icgA- vapH- orf7-virS).(Coulson y col., 2015; Wang y col., 2014).

El gen IcgA codifica una proteína de transporte perteneciente a la superfamilia principal de transportadores facilitadores (MFS). Es inducida luego de la fagocitosis, dónde su expresión reduce la velocidad de crecimiento del *R. equi* dentro del macrófago. Esto resulta en un aumento de la viabilidad del macrófago permitiendo al *R. equi* vivir más tiempo dentro de él. La proteína de transporte IcgA es el primer factor identificado que afecta negativamente el crecimiento del *R. equi* dentro del macrófago y, la segunda proteína estructural conocida no reguladora (vapA fue la primera) codificada por la PAI que tiene un efecto directo sobre el crecimiento intracelular del *R. equi*. La eliminación de icgA resulta en un fenotipo hipervirulento. (Coulson y col., 2015; Wang y col., 2014).

Los virR y virS son reguladores transcripcionales codificados por la PAI que influyen sobre la expresión de genes de la PAI en respuesta a cambios en el entorno. Entre ellos la expresión de vapA, lo que explica parte de la atenuación en los mutantes con falta de virR o virS. Además se demostró que los virR y virS modifican el transcriptoma cromosómico de tal forma que alteran la fisiología del *R. equi* permitiéndole ser un parásito de los macrófagos. Esto implica cambios significativos en procesos de transporte, producción de energía y el metabolismo celular. De esta forma se demostró que existen factores asociados a la virulencia codificados por el cromosoma pero regulados por la PAI. Esto indica que el surgimiento de la virulencia fue un proceso gradual, iniciado por la adquisición de genes claves mediante el plásmido conjugativo conteniendo la PAI, seguido por la alteración en la expresión de patrones génicos cromosómicos, resultando en un ajuste de la fisiología de la bacteria de tal forma que le permite vivir intracelularmente.(Coulson y col., 2015).

4.4 Aspectos inmunológicos en el control de la infección por *Rhodococcus equi*.

El mecanismo inmunitario para la protección contra *R.equi* tiene implicaciones importantes para el control de la enfermedad y, todos los aspectos del sistema inmune están involucrados. (Hines, 2013).

Las respuestas inmunes de los neonatos y potrillos jóvenes son diferentes a las de los adultos. A pesar que los componentes del sistema inmune y sus mecanismos son similares, la regulación de la inmunidad y las respuestas a patógenos o vacunaciones son muy diferentes. Son varios los factores que influyen sobre esta diferente respuesta inmunológica. Entre estos factores podemos citar la falta de memoria inmunológica y, los perfiles de citoquinas diferentes a la mayoría de los patógenos y estímulos antigénicos comparado con los caballos adultos. Esta diferencia en la respuesta inmune muchas veces se ha interpretado como una inmunodeficiencia. Esto puede ser defendido si se compara la respuesta inmune de potrillos y caballos adultos a los mismos antígenos de forma cuantitativa. Sin embargo, esta respuesta inmunológica diferente se considera una estrategia de sobrevivencia y no un defecto. Los potrillos inmunológicamente vírgenes pero capaces, enfrentan desafíos donde deben diferenciar comensales de patógenos y tolerar o eliminar distintos antígenos. Para esto se requieren mecanismos regulatorios muy bien establecidos, con capacidad de controlar y balancear la respuesta inmune. Por esta razón el sistema inmune del potrillo se considera virgen pero no inmunodeficiente. (Perkins y Wagner, 2015).

Los potrillos están expuestos al *R.equi* desde el momento del nacimiento y la mayoría no enferman ya que son capaces de generar respuestas inmunes que los protegen de por vida. La capacidad de superar la infección por *R.equi* está muy influenciada por el nivel de exposición y la virulencia del microorganismo, pero la respuesta inmune del hospedador es crítica. (Felippe Flaminio, 2010).

La respuesta inmune exacta de los potrillos a la infección por *R.equi* no se conoce. Igualmente, se ha propuesto que el sistema inmune virgen del potrillo presenta algunos puntos clave que, en algunos casos, pueden limitar su habilidad para defenderse de la infección por *R.equi*. Paradójicamente, los *R.equi* virulentos desarrollaron el mecanismo para sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos donde logran evadir al sistema inmune. La replicación de los *R.equi* virulentos dentro de los macrófagos no activados es fundamental para la patogenia de la enfermedad, por lo que al mismo tiempo la activación de los macrófagos con la subsecuente muerte de los *Rhodococcus* es clave para el control de la infección. (Hines, 2013).

El potrillo neonato adquiere inmunoglobulinas, células T y citoquinas de su madre a través del calostro. Éstas son cruciales para la sobrevivencia de los potrillos en el período neonatal y probablemente ayuden al desarrollo del sistema inmune luego del nacimiento. (Perkins y Wagner, 2015).

4.4.1 Inmunidad humoral

Inicialmente, los potrillos deben obtener todos sus anticuerpos derivados maternos mediante la ingestión de calostro, esto es debido a la placenta de tipo epiteliocorial de los equinos. Esta transferencia pasiva tiene un rol crítico en la resistencia a agentes

infecciosos. La declinación de los anticuerpos maternos coincide con la típica edad a la que se diagnostica la neumonía por *R. equi*. Las Igs de origen calostroal presentan una vida media de 21-30 días. Por otro lado la seroconversión detectable de los potrillos comienza a partir de las 4-5 semanas de edad debido a la estimulación antigénica oral y no exclusivamente a la enfermedad. En base a esto se ha sugerido que, a pesar de no significar una protección absoluta, existe un rol protector por parte de los anticuerpos. (Dawson y col., 2010).

Se ha demostrado *in vitro* que la opsonización de los *R. equi* con inmunoglobulinas específicas promueve la fagocitosis de la bacteria e incrementa la actividad bactericida al estimular la formación de fagolisosomas. Además, la fagocitosis mediante el receptor FcR incrementa la activación del macrófago con la subsecuente producción de citoquinas. Mediante este mecanismo la protección conferida por los anticuerpos es útil en la exposición inicial a la bacteria, previo a ingresar al ambiente intracelular. (Dawson y col., 2011).

La producción endógena de inmunoglobulinas comienza en el útero y bajas cantidades de IgM e IgG_a se detectan en el plasma de los neonatos previo a la ingesta de calostro. Igualmente el sistema inmune ingenuo del potrillo requiere del soporte brindado por la madre. El perfil de los anticuerpos de los potrillos difiere del de los adultos (Figura 3). El plasma de los adultos contiene predominantemente IgG_{4/7} (80%) y concentraciones moderadas de IgG_{3/5} e IgG₁. Inicialmente, el perfil de Ig del potrillo se parece al del calostro con predominancia de IgG_{4/7}. Luego, la concentración total de Ig en el plasma declina a medida que las Ig maternas son utilizadas y degradadas. La vida media de las Igs maternas es de 18, 32 y 21 días para las IgG₁, IgG_{4/7} e IgG_{3/5} respectivamente. Cuando el total de Igs llega a un mínimo subsecuente comienza a incrementarse en consecuencia a la producción endógena de Igs. El isotipo producido predominantemente por los potrillos es IgG₁, a diferencia de los adultos que es IgG_{4/7}. La producción endógena de IgG_{4/7} es lenta durante el primer año de vida siendo detectable recién a partir de las 16-20 semanas de vida. La producción de IgG₁ es detectable a las 5 semanas y la de IgG_{3/5} e IgA es detectable entre las 6 y 8 semanas de vida. Igualmente, la concentración y los mecanismos inmunes (por ejemplo activación del complemento e interacción con el receptor FcR) de IgG₁ e IgG_{3/5} en los potrillos con IgG_{4/7} en los adultos se compensan. A pesar de la diferencia en los perfiles de Igs, la producción endógena de Igs en los potrillos permite comprobar la activación de células B pero el camino regulatorio que influye en este perfil diferente no se conoce. Se ha sugerido que la infección por *R. equi* ocurre en las primeras semanas de vida, de esta forma los anticuerpos adquiridos pasivamente brindan una protección inicial hasta que los potrillos comiencen a producir las inmunoglobulinas de forma endógena. (Lewis y col., 2008; Perkins y Wagner, 2015).

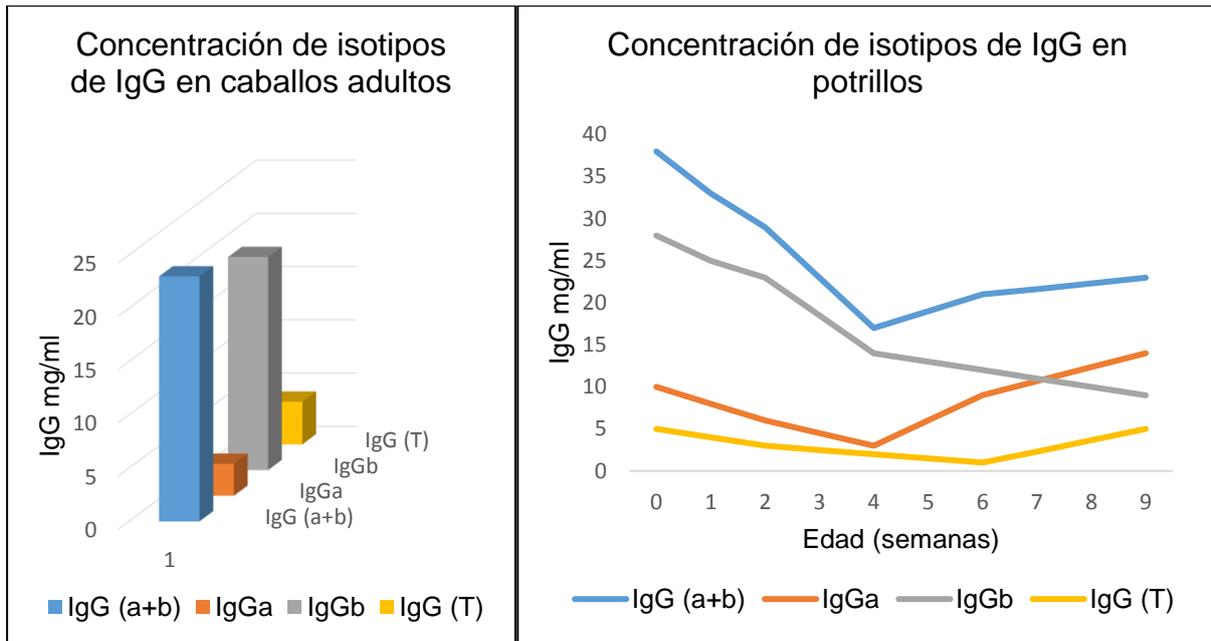


Figura 3. Concentración de los isotipos IgGa (IgG1/2), IgGb (IgG4/7) e IgG (T) (IgG3/5) en caballos adultos (izquierda) y potrillos hasta las 9 semanas de edad (derecha). Gráficas adaptadas de Lunn y Horohov (2004).

R. equi induce una fuerte respuesta inmune humoral en los potrillos. En condiciones naturales se detectan inmunoglobulinas específicas contra *R. equi* en todos los potrillos. La concentración de estas inmunoglobulinas se correlaciona con los cambios cuantitativos fecales de *R. equi*, lo que sugiere una estimulación antigénica oral. La mayoría de los anticuerpos específicos son contra las vap, en especial contra la vapA de superficie y la vapC secretora. La mayoría de los potrillos expuestos a *R. equi* desarrollan una respuesta humoral con anticuerpos contra vapA sin presentar signos de la enfermedad. Los potrillos con neumonía por *R. equi* inducida también producen niveles significativos de anticuerpos contra vapD y vapE. Esto puede deberse a la expresión alterada de vapD y vapE en las infecciones persistentes y puede estar asociado a la presencia y regulación de vapA. Por otro lado, esta diferencia también puede ser explicada por tratarse de antígenos poco inmunógenos y los anticuerpos contra estos aparecen luego de la infección persistente. (Hooper-McGrevy y col., 2003; Hooper-McGrevy y col., 2005).

Algunos estudios han propuesto que los potrillos clínicamente sanos y naturalmente expuestos a *R. equi* generan una respuesta humoral con predominancia del isotipo IgGa (IgG1/2). Por otro lado, también se ha propuesto que los potrillos con neumonía por *R. equi* tienden a presentar concentraciones más altas de IgG (T) (IgG3/5) comparado a los potrillos expuestos pero sanos. (Hooper-McGrevy y col., 2003; Jacks y Giguère, 2010; Sanz y col., 2015).

4.4.2 Inmunidad innata

La habilidad de las células del sistema inmune innato en controlar las infecciones primarias tiene un rol crítico en los potrillos inmunológicamente vírgenes. Los fagocitos

participan en las primeras etapas de la respuesta inmune eliminando los patógenos.(Felippe Flaminio, 2010).

Los neutrófilos son bactericidas para los *R.equi* opsonizados y son los primeros en reclutarse en los sitios de infección en respuesta a citoquinas y quimioquinas. La capacidad fagocítica de los neutrófilos de potrillos es comparable a la de los adultos pero se encontró que la capacidad opsonizante del suero de los potrillos es un factor limitante. El calostro posee factores opsonizantes y se ha demostrado que la capacidad fagocítica mejora luego de la ingestión de calostro. Se demostró *in vitro* que la actividad fagocítica y el estallido respiratorio de los fagocitos de los potrillos mejora al ser mezclado con plasma de adultos. Esto se le atribuye a factores opsonizantes como complemento, fibronectina e inmunoglobulinas provistos por el suero de adulto. Igualmente, en esos estudios se observó que los neutrófilos de algunos potrillos presentaban una eficiencia menor que el resto y se propuso que podría ser un factor en la susceptibilidad de algunos potrillos a la infección. Además de eliminar los patógenos, los neutrófilos pueden tener un efecto inmunomodulador en las vías aéreas al ser una fuente de citoquinas y quimioquinas. Se ha propuesto que la expresión de ciertas citoquinas por los neutrófilos está influenciada por la edad, lo que podría limitar la señalización y activación de células durante la infección por *R.equi*. A pesar de grandes cantidades de neutrófilos en las vías aéreas la infección en los potrillos puede continuar.(Felippe Flaminio, 2010).

Los macrófagos, a diferencia de los neutrófilos, no siempre logran eliminar los *R.equi* una vez fagocitados. Para que el macrófago consiga eliminar el *R.equi* necesita ser activado a macrófagos tipo 1 (mediante la vía clásica) y subsecuentemente producir citoquinas y otras moléculas reguladoras del sistema inmune. Como se mencionó anteriormente, la opsonización de los *R.equi* con anticuerpos específicos y su fagocitosis mediante el receptor FcR incrementa la capacidad bactericida y activación del macrófago. (Felippe Flaminio, 2010).

Los macrófagos también pueden activarse cuando los receptores de superficie (por ejemplo receptores tipo Toll [TLR]) reconocen estructuras altamente conservadas expresadas solamente por patógenos (patrones moleculares asociados a patógenos [PAMPs]). Los TLR-2 están implicados en el reconocimiento del *R.equi* y se ha demostrado que la vapA puede activar este receptor. Se ha reportado que los neonatos presentan una baja señalización de los TLR lo que podría suponer otro factor en la susceptibilidad a *R.equi*.(Felippe Flaminio, 2010).

Por otro lado la activación de los macrófagos es incrementada por ciertas citoquinas, en particular el IFN γ y el TNF α . Se ha propuesto que la activación de los macrófagos con IFN γ previo a la infección intracelular resulta en un efecto bactericida eficiente del *R.equi*. Estudios en ratones e *in vitro* han demostrado la importancia del IFN γ en las infecciones por *R.equi*. Se ha propuesto que bajos niveles de IFN γ en los potrillos puede ser un factor más en la susceptibilidad al *R.equi*. Sin embargo, se ha observado gran producción de estas citoquinas en potrillos infectados con *R.equi*. Los macrófagos inactivados no logran evitar la replicación del *R.equi* intracelular pero, la infección de éstos induce la secreción de citoquinas. Un estudio reportó que la infección por *R.equi* puede influir en el tipo de citoquinas producidas y subsecuentemente en la producción de IFN γ en los pulmones. Se ha propuesto que la respuesta de citoquinas está influenciado por la dosis de antígeno, dónde frente a un menor inóculo generan una mayor razón IFN γ /IL-4.(Giguère y col., 1999; Jacks y Giguère, 2010).

La respuesta inmune de tipo Th1 con producción de IFN γ y el desarrollo de células T citotóxicas (CTLs) específicas para *R. equi* derivan de una buena presentación de antígenos y signos co-estimuladores. Los macrófagos y células dendríticas forman el grupo de células presentadoras de antígenos (APC). Éstas procesan los antígenos y se los presentan a los CD4+ (Th0) mediante la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II) y a los CD8+ mediante el MHC-I juntos a otros signos co-estimuladores (por ejemplo IL-12). La expresión de MHC-II y MHC-I es reducido en las APC de los potrillos menores a 3 meses de edad pudiendo incrementar la susceptibilidad a infecciones por una baja presentación de antígenos a los linfocitos T. Sin embargo, las células de sistema inmune innato de potrillo, como las células dendríticas, responden a la infección por *R. equi* con un mayor incremento en la expresión de ARNm para IL-12 comparado a los adultos. (Dawson y col., 2010; Felipe Flaminio y col., 2009)

4.4.3 Inmunidad adquirida mediada por células

En infecciones de bacterias intracelulares se requiere de una respuesta inmune de tipo Th1. Este tipo de respuesta incrementa las células inflamatorias y recluta linfocitos CD4+ y CD8+ (linfocitos citotóxicos [CTL]) para reconocer y eliminar los macrófagos infectados. (Dawson y col., 2010)

El tipo de respuesta inmune depende en gran medida de las citoquinas circundantes. Por ejemplo, la IL-12 estimula a los linfocitos CD4+ (Th0) a diferenciarse en Th1. Esta citoquina es producida por los neutrófilos, macrófagos y células dendríticas activadas y se la considera importante en la eliminación de la infección por *R. equi*. Una vez que los linfocitos se diferencian en una dirección ésta suele persistir debido a que las citoquinas producidas por el subtipo de Th inhiben el desarrollo en otra dirección. (Dawson y col., 2010)

La expresión de citoquinas en los potrillos difiere de la de los adultos al menos hasta los tres meses de edad. A pesar de la cuantitativamente reducida expresión de citoquinas comparado a los adultos, los potrillos tienen tendencia a una respuesta inmune de tipo Th1. Las respuestas tipo Th2 apenas son detectables por un período extendido luego del nacimiento. La producción de IFN γ por los Th1, CTLs y NK es detectable a los pocos días de vida y va incrementado gradualmente con la edad. A diferencia, la producción de IL-4 por los Th2 es prácticamente indetectable durante los primeros tres meses de vida. La concentración de IL-4 detectada en los primeros días de vida es producida principalmente por basófilos. En los animales adultos, la activación de las células B es principalmente vía Th2. Los potrillos producen gran cantidad de IgG1 e IgG3/5 desde una edad temprana a pesar de la falta virtual de una respuesta Th2. Esto lleva a suponer que existen caminos independientes a Th2 (vías alternativas) que son importantes en la producción de IgG en los potrillos. (Perkins y Wagner, 2015).

Actualmente existe cierta controversia sobre las respuestas inmunes de los potrillos. Algunos autores proponen que los potrillos tienen una tendencia a las respuestas inmunes de tipo Th2. Probablemente esto haya sido extrapolado de estudios en ratones, quienes sí tienen una tendencia Th2. A diferencia, estudios en neonatos humanos han mostrado que tienen una tendencia Th1 o Th0 pero no Th2. En un estudio por Wagner y col. (2010) se compararon las respuestas Th1 y Th2 en potrillos

evaluando el IFN γ e IL-4 intracelular y no sólo mediante la concentración total de citoquinas en plasma. Este estudio mostró que los potrillos tienen una respuesta Th2 poco precisa y tienen tendencia a la respuesta Th1. Los estudios que han establecido el concepto sobre la tendencia inmune Th2 en los potrillos lo han concluido a partir de la medición del total de citoquinas sin tener en cuenta el origen de éstas. (Perkins y Wagner, 2015; Wagner y col., 2010).

Respaldando el concepto de la tendencia Th1 de los potrillos, Perkins y col. (2014) realizaron un estudio donde demuestran una diferencia entre la composición de células y el perfil de inducción de citoquinas en el calostro de las yeguas comparado a las células de la sangre periférica de la yegua al momento del parto. Esta diferencia muestra que existe una selección en la transferencia de células al calostro y es predominante para Th1, Th17 y CTLs. En base a esto, sugieren que las células T maternas transferidas pueden tener un rol importante en la inmunidad pasiva de los potrillos y que puede ser un factor en la tendencia a una respuesta de tipo Th1 en los neonatos.(Perkins y col., 2014).

A pesar de la tendencia de la respuesta inmune tipo Th1 y que la mayoría de los potrillos son sanos, éstos presentan una susceptibilidad particular a la infección por *R.equi*. Está demostrado una menor producción de IFN γ por los potrillos comparado a los adultos y se ha propuesto como un factor de susceptibilidad a *R.equi*. Sin embargo, la expresión de IFN γ incrementa en la infección por *R.equi* en potrillos y adultos.(Dawson y col., 2010).

Se ha resaltado la importancia de la inmunidad pulmonar compartimentalizada. Un estudio por Giguère y col. (1999) sugiere que la infección de los potrillos con *R.equi* virulento estimula la expresión de ARNm para citoquinas inflamatorias en el pulmón e inhibe la expresión de ARNm para INF γ en las células CD4+ del pulmón comparado a controles con *R.equi* avirulento. (Giguère y col., 1999).

Existen más diferencias asociadas a la edad, propuestas como factores para la susceptibilidad de los potrillos a la neumonía por *R.equi*. Sin embargo, a pesar de todas las diferencias propuestas, la mayoría de los potrillos son capaces de montar respuestas inmunes satisfactorias y no desarrollar la enfermedad clínica luego de la exposición. Actualmente las bases de la susceptibilidad asociada a la edad no están claras pero es muy probable que sea multifactorial. Mcqueen y col. (2014) reportaron que puede existir un trasfondo genético en el desarrollo de la enfermedad clínica pero esto aún no ha sido comprobado.(Mcqueen y col., 2014).

4.5 Diagnóstico

El diagnóstico temprano de la infección es muy importante porque *R.equi* no responde a los antimicrobianos comúnmente utilizados para otro tipo de neumonías y, comenzar el tratamiento adecuado lo antes posible mejora el pronóstico. (Rusca Correa Porto y col., 2011).

La baja velocidad de diseminación de la enfermedad junto a la gran capacidad de los potrillos para compensar la pérdida progresiva de los pulmones hace que los signos iniciales sean muy sutiles y dificulten el diagnóstico temprano. (Cohen, 2012a).

La observación diaria de los animales ayuda a detectar pequeños cambios comportamentales indicando la necesidad de exámenes complementarios. El hecho

que se haya diagnosticado la enfermedad en otro potrillo del establecimiento y que se trate de un animal menor a 6 meses implica tener en cuenta la posibilidad de infección por *R.equi*. (Rusca Correa Porto y col., 2011).

Entre los exámenes complementarios más utilizados se encuentran la imagenología, los análisis sanguíneos, el PCR, la citología y el cultivo del microorganismo. Cualquiera de esos debe utilizarse teniendo en cuenta la sintomatología clínica, la epidemiología y si es posible utilizarlos en conjunto (Cohen, 2012a).

La imagenología permite revelar anomalías en el parénquima pulmonar o en el abdomen. La ultrasonografía (US) torácica es la que tiende a ser más utilizada por su practicidad y fácil acceso en el campo. Permite observar lesiones en la periferia, y resulta útil ya que se ha demostrado que casi todos los animales con enfermedad pulmonar presentan lesiones a este nivel. La US no debe ser utilizada como diagnóstico definitivo ya que otros agentes patógenos pueden causar abscesos similares, como el *streptococcus zooepidermicus* principalmente en portillos mayores a 3 meses de edad. (Hines, 2013; Rusca Correa Porto y col., 2011).

El conteo de células sanguíneas, concentración de fibrinógeno y la bioquímica sanguínea aportan información sobre la presencia de inflamación pero estas son inespecíficas. La hiperfibrinogenemia es el hallazgo más consistente aunque hay casos que pueden mantener valores normales. La leucocitosis neutrofílica con o sin monocitosis también es común. La trombocitosis e hiperglobulinemia han sido reportados asociados a infecciones por *R.equi*. (Hines, 2013; Rusca Correa Porto y col., 2011).

Valores de fibrinógeno por encima de 700mg/dl junto a un conteo de células blancas superiores a 20.000 cel./microlitro y la observación de abscesos en la ecografía pulmonar es más probable en la infección por *R.equi* que en neumonías por otros agentes etiológicos. (Hines, 2013).

El PCR y el cultivo bacteriológico (figura 4) revelan la presencia del microorganismo, pero esto no siempre significa que sea el agente causal de la enfermedad. Las muestras se pueden obtener de aspirados traqueobronquiales u otros sitios si se trata de DEPs. El cultivo permite además identificar si existen otros patógenos concurrentes en la infección y mediante el antibiograma evaluar la sensibilidad a los antimicrobianos. El PCR permite la detección de *R.equi* de forma muy sensible aunque exista una infección concurrente, por lo que utilizar el PCR junto al cultivo es de gran utilidad. La citología ayuda a confirmar si la presencia del microorganismo se corresponde con una inflamación concurrente en el tracto respiratorio lo que permitiría realizar el diagnóstico definitivo. (Hines, 2013; Johns, 2013).

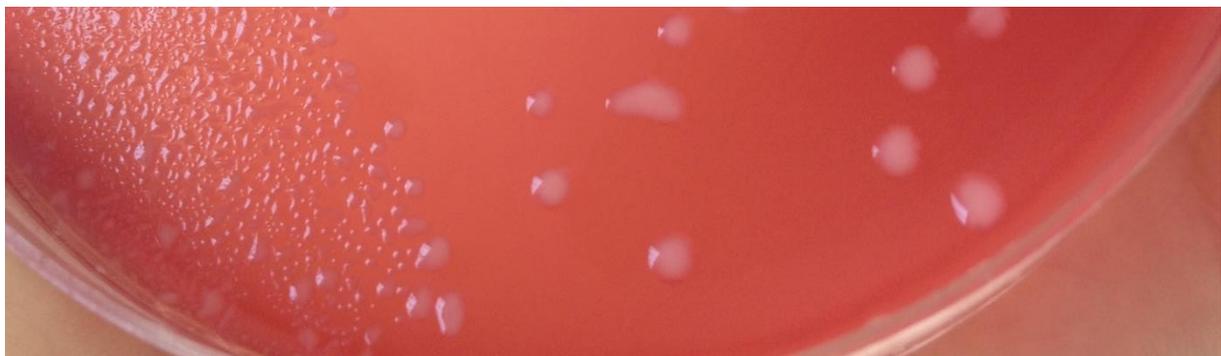


Figura 4. Cultivo puro de *R.equi*. Se observan colonias irregulares, semitransparentes, brillantes y muy mucosas.

4.6 Tratamiento y pronóstico

R. equi es sensible a una gran cantidad de antimicrobianos *in vitro*, pero son muy pocos los que resultan efectivos *in vivo*. Esta falta de correlación se debe principalmente a que *R. equi* es un patógeno intracelular que causa inflamaciones piogranulomatosas y por lo tanto es necesario que los antimicrobianos, además de ser efectivos contra *R. equi*, tengan buena penetración de tejidos y macrófagos y, funcionen en un entorno relativamente ácido. (Cohen, 2012b; Hines, 2013).

En la década del 80 se comenzó a utilizar la combinación de eritromicina, un macrólido, junto a rifampicina, una rifamicina, lo que logró reducir drásticamente la mortalidad de los potrillos a causa de la infección por *R. equi*. El éxito de sobrevivencia aumentó de aproximadamente 20 - 30% a 60 - 90%. Actualmente la azitromicina y la claritromicina, macrólidos de generación más nueva, han remplazado a la eritromicina. (Giguère y col., 2011; Hines, 2013; Rusca Correa Porto y col., 2011)

La rifampicina y los macrólidos son antibióticos bacteriostáticos, que a altas concentraciones pueden tener efectos bactericidas. Tienen las características de ser liposolubles, capaces de penetrar las células y concentrarse en granulocitos y macrófagos. La combinación de ambas drogas se hace en base a que funcionan sinérgicamente y a que ayuda a evitar el desarrollo de resistencia bacteriana, proceso que sería más rápido utilizándolas como monodroga. No obstante, existe un estudio donde se demostró que la rifampicina disminuye la concentración de claritromicina y potencialmente otros macrólidos en el plasma, el tejido pulmonar y las células bronquioalveolares. (Giguère y col., 2011; Hines, 2013)

DROGA	VÍA	DOSIS
Eritromicina	oral	25mg/kg c/6-8hrs o 37,5mg/kg c/12hrs.
Claritromicina	oral	7,5mg/kg c/12hrs.
Azitromicina	oral	10mg/kg c/24hrs por 5 días y luego continuar c/48hrs.
Rifampicina	oral	5-10mg/kg c/12 hrs o 10mg/kg c/24hrs.

Tabla 1. Antibióticos frecuentemente utilizados para tratar la infección por *R. equi* en potrillos. Datos adaptados de Cohen, 2012b; Giguère y col., 2011.

El tratamiento es largo, de 3 a 12 semanas normalmente, que se define a través del monitoreo del paciente teniendo en cuenta la resolución de la sintomatología, la desaparición de las lesiones ultrasonográficas y la concentración de fibrinógeno en valores normales. (Cohen, 2012b; Hines, 2013).

La claritromicina y la azitromicina presentan mayor biodisponibilidad oral, logran mayor concentración en el parénquima pulmonar y presentan menor incidencia de efectos secundarios que la eritromicina. Un estudio comparando los tres macrólidos, cada uno administrado junto a rifampicina, mostró que la claritromicina es la que tiene mejores resultados en el tiempo de recuperación. También se observó que la azitromicina no se diferencia a la eritromicina en el tiempo de recuperación pero tiene la ventaja de administrarse una sola vez al día. (Hines, 2013).

Se han propuesto otros macrólidos como la tulatromicina, tilmicosina y gamitromicina de uso inyectable cada siete días, lo que los hace muy tentadores para su uso en la clínica. Para los dos primeros existen investigaciones que descartan su utilidad para

infecciones por *R. equi* debido a una recuperación significativamente más lenta del paciente comparado con los macrólidos orales. La gamitromicina, en cambio, todavía está en estudio y hasta el momento parecería tener buenos resultados para tratar los casos de neumonía por *R. equi*. La dosificación recomendada de la gamitromicina es de 6 mg/kg intramuscular cada 7 días. (Cohen, 2012b).

A nivel mundial existen varios reportes de cepas resistentes a los macrólidos, tanto en animales como en humanos. Hasta donde sabe el autor en Uruguay todavía no hay ningún estudio que documente tal resistencia. En el 2014 en Santa María, Brasil, se realizó un estudio con cepas de la zona que reporta cierta resistencia a la eritromicina pero gran sensibilidad a los demás macrólidos. Se ha reportado que en los últimos años el desarrollo de resistencia bacteriana se ha visto favorecido por tratar masivamente a todos los animales con lesiones ultrasonográficas a pesar de no presentar enfermedad clínica. (Gressler y col., 2015; Rusca Correa Porto y col., 2011).

Respecto a los efectos secundarios al uso de los macrólidos, las diarreas leves y la hipertermia son los más comunes. Si la diarrea es muy severa se recomienda cortar el tratamiento, estabilizar al animal y algunos autores recomiendan el uso de probióticos. La hipertermia suele resolverse trasladando al animal a un lugar fresco. En las yeguas madre, que eventualmente ingieren los antimicrobianos, puede causar una colitis que normalmente se resuelve espontáneamente. (Cohen, 2012b; Hines, 2013).

Se debe tener en cuenta que además de la antibióticoterapia muchas veces se requiere proveer un tratamiento adicional que asegure mantener una buena nutrición, hidratación y ventilación del animal. Si es necesario, se puede administrar AINES para mantener la temperatura en rangos normales y estimular el apetito. Algunos autores recomiendan la suplementación con ácidos grasos ya que se ha visto que estos estimulan la fagocitosis por parte de los macrófagos. Respecto al uso de broncodilatadores se ha visto que no aportan ningún beneficio extra. (Hines, 2013).

Los casos de DEPs infecciosos deben ser tratados con los mismos antibióticos que para la neumonía aunque las terapias locales son consideradas en algunos casos. Por ejemplo, lavajes articulares en artritis sépticas o desbridamiento quirúrgico en la osteomielitis. (Giguère y col., 2011; Johns, 2013).

Los potrillos con sinovitis aséptica normalmente no necesitan un tratamiento específico y la efusión desaparece al resolverse la infección pulmonar. El ejercicio limitado pero no eliminado ayuda a disminuir la inflamación. (Giguère y col., 2011; Johns, 2013).

Los potrillos con uveítis o anemia hemolítica inmunomediada necesitan un tratamiento específico. La atropina y los corticoides tópicos junto a AINES son adecuados para las uveítis siempre que no haya úlcera de córnea. Los corticoides sistémicos son el tratamiento ideal para la anemia hemolítica, pero su uso puede interferir con la respuesta inmune frente a la infección bacteriana. De todas formas se indican los corticoides en los casos graves junto a transfusiones sanguíneas. (Johns, 2013).

Con las terapias antimicrobianas disponibles al día de hoy la sobrevivencia de los potrillos con neumonía por *R. equi* varía de un 60 a 70% en los hospitales a donde generalmente llegan los casos más graves. En los establecimientos se logran sobrevivencias del 70 a 90%, llegando a un 100% en aquellos lugares donde se emplean programas de monitoreo para detectar la enfermedad temprana. En general

el pronóstico es más desfavorable en los casos con abscesos abdominales y osteomielitis. (Hines, 2013).

Muchos estudios han intentado evaluar los efectos a largo plazo de la función pulmonar y la performance atlética. Un estudio reportó que no existe impacto sobre la posibilidad y la edad de comenzar a correr, pero si se observaron resultados negativos respecto a la longevidad de la carrera deportiva y la posibilidad de ser “grandes corredores”. De todas formas todavía no está claro el rol que juega la neumonía por *R. equi* en el potrillo con respecto a su futuro deportivo. (Hines, 2013; Treloar y col., 2012) .

4.7 Control y prevención

Las medidas de control y prevención de la neumonía por *R. equi* son ampliamente utilizadas en los Haras donde la enfermedad se presenta de forma endémica. Consisten en identificar de forma temprana los potrillos infectados y disminuir el riesgo de infección de los potrillos. (Johns, 2013).

4.7.1 Monitoreo para identificar los infectados de forma temprana

La neumonía que produce el *R. equi* es de naturaleza insidiosa, donde los signos clínicos suelen aparecer cuando los cambios patológicos ya son muy avanzados y su evolución puede ser devastadora. Debido a esto la detección temprana de potrillos infectados se ha vuelto una práctica de rutina en muchos Haras con enfermedad endémica. (Cohen, 2012c; Johns, 2013).

Se han descrito una gran variedad de métodos de monitoreo con el fin de detectar la enfermedad en sus comienzos y lograr un mejor pronóstico. Estos incluyen la observación diaria de los potrillos, el examen clínico regular, la medición de parámetros hematológicos y serológicos y, la imagenología. (Johns, 2013)

La observación diaria de los potrillos ayuda a detectar sutiles cambios comportamentales y cambios en el estado general del potrillo. El examen clínico regular en busca de signos de neumonía o DEPs y la medición de la temperatura rectal puede ayudar a detectar animales enfermos de forma temprana. (Cohen, 2012c).

La ultrasonografía torácica es un método de monitoreo accesible (Figura 5). A pesar de esto, el uso de la ultrasonografía como método de monitoreo ha identificado lesiones hasta en el 80 a 92% de los potrillos en los Haras donde la enfermedad es endémica. Sin embargo, el porcentaje de estos potrillos que llega a desarrollar la enfermedad clínica sin tratamiento es considerablemente más baja. Se han reportado estudios donde sólo el 21% de los potrillos con lesiones ultrasonográficas desarrollan neumonía. Debido a que un alto porcentaje de los potrillos resuelve la infección espontáneamente, la identificación de lesión ultrasonográfica no debe ser utilizada por sí sola como una razón para iniciar la terapia con antibióticos. Se han desarrollado sistemas de graduación para cuantificar la severidad de las lesiones e intentar determinar qué animales necesitan tratamiento. A pesar de esto, existen algunas desventajas en este método de monitoreo. La necesidad de realizar las

ultrasonografías en una forma seriada aumenta la mano de obra y el costo total para el establecimiento. Los potrillos son expuestos a un manejo más intenso repetitivamente lo que puede incrementarles el estrés y la susceptibilidad a enfermedades. Además el número de potrillos tratados con antimicrobianos por neumonía presuntiva aumenta. Por otro lado la ultrasonografía es útil como monitoreo de los tratamientos y es de gran utilidad para definir el fin de la antibióticoterapia. (Cohen, 2012c; Slovis y col. 2005).

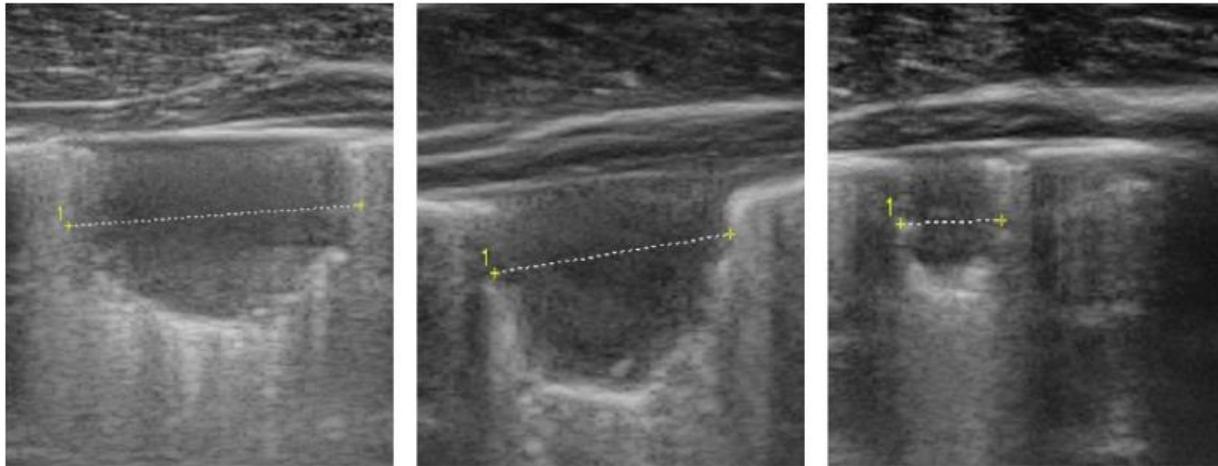


Figura 5. Ecografías torácicas observándose abscesos pulmonares de diferentes diámetros. Fuente: Sanz, 2013.

La medición de la concentración de fibrinógeno por sí solo es poco sensible e inespecífico. Según un estudio realizado por Giguère y col. (2003) la medición de la concentración de células blancas puede ser utilizado como método de monitoreo con sensibilidad y especificidad razonable cuando existen conteos mayores a 15.000 células blancas / μl . (Johns, 2013).

La medición de la concentración sérica del total de anticuerpos específicos contra *R. equi* no es útil como método de monitoreo. Recientemente un estudio demostró que la concentración sérica individual de los isotipos de IgG contra la vapA no son útiles como predictores de enfermedad, excepto por IgG (T). Esto es debido a la presencia de los anticuerpos por exposición y no exclusivamente enfermedad. Este estudio propone que las IgG (T) específicas contra vapA podrían tener buena sensibilidad y especificidad en los potrillos enfermos pero aún no está demostrado. (Cohen, 2012c; Sanz y col., 2015).

Recientemente, y aún no publicado, Crowley y col. (2016) proponen el uso potencial del estrés oxidativo como un biomarcador en el diagnóstico de la neumonía por *R. equi* e incluso como un identificador de potrillos en riesgo al nacimiento. (Crowley y col., 2016).

A pesar de los diferentes métodos de monitoreo descritos, todos ellos tienen sus limitaciones. Los programas de monitoreo y las medidas tomadas frente a los casos "positivos" deben ser adaptados a cada Haras según su historia de morbilidad y mortalidad de la infección por *R. equi*, los recursos disponibles y, la habilidad de cambiar el manejo según los resultados del programa. (Johns, 2013).

4.7.2 Manejo del entorno

Respecto al manejo en los Haras se han investigado varias estrategias preventivas con el fin de minimizar la carga bacteriana y de evitar la aerosolización de los microorganismos. (Johns, 2013).

La densidad de caballos, particularmente yeguas con sus potrillos, aumenta el riesgo de neumonía por *R.equi*. Los esfuerzos para lograr disminuir la carga de animales por hectárea deberían ser considerados en Haras donde existe una alta concentración de animales y la enfermedad se presenta de forma endémica. El hecho de mantener separados los lotes de animales residentes de los transitorios ayuda a disminuir la transmisión. (Cohen y col., 2002).

Las heces equinas son un excelente sustrato para la multiplicación de *R.equi*, especialmente debido a que son ricas en ácidos grasos volátiles por lo que se ha considerado como medida de control remover las heces de los potreros y parideras. Sin embargo, esto no ha demostrado tener un impacto en la reducción de la incidencia de la enfermedad. La infección por *R.equi* puede ocurrir desde el día del nacimiento, y se ha demostrado que los potrillos que nacen a campo tienen menos probabilidad de desarrollar neumonía que aquellos que nacen en box. (Giguère y col., 2011; Hines, 2013)

Varios autores recomiendan el aislamiento de los potrillos enfermos para disminuir la contaminación del suelo. Se ha demostrado que los potrillos enfermos tienen una mayor concentración del microorganismo en sus heces respecto a los potrillos sanos. De todas formas no se ha observado una disminución en la incidencia de la enfermedad con el uso de esta medida. (Giguère y col., 2011; Johns, 2013; Madrigal y col., 2016).

Evitar la aerosolización del microorganismo es de gran importancia debido a que la inhalación es la principal vía de infección. La concentración de *R.equi* en el aire inspirado ha sido correlacionada con la incidencia de la enfermedad en un estudio en Australia. Los factores asociados a una mayor concentración de *R.equi* en el aire incluyen temperaturas ambientales altas, baja humedad del suelo, escasa cobertura de pasto y mayor concentración de animales. Lograr una buena cobertura de pasto en los potreros donde residen los potrillos ayuda a evitar la aerosolización de la bacteria. Para controlar el polvo en los piquetes se ha propuesto humedecer el suelo. (Giguère y col., 2011; Muscatello y col., 2006).

4.7.3 Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis con maltolato de galio (GaM) ha sido sugerida como otra herramienta para la prevención. El ion férrico (Fe^{3+}) es esencial para el crecimiento de la mayoría de los microorganismos, incluyendo el *R.equi*. El secuestro de hierro por proteínas del hospedador como la transferrina, lactoferrina y ferritina son mecanismos de defensa innata que limitan el acceso de los microorganismos al hierro. Sin embargo, *R.equi* tiene la capacidad de usar el Fe unido a las proteínas, de forma tal que esquivando este mecanismo de defensa. El galio es un semimetal trivalente, químicamente similar al ion férrico, que se une a la transferrina en los lugares de unión del hierro. La bacteria lo adquiere en lugar del hierro, pero este no es reducible a una

forma divalente en condiciones fisiológicas y por lo tanto no puede ser usado en las vías metabólicas. Además es preferentemente tomado por los fagocitos mononucleares en zonas de inflamación, lo cual logra una gran concentración en los tejidos infectados, sin necesidad de altas concentraciones sanguíneas. El GaM se ha administrado de forma segura a potrillos vía oral y se ha demostrado que alcanza concentraciones antimicrobianas a una dosis de 20-30 mg/kg. Se demostró *in vitro* que el GaM reduce significativamente la concentración de *R.equi* intracelular. Sin embargo, un estudio en un Haras con historia de la enfermedad endémica no mostró una diferencia significativa en el número de potrillos enfermos entre grupos a los que se les administró GaM oral y a los que se les administró placebo. Otros estudios se han enfocado en el tratamiento de las yeguas periparturientas con GaM donde la concentración de *R.equi* en las heces fue significativamente menor, pero no se observó una disminución en la concentración de la bacteria en el aire. (Johns, 2013; Martens y col., 2007).

Estudios recientes han propuesto el uso del GaM como tratamiento alternativo a los macrólidos para potrillos que presentan lesiones pulmonares relativamente pequeñas. Su efectividad aún no ha sido comprobada pero la posibilidad de poder utilizar otros antimicrobianos es de gran interés para disminuir la velocidad de desarrollo de resistencia a los macrólidos. (Cohen y col., 2015).

4.7.4 No utilizar antibióticos como profilaxis

El uso masivo de antibióticos como profilaxis en los potrillos de establecimientos afectados endémicamente no es recomendado debido a las altas probabilidades de desarrollar resistencia bacteriana. En un establecimiento se reportó un incremento en la resistencia del 25% previo al tratamiento a un 62% post tratamiento. Además otros estudios han cuestionado la eficacia de los antibióticos como preventivos y se ha visto que su uso no altera la proporción de enfermos. (Johns, 2013; Venner y col., 2013).

4.7.5 Inmunización activa del potrillo

Se ha demostrado la importancia de respuestas inmunes tanto mediadas por células como humorales para combatir la infección por *R.equi*. La vacunación de los potrillos es la que lograría estimular la inmunidad mediada por células. Esta debería ser administrada a edad muy temprana y producir un efecto protector rápido debido a que los potrillos se pueden infectar desde los primeros días de vida. (Dawson y col., 2010; Johns, 2013).

Una vacuna efectiva necesita estimular la producción de células de memoria en los nódulos linfáticos regionales que rápidamente pueda expandir a la zona afectada una respuesta promoviendo la producción de citoquinas tipo 1. Ha sido demostrado que los potrillos menores a 3 semanas de edad logran establecer respuestas inmunes protectoras contra *R.equi*, por lo que dado una correcta estimulación los potrillos pueden producir una respuesta inmune protectora frente a una vacuna. (Giles y col., 2014).

Hasta el momento no se ha logrado una vacuna comercial efectiva que proteja a los potrillos de la infección por *R.equi*. Se han intentado desarrollar vacunas vivas, muertas y físicamente atenuadas mediante los métodos convencionales pero no han sido exitosas. (Bordin y col., 2014; Giles y col., 2016). El único método de inmunización activa comprobado en proteger a los potrillos contra la infección intrabronquial con *R.equi* virulento es la administración oral de *R.equi* virulento vivo. A pesar de esto, la administración de organismos virulentos vivos como vacuna no es admisible por razones de seguridad ambiental y para los potrillos, pero esto es alentador para continuar con el intento de desarrollar una vacuna comercial efectiva. (Chirino-Trejo y col., 1987; Hooper-Mcgrevy y col. 2005) .

Las vacunas modernas con ingeniería molecular, por ejemplo vacunas conteniendo subunidades, ADN, o genéticamente atenuadas han demostrado cierto potencial, sin embargo hasta el momento no se ha logrado que confieran la protección requerida. Las vacunas utilizando vectores portando el gen vapA están siendo probados y han dado buenos resultados en roedores pero aún deben ser estudiados en potrillos. Se demostró que el *R.equi* inactivado por irradiación y estructuralmente intacto es inmunogénico cuando es administrado oralmente, pero los regímenes de vacunación en potrillos evaluados hasta el momento no han sido suficientemente inmunogénicos. Regímenes de dosis y vías alternativas necesitan más investigación. (Bordin y col., 2014; Carla Giles y col., 2016; Rocha y col., 2016).

4.7.6 Inmunización pasiva del potrillo

Los anticuerpos son importantes en las etapas iniciales de la infección pero su presencia no significa que exista una protección absoluta. Algunos mecanismos mediante los que los anticuerpos contribuyen a la inmunidad incluyen bloquear las etapas iniciales de infección celular, alterar la ruta por la que el *R.equi* ingresa al macrófago y disminuir la habilidad del *R.equi* de evitar la maduración del fagosoma. Varios hechos evidencian el rol de los anticuerpos: 1. La edad a la que suele aparecer la enfermedad clínica coincide con la ventana inmunitaria. 2. los anticuerpos contra *R.equi* tienen amplia distribución entre los caballos y en la mayoría de los potrillos de tres meses de edad están presentes. 3. Existe una correlación inversa entre la concentración de anticuerpos en sangre y la severidad y prevalencia de la enfermedad. 4. Luego del desafío con *R.equi* virulento la respuesta inmunitaria se caracteriza por aumentos en la concentración sanguínea de IgG_a e IgG_b, que son isotipos importantes en la opsonización y fijación del complemento. 5. *In vitro*, la opsonización del *R.equi* con anticuerpos específicos incrementa la fusión fagosoma-lisosoma, aumentando significativamente la muerte de los *R.equi* por macrófagos alveolares de potrillos. 6. Información adicional apoyando el papel de la inmunidad humoral viene de estudios sobre la inmunización pasiva con plasma hiperinmune. (Hines, 2013).

4.7.6.1 Inmunización pasiva vía calostro

La vacunación de las yeguas durante la preñez contra *R.equi* resulta en la producción de anticuerpos específicos y la subsiguiente transferencia de éstos a los potrillos

mediante el calostro. Los anticuerpos calostrales incrementan la capacidad de opsonización del plasma del potrillo pero no brindan una protección absoluta contra la enfermedad debido a la importancia de la inmunidad mediada por células y a su declinación a valores no protectores cuando el potrillo aún es susceptible a la infección. (Johns, 2013).

Los estudios investigando la inmunización activa de yeguas con el fin de aumentar la transferencia pasiva de anticuerpos contra *R.equi* en el calostro y proteger a los potrillos de la neumonía por *R.equi* han dado resultados diferentes. Algunos estudios muestran que la vacunación de las yeguas por sí sola no ha probado tener un efecto protector contra la neumonía en los potrillos a pesar de lograr un aumento significativo en la concentración de anticuerpos específicos contra *R.equi* en el calostro. Sin embargo, otros investigadores encontraron que la transferencia pasiva de anticuerpos específicos contra *R.equi* estaba asociada a protección contra la enfermedad en potrillos. (Becú y col., 1997; Erganis y col., 2014; Martens y col., 1991; Varga y col., 1997).

Becú y col. (1997) estudiaron la dinámica en la declinación de anticuerpos contra *R.equi* en el suero de potrillos cuyas madres fueron vacunadas. La concentración fue evaluada subjetivamente mediante inmunodifusión en gel de agar (AGID) y objetivamente mediante fijación de complemento. La vida media de los anticuerpos fue de 30-35 días y a los 75 días de edad ya no eran detectables. Igualmente existió una variabilidad importante entre los potrillos, dónde algunos que presentaron fuertes reacciones en la AGID a los dos días de edad mantuvieron niveles similares a los 3 meses. (Becú y col., 1997).

Cuando se utiliza la vacunación de las yeguas madre como única medida de prevención queda un gran número de potrillos en riesgo debido a la declinación de anticuerpos a concentraciones no protectoras cuando el potrillo aún es susceptible, el significativo porcentaje de yeguas que no responden a las vacunas y el porcentaje de potrillos que no adquieren una buena inmunidad calostrual por diversas razones. Una forma de estandarizar la administración de inmunoglobulinas específicas ha sido mediante la administración de plasma hiperinmune para *R.equi*. (Becú y col., 1997; Felipe Flaminio, 2010).

4.7.6.2 Inmunización pasiva vía plasma hiperinmune

La inmunización pasiva mediante la administración de plasma hiperinmune (HIP) específico para *R.equi* ha sido utilizado como método de control en los Haras endémicos. A través de este método se logra una mejora en el mecanismo efector humoral de los potrillos. (Mechelen, 2015).

El HIP se obtiene de animales donantes con alta concentración de anticuerpos circulantes contra un antígeno específico y en medicina equina suele congelarse fresco (enseguida de su obtención). (Tennent-brown, 2011).

Los componentes protectores del HIP no están claros. La administración de plasma hiperinmune o de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* purificadas induce el mismo nivel de protección. Este hecho indica que las inmunoglobulinas son el componente principal que protege a los potrillos contra la infección de *R.equi* en el plasma hiperinmune, especialmente aquellas contra la vapA. Igualmente, el plasma

equino también contiene otros constituyentes como la fibronectina, componentes del complemento, colectinas, citoquinas y proteínas de fase aguda que pueden tener un efecto protector adicional. (Hooper-McGrevy y col., 2001; Johns, 2013; Mechelen, 2015).

A pesar que el mecanismo protector de los anticuerpos no ha sido completamente descrito, diferentes estudios a lo largo de los años describen funciones que podrían justificar el efecto protector. Gran parte de los estudios demuestran que la capacidad opsonizante de las Igs incrementa la fagocitosis y el efecto bactericida. Algunos lo demuestran *in vitro* mediante el uso de Igs específicas o HIP, otros mediante la vacunación de caballos adultos y otros mediante la transferencia de las Igs a los potrillos en el calostro. (Cauchard y col., 2004; Dawson y col., 2011; Martens y col., 1989; Martens y col., 1987).

La producción endógena de IgG e IgA no es significativa hasta las primeras 4-5 semanas de vida en los potrillos. La deficiencia relativa de anticuerpos puede tener un rol en el desarrollo de la neumonía. La vida media de las IgG luego de la administración intravenosa tiene un rango de 21 a 30 días, por lo que el HIP podría ser una fuente importante de anticuerpos hasta que la producción endógena ocurra. (Higuchi y col., 1999; Lopez y col., 2002; Sanz y col., 2016).

El mecanismo de protección asociado al HIP no está completamente claro. Dawson y col. (2011) propusieron la difusión de los anticuerpos específicos hacia las vías aéreas luego de la administración intravenosa. Recientemente, Sanz y col. (2016) reportaron que luego de la administración de HIP incrementa la concentración de IgG específicas contra la vapA en el líquido bronquioalveolar. Este incremento fue apreciable entre las 24hrs y 5 días luego de administrado el HIP. Esto indica que probablemente exista una compartimentalización de los anticuerpos fuera de la circulación sistémica y que la difusión de los anticuerpos es rápida y explica parte del mecanismo protector del HIP. La difusión de otras moléculas como factores del complemento y citoquinas no fueron estudiadas. (Dawson y col., 2011; Sanz y col., 2016).

No ha sido determinado aún si la administración de HIP reduce la excreción de bacterias en las heces lo que podría tener un rol interesante en la prevalencia de la enfermedad en los Haras. (Mechelen, 2015)

Luego de la administración de HIP, varios estudios han reportado una reducción en la morbilidad y mortalidad de potrillos por *R. equi*. Sin embargo, otros estudios no encontraron una diferencia significativa en la protección de los potrillos luego de la administración de HIP. Las razones para la discrepancia en los resultados sobre la efectividad del plasma son muy variadas. (Becú y col., 1997; Caston y col., 2006; Erganis y col., 2014; Steeve Giguère y col., 2002; Higuchi y col., 1999; Hooper-McGrevy y col., 2001; Madigan y col., 1991; Martens y col., 1989; Perkins y col., 2001; Sanz y col., 2016).

La extrapolación de desafíos experimentales a naturales es complicada. Los estudios en condiciones naturales presentan la desventaja de ser afectados por muchas variables que pueden influir en los resultados, como la variación en la prevalencia de la enfermedad año a año y los cambios en el manejo concurrentes. En la mayoría de los estudios la eficacia del HIP fue basado en comparaciones año a año. Sin embargo, Becú y col. (1997) utilizaron controles a los que no se les administró el HIP en el mismo año, aunque los controles y los tratados pertenecieron a diferentes establecimientos que pueden haber presentado diferentes medidas de manejo y prevalencias de la enfermedad. (Becú y col., 1997).

El uso de desafíos experimentales con *R. equi* provee un ambiente más controlado para la evaluación del HIP. Sin embargo la mayoría de los estudios han utilizado dosis altas de *R. equi* para infectar a los potrillos. Esto resulta en neumonías agudas y severas con áreas grandes de consolidación pulmonar y, la necesidad de eutanasiar a la mayoría de los potrillos poco después del desafío. Estos hallazgos clínico-patológicos no se reflejan con los típicamente encontrados en la infección natural. Esto ha llevado a cuestionar la efectividad de estos modelos de infección para evaluar la efectividad del HIP. Algunos de los estudios experimentales no encontraron un efecto significativo en el uso de HIP. Sin embargo, en un estudio experimental por Hooper-McGrevy y col. (2006) los primeros signos de neumonía, el número de bacterias aisladas del pulmón y, la relación entre el peso del pulmón y el peso del animal fueron más bajos en los animales que recibieron HIP antes del desafío. Igualmente, todos los potrillos desarrollaron lesiones pulmonares. Recientemente, Sanz y col. (2016) reportaron cierta protección conferida por el HIP utilizando un modelo experimental con baja dosis. Este modelo puede ser más adecuado para evaluar la eficacia del HIP. Igualmente en los estudios experimentales los potrillos son desafiados con el *R. equi* virulento en una sola ocasión mientras que en condiciones naturales están continuamente expuestos. (Caston y col., 2006; Hooper-McGrevy y col., 2001; Martens y col., 1989; Perkins y col., 2001; Sanz y col., 2016).

La evaluación de los animales puede tener un efecto en los resultados de los estudios. En muchos estudios el diagnóstico definitivo por cultivo y citología del líquido traqueal no fue realizado. Sin embargo, en estudios naturales el registro de una menor incidencia y severidad de casos clínicos se ha reportado como un efecto protector del HIP. (Becú y col., 1997).

La variabilidad en los plasmas producidos tanto caseros como comerciales puede tener un rol importante en la discrepancia de los resultados. Se ha recomendado la administración de HIP para prevenir la infección en establecimientos endémicos, pero la dosis óptima no es clara. Los plasmas comerciales recomiendan la administración de un litro de HIP, sin embargo se han demostrado variaciones muy grandes entre estos que no dejan claro la dosis óptima. Cesar y col. (2016) evaluaron la concentración de IgG específicas contra la vapA y sus isotipos en diferentes HIP, donde encontraron una marcada variación entre los diferentes productos e incluso entre los lotes de los mismos productos (Figura 6). Sin embargo, esta variación no se refleja en la concentración total de IgG de los HIP, la cual tiende a ser mucho más constante. Esto puede tener importantes consecuencias clínicas y económicas. Los resultados de este estudio revelaron una variabilidad de IgG específicas contra vapA aún más grande que estudios anteriores por Sanz y col. (2014). Estos resultados corroboran la explicación sobre las diferencias en la eficacia del HIP en base a la variabilidad de los HIP. (Cesar y col., 2016; Sanz y col., 2014).

Cuando se elabora el HIP de forma casera, algo común en Uruguay debido a la falta de HIP comerciales, es importante titularlos debido a que los caballos donantes responden muy diferente a la misma vacuna. En referencia a la vacuna Rhodovac®, la vacuna normalmente utilizada en Uruguay, algunos pocos caballos responden con títulos de hasta 40.960 mientras que otros pueden responder con títulos menores a 2.560, estando reconocido un 2-5% de los caballos adultos que responden muy débilmente a la vacuna. Si titulamos el HIP producido podemos optimizar su uso y conseguir títulos más homogéneos entre los potrillos. (Becú y col., 1997)

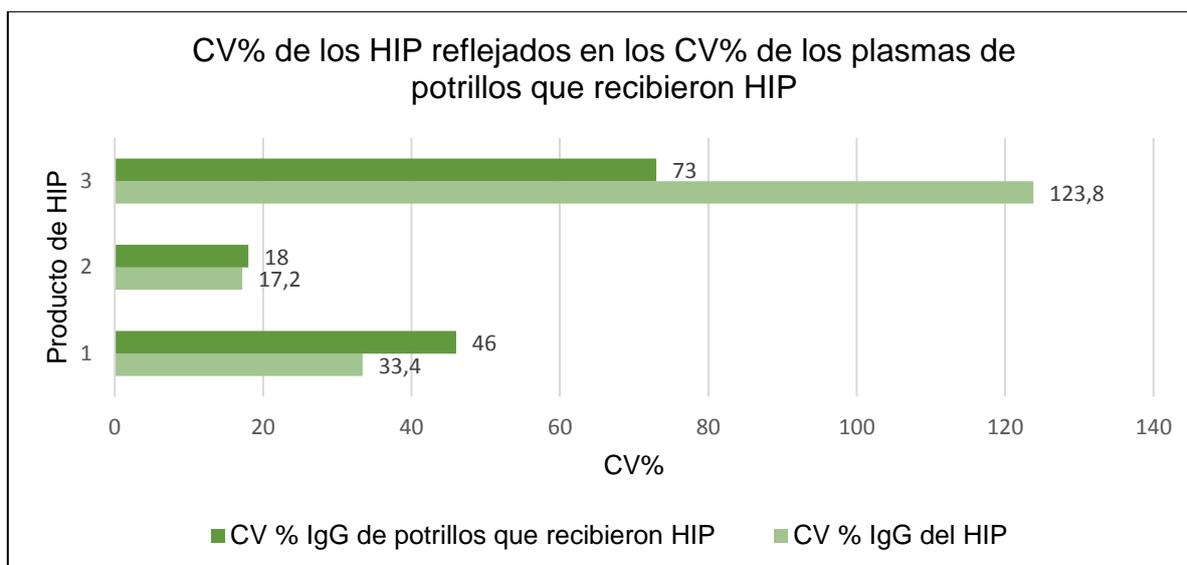


Figura 6. Gráfica relacionando la variabilidad de la concentración de IgG contra la vapA dentro de los lotes de 3 HIP comerciales (1, 2 y 3) y la variabilidad observada en el plasma de los potrillos luego de recibir ese HIP comercial. La variabilidad está representada mediante el coeficiente de variación (CV%). (CV%= desviación típica/la Media). Datos adaptados de Sanz (2014).

El momento de administración del plasma puede influir en los resultados. El HIP no mejora los signos clínicos ni altera el curso de la enfermedad si se administra a potrillos 7 días después del desafío con *R. equi*. Esto indica que el HIP es efectivo como preventivo pero no como tratamiento de la infección. Debido a esto, un punto de discusión ha sido la edad a la que se debe administrar el HIP. La existencia de Igs de forma temprana es crítico. Los potrillos son susceptibles a la infección desde las primeras semanas de vida y se ha propuesto que la mayoría de los potrillos se infectan en los primeros 15 días de vida. Considerando que los potrillos se pueden infectar desde el día del nacimiento se ha recomendado administrar el plasma hiperinmune no más tarde que el segundo día de vida. Como es probable que las inmunoglobulinas administradas disminuyan a niveles no protectores en el tiempo en que los potrillos todavía son susceptibles, se ha recomendado una segunda dosis a las 2 a 4 semanas posteriores a la primera dosis. (Chaffin y col. 1987; Dawson y col., 2010; Johns, 2013; Mechelen, 2015; Sanz y col., 2015). Becú propone que si se vacunan las yeguas contra *R. equi* se puede administrar una única dosis de HIP a los 10- 15 días de edad. (Comunicación personal, Becú, T., 2016).

La carga bacteriana del ambiente tiene un efecto importante sobre la duración del efecto protector del HIP. El manejo del establecimiento puede llevar a suprimir la efectividad del HIP, especialmente cuando se permite la exposición de los potrillos a polvo conteniendo altas concentraciones de *R. equi* virulento que provoca el consumo incrementado de las Igs. (Johns, 2013; Mechelen, 2015).

A pesar de los diferentes resultados posiblemente afectados por las variables, existe un efecto comprobado en la disminución de la incidencia y severidad de los casos en gran parte de los estudios. Cuando el uso del HIP se toma como medida de prevención se debe tener en cuenta que la transfusión de HIP no brinda una protección absoluta

debido a la importancia de los demás aspectos inmunes frente a esta enfermedad. Por lo tanto, su uso no elimina la necesidad de monitorear los potrillos en riesgo ni las medidas de manejo tomadas para disminuir la exposición al *R. equi*. (Giguère y col., 2011).

El uso de HIP es seguro pero igualmente se han reportado efectos secundarios al uso de plasma. A pesar que el riesgo es muy bajo no se debe subestimar y lo ideal es entender los riesgos y anticiparlos. Las reacciones secundarias se pueden clasificar como hemolíticas, febriles no hemolíticas y anafilácticas. Luego de la administración de plasma las reacciones anafilácticas pueden ocurrir por la presencia de células o agregados proteicos. Los síntomas clínicos se caracterizan por taquicardia, taquipnea, urticaria, fiebre, palpitations cardíacas, temores musculares, cólico y colapso. Se deben monitorear los parámetros cardíacos y respiratorios durante la administración del plasma. Realizar una infusión inicial lenta permite detectar los primeros signos de una reacción y tomar medidas para limitarla. Se puede reducir la velocidad de administración o finalizarla. Se recomienda disponer de epinefrina (0,01 mg/kg), corticoides (prednisolona 0,25 – 1 mg/kg lento IV) y flunixin de meglumine (1,1 mg/kg) para administrar si ocurre un shock anafiláctico. Igualmente, si el plasma es mantenido en condiciones adecuadas, congelado, administrado poco después de descongelado y nada del plasma coagula el riesgo de shock anafiláctico es muy reducido. El uso de filtros en el equipo de infusión ayuda a retener las partes corpusculares y prácticamente elimina los riesgos de anafilaxia. El exceso de citrato en el producto puede causar fasciculaciones y falla cardíaca pero la concentración en los productos de plasma son muy bajas. Es importante el uso de donantes de plasma libres de enfermedades, particularmente de la piroplasmosis y anemia infecciosa equina en el Uruguay. Además, el uso de donantes libres de aloanticuerpos es de gran importancia. Los potrillos menores a 7 días de edad son los que presentan mayor riesgo a efectos secundarios y a la sobredosis por volumen de líquido, por lo que la administración lenta y monitoreada es importante. Un litro de plasma en 20 minutos puede ser administrado a potrillos de 45-50 kg de forma segura, administrándose los primeros 100ml de forma muy lenta y monitoreando al animal. (Hardefeldt y col., 2010; Reynolds, 2012).

5 Hipótesis

Podremos estimar parámetros que permitan optimizar el uso de plasma hiperinmune al existir una correlación entre la concentración de inmunoglobulinas en el HIP y la concentración de inmunoglobulinas en el plasma de los potrillos a las 24 horas de recibir ese HIP.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Describir la cinética de inmunoglobulinas específicas contra *Rhodococcus equi* en potrillos a los que se les administrará plasma hiperinmune en un volumen y título conocido.

6.2 Objetivos particulares

6.2.1. Estimar la concentración sanguínea de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* a las 24 horas de la administración de plasma hiperinmune en un volumen y título conocido.

6.2.2. Estimar el porcentaje de distribución fuera del lecho vascular de las inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* a las 24 horas de la administración de plasma hiperinmune en un volumen y título conocido.

6.2.3. Estimar los momentos prácticos para medir las inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* en sangre.

6.2.4. Comparar los niveles de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* en potrillos tratados y no tratados con plasma hiperinmune cada 10 días hasta los 78 ± 2 días de edad.

6.2.5. Comparar la producción endógena de inmunoglobulinas específicas en potrillos tratados y no tratados con plasma hiperinmune.

6.2.6. Evaluar la influencia de tratamientos quirúrgicos y antimicrobianos sobre la velocidad catabólica y anabólica de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi*.

7 Material y métodos

7.1 Material

7.1.1 Predio dónde se realizó la investigación.

La investigación se realizó en un Haras de caballos Sangre Pura de Carrera en Uruguay. Se trata de un Haras que ha presentado casos de neumonía por *R.equi* en años anteriores. En la temporada del 2015, temporada en que se realizó esta investigación, se implementaron medidas de manejo con el fin de reducir la exposición de los potrillos al *R.equi*.

7.1.2 Material biológico

- 20 bolsas de 300ml de plasma hiperinmune para *R.equi*.
- 25 potrillos al pie de la madre de 27 ± 2 días de edad.

7.1.3 Material no biológico

Equipo de conservación:

- Congelador a -18°C .
- Heladera a 4°C .
- Bolsa iso-térmica
- Refrigerantes

Equipo de infusión de HIP:

- 20 Catéteres 16G.
- 20 Infusores macrogoteros.

Equipo de extracción y procesado de muestras:

- 158 Tubos con vacío tipo Vacutainer con las agujas correspondientes.
- 158 Jeringas de 5ml con aguja.
- 474 Tubos eppendorf.
- Etiquetas para identificar las muestras.
- Bolsas tipo ziploc para organizar las muestras.

Material para mantener asepsia:

- Guantes de látex.
- Algodón
- Iodopovidona

7.2 Método

7.2.1 Obtención de plasma hiperinmune

El plasma hiperinmune fue material cedido por el Dr. Perdigón.

El donante de este plasma fue negativo a anemia infecciosa equina y piroplasmosis.

Los anticuerpos específicos contra *R. equi* en el donante se obtuvieron mediante el uso de la vacuna Rhodovac®. El plasma fue congelado fresco, en bolsas sanguíneas de 300ml, a -18°C hasta su posterior uso.

Se llevó a titular a una clínica particular una muestra del plasma hiperinmune mediante un ELISA indirecto cuantitativo. Conocer el título del HIP administrado (Título=5.120) fue importante para poder estimar la concentración lograda en el plasma de los potrillos receptores del HIP según el volumen administrado.

7.2.2 Selección de potrillos

Se seleccionó un lote de potrillos nacidos en el Haras que convivieron junto a sus madres durante toda la temporada de reproducción. Las yeguas madre residieron en el Haras durante al menos los últimos dos meses de gestación y se conoce que éstas no fueron vacunadas contra *R. equi* en esa gestación.

En el Haras se realiza un manejo de pastoreo rotativo entre los potreros y el lote rotó todo junto sin mezclarse con animales pertenecientes a otros lotes. Los potreros pastoreados por animales locales del Haras no son pastoreados por animales transitorios y viceversa.

El lote seleccionado estaba compuesto por 27 yeguas y sus potrillos. Los potrillos correspondían a todos los potrillos del Haras nacidos de yeguas locales entre el 23 de setiembre y el 7 de noviembre del 2015.

De los potrillos del lote se asignaron 20 a un grupo problema (los que recibieron HIP) y 5 a un grupo control (los que no recibieron el tratamiento). Los dos potrillos restantes se dejaron sin asignar por lo que no formaron parte del estudio y funcionaron como “reserva” en caso de imprevistos.

El grupo control estaba formado por 5 potrillos a los cuales se extrajeron muestras de tal forma que se adjudicaran 2 muestras control para cada instancia de muestra problema (n=2).

El rango de edad y los pesos aproximados a los que el grupo problema recibió el HIP fueron de 25 a 29 días y de 74 a 91kg respectivamente. Los pesos de los potrillos fueron estimados en base al peso al nacimiento más 1 kg ganado por día.

La edad a la que se administró el HIP se seleccionó con el fin de evitar la interferencia de las Igs de origen diferente al HIP con los resultados de la investigación. A pesar que las yeguas madre no fueron vacunadas contra *R. equi* en esa gestación puede existir cierta cantidad de Igs que son transferidas debido a la exposición natural de las

yeguas al *R.equi*. Entonces se estimó que a los 27 días de edad sería el momento de menor concentración de Igs específicas contra *R.equi* en los potrillos y se adjudicó un rango de ± 2 días para facilitar el manejo en el Haras. (Higuchi y col., 1999).

Hay factores importantes no controlables en este estudio que influyen sobre la interpretación de los resultados. Dos de ellos son la posible existencia de infección en algunos potrillos y la exposición al *R.equi*. Estos factores incrementan el consumo de las Igs y es diferente para cada animal. Para intentar controlar estos factores se eligieron potrillos que pertenecieron a un mismo lote dentro del Haras. De esta forma la exposición al *R.equi* se mantuvo lo más similar posible entre los potrillos. (Giguère y col., 2011).

7.2.3 Administración de plasma hiperinmune.

El plasma se descongeló de forma lenta a 35-40°C aproximadamente y fue administrado tibio no más de 3 horas luego de descongelado.

La administración de plasma hiperinmune se realizó por vía endovenosa mediante venopunción yugular con un catéter 16G. El protocolo de administración fue de 300ml de HIP con título 5.120 a los 27 ± 2 días de vida.

La razón por la que se seleccionó administrar ese volumen de HIP fue porque el Dr. Perdigón ha observado una disminución en la incidencia y severidad de la neumonía por *R.equi* en los 5 años que ha estado utilizando 300 ml de HIP por potrillo y la vacunación de las yeguas preparto como método de prevención. El efecto protector conferido en estos 5 años es una percepción del Dr. Perdigón ya que no se ha realizado un estudio estadístico que lo corrobore. (Comunicación personal, Perdigón, 2015.).

Aparte de la eficacia o no de ese volumen de HIP administrado se consideró que los 300ml de HIP eran suficientes para realizar este estudio en base a los siguientes conceptos influido por la idea de optimizar gastos (Tabla 2):

- El volumen plasmático de los caballos adultos es aproximadamente el 5% de su peso y el de los neonatos el 8%. El peso promedio de los potrillos en este estudio fue de 83 kg. Entonces, seguido a administrar el HIP este se diluye en 4,5 - 5 l de suero aproximadamente. (Comunicación personal, Becú, T., 2016.).
- La concentración observada de las gammaglobulinas luego de ser administradas de forma intravenosa a las 24 horas de administradas es del 30 a 40% menos de lo estimado por la dilución en el volumen plasmático. Esta diferencia entre lo medido y lo estimado se ha adjudicado a la redistribución fuera del lecho vascular que se estabiliza a las 24 horas aproximadamente. (Comunicación personal, Becú, T., 2016). Esto no ha sido evaluado para las Igs específicas contra *R.equi* administradas mediante HIP. En este estudio se tomó como supuesto que podría ser similar y se consideró al momento de seleccionar el volumen a administrar.
- La dilución del suero de 1/100 se propuso para realizar los cálculos al ser la dilución utilizada por estudios que han medido la concentración de IgG específicas contra *R.equi* en potrillos luego de administrado el plasma. (Sanz y col., 2014).

Volumen propuesto por el Dr. Perdigón	300 ml
Vol. Plasmático de los potrillos (5-8% del PV)	4,5 l
Porcentaje de difusión fuera del lecho vascular	30-40%
Dilución más frecuentemente utilizada	1/100
Título del plasma hiperinmune	5.120

Tabla 2. Resumen de datos y supuestos para estimar el volumen administrado.

En base a los datos y supuestos propuestos se estimó la concentración esperada a observar en el ELISA de las muestras plasmáticas de los potrillos a las 24 horas de recibir el HIP. Al administrar 300 ml de HIP con título 5.120 deberíamos apreciar títulos aproximados de 340 en el plasma de los potrillos seguido a la dilución en el volumen plasmático (4,5l). La primer muestra fue tomada a las 24 hrs de administrado el HIP. Si el porcentaje de difusión fuera del lecho vascular (30-40%) fuera igual al del resto de las gammaglobulinas, a las 24 hrs de administradas podríamos apreciar títulos de 205 a 240. Estos títulos serían apreciables en diluciones de 1/100 en el ELISA.

7.2.4 Obtención de muestras plasmáticas de los potrillos.

La extracción de muestras sanguíneas en potrillos se realizó mediante venopunción yugular con agujas para tubos de vacío tipo vacutainer con EDTA (7mL).

En los potrillos problema, la primer extracción fue previo a administrarse el HIP (M0 (día)) y la segunda a las 24 horas de administrado el HIP (M1 (día)). Posteriormente, se recolectaron 5 muestras a intervalos de 10 días, siendo la última muestra a los 50 días de administrado el HIP (M10 (días), M20 (días), M30 (días), M40 (días), M50 (días)). Se estima que la vida media de las Igs administradas es de 21 a 30 días por lo que se consideró suficiente tomar las muestras por 50 días cada 10 días. (Higuchi y col., 1999).

En los potrillos control la extracción de muestras sanguíneas se realizó a las edades correspondientes para cada muestra de los potrillos problema, adjudicando dos muestras control para cada instancia (M0-M50) de muestra problema.

Cada muestra recolectada se mantuvo en los tubos de recolección en heladera a 4°C y, al decantar la fracción celular se extrajo el plasma con aguja y jeringa de 5cc. Cada muestra de plasma se dividió en tres fracciones, colocándolas cada una en un eppendorf identificado con la fecha de extracción, el animal al que pertenece y, el número de muestra que corresponde. Se congelaron a -18°C hasta su posterior análisis.

7.2.5 Registro de datos de los potrillos.

Se realizó una ficha de datos para cada potrillo que contiene información sobre el nacimiento, edad a la que se administró el plasma, días en los que se extrajeron las muestras, alteraciones patológicas que presentaron, cirugías y terapias a las que se los sometió desde el nacimiento hasta el fin del protocolo.

Se propuso que las intervenciones quirúrgicas y las patologías y sus tratamientos pueden influir sobre el consumo de las Igs y la seroconversión. Para intentar diferenciar estos potrillos en los resultados se registraron las intervenciones quirúrgicas, patologías y tratamientos que presentaron los potrillos desde el nacimiento hasta el fin del protocolo.

Se controló la aparición de efectos secundarios a la administración del HIP mediante el registro de alteraciones en la frecuencia cardíaca y respiratoria, sudoración, signos de debilidad muscular y, cólicos.

7.2.6 Determinación de niveles de inmunoglobulinas anti-*Rhodococcus equi* en el plasma de los potrillos.

Para evaluar los títulos conseguidos se propuso que lo más exacto sería utilizar una prueba diagnóstica que utilizara los antígenos con los que se elabora la Rhodovac® por lo que se contactó la clínica que realiza las pruebas de titulación con estos antígenos. Una vez obtenidas todas las muestras y finalizado el protocolo se llevó una copia de cada muestra a la clínica.

Las muestras se descongelaron pero mantuvieron frías en todo momento hasta su análisis.

En la clínica se realizó una prueba de ELISA indirecto cuantitativa para detectar la presencia de inmunoglobulinas específicas contra *R. equi* en los plasmas obtenidos durante el protocolo. El antígeno utilizado para la sensibilización de las placas es el mismo que el utilizado para elaborar la vacuna Rhodovac®.

La lectura de las placas se realizó en espectrofotómetro a 405nm. La interpretación de la lectura se realizó en base a la densidad óptica corregida (ODc) y el título se define como la última dilución cuya ODc es mayor al punto de corte (15% de positividad de la ODc del control positivo).

La curva de este ELISA fue estandarizada por la clínica que la realiza. Se analizan las muestras en dos diluciones (1/320 y 1/1.280). Los controles negativos corresponden a sueros de equinos mestizos de Argentina provenientes de rodeos epidemiológicamente libres de la neumonía por *R. equi*, sin antecedentes de inmunización y confirmados como negativos por AGID y FC (técnicas diagnósticas no utilizadas para la detección de IgG específicas para *R. equi* por su baja sensibilidad). Los controles positivos corresponden a animales hiperinmunizados con la vacuna Rhodovac.

7.2.7 Eliminación de residuos.

Para la eliminación de residuos se utilizó el sistema de eliminación de residuos del Haras o de la clínica particular según correspondiera.

7.2.8 Análisis estadístico.

Se realiza estadística descriptiva de las variables y se resumen en tablas y gráficas tomando en cuenta el tipo y escala de medida.

Se analizan los datos mediante análisis de frecuencias Test de Chi cuadrado para determinar significancia de las diferencias de los grupos (M0 (día), M1 (día) y M50 (días)), así como análisis de frecuencias entre seroconversión entre M30 (días) y M50 (días), con una significancia del 95%.

8 Resultados

El título de inmunoglobulinas específicas contra *R. equi* del plasma hiperinmune utilizado fue de 5.120. Un total de 20 potrillos recibieron 300ml cada uno de este plasma hiperinmune.

No se analizaron todas las muestras de los potrillos, la razón de esto fue para optimizar gastos. Se decidió tomar esa medida cuando se observó que los 8 potrillos analizados (un total de 56 muestras) hasta ese momento daban negativo en casi todas sus muestras. Sólo 3 muestras de las 56 analizadas hasta ese momento habían presentado títulos apreciables (título 320) y se correspondían a las M1 (días) (24 horas luego de administrado el HIP) de 3 potrillos. (Tabla 3)

Título	M0 (día)	M1 (día)	M10 (días)	M20 (días)	M30 (días)	M40 (días)	M50 (días)
Positivo (320)	1	4	1	1	1	1	1
Negativo (<320)	8	16	8	8	8	8	19
no analizado	11	0	11	11	11	11	0

Tabla 3. Frecuencias de muestras positivas, negativas y no analizadas mediante el ELISA indirecto de las muestras plasmáticas de los potrillos problema. Para cada muestra n=20.

Se seleccionaron las M1 y M50 de los potrillos que todavía no habían sido analizados y se analizaron. El criterio fue que si en la M1 (días) eran negativos en la M0 (día) también lo serían, ya que si a las 24 horas de administrar el HIP el valor era negativo, 24 horas antes y previo a la administración del HIP también lo sería. Además se supuso que si en la M0 y M50 eran negativos, en las muestras M10, M20, M30 y M40 también lo serían. Se propuso que si alguna de las dos muestras (M0 y M50) analizadas presentaba títulos apreciables se analizarían las demás muestras de ese potrillo.

Uno de los potrillos presentó títulos apreciables en las M1 (días) y M50 (días) por lo que se analizaron todas sus muestras. Se observó que presentaba el mismo título para la M0 (día) y M1 (días) con lo que se concluyó que las inmunoglobulinas apreciables no tenían su origen en la administración del HIP. Además la administración del HIP no generó un incremento apreciable en el título a las 24 horas de administrado. Por estas razones se excluyó ese potrillo del análisis de frecuencias para M0 (días), M1 (días) y M50 (días). Los 19 potrillos restantes dieron negativo en su M1 y M50 (Figura 7).

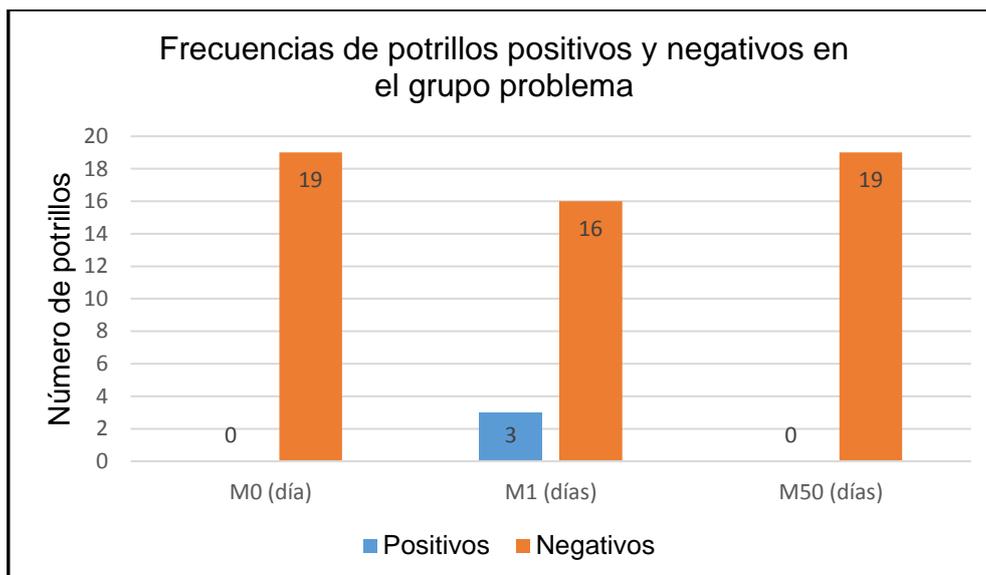


Figura 7. Frecuencias de positivos y negativos en las muestras M0 (día), M1 (días) y M50 (días) de los potrillos problema. Se adjudicó el valor negativo a las M0 (día) no medidas cuando la M1 (día) fue negativo. Para cada muestra n=19.

Los resultados de las muestras control fueron todos negativos (Figura 8).

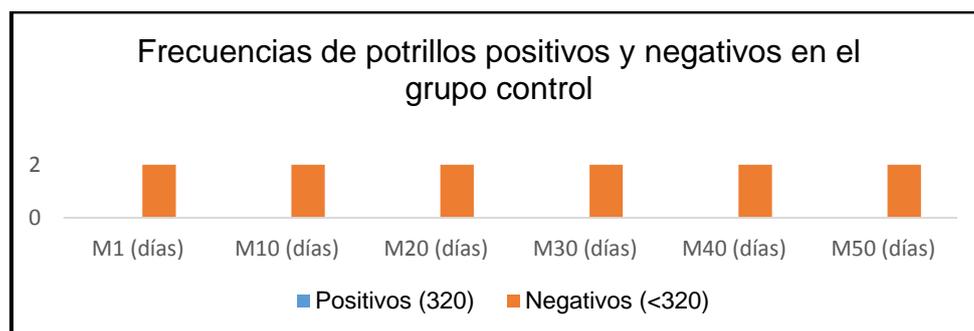


Figura 8. Frecuencias de positivos y negativos en las muestras M0 (días), M1 (días), M10 (días), M20 (días), M30 (días), M40 (días) y M50 (días), del grupo control.

En el análisis de frecuencias entre M0, M1 y M50 se observó una asociación estadísticamente significativa ($p=0,042$) previo a administrarse el plasma, a las 24 hrs de administrado y a los 50 días de administrado. (Cálculos en el Anexo).

No existen diferencias significativas entre la seroconversión en las M30 (días) y M50 (días). ($p=0.923$). (Cálculos en el Anexo).

No se observaron reacciones adversas en ningún potrillo luego de la administración del plasma.

9 Discusión

Se administró un total de 300ml de HIP con título 5.120 a cada potrillo problema de 80kg promedio. Seguido a la administración, el HIP se diluye en el plasma de los potrillos el cual corresponde al 5-8% del peso vivo aproximadamente (4,5 litros). En el cálculo matemático esto resultaría en títulos de 340 de Igs específicas contra *R.equi*. Sin embargo, no se obtuvo este título en la mayoría de las muestras a las 24 horas de administrado el HIP.

Las concentraciones de gamma globulinas a las 24 horas de administradas suele ser un 30-40% inferior al esperado por el cálculo matemático de dilución en plasma. Este hecho se le ha adjudicado a la distribución de las gamma globulinas fuera del lecho vascular. (Comunicación personal, Becú, 2016). Esto no ha sido estudiado para las Igs específicas contra *R.equi* administradas mediante el HIP, pero si consideramos que el porcentaje de distribución fuera del lecho vascular es similar a las 24 horas de administradas deberíamos apreciar títulos aproximados a 205 - 240 en las M1 (días) de cada potrillo.

La curva del ELISA utilizado en este estudio está estandarizada a partir de la dilución 1/320. Se conoce que, a pesar de no presentarse casos de la enfermedad en un establecimiento, el *R.equi* existe en el ambiente y provoca la estimulación antigénica vía oral. (Hines, 2013). Por esta razón algunos caballos adultos pueden presentar títulos apreciables en diluciones de 1/80 hasta 1/160. Los controles negativos utilizados por la clínica son sueros de animales adultos de predios en Argentina dónde no se han reportado casos de neumonía por *R.equi*. (Comunicación personal, Becú, 2016). Entonces, en la clínica la primer dilución la realizan en 1/320 debido a que títulos menores tienen poca significancia en la práctica ya que caballos adultos sin vacunar pueden presentar títulos de hasta 1/160. Cuando la ODc de la muestra analizada en la dilución 1/320 no alcanza al 15% de positividad del control positivo se la clasifica cualitativamente como negativa.

Según los cálculos matemáticos, en este estudio, no obtenemos inmunoglobulinas apreciables en la dilución 1/320 luego de la distribución fuera del lecho vascular (M1 (días), 24 hrs luego de administrar el HIP).

Se propuso utilizar el ELISA con diluciones más bajas, pero estandarizar la curva para esto significaba utilizar un control verdaderamente negativo del cual no se dispuso en ese momento.

Debido a que el HIP administrado en este estudio no logró aportar títulos considerados positivos para los factores de dilución utilizados normalmente en la clínica para el ELISA, no se pudo evaluar la concentración sanguínea de Igs específicas contra *R.equi* ni estimar el porcentaje de distribución fuera del lecho vascular a las 24 horas de administrado el HIP. Debido a esto tampoco se pudo evaluar los efectos de los tratamientos sobre la cinética de las Igs administradas mediante el HIP y la seroconversión.

Igualmente, el hecho de no observar inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* en las diluciones 1/320 en la mayoría de los potrillos a las 24 horas de administrado el HIP, nos lleva a suponer que existe una difusión de las Igs específicas contra *R.equi* fuera del lecho vascular. Esto se corresponde con los hallazgos de Sanz y col. (2016) donde observaron inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* en el líquido de lavados

bronquioalveolares (BALF) entre las 24 hrs y los 5 días de administrado el HIP. (Sanz y col., 2016).

Evaluando la no apreciación de los anticuerpos en la dilución 1/320 luego de administrado el HIP, proponemos que la difusión de los anticuerpos fuera del lecho vascular podría ser al menos un camino por el cual el HIP ejerce su efecto protector al considerar que probablemente parte de esos anticuerpos lleguen al parénquima pulmonar. Esta teoría puede ser apoyada por los hallazgos de Sanz y col. 2016 que observaron las inmunoglobulinas en el BALF luego de administrar el HIP vía intravenosa.

A pesar que la mayoría de los potrillos no presentaron títulos apreciables en la dilución 1/320 a las 24 horas de administrado el HIP, tres potrillos presentaron inmunoglobulinas apreciables en la dilución 1/320 a las 24 horas de administrado el HIP. Este hecho puede ser explicado por una diferencia individual en la cinética de las Igs, dónde la difusión de las Igs fuera del lecho vascular fue más lento. Esto probablemente haya llevado a que se obtuvieran títulos apreciables a las 24 hrs de administrado el plasma pero no a los 10 días. Sanz y col. (2016) obtuvieron un resultado similar al observar que en algunos potrillos las inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* eran detectables en el BALF hasta 5 días después de administrado el HIP. (Sanz y col. 2016).

El Haras dónde se llevó a cabo la investigación es un Haras que tiene historia de neumonía por *R.equi*. Por esta razón se considera que los potrillos están expuestos al *R.equi* virulento (ya sea vía oral o inhalatoria). A pesar que ninguno de los potrillos presentó la enfermedad clínica en este estudio, se espera que muchos de los potrillos hayan tenido un “consumo extra” de las Igs específicas contra *R.equi* administradas, en un porcentaje desconocido y diferente para cada caso que no se pudo evaluar debido a la falta de títulos apreciables. Por esta razón tampoco se pudo estimar los momentos prácticos para medir las Igs específicas contra *R.equi* en el plasma de los potrillos de este Haras.

Uno de los potrillos problema presentó títulos apreciables en todas sus muestras y es probable que sean de origen calostroal. Las yeguas madre no fueron vacunadas en el año en que se realizó la investigación pero la exposición al agente induce la respuesta inmunológica en las yeguas y, los potrillos pueden adquirir inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* del calostro de sus madres. La vida media de las inmunoglobulinas calostrales es de 21 a 30 días y caen a concentraciones mínimas por el catabolismo y consumo de los anticuerpos. Subsecuentemente al mínimo de concentración de Igs comienzan a aumentar por la producción endógena logrando concentraciones apreciables con este ELISA en la dilución 1/320 a partir de los 60 días de edad. (Comunicación personal, Becú, 2016). A pesar de esto Becú y col. observaron que algunos potrillos que presentan títulos altos luego de la ingestión de calostro logran mantener concentraciones detectables por tres meses o más. (Becú y col., 1997). En base a esto, concluimos que la permanencia de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* apreciables hasta la M50 (días) en uno de los potrillos problema puede deberse a la inmunización pasiva mediante el calostro con altas concentraciones de estas inmunoglobulinas.

Con respecto a la falta de IgGs apreciables en la M1 (días) de 19/20 potrillos problema y 2/2 potrillos control proponemos que la edad a la que se administra el HIP debería ser antes de los 25 días de edad, en especial si no se van a vacunar las yeguas madre. Igualmente no se conoce qué títulos se deben obtener en los potrillos para considerar

que éstos están protegidos y, probablemente sea variable para cada Haras según la incidencia y las otras medidas de prevención adoptadas. Los autores del ELISA utilizado en este estudio recomiendan títulos mínimos de 1.280. (Referencias de los resultados ELISA). Sin embargo, la recomendación de esos títulos mínimos fue en base a estudios sobre el título de Igs adquirido por la transferencia pasiva mediante el calostro y no por estudios sobre el efecto protector. (Referencias de los resultados ELISA).

No se observaron títulos apreciables en las M40 (días) ni M50 (días) de los potrillos problema ni los potrillos control. En condiciones naturales se detectan inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* en todos los potrillos. Esto refleja la exposición al agente y no exclusivamente a la infección. (Takai y col., 1986). La seroconversión de los potrillos a títulos apreciables con este ELISA es a partir de los 60-70 días de vida, y se va dando de forma gradual en los lotes de animales. (Referencias de los resultados del ELISA). Se propuso que la administración de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* mediante el HIP podría influir sobre la producción endógena de anticuerpos y, se observó que a los 77 ± 2 días de vida (M50 (días)) no hubo producción endógena apreciable de estas inmunoglobulinas con la técnica utilizada en ninguno de los potrillos problema. La falta de seroconversión a los 77 ± 2 días de vida en nuestro lote podría deberse a un efecto inmunomodulador del HIP. (Sanz y col., 2016). Sin embargo, tampoco se observó seroconversión apreciable en el ELISA en los potrillos control.

Para poder analizar el efecto inmunomodulador del HIP sobre la producción endógena de inmunoglobulinas específicas contra *R.equi* habría que evaluar a los potrillos por más tiempo. Las primeras seroconversiones de animales no enfermos se observan a partir de los 60 días y se da de forma acumulativa, no todos juntos. (Sanz y col., 2015). Utilizando un número de animales control más grande podría llegarse a estimar de forma más contundente el efecto del HIP sobre la seroconversión.

No se reportaron muertes por neumonía por *R.equi* en el Haras donde se realizó el estudio en esa temporada, pero sí hubo casos sospechosos aunque no confirmados por cultivo y citología. Este estudio es sobre la cinética de las Igs administradas mediante el HIP por lo que el volumen de HIP utilizado en este estudio y la edad de los potrillos no corresponden a los recomendados para prevenir la enfermedad ni se le puede adjudicar un efecto protector en la prevención de la enfermedad. El Haras adoptó nuevas medidas de manejo en esa temporada para disminuir la incidencia de la enfermedad lo que también puede haber influido sobre la seroconversión de los potrillos. Además, la temporada del 2015 fue un año en que los veterinarios observaron una menor incidencia de la enfermedad en el Uruguay comparado a años anteriores, lo cual probablemente haya influido en nuestros resultados.

10 Conclusiones

Podemos concluir que existe una difusión de las inmunoglobulinas al espacio extravascular a las 24 horas de administrado el HIP y probablemente sea un importante método mediante el cual el HIP ejerce su efecto protector.

Además podemos concluir que la administración de HIP debe ser antes de los 25 días de edad, especialmente si no se va a vacunar a las yeguas.

Es importante titular los plasmas para evaluar el volumen a administrar y lograr un óptimo uso del HIP. Igualmente, no se logró estimar la concentración de Igs alcanzadas luego de la administración del HIP titulado.

La falta de títulos apreciables en este estudio no permitió definir la cinética de las Igs administradas mediante el HIP.

Si se logra una vacuna comercial efectiva para potrillos esta deberá lograr proveer una protección a las 3 semanas de vida aproximadamente. La protección conferida durante los primeros 21 días de vida seguirá dependiendo de la inmunidad calostrual o la conferida por el HIP por lo que sería óptimo que la vacuna actuara en presencia de altas concentraciones de inmunoglobulinas de origen pasivo.

11 Referencias

1. Becú, T., Polledo, G., Gaskin, J. M. (1997). Immunoprophylaxis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Veterinary Microbiology*, 56(3-4): 193-204.
2. Bordin, A. I., Pillai, S. D., Brake, C., Bagley, K. B., Bourquin, J. R., Coleman, M., Oliverira, F. N., Mwangi, W., McMurray, D. N., Love, C. C., Felipe, M. J., Cohen, N. D. (2014). Immunogenicity of an electron beam inactivated *Rhodococcus equi* vaccine in neonatal foals. *PLoS ONE*, 9(8): 1-11.
3. Caston, S. S., McClure, S. R., Martens, R. J., Chaffin, M. K., Miles, K. G., Griffith, R. W., Cohen, N. D. (2006). Effect of Hyperimmune Plasma on the Severity of Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* in Experimentally Infected Foals. *Veterinary Therapeutics*, 7(4): 361-375.
4. Cauchard, J., Sevin, C., Ballet, J. J., Taouji, S. (2004). Foal IgG and opsonizing anti-*Rhodococcus equi* antibodies after immunization of pregnant mares with a protective VapA candidate vaccine. *Veterinary Microbiology*, 104(1-2): 73-81.
5. Cesar, F. B., Sanz, M. S., Martinez, E. H., Horohov, D. W. (2016). Variation of anti-*Rhodococcus equi* VapA specific IgGs among eleven different lots of one commercially available *Rhodococcus equi* specific hyperimmune plasma product. *Journal of Equine Veterinary Science*, 39: S85-S86.
6. Chaffin, M. K., Martens, R. J., Martens, J. G. (1991). Therapeutic effects of immune plasma in foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 23(S12): 23-29.
7. Chirino-Trejo, J. M., Prescott, J. F., Yager, J. A. (1987). Protection of foals against experimental *Rhodococcus equi* pneumonia by oral immunization. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 51(4): 444-447.
8. Cohen, N. D. (2012a). *Rhodococcus equi* Foal Pneumonia: Clinical Manifestations and Diagnosis. Ontario Veterinary Medical Association Conference Proceedings, Toronto, Canada, pp. 248-267.
9. Cohen, N. D. (2012b). *Rhodococcus equi* Foal Pneumonia: Treatment. Ontario Veterinary Medical Association Conference Proceedings, Toronto, Canada, p.252-263.
10. Cohen, N. D. (2012c). *Rhodococcus equi* Foal Pneumonia: Prevention. Ontario Veterinary Medical Association Conference Proceedings, Toronto, Canada, p.264-267.
11. Cohen, N. D., Chaffin, M. K., Martens, R. J. (2002). How to Prevent and Control Pneumonia Caused by *Rhodococcus equi* at Affected Farms. AAEP Proceedings of the American Association of Equine Practitioners, Phoenix, USA, 48: 295-299.
12. Cohen, N. D., Slovis, N. M., Giguère, S., Baker, S., Chaffin, M. K., Bernstein, L.

- R. (2015). Gallium Maltolate as an Alternative to Macrolides for Treatment of Presumed *Rhodococcus equi* Pneumonia in Foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29(3): 932-939.
13. Coulson, G. B., Agarwal, S., Hondalus, M. K. (2010). Characterization of the role of the pathogenicity island and vapG in the virulence of the intracellular actinomycete pathogen *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 78(8): 3323-3334.
 14. Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A., Miranda-CasoLuengo, R., Wang, X., Oliver, J., Willingham-Lane, J. M., Meijer, W. G., Hondalus, M. K. (2015). Transcriptome reprogramming by plasmid-encoded transcriptional regulators is required for host niche adaption of a macrophage pathogen. *Infection and Immunity*, 83(8): 3137-3145.
 15. Crowley, J., Fishburn, J., Po, E., Celi, P., Muscatello, G. (2016). Oxidative stress and *Rhodococcus equi* pneumonia. *Journal of Equine Veterinary Science*, 39: S84.
 16. Dani, D. (2013). Healthy as a horse vet.
Disponible en: <https://healthyasahorsevet.wordpress.com/vet-life/>
Fecha de consulta: 4 de Agosto del 2016.
 17. Dawson, D., Nydam, D., Price, C., Graham, J., Cynamon, M., Divers, T., Feloppe, M. (2011). Effects of opsonization of *Rhodococcus equi* on bacterial viability and phagocyte activation. *American Journal of Veterinary Research*, 72(11): 1465-1475.
 18. Dawson, T., Horohov, D., Meijer, W., Muscatello, G. (2010). Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135(1-2): 1-11.
 19. Erganis, O., Sayin, Z., Huseyin Hadimli, H., Sakmanoglu, A., Pinarkara, Y., Ozdemir, O., Maden, M. (2014). The Effectiveness of Anti- *R. equi* Hyperimmune Plasma against *R. equi* Challenge in Thoroughbred Arabian Foals of Mares Vaccinated with *R. equi* Vaccine. *The Scientific World Journal*.
Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/480732/>
Fecha de consulta: 2 de Noviembre del 2015.
 20. Felipe Flaminio, M. J. B. (2010). Immunity to *Rhodococcus equi*. *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP*. Baltimore, USA, p. 132-139.
 21. Felipe Flaminio, M. J. B., Nydam, D. V., Marquis, H., Matychak, M. B., Giguère, S. (2009). Foal monocyte-derived dendritic cells become activated upon *Rhodococcus equi* infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 16(2): 176-183.
 22. Ferrari, A., Sader, M., Pérez, F., López, D., Recuero, M. (2012). Caracterización y potencialidades del sector ecuestre en Uruguay.
Disponible en: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/es/wp->

23. Garton, N. J., Gilleron, M., Brando, T., Dan, H. H., Giguère, S., Puzo, G., Sutcliffe, I. C. (2002). A novel lipoarabinomannan from the equine pathogen *Rhodococcus equi*: Structure and effect on macrophage cytokine production. *Journal of Biological Chemistry*, 277(35): 31722-31733.
24. Giguère, S., Cohen, N. D., Keith Chaffin, M., Hines, S. A., Hondalus, M. K., Prescott, J. F., Slovis, N. M. (2011). *Rhodococcus equi*: Clinical Manifestations, Virulence, and Immunity. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25(6): 1221-1230.
25. Giguère, S., Cohen, N. D., Keith Chaffin, M., Slovis, N. M., Hondalus, M. K., Hines, S. A., Prescott, J. F. (2011). Diagnosis, Treatment, Control, and Prevention of Infections Caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25: 1209-1220.
26. Giguère, S., Gaskin, J. M., Miller, C., Bowman, J. L. (2002). Evaluation of a commercially available hyperimmune plasma product for prevention of naturally acquired pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(1): 59-63.
27. Giguère, S., Wilkie, B. N., Prescott, J. F. (1999). Modulation of cytokine response of pneumonic foals by virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 67(10): 5041-5047.
28. Giles, C., Ndi, O., Barton, M. D., Vanniasinkam, T. (2016). An Adenoviral Vector Based Vaccine for *Rhodococcus equi*. *PloS one*, 11(3), e0152149.
29. Giles, C., Vanniasinkam, T., Ndi, S., Barton, M. D. (2014). *Rhodococcus equi* (Prescottella equi) vaccines; the future of vaccine development. *Equine Veterinary Journal*, 47: 1-9.
30. Gressler, L., Petri da Silveira, B., Shwab, M. L., Castagna de Vargas, A., Pötter, L., de Avila Botton, S. (2015). Susceptibility profile of Brazilian *Rhodococcus equi* isolates against azithromycin, clarithromycin and erythromycin. *Ciência Rural*, 45(4): 680-683.
31. Hardefeldt, L. Y., Keuler, N., Peek, S. F. (2010). Incidence of transfusion reactions to commercial equine plasma. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(4): 421-425.
32. Higuchi, T., Arakawa, T., Hashikura, S., Inui, T., Senba, H., Takai, S. (1999). Effect of prophylactic administration of hyperimmune plasma to prevent *Rhodococcus equi* infection on foals from endemically affected farms. *Journal of Veterinary Medicine*, 46(9): 641-648.
33. Hines, M. T. (2013). *Rhodococcus equi*. En: Sellon, D. C., Long, M. *Equine Infectious Diseases*. Missouri, Elsevier, p. 287-301.

34. Hooper-McGrevy, K. E., Giguère, S., Wilkie, B. N., Prescott, J. F. (2001). Evaluation of equine immunoglobulin specific for *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins A and C for use in protecting foals against *Rhodococcus equi*-induced pneumonia. *American Journal of Veterinary Research*, 62(8): 1307-1313.
35. Hooper-McGrevy, K. E., Wilkie, B. N., Prescott, J. F. (2003). Immunoglobulin G subisotype responses of pneumonic and healthy, exposed foals and adult horses to *Rhodococcus equi* virulence-associated proteins. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(3): 345-351.
36. Hooper-McGrevy, K. E., Wilkie, B. N., Prescott, J. F. (2005). 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*, 23(50): 5760-5767.
37. Jacks, S., Giguère, S. (2010). Effects of inoculum size on cell-mediated and humoral immune responses of foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*: A pilot study. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133(2-4): 282-286.
38. Johns, I. (2013). Management of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 2013(4): 49-59.
Disponível em: <https://www.dovepress.com/management-of-rhodococcus-equi-pneumonia-in-foals-peer-reviewed-article-VMRR>
Fecha de consulta: 15 de Enero del 2015.
39. Jones, A. L., Sutcliffe, I. C., Goodfellow, M. (2013). *Prescottia equi* gen. nov., comb. nov.: a new home for an old pathogen. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(3): 655-71.
40. Kakuda, T., Hirota, T., Takeuchi, T., Hagiuda, H., Miyazaki, S., Takai, S. (2014). VirS, an OmpR/PhoB subfamily response regulator, is required for activation of vapA gene expression in *Rhodococcus equi*. *BMC Microbiology*, 14(243): 1-9.
41. Kanaly, S. T., Hines, S. A., Palmer, G. H. (1995). Cytokine modulation alters pulmonary clearance of *Rhodococcus equi* and development of granulomatous pneumonia. *Infection and Immunity*, 63(8): 3037-3041.
42. Lazzari, A., Castagna de Vargas, A., Dutra, V., Matiuzzi da Costa, M., Auri Santos Flores, L. (1997). Aspectos epidemiológicos do *Rhodococcus equi* em equinos do município de Bagé, RS, Brasil. *Ciência Rural*, 27(3): 441-446.
43. Letek, M., González, P., MacArthur, I., Rodríguez, H., Freeman, T. C., Valero-Rello, A., Blanco, M., Buckley, T., Cherevach, I., Fahey, R., Hapeshi, A., Holdstock, J., Leadon, D., Navas, J., Ocampo, A., Quail, M. A., Sanders, M., Scotti, M. M., Prescott, J., Fogarty, U., Meijer, W. G., Parhill, J., Bentley, S. D., Vázquez-Boland, J. A. (2010). The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: Cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genetics*, 6(9):

e1001145.

44. Lewis, M. J., Wagner, B., Woof, J. M. (2008). The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies. *Molecular Immunology*, 45(3): 818-827.
45. Lopez, a M., Hines, M. T., Palmer, G. H., Alperin, D. C., Hines, S. A. (2002). Identification of pulmonary T-lymphocyte and serum antibody isotype responses associated with protection against *Rhodococcus equi*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6): 1270-1276.
46. Lunn, D. P., Horohov, D. W. (2004). The equine immune system. En: Reed, S. M., Bayly, W. M., Sellon, D. C. *Equine Internal Medicine*. 2^a ed., Missouri, Saunders, p. 1-26.
47. Madigan, J., Hietala, S., Muller, N. (1991). Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. *Journal of Reproduction and Fertility*, 44: 571-578.
48. Madrigal, R. G., Shaw, S. D., Witkowski, L. A., Sisson, B. E., Blodgett, G. P., Chaffin, M. K., Cohen, N. D. (2016). 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*, 30(2): 664-670.
49. Martens, R. J., Martens, J. G., Fiske, R. A. (1991). Failure of passive immunisation by colostrum from immunised mares to protect foals against *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 23(S12): 19-22.
50. Martens, R. J., Martens, J. G., Fiske, R. A. (1989). *Rhodococcus equi* foal pneumonia: protective effects of immune plasma in experimentally infected foals. *Equine Veterinary Journal*, 21(4): 249-255.
51. Martens, R. J., Martens, J. G., Renshaw, H. W., Hietala, S. K. (1987). *Rhodococcus equi*: Equine neutrophil chemiluminescent and bactericidal responses to opsonizing antibody. *Veterinary Microbiology*, 14(3): 277-286.
52. Martens, R. J., Miller, N. A., Cohen, N. D., Harrington, J. R., Bernstein, L. R. (2007). Chemoprophylactic Antimicrobial Activity of Gallium Maltolate against Intracellular *Rhodococcus equi*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(8): 341-345.
53. Mcqueen, C. M., Doan, R., Dindot, S. V, Bourquin, J. R., Zlatev, Z. Z., Chaffin, M. K., Blodgett, G. P., Ivanov, I., Cohen, N. D. (2014). Identification of Genomic Loci Associated with *Rhodococcus equi* Susceptibility in Foals, PLoS ONE, 9(6): 1-10.
54. Mechelen, E. Van. (2015). Innate immunity of the foal. Thesis, Ghent University, p.30.
55. Muscatello, G. (2012). *Rhodococcus equi* pneumonia in the foal - Part 1:

Pathogenesis and epidemiology. *Veterinary Journal*, 192(1): 20-26.

56. Muscatello, G., Anderson, G. A., Gilkerson, J. R., Browning, G. F. (2006). Associations between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the Epidemiology of *R. equi* Pneumonia on Australian Thoroughbred Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9): 6152-6160.
57. Perkins, G. A., Goodman, L. B., Wimer, C., Freer, H., Babasyan, S., Wagner, B. (2014). Maternal T-lymphocytes in equine colostrum express a primarily inflammatory phenotype. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 161(3-4): 141-150.
58. Perkins, G. A., Wagner, B. (2015). The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Veterinary Journal*, 47(3): 267-274.
59. Perkins, G. A., Yeager, A., Erb, H. N., Nydam, D. V, Divers, T. J., Bowman, J. L. (2001). Survival of Foals with Experimentally Induced *Rhodococcus equi* Infection Given Either Hyperimmune Plasma Containing *R. equi* Antibody or Normal Equine Plasma. *Veterinary Therapeutics*, 3(3): 334-346.
60. Reynolds, N. (2012). Plasma Transfusion Reactions. Disponible en: <http://www.veterinaryimmunogenics.com/News/Transfusion%20Reactions.pdf>
Fecha de consulta: 21 de Julio del 2016.
61. Rocha, J. N., Cohen, N. D., Bordin, A. I., Brake, C. N., Giguère, S., Coleman, M. C., Alaniz, R. C., Lawhon, S. D., Mwangi, W., Pillai, S. D. (2016). Oral Administration of Electron-Beam Inactivated *Rhodococcus equi* Failed to Protect Foals against Intrabronchial Infection with Live, Virulent *R. equi*. *PLoS ONE*, 11(2): 1-18.
62. Rusca Correa Porto, A. C., Fernandes, W. R., Roque Barreira, M. C. (2011). *Rhodococcus equi*: epidemiologia , manifestações clínicas , diagnóstico e tratamento. *Ciência Rural*, 41(12): 2143-2150.
63. Sanz, M. G., Loynachan, A., Horohov, D. W. (2016). *Rhodococcus equi* hyperimmune plasma decreases pneumonia severity after a randomised experimental challenge of neonatal foals. *The Veterinary Record*, 178(11), 261.
64. Sanz, M. G., Oliveira, a F., Page, A., Horohov, D. W. (2014). Administration of commercial *Rhodococcus equi* specific hyperimmune plasma results in variable amounts of IgG against pathogenic bacteria in foals. *The Veterinary Record*, 175 (19): 1-5.
65. Sanz, M. G., Oliveira, A. F., Loynachan, A., Page, A., Svansson, V., Giguère, S., Horohov, D. W. (2015). Validation and evaluation of VapA-specific IgG and IgG subclass enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to identify foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *Equine Veterinary Journal*, 48(1):103-108.
66. Sanz, M. G., Villarino, N., Ferreira-Oliveira, A., Horohov, D. W. (2015). VapA-

specific IgG and IgG subclasses responses after natural infection and experimental challenge of foals with *Rhodococcus equi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 164(1-2): 10-15.

67. Sanz, M. G., Loynachan, A., Sun, L., Oliveira, A., Breheny, P., Horohov, D. W. (2013). The effect of bacterial dose and foal age at challenge on *Rhodococcus equi* infection. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4):623-631.
68. Slovis, N. M., Acvim, D., Mccracken, J. L., Mundy, G. (2005). How to Use Thoracic Ultrasound to Screen Foals for *Rhodococcus equi* at Affected Farms. Proceedings of the 51st Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Seattle, Washington, USA, p. 274-278.
69. Szeredi, L., Molnár, T., Glávits, R., Takai, S., Makrai, L., Dénes, B., Del Piero, F. (2006). Two cases of equine abortion caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Pathology*, 43(2): 208-11.
70. Takai, S., Kawazu, S., Tsubaki, S. (1986). Immunoglobulin and specific antibody responses to *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* infection in foals as measured by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 23(5): 943-947.
71. Takai, S., Sekizaki, T., Ozawa, T., Sugawara, T., Watanabe, Y., Tsubaki, S. (1991). Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infection and Immunity*, 59(11): 4056-4060.
72. Tennent-Brown, B. (2011). Plasma Therapy in Foals and Adult Horses. *Compendium Continuing Education for Veterinarians*, 33(10):E1-4.
73. Treloar, S. K., Dhand, N. K., Muscatello, G. (2012). *Rhodococcus equi* pneumonia and future racing performance of the Thoroughbred. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(10): S16-S17.
74. Varga, J., Fodor, L., Rusvai, M., Soós, I., Makrai, L. (1997). Prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia of foals using two different inactivated vaccines. *Veterinary Microbiology*, 56(3-4): 205-212.
75. Vázquez-Boland, J. A., Letek, M., Valero-Rello, A., González, P., Scotti, M., Fogarty, U. (2010). *Rhodococcus equi* and Its Pathogenic Mechanisms. En: Alvarez, H. M., *Biology of Rhodococcus*, 16^a ed., Berlin, Springer, p. 331-359.
76. Vázquez-Boland, J. A., Giguère, S., Hapeshia, A., MacArthur, I., Anastasia, E., Valero-Rello, A. (2013). *Rhodococcus equi*: The many facets of a pathogenic actinomycete. *Veterinary Microbiology*, 167: 9-33.
77. Venner, M., Astheimer, K., Lämmer, M., Giguère, S. (2013). Efficacy of Mass Antimicrobial Treatment of Foals with Subclinical Pulmonary Abscesses Associated with *Rhodococcus equi*. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(1): 171-176.

78. Venner, M., Rodiger, A., Laemmer, M., Giguere, S. (2012). Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Journal*, 192(3): 293-298.
79. Von Bargen, K., Haas, A. (2009). Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33: 870-891.
80. Von Bargen, K., Polidori, M., Becken, U., Huth, G., Prescott, J. F., Haas, A. (2009). *Rhodococcus equi* virulence-associated protein A is required for diversion of phagosome biogenesis but not for cytotoxicity. *Infection and Immunity*, 77(12): 5676-5681.
81. Wagner, B., Burton, A., Ainsworth, D. (2010). Interferon-gamma, interleukin-4 and interleukin-10 production by T helper cells reveals intact Th1 and regulatory TR1 cell activation and a delay of the Th2 cell response in equine neonates and foals. *Veterinary Research*, 41(47): 1-14.
82. Wang, X., Coulson, G. B., Miranda-CasoLuengo, A. A., Miranda-CasoLuengo, R., Hondalus, M. K., Meijer, W. G. (2014). IcgA is a virulence factor of *Rhodococcus equi* that modulates intracellular growth. *Infection and Immunity*, 82(5): 1793-1800.

12 ANEXO – Análisis de frecuencias (chi²)

row	col			Total
	1	2	3	
1	0	3	0	3
2	19	16	19	54
Total	19	19	19	57

Pearson chi2(2) = 6.3333 Pr = 0.042
 likelihood-ratio chi2(2) = 6.9317 Pr = 0.031
 Cramér's V = 0.3333
 gamma = 0.0000 ASE = 0.162
 Kendall's tau-b = 0.0000 ASE = 0.044
 Fisher's exact = 0.099

Análisis de frecuencias (chi²) de positivos y negativos en M-1, M0 y M50.

Valor de probabilidad 0,042. 4,2% que esto no sea cierto. Existen diferencias significativas (p=0,042) entre las M-1, M0, M50.

row	col		Total
	1	2	
1	23	20	43
2	1	1	2
Total	24	21	45

Pearson chi2(1) = 0.0093 Pr = 0.923
 likelihood-ratio chi2(1) = 0.0093 Pr = 0.923
 Cramér's V = 0.0144
 gamma = 0.0698 ASE = 0.720
 Kendall's tau-b = 0.0144 ASE = 0.149
 Fisher's exact = 1.000
 1-sided Fisher's exact = 0.721

Análisis de frecuencias (chi²) de positivos y negativos en M30 y M50.

No existen diferencias significativas entre proporción de positivos en 60 o 80 días.