

Producción de una bacterina para inmunización de potros frente a *Rhodococcus equi*

Galán Torres JA.¹, Serrano Valín A.², Aguinaga Zapata H.³, Tabanera de Lucio A.⁴, Castro Urda J.⁴

Sanid. mil. 2009; 65 (2): 107-112

RESUMEN

Rhodococcus equi es un importante patógeno causante de neumonía piogranulomatosa muy grave en potros menores de tres meses. En este trabajo se describe un brote de la enfermedad en una Yeguada Militar. Tras el aislamiento e identificación del agente causal y la determinación de su sensibilidad a los antibióticos, se preparó una vacuna inactivada por calor y formaldehído para la inmunización de yeguas gestantes y potrillos de más de 6 semanas de vida. El resultado tras diez años de aplicación sistemática de la misma ha sido satisfactorio, no habiéndose dado ningún nuevo caso de esta patología ni presentado reacciones adversas locales o sistémicas.

PALABRAS CLAVE: *Rhodococcus equi*. Potros. Inmunización.

A bacterine output for fous immunization against *Rhodococcus equi*

ABSTRACT:

Rhodococcus equi is an important pathogen, causing quite serious piogranulomatous pneumonia within less than three months fous. In this paper, an outbreak in a stud, Military livestock, is described. After isolation and identification of the causing agent, as much as its antimicrobial susceptibility determination, an inactivated vaccine, by heat and formaldehyde, was performed for immunization of pregnant mares and little fous, with more than six weeks of life. The result, after ten years with systematic application of the vaccine was well satisfactory, without any new case of this pathology and without adverse reactions, local or systemic.

KEY WORDS: *Rhodococcus equi*. Fous. Immunization.

INTRODUCCIÓN

En 1923, Magnusson, en Suecia¹, aisló un germen al que dio el nombre de *Corynebacterium equi*, de una neumonía supurada de un potro. Posteriormente se sucedieron diversos aislamientos en Estados Unidos y, en 1936, en Dinamarca a partir de lesiones tuberculoides de los ganglios cervicales del cerdo. La enfermedad habría sido reconocida desde 1600.

Rhodococcus equi fue designado como tal en 1977, aprobándose oficialmente su nomenclatura en 1980. Debido a la composición de su pared celular y a la homología del DNA se ha incluido en el orden Actinomycetales, familia *Nocardiaceae*, junto con los géneros *Nocardia*, *Gordona* y *Skermania*². Es un microorganismo productor de zoonosis, causante de neumonía granulomatosa y abscesos de pulmón en los potros con menos de seis meses de edad.

Infecta esporádicamente a otros mamíferos, entre ellos el gato, el perro y el cerdo; también cabras³, en el cual produce adenitis submandibular. Es un patógeno intracelular facultativo que infecta los macrófagos y los polimorfonucleares². En humanos afecta especialmente a pacientes con alteraciones de la inmunidad celular, tratamiento inmunodepresor, neoplasias hematológicas y, en general, cualquier tipo de

inmunodeficiencia. No obstante, la infección es posible, aunque muy infrecuente, en personas inmunocompetentes⁴.

El género *Rhodococcus* incluye nueve especies², siendo *R. equi* la más frecuente y con mayor poder patógeno (Figs. 1-3). Se han encontrado otras especies en diferentes muestras clínicas humanas, generalmente no asociadas a infección respiratoria, sino a úlcera corneal, endoftalmitis postquirúrgica, peritonitis o nódulos subcutáneos⁴.

Rhodococcus equi es un cocobacilo Gram-positivo (Fig. 2) muy pleomórfico y poco reactivo desde el punto de vista bioquímico. No oxida ni fermenta los azúcares y no es proteolítico, pudiendo



Figura 1. Colonias de *Rhodococcus equi* con su característico aspecto mucoso y color salmón.

¹ Tcol. Veterinario. Jefe del Servicio de Microbiología, Higiene y Sanidad Ambiental.

² Técnico analista de laboratorio.

³ Licenciada en Farmacia.

⁴ Cte. Veterinario. Especialista en Microbiología, Higiene y Sanidad Ambiental. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa.

Dirección para correspondencia: J. A. Galán Torres. Servicio de Microbiología, Higiene y Sanidad Ambiental. Centro Militar de Veterinaria de la Defensa. Dario Gazapo 3. 28024 Madrid.

Recibido: 2 de marzo de 2009

Aceptado: 9 de abril de 2009

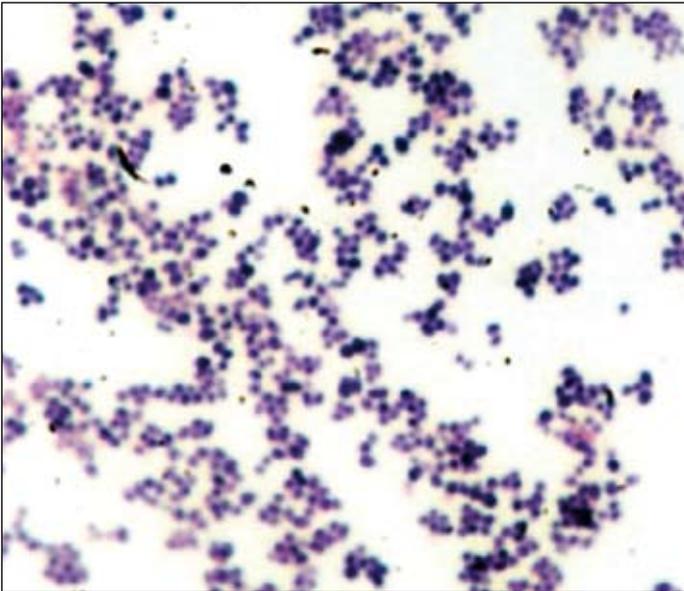


Figura 2. *Rhodococcus equi*. 1000x.



Figura 3. Colonias de *Rh. equi* en agar infusión cerebro-corazón.



Figura 4. Potrillo de tres semanas de edad junto a su madre. Yeguada Militar.

ser identificado con las siguientes pruebas: catalasa (+), oxidasa (-), ureasa (+), movilidad (-), no forma indol ni licúa la gelatina. No modifica la leche tornasolada y puede utilizar la glucosa sin producción de ácido. Reduce los nitratos a nitritos, hidroliza la esculina y produce el denominado *factor equi*¹⁻⁵.

La evidencia de este factor es muy importante, ya que se ha demostrado en todas las cepas aisladas hasta el momento. Su fundamento e investigación es similar a la prueba del CAMP efectuada para diferenciar los estreptococos del grupo B del resto de los estreptococos β -hemolíticos. En este caso, el *factor equi* interacciona con la fosfolipasa D de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, la β -toxina de *Staphylococcus aureus* y una hemolisina de *Listeria monocytogenes*, produciendo un aumento de la hemólisis de estas cepas. El ensayo se realiza en una placa de agar sangre en donde se siembra verticalmente una estría de *R. equi* y, perpendicular a ésta, otra de alguno de los tres organismos anteriormente mencionados².

Rhodococcus equi es un patógeno ambiental oportunista con distribución universal, que se encuentra en el aire, el agua y la tierra. Coloniza el intestino de los omnívoros y los herbívoros, principalmente caballos. Origina una bronconeumonía supurativa en los potros de 1 a 4 meses. Esta importante enfermedad se caracteriza por la formación de abscesos en el pulmón. El contacto directo con los animales, sus excrementos y con el estiércol puede ser el origen de la infección, siendo la inhalación el mecanismo de transmisión más probable, aunque también es posible adquirirlo por inoculación a través de la piel, membranas mucosas e ingestión oral².

El microorganismo está presente a menudo en grandes cantidades en las heces de potros sanos de menos de 3 meses de edad (Fig. 4) y puede también aislarse de las heces de caballos adultos y de otros mamíferos y pájaros⁵.

Se puede producir la concentración de *R. equi* en pastos con mucha carga de caballos, ocasionando brotes de la enfermedad. A veces, cuando los potros afectados se tragan los esputos que contienen grandes cantidades de la bacteria, se pueden producir enterocolitis ulcerativas granulomatosas y linfadenitis mesentéricas⁶.

La virulencia de *R. equi*, patógeno intracelular, está principalmente asociada con antígenos específicos de superficie codificados en el DNA de un plásmido grande. La producción de estos antígenos es dependiente de la temperatura y se expresan entre 34° y 41° C. Otros factores que incrementan la virulencia incluyen los polisacáridos capsulares y los ácidos micólicos de la pared celular que retrasan la fagocitosis, y también algunos isoenzimas. La particular susceptibilidad de los potros menores de 4 meses a la bronconeumonía causada por este patógeno se atribuye por algunos autores a la reducida inmunidad celular de los pulmones².

En humanos se ha comunicado la transmisión entre enfermos hospitalizados y un caso de probable adquisición ocupacional en un trabajador de laboratorio, sin ningún tipo de inmunodepresión y que desarrolló un episodio neumonía causada por éste microorganismo⁴.

Tabla I. Cuadros clínicos asociados a *Rhodococcus equi*

Hospedador	Cuadro clínico
Potros de 1 a 4 meses de edad	Bronconeumonía supurativa y abscesos bronquiales
Caballos	Abscesos superficiales
Cerdos, vacuno	Linfoadenopatía cervical moderada
Gatos, cabras ⁴ , otros	Abscesos subcutáneos y granulomas mediastínicos

Producción de una bacterina para inmunización de otros frente a *Rhodococcus equi*

Provoca infecciones en pacientes inmunocomprometidos, principalmente VIH, provocando infección pulmonar crónica y en ocasiones abscesos intracerebrales por diseminación hematogena.

Los signos clínicos varían según la edad a la que el potro se infecta. La enfermedad aguda se produce generalmente en potros de un mes de edad, con aparición súbita de fiebre, anorexia y signos de bronconeumonía. La enfermedad tiende a ser insidiosa en potros de 2 a 4 meses de edad y las lesiones pueden estar muy avanzadas antes de que el animal presente tos, disnea, pérdida de peso, intolerancia al ejercicio y un sonido estertor característico alto y húmedo en la auscultación pulmonar. Se produce leucocitosis (neutrofilia) y aumento del fibrinógeno (por los abscesos pulmonares). Ocasionalmente se puede presentar diarrea. También pueden verse afectadas las articulaciones y formación de abscesos en otras localizaciones en caballos adultos.

La presencia de malacoplaquia, respuesta granulomatosa crónica con cuerpos de Michaelis-Gutmann y microabscesos necrosantes, asociados a la presencia de cocos Gram positivos intracelulares, es característica de las lesiones pulmonares producidas por *R. equi*. Su hallazgo debe hacer sospechar la infección por este organismo, aunque se ha descrito también en otras infecciones bacterianas. Los animales de experimentación son resistentes, aunque algunas cepas matan al ratón y al cobayo. Los embriones de pollo inoculados mueren entre 4-6 días⁵.

El tratamiento de elección, aunque caro, es una combinación oral de rifampicina (5 mg/kg cada 12 horas o 10 mg/kg cada 24) y eritromicina durante 4 a 10 semanas. Sin embargo, en los potros gravemente afectados puede no ser efectivo. La respuesta a la terapia puede ser evaluada radiográficamente. La terapia de apoyo incluye rehidratación y el uso de agentes broncodilatadores o expectorantes.

La condición de patógeno intracelular confiere a *R. equi* unas características especiales respecto a los estudios de sensibilidad y la elección del tratamiento antibiótico. En este caso, la sensibilidad *in vitro*, no siempre se correlaciona con la eficacia *in vivo*. Por otra parte, el éxito del tratamiento depende de la utilización de antibióticos que puedan penetrar en los macrófagos y neutrófilos y ser activos en un medio en donde el organismo sobrevive y existen concentraciones de oxígeno bajas y un pH ácido⁶.

Los tratamientos combinados pueden mostrar mayor eficacia y evitan la selección de mutantes resistentes. Dada la frecuencia de bacteriemia y la posible diseminación de *R. equi* por el organismo, se ha sugerido que todas las pautas de tratamiento en medicina humana incluyan un antibiótico con buena penetración en el sistema nervioso central⁴.

Se pueden utilizar test de aglutinación e inmunodifusión (con antígeno y antisuero positivo control) para el diagnóstico en animales sospechosos mediante la detección de anticuerpos. En suero de potrillos infectados, también para la evaluación semicuantitativa de la respuesta inmune en animales vacunados o en potrillos recién nacidos cuyas madres hayan sido vacunadas durante la preñez. Las medidas de control incluyen la observación clínica periódica de los potros hasta los 4 meses de edad, sobre todo en aquellas granjas donde haya tenido lugar la enfermedad. Es deseable la prevención de la concentración de *R. equi* en el ambiente, retirando el estiércol de los pastos a intervalos regulares y trasladando a los potros y sus yeguas a pastos frescos. También debe minimizarse las condiciones polvorientas de los corrales y cercados^{7,8}.

Se ha asegurado que el suero hiperinmune de la yegua, administrado al potro en la primera semana de vida, seguida de otra administra-

ción 30 días después, reduce la prevalencia de la enfermedad. El suero debe contener entre 1 y 2,2 gramos % de gammaglobulinas y 6,5 a 8,5 gramos % de proteínas totales. Se puede almacenar en bolsas estériles de 500-1.000 ml utilizando citrato como anticoagulante y fosfatos como estabilizador y mantener congelado a -20°C. Las dosis pueden oscilar entre 0,5 y 2 litros según la gravedad del caso. Existen algunas vacunas en el mercado; en Argentina se produce Rhodovac[®]), aunque su empleo no está extendido. Algunos ensayos realizados no han podido demostrar la protección de potros infectados experimentalmente. El potro no adquiere la inmunidad hasta unas tres semanas después de la administración de la vacuna y la infección suele aparecer antes de este periodo de tiempo. La vacunación en yeguas preñadas se realiza 45 y 15 días antes de la fecha del parto⁹.

Las vacunas autógenas pueden ser más beneficiosas que las comerciales. Se han descrito reacciones locales y abscesos en el punto de inoculación y no deben utilizarse en individuos con enfermedad clínica⁹.

Descripción de un brote

A continuación se describe resumidamente un brote ocurrido en la Yeguada Militar de Jerez en el año 1999. Años antes se habían dado algunos casos no bien documentados.

Los potros afectados presentaban un estado de astenia y andar errático que los retrasaba siempre del grupo. La época de presentación del cuadro clínico coincidió con los meses de julio y agosto en un año especialmente seco. En estas condiciones los animales inhalaban una gran cantidad de polvo en los movimientos de la manada. Se debe tener en cuenta que se trata de un germen telúrico muy resistente a la desecación y a la luz solar.

También se presentó un cuadro pirético de en torno a 40°C con anorexia y decaimiento general. La destilación nasal se hacía frecuente conforme avanzaba el cuadro y era amarilla y espesa. A la auscultación presentaban roncus y sibilancias, más acentuadas en los lóbulos apicales pulmonares. La presencia de tos alcanzaba el 75%.

Hallazgos de necropsia

Abscesos pulmonares con tamaños que oscilaban entre 1 y 8 cm (Fig. 5). El pus era muy espeso y amarillento (Fig. 6). Los lóbulos



Figura 5. Nódulos granulomatosos en el pulmón de un potro.



Figura 6. Pulmón de un potro muerto durante el brote.

apicales eran siempre los más afectados aunque los abscesos se repartían por todo el parénquima pulmonar. En ocasiones encontramos también abscesos en los ganglios mesentéricos y mediastínicos (Fig. 7). La presencia de ascitis era baja. Las asas intestinales tenían un aspecto pálido, así como las mucosas.

Epidemiología

Afectó con mayor incidencia a los potros de pura raza árabe (PRa) con respecto a los potros de pura raza española (PRe). De 30 potros nacidos ese año de PRa se infectaron 20 y murieron, estando en tratamiento, 12. En potros de PRe, sobre un total de 70 murieron 2 en el curso del tratamiento. Esta mayor incidencia en los PRa se achacó a su mayor grado de homocigosis,

Diagnóstico

El cuadro clínico descrito, los hallazgos de necropsia y la falta de respuesta a las combinaciones antibióticas habituales, indujo a tomar una muestra por lavado bronco-alveolar en un paciente con cuadro clínico agudo, para su remisión al Servicio de Microbiología del CEMIL-VET. También se recogió una muestra mediante hisopado lesional durante una necropsia. El resultado laboratorial fue concluyente: *R. equi*.

Se consideró la posibilidad de realizar placas de tórax para el diagnóstico en vivo pero el equipo no era adecuado. La sonda lineal de 5 MHz fue insuficiente para detectar los abscesos pulmonares.

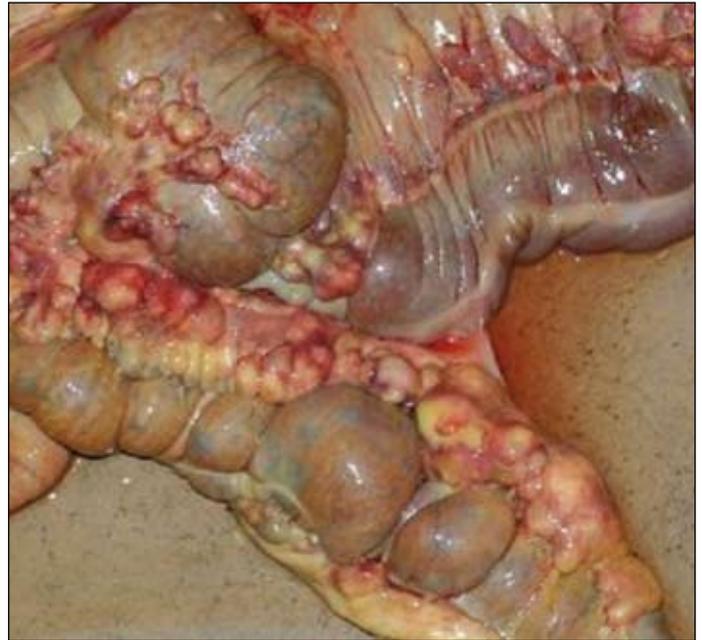


Figura 7. Afectación de ganglios mesentéricos.

Tratamiento

El tratamiento seguido fue el de elección, consistente en una combinación de rifampicina y eritromicina⁶. Las dosis y pauta recomendada son de 25 a 30 mg/kg cada 6 horas para la eritromicina y de 5 a 10 mg/kg de rifampicina cada 12 horas. Debido a las dificultades de manejo y falta de personal, la pauta seguida fue de 30 mg/kg de eritromicina y 10 mg/kg de rifampicina cada 12 horas. Se ha estimado que la rifampicina usada en solitario puede causar resistencia y es frecuente que aumente el cuadro pirético con su uso. En algunos casos se apoyó la terapia respiratoria con clenbuterol.

En general, *Rhodococcus equi* es sensible *in vitro* a ciprofloxacino, vancomicina, eritromicina y rifampicina. Presenta variabilidad a gentamicina, tobramicina, amikacina, clindamicina, tetraciclina y cloranfenicol. Y es resistente a penicilinas y cefalosporinas.

Prevención y control

Estudiando retrospectivamente el caso nos dimos cuenta que los potros más afectados, a parte de la raza, tenían en común ser los últimos en nacer (en torno al mes de abril-mayo), de un año con escaso pasto por la fuerte sequía. En consecuencia se decidió terminar las cubriciones un mes antes, en especial en aquellos años que se presentaban muy secos.

MATERIAL Y MÉTODO

Con el germen aislado, el Servicio de Microbiología del CEMILVET preparó una autovacuna tipo bacterina (Fig. 8). El año siguiente se vacunaron las yeguas madres estableciéndose una primoinmunidad con 15 días de intervalo entre dosis en los dos últimos meses de gestación^{10,11}.

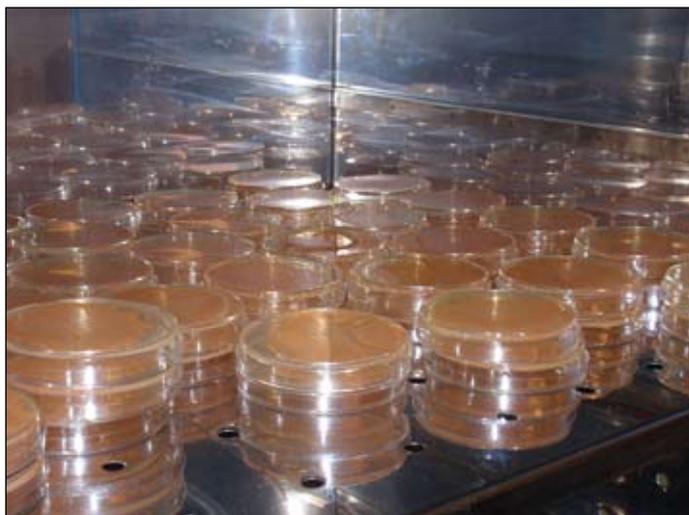


Figura 8. Cultivos en superficie de la cepa de *Rh. equi* aislada para preparación del antígeno.



Figura 9. Viales de 10 ml con suspensión inactivada de *R. equi*.

Se seleccionaron 6 yeguas de PRe a las que se hiperinmunizó con 6 dosis de bacterina separadas 2 semanas-2 semanas-3 semanas-3 semanas-3 semanas. Estas yeguas, a los 15 días de la última vacunación, se utilizaron para la extracción de plasma hiperinmune, que se congeló en dosis de un litro^{12,13}.

Al año siguiente se tomó control de temperatura a los potros de PRA con edades comprendidas entre los dos y los tres meses, transfundiéndoles plasma a aquellos que presentaban temperatura superior a 39°C con cuadro sospechoso de enfermedad. Sólo se trataron 5 potros y el resultado fue satisfactorio en 4 de ellos. El resto del plasma se utilizó en transfusiones a potros que dieron a los 5 días de vida, por la prueba del glutaraldehído, tasa de IgG inferiores a 800 mg/dL.

Esta prueba semicuantitativa se realiza con el objeto de determinar el estado inmunológico de los potros y evaluar cual ha sido la cantidad de calostro que mamaron en las primeras 24 horas de vida, siendo esta la única fuente de defensas que puede adquirir el potro, ya que nace sin ningún tipo de anticuerpos (agammaglobulinémico). Se basa en la coagulación de las inmunoglobulinas por el glutaraldehído. La técnica consiste en colocar un tubo de ensayo 0,5 ml de suero y agregar una gota del reactivo. Se debe agitar y luego observar la gelificación cada 10 minutos durante una hora. Cuando se produce un gel sólido y firme la reacción es positiva. Cuando la gelificación es incompleta la reacción es dudosa, y si no se produce aquella es negativa.

Los valores normales para un estado inmunitario adecuado en los potros, deben alcanzar los 10 mg/ml de IgG, tomándose como mínimo aceptable el valor de 8 mg/ml. Para ello la gelificación se debe producir en los 30 y 40 minutos de iniciada la reacción.

Desde entonces se continúa con la pauta de vacunación de madres gestantes y potros de riesgo con dos meses de vida.

Preparación de la bacterina

A partir de la cepa aislada en el referido brote y tras pase por embrión de pollo, se elaboró una bacterina (Fig. 9) mediante inactivación por calor y formaldehído a baja concentración y a la que se añadió un 1% de hidróxido de aluminio al 2,5%. La concentración de microorganismos por ml se estimó en $1,5 \times 10^9$ aprox., por

método turbimétrico. Se realizaron las correspondientes pruebas de inactivación e inocuidad.

La cepa de *R. equi* aislada ha quedado depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Pautas de vacunación

– Potros: A partir de las 4-6 semanas de edad: 1.ª inoculación 2 ml. SC. 2.ª inoculación 3 ml. SC, dos semanas después de la anterior.

– Yeguas 1.ª inoculación 4 ml. SC. 2.ª inoculación 6 ml. SC. 2-4 semanas después de la anterior, en los dos últimos meses de gestación.

DISCUSIÓN

La respuesta inmunitaria frente a patógenos intracelulares facultativos es a menudo insuficiente; la respuesta inmunomediada por células no está totalmente aclarada en la actualidad (casi todo el conocimiento sobre estos hechos se han desarrollado en ratones), y se centran en la propia actividad fagocítica, el complemento C5, el mecanismo de actuación de los linfocitos T mediante la secreción de citoquinas, la citotoxicidad directa y la respuesta de células NK.

Es difícil producir vacunas para promover el tipo celular de inmunidad que se piensa es especialmente importante en esta infección.

La escasa respuesta inmune humoral en los potros frente a *Rhodococcus equi*, probablemente por falta de maduración de su inmunidad celular¹⁴ y también por una especial sensibilidad del tejido pulmonar a la presencia del patógeno, plantea la necesidad de hiperinmunizar a las yeguas madres para que el calostro pueda proteger específicamente al recién nacido frente al contacto inicial con la bacteria durante los primeros días de vida¹⁵.

Se debe recordar que las inmunoglobulinas desaparecen del calostro a las 24-36 horas tras el parto, que la acción de mamar estimula la secreción de algunas de ellas, y que el intestino del neonato

solamente es permeable a las proteínas grandes prácticamente durante ese mismo tiempo.

La utilización de cultivos integrales del patógeno inactivado por calor y formalina y absorbidos en alumbre se viene realizando en algunos países, aunque principalmente para la inmunización de las yeguas preñadas (45 y 15 días antes del parto), con el fin de conferir inmunidad pasiva a los potrillos por vía calostrada. Suele administrarse 1 ml SC.

Para mejorar los resultados se ha preconizado, en algunas bacterinas, inyectar levamisol por su actividad estimuladora de la respuesta inmune.

CONCLUSIONES

En la utilización con fines inmunizantes de suspensiones de gérmenes inactivados es muy conveniente emplear la cepa o variedad que ha causado brotes de la enfermedad en una determinada explotación, ello es particularmente importante cuando se trata de gérmenes de extraordinaria ubicuidad.

El empleo de gérmenes vivos atenuados en aerosoles aunque puede ser eficaz se considera peligroso. En nuestro caso, el empleo de bacterinas autógenas preparadas a partir de material infectado nos ha dado resultado satisfactorio a lo largo de más de diez años de su empleo preventivo en las distintas yeguas militares.

Según nuestra experiencia, la potenciación de la inmunidad pasiva calostrada a través de la vacunación de las yeguas gestantes en los dos últimos meses previos al parto, y la aplicación en potrillos de una bacterina a partir de una cepa autóctona, es una manera eficaz y razonable de prevenir la presencia de esta enfermedad en los establecimientos de cría.

La aplicación del producto no ha provocado efectos adversos locales ni sistémicos. No se ha dado ningún caso de neumonía en los potrillos durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento a los compañeros veterinarios de la Yeguada Militar de Jerez.

BIBLIOGRAFÍA

1. Merchant JA y Packer RA. Bacteriología y Virología Veterinarias. Ed. Acribia. 1970; 447-49.
2. Quinn PJ, et al. Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Ed. Acribia. 2002; 73-75.
3. Gutiérrez C, Corbero JA, Juste MC, Padrón TR, Doreste F. Infección por *Rhodococcus equi* en el caprino: A propósito de 2 casos. 2005. Comunicación. Facultad de Veterinaria. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 35416, Arucas. Las Palmas.
4. Prescott JF. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. Clin Microbiol Rev. 1991; : 20-34.
5. Mansmann RA, McAllister ES. Equine Medicine and Surgery. American Veterinary Publications, INC. USA. 1982. 3ª ed. Vol. 2: 734-36.
6. Weinstock DM, Brown AE. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin Infect. Dis. 2002; 34: 1379-1385.
7. Knottenbelt DC. *Rhodococcus equi* infection in foals: a report of an outbreak on a thoroughbred stud in Zimbabwe. Veterinary Record. 1993; 132: 79-85.
8. Paredes EM, et al. Primer caso descrito en Chile de neumonía y colitis por *Rhodococcus equi* en un potrillo. Arch. Med. Vet. 2000. V.32 n.1 Valdivia.
9. Fernández AS, Prescott JF, Nicholson, VM. 1997. Protective effect against *Rhodococcus equi* infection in mice of IgG purified from horses vaccinated with virulence associated protein (Vap A) enriched antigen. Vet. Microbiol. 1997; 56: 187-192.
10. Muller N S, Madigan J E. Methods of implementation of an immunoprophylaxis program for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia: Results of a 5-year field study. In: Proceedings of the Assoc. Equine Pract. 1992; 38: 193-201.
11. Ciguere S and Prescott J F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. Veterinary Microbiology. 1997; 56: 313-34.
12. Higuchi T, et al. Physical and serological examinations of foals at 30 and 45 days of age for early diagnosis of *Rhodococcus equi* infection on endemically infected farms. JAVMA 1998; 212: 776-781.
13. Madigan JE, Hietala S, Muller N. Protection against naturally acquired *Rhodococcus equi* pneumonia in foals by administration of hyperimmune plasma. J. Reprod. Fert. 1991; Suppl. 44: 571-578.
14. Cotral GE. Manual of Standardized Methods for Veterinary Microbiology. Comstock. Cornell University Press. 1978; 545-552.
15. Bern D, Lämmler CH. Biochemical and serological characteristics of *Rhodococcus equi* isolates from animals and humans. J. Vet. Med. 1994; B 41: 161-165.