

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Rhodococcus*
***equi* DE POTROS PELA PCR MULTIPLEX DOS**
GENES DA FAMÍLIA VAP

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Monego

Santa Maria, RS, Brasil.
2008

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* DE
POTROS PELA PCR MULTIPLEX DOS GENES DA FAMÍLIA
VAP**

por

Fernanda Monego

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Prof^ª. Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS, Brasil.

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* DE POTROS
PELA PCR MULTIPLEX DOS GENES DA FAMÍLIA VAP**

elaborada por
Fernanda Monego

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

**Agueda Castagna de Vargas, Dra.
(Presidente/Orientador)**

Márcio Garcia Ribeiro, Dr. (UNESP)

Elgion Lucio da Silva Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2008.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Leinor e Cleonice e meu irmão Mauren, que apesar da enorme distância sempre se fizeram presentes, me apoiando em todas as etapas de minha vida.

A professora Agueda, que foi um exemplo de pessoa e profissional, e quem despertou em mim o interesse pela pesquisa.

A todos os professores do mestrado, que foram essenciais para minha formação e aprendizado nesta etapa importante da vida profissional.

A todos os colegas do Laboratório de Bacteriologia de Santa Maria por todos os momentos vividos, de trabalho e de amizade.

Ao Mateus, que foi um excelente professor, me ajudando e orientando em todas as etapas na execução deste trabalho.

A Lílian, Cari, Cris, Lu, Niura, Soninha e Rose, que muito mais que colegas, foram amigas de todas as horas, fundamentais para enfrentar todos os problemas e das quais eu irei lembrar sempre com muito carinho.

Ao Rafa, meu amor, companheiro, amigo e conselheiro, que me apoiou e auxiliou em todos os momentos, sendo o incentivo crucial nas horas de desânimo. Obrigada pela paciência, lealdade e amor.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* DE POTROS PELA PCR MULTIPLEX DOS GENES DA FAMÍLIA VAP

AUTOR: FERNANDA MONEGO

ORIENTADORA: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Santa Maria, 19 de fevereiro de 2008.

O presente estudo tem por objetivo a caracterização molecular de isolados de *Rhodococcus equi* de equinos pela padronização de uma técnica de PCR multiplex para detecção dos genes da família *vap* (*vapA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* e *H*). Foram analisadas 180 amostras de *Rhodococcus equi* de diferentes origens: fezes (112), solo (12) instalações (23) e isolados clínicos (33). A técnica foi padronizada e confirmada pelo sequenciamento da cepa padrão de *R. equi* (ATCC 33701), e de uma amostra de paciente humano contendo o gene *vapB*. Trinta e dois (17,8%) foram positivos para *vapA* e carregavam no mínimo 4 genes *vap* associados. Os 147 isolados oriundos de fezes, instalações e sola não apresentavam genes *vap*. Trinta e dois (97.0%) dos isolados clínicos foram positivos na PCR multiplex e demonstraram seis padrões moleculares, 100% com *vapA*, *vapD* and *vapG*, 86.6% *vapF*, 76,6% *vapH*, 43.3% *vapC*, 36.6% *vapE* e nenhum com *vapB*. O perfil molecular mais freqüente foi *vap A*, *D*, *F*, *G* e *H* presente em 37.5% das cepas. foram obtidos, sendo que os genes *vapA*, *vapD* e *vapG* estavam presentes em todas as amostras. Não foi obtido nenhum padrão molecular para cada propriedade estudada. Esta nova técnica constitui-se um método prático e eficaz para condução de estudos clínicos e epidemiológicos, bem como, por relevar os aspectos moleculares da infecção.

Palavras – chave: *Rhodococcus equi*; *vap*; PCR multiplex; potros; fezes.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Rhodococcus equi* FROM FOALS BY MULTIPLEX PCR FOR VAP GENES

AUTHOR: FERNANDA MONEGO

ADVISER: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Santa Maria, February 19th, 2008.

This study evaluated molecular characteristic of *Rhodococcus equi* isolates obtained from horses and standardized by PCR multiplex assay, which amplifies the *vap* gene family (*vapA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* e *H*). One hundred eighty *Rhodococcus equi* isolates from different sources: healthy horse's feces (112), soil (12), stalls (23) and clinical isolates (33) of horse-breeding farms, were studied. The technique was standardized and confirmed by sequencing of amplified *vap* gene family controls. Thirty-two (17.8%) *R. equi* isolates evaluated were positive for *vapA* gene and carried at least three another *vap* genes associated. All 147 isolates from equine feces, stalls and soil from horse-breeding farms did not demonstrate any virulence-associated proteins genes. Thirty-two (97.0%) out of 33 clinical equines isolates were positive to multiplex PCR assay for *vap* gene family and demonstrated six molecular profile, 100% with *vapA*, *vapD* and *vapG* genes, 86.6% *vapF*, 76,6% *vapH*, 43.3% *vapC*, 36.6% *vapE* and none *vapB*. The most frequent molecular profile was *vap A*, *D*, *F*, *G* and *H* present in 37.5% of strains. Moreover, there was no molecular epidemiological pattern for *R. equi* isolates from each horse-breeding farm studied. Thus this technique allows the identification of eight *vap genes* family (*vapA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* e *H*), it is a practical an efficient method of conducting clinical and epidemiological studies on *R. equi* isolates.

Key-words: *Rhodococcus equi*; *vap* genes; PCR multiplex; foals; feces.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Árvore filogenética dos genes *vap* da cepa de *R. equi* p33701 e do *vapB* identificado em um isolado de virulência intermediária de *R. equi*..... 18

FIGURA 2. Mapa do plasmídeo de virulência do *R. equi* p33701. O círculo mostra a orientação das ORFs, com a direção da leitura. Genes com uma função conhecida ou suspeita são nomeados..... 19

CAPÍTULO 1

FIGURA 1. FIGURA 1. (a) Molecular profile obtained by *vap* genes family amplifying in 32 *R. equi* isolates. (b) Molecular samples frequency of *vap* genes family founded on isolates obtained on the seven studied farms..... 36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Níveis de virulência encontrados em cepas de *R. equi*, com o respectivo antígeno codificado e fontes de origem..... 16

TABELA 2. Similaridade de aminoácidos da VapB, C, D e E em relação a VapA..... 17

CAPÍTULO 1

TABELA 1. TABLE 1. Primers utilized on multiplex PCR for *vap* gene family amplification..... 35

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO	4
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
SUMÁRIO	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	11
2.1 <i>R. equi</i>	12
2.2 Infecção por <i>R. equi</i>	13
2.3 Plasmídeos de virulência e genes da família <i>vap</i>	15
2.4 <i>R. equi</i> em humanos.....	20
2.5 Diagnóstico microbiológico da infecção por <i>R. equi</i>	21
2.6 Tratamento e profilaxia das infecções por <i>R. equi</i>	23

3. CAPÍTULO 1.....	24
Molecular characterization of <i>Rhodococcus equi</i> from horse-breeding farm by multiplex PCR for <i>vap</i> gene family.....	25
Abstract.....	25
Introduction.....	25
Materials e Methods.....	27
Results.....	28
Discussion.....	29
References.....	32
4. CONCLUSÃO.....	37
5. REFERÊNCIAS.....	38
6. APÊNDICE.....	44

1 INTRODUÇÃO

A criação de eqüinos no Brasil é uma atividade em crescimento constante, apresentando um plantel de 5,9 milhões de animais. O elevado número de animais, associado à necessidade de produção crescente, gera aumento no número de enfermidades, levando a prejuízos econômicos significativos para a atividade (FAO, 2002).

Dentre as enfermidades que afetam eqüinos, o segundo grupo com maior prevalência é formado por doenças associadas ao aparelho respiratório, implicando em importantes perdas no rendimento, gastos com o tratamento e, ocasionalmente, em alguns casos, morte dos animais. As enfermidades respiratórias mais freqüentes em eqüinos são as causadas por agentes bacterianos, como *Rhodococcus equi* (*R. equi*), que está associado à mortalidade de aproximadamente 3% dos potros em todo o mundo e a prejuízos devido principalmente ao fraco desempenho dos animais nas corridas (CHANTER et al.,1997).

R. equi é um importante patógeno de potros jovens entre três e cinco meses de idade, onde as manifestações clínicas mais comuns são broncopneumonia piogranulomatosa, enterite ulcerativa e linfadenite supurativa em potros (GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997). Nesta última década, *R. equi* tem sido descrito também em humanos como um importante agente de pneumonia, abscessos pulmonares e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, em especial os portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana) (BYRNE et al., 2001).

Várias técnicas tem sido utilizadas para o diagnóstico e caracterização da patogenicidade bacteriana do *R. equi*, entre elas os testes sorológicos, os quais são de eficiência questionada. A cultura e isolamento do agente é realizada a partir de animais enfermos, de fezes de animais e de ambiente, como solo contaminado por fezes. O isolamento de *R. equi* é adotado como método diagnóstico padrão na maioria dos estudos de caracterização dessa bactéria.

A caracterização da virulência dos isolados é principalmente realizada pelo ensaio em camundongos. Essa técnica, contudo, vem sendo substituída por testes de detecção de plasmídeos associados à patogenicidade, bem como pela detecção de genes da família vap presentes nestes plasmídeos.

O reconhecimento de plasmídeos e antígenos de virulência (Vap) em *R. equi* associada aos testes de patogenicidade em camundongos, tem sido de grande importância para o esclarecimento de aspectos relacionados a patogenia da doença causada por essa bactéria em eqüinos. Assume-se que esses antígenos são responsáveis pela inibição da fusão

fagolisossômica, resistência à fagocitose e pela multiplicação bacteriana no interior de macrófagos (HONDALUS & MOSSER, 1994). As proteínas Vap são codificadas em um operon de 27,5kb, onde foram identificados sete membros de genes desta família (*vapA*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, e *H*). As proteínas VapA e VapB são consideradas isoformas. Linhagens *vapA* tem sido associada à patogenicidade para eqüinos, a VapB tem sido encontrada em isolados clínicos de *R. equi* de suínos e humanos (TAKAI et al., 2000). Nenhum dos outros genes dessa família tem sua função plenamente compreendida. Contudo, estudos têm demonstrado que esses genes têm expressão induzida durante as fases iniciais da fagocitose, o que pode indicar sua participação na resistência da bactéria à destruição no interior dos macrófagos (RAHMAN et al., 2005).

Assim, cumpre destacar que a identificação precisa dos isolados de *R. equi* é extremamente importante para o diagnóstico definitivo e caracterização da enfermidade, adoção de medidas de controle e tratamento, bem como para compreensão dos mecanismos biológicos de patogenicidade da bactéria para eqüinos e demais espécies animais. Mas principalmente nos fornece um método para traçarmos um perfil epidemiológico de uma propriedade ou região a ser estudada. Diante disso, o presente trabalho teve por objetivo a caracterização molecular de isolados de *R. equi* de eqüinos pela padronização de uma técnica de PCR multiplex para detecção dos genes da família *vap* (*vapA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G* e *H*).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *R. equi*

As bactérias do gênero *Rhodococcus* são actinomicetos nocardioformes, membros da família *Mycolata*, que contém também gêneros importantes em medicina veterinária como *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Arcanobacterium* e *Nocardia*. Existem aproximadamente 27 espécies do gênero *R. equi* classificadas pela diversidade de metabolismo, aplicação industrial ou potencial em biorremediação (GYLES et al., 2004). Dentre essas, uma espécie é reconhecida como patógeno em mamíferos: *Rhodococcus equi* (BELL et al., 1998).

No primeiro relato de isolamento esta bactéria foi denominada *Corynebacterium equi* (TAKAI et al., 1994b). Com novos métodos usados para classificar os actinomicetos nocardioformes, este microrganismo foi então reclassificado dentro do gênero *Rhodococcus* (cocos com pigmento vermelho). Esses métodos incluem a análise das seqüências parciais 16S do rRNA, onde organismos com similaridade de 97% ou mais podem ser considerados da mesma espécie; e a hibridização DNA-DNA, onde valores de 70% de associação definem a identidade da espécie (BELL et al., 1998).

R. equi apresenta sua multiplicação em forma de micélio com fragmentação em elementos cocóides ou coco-bacilares (HOLT et al., 1994). É também observado como organismos pleomórficos e capsulados, que em cultivo por períodos prolongados demonstram pigmento salmão, de onde decorre o nome *Rhodococcus* (QUINN et al., 1994). É um microrganismo intracelular facultativo, provocando o desenvolvimento de lesões piogranulomatosas nos animais graças à sua habilidade de sobreviver e se multiplicar no interior dos macrófagos. A presença do ácido micólico na parede celular está estritamente relacionada com a capacidade do microrganismo em sobreviver em condições adversas do meio ambiente (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

O microrganismo é predominantemente telúrico e apresenta requerimento nutricional simples, o qual é suprido pelas fezes dos animais (PRESCOTT & HOFFMAN, 1993). *R. equi* é aeróbico estrito, encontrado normalmente no trato gastrintestinal de eqüinos, multiplicando-se no intestino delgado. A multiplicação ocorre apenas nas primeiras 12 semanas de vida do potro e não é observada em cavalos adultos (TAKAI, 1997), provavelmente devido ao desenvolvimento da microbiota intestinal.

A temperatura ótima de desenvolvimento desta bactéria é de 30°C, embora apresente boa multiplicação a 37°C. Em condições de campo ideais, a bactéria pode aumentar seu número de 1 para 10.000 UFC em 2 semanas (PRESCOTT & HOFFMAN, 1993).

Segundo Lazzari et al. (1997) o microrganismo pode ser isolado das fezes de diversas espécies animais, como bovinos, suínos, caninos, caprinos e aves. O isolamento também pode ser realizado a partir de amostra de solo, água, ar circulante e parede de baias, sugerindo sua ampla distribuição no ambiente eqüino. Também pode ser cultivado de locais nunca ocupados por eqüinos, como solo de praças e parques (TAKAI et al., 1996).

2.2 Infecção por *R. equi*

R. equi ocasiona broncopneumonia piogranulomatosa e enterite ulcerativa em potros com menos de seis meses de idade (TAKAI et al., 1996). A doença apresenta distribuição mundial, sendo endêmica em determinadas regiões (TAKAI, 1997). Esta bactéria também pode ser encontrada a partir de isolados de bovinos e suínos, nos quais leva ao desenvolvimento de linfadenites, produzindo lesões semelhantes às da tuberculose (TAKAI et al., 1996b; SOEDERMANTO et al., 1997). Outras espécies animais que podem ser infectadas por *R. equi* são ovelhas, cabras, cervos, búfalos, gatos e cães, apresentando alterações nos linfonodos e abscedação (HONDALUS et al., 1997). Nos últimos anos, *R. equi* tem sido descrito como patógeno oportunista de pacientes humanos imunossuprimidos, particularmente daqueles que apresentam a síndrome da imunodeficiência adquirida - AIDS (SOEDERMANTO et al., 1997).

R. equi é caracterizado como um patógeno intracelular facultativo que se multiplica dentro de macrófagos. A sobrevivência intracelular é considerada necessária para o desenvolvimento da doença, que é caracterizada por severa e fatal pneumonia principalmente em potros (DONISI et al., 1996).

A característica coprofágica dos potros (PRESCOTT & HOFFMAN, 1993), e a inalação do microrganismo (TAKAI et al., 1994b) contribuem para a infecção dos animais. A temperatura de multiplicação da bactéria faz com que a maior parte dos casos ocorra no verão, período que também favorece a aerossolização, que favorecem sua inalação (TAKAI, 1997; MEIJER & PRESCOTT, 2004).

Microrganismo foi considerado patógeno oportunista (TAKAI et al., 1995a) devido a combinação de fatores que podem estar relacionados a suscetibilidade dos potros, estes incluem: a) a quantidade de microrganismo inalada ou ingerida deve ser equivalente à dose infectante, a qual parece ser bastante baixa para potros; b) a idade de maior suscetibilidade dos animais está entre 1 e 6 meses, época que coincide com o declínio dos anticorpos maternos adquiridos via colostro; c) o sistema imune do animal nessa idade encontra-se ainda imaturo, principalmente em nível de resposta celular (PRESCOTT, 1991; CHAFFIN et al., 2003).

A distribuição da infecção está relacionada a fatores ambientais como umidade, temperatura e pH do solo, os quais contribuem para a multiplicação do microrganismo (MEIJER & PRESCOTT, 2004). As condições de manejo como o tamanho da fazenda,

número de animais, tipo de material encontrado no piso das cocheiras (terra ou concreto) e o transporte dos potros entre fazendas também estão envolvidos com a ocorrência da doença (COHEN et al., 2005). A maioria dos animais apresenta títulos para a infecção, sendo que os anticorpos estão presentes em níveis maiores nas fazendas endemicamente afetadas (PRESCOTT & HOFFMAN, 1993).

2.3 Plasmídeos de virulência e genes da família vap

Os principais fatores de virulência desta bactéria são os antígenos e plasmídeos associados à virulência, que permitem a classificação dos isolados de *R. equi* em 3 tipos (Tabela 1) (TAKAI et al., 1991). Isolados virulentos e de virulência intermediária são caracterizados pela presença de antígenos associados à virulência VapA (15 a 17kDa) e VapB (20kDa), cujos genes estão presentes em plasmídeos (RIBEIRO et al., 2005).

Cepas virulentas VapA positivas são amplamente distribuídas no ambiente equino e causam principalmente broncopneumonia em potros com menos de seis meses de idade (TAKAI et al., 1993). Estão descritos 11 tipos clássicos de plasmídeos de virulência em isolados considerados VapA positivos, os quais apresentam tamanhos de 85 kb (tipos I-IV), 87 kb (tipos I e II) e 90 kb (tipos I-V). O plasmídeo de “87 kb tipo III” caracterizado nova variante foi isolado de potros no Brasil (RIBEIRO et al., 2005).

Cepas com virulência intermediária, consideradas VapB positivas, são encontradas especialmente em linfonodos submandibulares de suínos e em isolados de humanos imunossuprimidos (TAKAI et al., 1996a). Inicialmente Ribeiro et al. (2005) descreveu 16 tipos de plasmídeos distintos nesses isolados, os quais variam em tamanho de 79 a 100 kb (tipos 1-16). Recentemente, foi descrito novo tipo de plasmídeo que apresentou padrão de digestão enzimática (*EcoRI* e *EcoT22I*) diferente dos reconhecidos (MAKRAI et al., 2005a).

Cepas avirulentas estão presentes principalmente no solo e não apresentam plasmídeo relacionado à virulência (RIBEIRO et al., 2005).

Tabela 1 - Níveis de virulência encontrados em cepas de *R. equi*, com o respectivo antígeno codificado e fontes de origem.

Nível de virulência	Fonte principal	Antígeno com gene presente em plasmídeo
Virulento	Potros doentes, cães e gatos	VapA (15-17kDa)
Virulência intermediária	Humanos e suínos	VapB (20 kDa)
Avirulento	Ambiente (solo)	Nenhum

Fonte: Adaptada de TAKAI et al., 1991; RIBEIRO et al., 2005.

O principal antígeno de virulência relacionado com a infecção em equinos é, portanto, a proteína VapA, sendo também a estrutura melhor caracterizada até o momento. É uma proteína de superfície ancorada por sua porção N-terminal ao envelope celular (TAN et al, 1995), codificada por genes presente em plasmídeos de virulência que variam em tamanho de 85 a 90Kb (BYRNE et al., 2001). Sua expressão é termorregulada, ocorrendo entre 34 e 41°C e aumentando em condições de baixo pH (TAKAI et al., 1994b), situação igualmente observada na expressão da proteína VapD (BENOIT et al., 2001).

A regulação da expressão do gene *vapA*, assim como os outros genes da família, ocorre no endossoma do macrófago sendo considerado parte do mecanismo pelo qual o organismo sobrevive à morte intracelular (BENOIT et al, 2002). Estudos *in vitro* têm mostrado que a expressão de alguns genes *vap* seja mediada quando concentrações de micronutrientes estão restritas, semelhante ao ambiente do endossoma (REN & PRESCOTT, 2003). Ainda que a regulação dos genes *vap* é estimulada no ambiente intracelular dos macrófagos, ela pode ocorrer a níveis reduzidos sob severas condições ambientais, possivelmente contribuindo para a sobrevivência e replicação do *R. equi* fora do hospedeiro (MUSCATELLO et al., 2006).

Uma variante de VapA, apresentando um peso de 20 kDa, foi classificada como VapB, pela sua maior similaridade em relação à VapA, como mostra a Tabela 2 (BYRNE et al, 2001).

Tabela 2 – Similaridade^a de aminoácidos da VapB, C, D e E em relação a VapA^b.

Proteína Vap	Identidade (%)	Similaridade (%)	Similaridade da posição carboxi-terminal ^c (%)
VapB	76	79	94 (82-187)
VapC	39	46	79 (85-196)
VapD	43	50	76 (53-164)
VapE	41	51	79 (95-206)

Fonte: BYRNE et al. (2001)

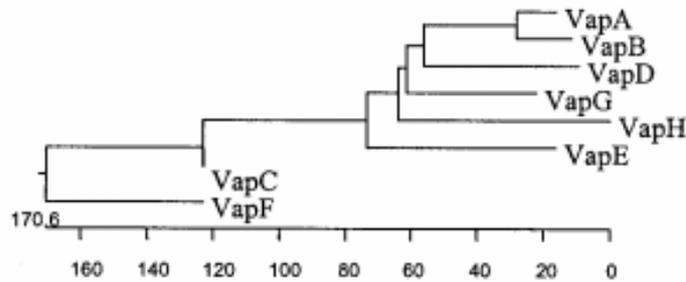
^a Similaridade determinada pelo GCG programa GAP.

^b Sequências do *R. equi* 33701.

^c Região de maior similaridade. O número entre parênteses é a posição de aminoácido de cada Vap usada para comparação.

As proteínas VapC, VapD e VapE são aproximadamente 50% similares a VapA e a VapB. Como consequência, provavelmente tem funções distintas em relação a VapA. Essa proposição é suportada pela observação de que estas proteínas são secretadas para o meio o que não ocorre com a VapA, já que esta fica ancorada na parede celular (BYRNE et al., 2001).

Uma árvore filogenética dos genes *vap*, incluindo o gene *vapB* obtido de uma cepa de *R. equi* de virulência intermediária, é mostrada na Figura 1. Esta estrutura pode ser significativa para o entendimento das funções de virulência das proteínas Vap, principalmente na observação de que os genes *vapA* e *vapB* estão intimamente relacionados (TAKAI et al., 2000). O gene *vapI*, o último identificado, apresenta 57% de homologia com o gene *vapE* (POLIDORE et al., 2006). Esta similaridade é próxima a encontrada por outros genes *vap* como *vapC*, *vapD* e *vapE* e difere da alta similaridade (79%) entre *vapA* e *vapB* (BYRNE et al., 2001).



Fonte: TAKAI et al (2000)

Figura 1 – Árvore filogenética dos genes *vap* da cepa de *R. equi* p33701 e do *vapB* identificado em um isolado de virulência intermediária de *R. equi*.

A análise dos dados do sequenciamento de dois plasmídeos de virulência (Figura 2) contendo o gene *vapA*, forneceu 64 quadros abertos de leitura (ORFs). A maioria (37, excluindo os sete genes *vap*) tinham função desconhecida, baseada na falta de homologia destas seqüências com genes de função conhecida no GenBank. Como resultado deste estudo três regiões funcionais do plasmídeo foram identificadas (TAKAI et al., 2000).

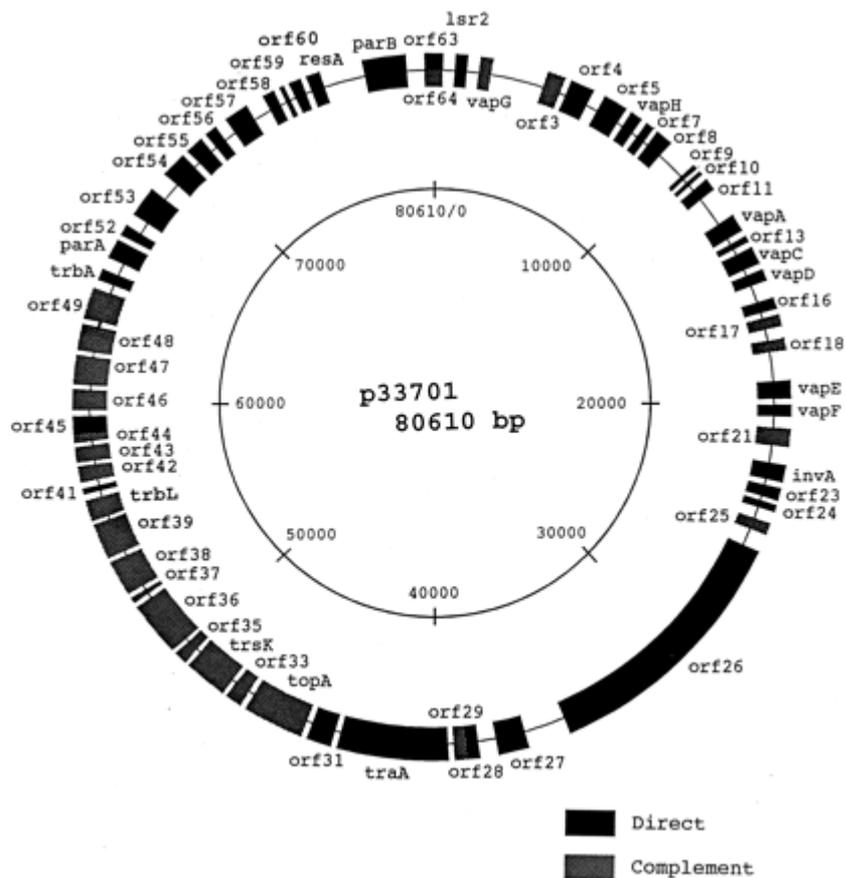
Duas regiões funcionais continham genes similares aos codificadores de proteínas envolvidas em conjugação, replicação plasmideal, estabilidade e segregação. A similaridade destes genes em relação àqueles adquiridos por conjugação sugere que o plasmídeo pode mover-se entre as cepas virulentas e avirulentas. Podendo esse fato estar relacionado com o mecanismo pelo qual o plasmídeo se propague em uma população de cepas avirulentas (TAKAI et al., 2000).

A terceira região é formada por no mínimo 25 ORFs incluindo a presença de 7 membros da família de genes *vap* (*vapA*, *C*, *D*, *E*, *F*, *G*, e *H*), todos eles codificando proteínas (TAKAI et al., 2000). Esta região apresenta características típicas de uma ilha de patogenicidade, tendo conteúdo GC mais baixo que o resto do plasmídeo e um tamanho de 27,5 kb. Apresenta-se limitada por duas ORFs (ORF61 e ORF22) com função de transposon. As outras ORFs, que não as da família *vap*, não apresentaram similaridade com genes de função conhecida de outros microrganismos (TAKAI et al., 2000).

Os sete genes *vap* estão localizados em uma seqüência de 19000 pb em seis sub-regiões, em uma direção positiva, com exceção de *vapG*. *vapA*, *vapC* e *vapD* são agrupados

muito próximos um com o outro, e *vapE* e *vapF* são imediatamente adjacentes. Já *vapG* e *vapH* estão presentes como genes individuais (TAKAI et al., 2000).

No total 11 genes codificadores foram identificados, os sete genes membros da família *vap* e mais quatro que potencialmente também codificam proteínas, as quais parecem ser importantes para a virulência, uma vez que podem interagir com o hospedeiro (TAKAI et al., 2000; MEIJER & PRESCOTT, 2004).



Fonte: TAKAI et al. (2000)

Figura 2 – Mapa do plasmídeo de virulência do *R. equi* p33701. O círculo mostra a orientação das ORFs, com a direção da leitura. Genes com uma função conhecida ou suspeita são nomeados.

Apesar da descoberta de que a virulência do *R. equi* depende de um plasmídeo, o subsequente sequenciamento do mesmo não ofereceu muitas informações novas em relação ao conhecimento dos mecanismos de virulência do microrganismo. Um dos motivos seria a ausência de similaridade das proteínas codificadas dentro da ilha de patogenicidade com

proteínas de outros organismos, sugerindo que o *R. equi* emprega um novo mecanismo de virulência que não se assemelha ao de nenhum microrganismo já descrito (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

Vários trabalhos relatam que o antígeno VapA é encontrado em todos os isolados clínicos de *R. equi* obtidos de potros, bem como em algumas amostras ambientais (TAKAI et al., 1996b; COSTA et al., 1999). Entretanto, existem relatos de amostras desprovidas de plasmídeo de virulência ocasionando doenças no homem e animais, especialmente bovinos e caprinos (CANTOR et al., 1998). Takai et al. (1991) descreveu que isolados sem plasmídeo perdem a capacidade de sobreviver e replicar no interior de macrófagos, mostrando queda acentuada na letalidade para camundongos (TAKAI et al., 1991). Estes achados é similar a outros autores que verificaram que a perda do plasmídeo de virulência que codifica para VapA coincide também com a diminuição da patogenicidade do *R. equi* para camundongos e eqüinos (TAKAI et al., 1995b; WADA et al., 1997).

Além disso, cultivo *in vitro* a 37°C com repetidas passagens eliminou o fenótipo de virulência devido à perda do plasmídeo, indicando que as proteínas codificadas por eles são realmente necessárias para a virulência (TAKAI et al., 1991).

2.4 *R. equi* em humanos

A imunossupressão em pacientes humanos, principalmente naqueles submetidos a transplantes ou ainda portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (aids) torna-se um fator predisponente para a infecção. Porém, pacientes imunocompetentes também têm sido acometidos (MIZUNO et al., 2005). Supõe-se que o solo contaminado com *R. equi* seja uma potencial fonte da infecção para esses hospedeiros (TAKAI et al., 1994a).

A infecção pulmonar por *R. equi* em pacientes imunossuprimidos é a forma mais comum de ocorrência da enfermidade. Grande parte destas infecções (aproximadamente 85%) é relacionada com o comprometimento do sistema imunológico, sendo que um substancial aumento no número de casos ocorreu desde 1981 com a epidemia da aids (VERVILLE et al., 1994). Mesmo sendo os pacientes imunossuprimidos os mais atingidos, podendo estar relacionada com algum agente primário, como parasitas ou outras bactérias, assim como ocorre nos eqüinos (NAPOLEÃO et al., 2005).

A exposição ao solo contaminado com fezes de herbívoros é a principal fonte do microrganismo tanto para o homem como para os animais (PRESCOTT, 1991; TAKAI et al., 1994a). Pessoas expostas ao ambiente de criações de animais domésticos em especial eqüinos, estão expostos ao risco de contrair a infecção (VERVILLE et al., 1994).

A taxa de mortalidade nestas infecções está em torno de 11% para pacientes imunocompetentes e 20 a 55% para pacientes imunocomprometidos. Esses altos valores estão geralmente relacionados ao uso de terapia inadequada no início do tratamento, quando o diagnóstico laboratorial ainda não foi realizado (KEDLAYA et al., 2001).

A presença de cepas contendo o plasmídeo de virulência não parece ser o único fator para o desenvolvimento da infecção, já que muitos isolados humanos são avirulentos (TAKAI et al., 1994a). A maioria das cepas isoladas de pacientes humanos com aids são virulentas ou de virulência intermediária (*vapB*), enquanto que as cepas isoladas de pacientes com outros tipos de imunossupressão são avirulentas (MAKRAI et al., 2005a).

2.5 Diagnóstico microbiológico da infecção por *R. equi*

Devido ao fato da infecção pulmonar por *R. equi* ser insidiosa e pela capacidade dos potros em compensar a progressiva perda da função pulmonar, o diagnóstico clínico precoce torna-se difícil. Dessa forma, o diagnóstico laboratorial da enfermidade apresenta grande importância, tornando-se indispensável.

O diagnóstico definitivo deve ser realizado pela cultura microbiológica combinada com o exame citológico do exsudato traqueobronquial. A presença de cocobacilos pleomórficos, Gram positivos, é sugestivo de infecção por *R. equi* (VARGAS, 2001). As colônias em ágar sangue ovino apresentam-se com aspecto liso, mucóide e não hemolíticas (QUINN et al., 1994), embora já tenha sido relatado o isolamento de colônias hemolíticas (PATE et al., 2004).

Uma das provas diferenciais para a identificação do microrganismo é o teste de CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen Test), no geral se observa a hemólise sinérgica entre *R. equi* e *Staphylococcus aureus*. Porém a identificação definitiva é realizada pelas provas bioquímicas, onde o patógeno mostra-se incapaz de fermentar açúcares como glicose, maltose e sacarose, mas demonstrando capacidade de reduzir nitrato a nitrito e produzir urease

(QUINN et al., 1994). No entanto, trabalho realizado por VIANA et al. (2007) evidencia a variabilidade fenotípica dos isolados dentro da espécie, obtendo-se distintos perfis bioquímicos para esta bactéria. No mesmo estudo, refere que os testes fenotípicos rotineiramente utilizados são insuficientes para a identificação e a diferenciação entre isolados de *R. equi* e *Dietzia maris*, sendo o teste da utilização do ONPG (orhonitrophenyl- β -D-galactopyrannoside) a única prova que demonstrou capacidade discriminatória

Além dos testes convencionais, existem outros testes realizados com meios de cultivo seletivos que promovem o isolamento do *R. equi* a partir de materiais contaminados como fezes ou solo. Dentre eles, os principais são o meio NANAT (“nalidixic acid novobiocin actidione-cycloheximide potassium telurite”) (WOLCOOK et al., 1979) e os recentemente descritos CAZ-NB (agar ceftazidima-novobiocina) e TCP (*trimethoprim, cefoperazone, polymyxin B*), ambos contendo antimicrobianos que inibem contaminantes e favorecem o isolamento do *R. equi* (MAKRAI et al., 2005b).

As técnicas moleculares para a detecção do *R. equi* em lavados bronquiais de potros representam um avanço para o diagnóstico laboratorial da doença (SELLON et al., 1997). O teste da PCR (reação em cadeia da polimerase) apresenta rapidez, sensibilidade e especificidade, facilitando o tratamento precoce da infecção. A grande vantagem desta técnica é o reconhecimento do fragmento do gene que codifica a região 16S do rRNA do *R. equi*, sendo portanto uma técnica bastante específica (BELL et al., 1996).

A PCR não somente identifica o microrganismo como também pode identificar cepas virulentas pela amplificação de genes relacionados à virulência, como a identificação do gene *vapA* descrito por Takai et al. (1995b). Este diagnóstico ainda pode ser feito simultaneamente pela técnica de PCR multiplex, na qual se identifica cepas de *R. equi* e avaliar a presença de genes *vapA* (HALBERT et al., 2005; KREWER, 2006). Quando comparada com outros testes diagnósticos como análise de plasmídeo, padrão de proteínas e patogenicidade para camundongos, a técnica de PCR apresenta vantagens na diferenciação de isolados virulentos e avirulentos para eqüinos (TAKAI et al., 1997).

Estudos epidemiológicos sobre a rododocose também podem ser beneficiados por técnicas de PCR que permitem a identificação do tipo de plasmídeo (*vapA* ou *vapB* positivo), como a técnica descrita por Oldfield et al. (2004). Uma maior eficiência pode ser obtida pela PCR “real time” para detecção e quantificação de isolados de *R. equi* virulentos (*vapA*), realizada a partir de fluido traqueo-bronquial (HARRINGTON et al., 2005).

O isolamento de *R. equi*, tanto pelo cultivo como pela técnica de PCR, não indica doença já que o animal pode ser apenas um portador. Portanto, o diagnóstico definitivo desta

enfermidade deve sempre estar relacionado ao estado clínico dos animais (GIGUÈRE et al., 2003).

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

O *R. equi* é sensível a uma variedade de agentes antimicrobianos *in vitro*, mas *in vivo* a maioria destas drogas torna-se ineficiente devido a natureza intracelular do microrganismo. A combinação da eritromicina e rifampicina tem se mostrado útil no tratamento da pneumonia por *R. equi* em potros, embora já existam relatos de resistência do microrganismo a estas drogas (GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997). Nesses casos a azitromicina e a claritromicina têm sido utilizadas como drogas alternativas (JACKS et al., 2007).

A vacinação dos potros nem sempre é eficiente, pois a imunidade mediada por células parece ser importante na prevenção da infecção por *R. equi*. Por outro lado, vacinas que estimulam a imunidade de mucosas (IgA) têm se mostrado bastante eficiente. A vacinação com peptídeos presentes no antígeno VapA induziram a produção de uma forte resposta de mucosas no trato respiratório de animais vacinados (TAOUJI et al., 2002).

Evitar o excesso de poeira nas instalações, realizar a remoção de fezes, promover o isolamento de potros que retornaram de criações onde a doença é endêmica e exame cuidadoso e regular dos animais pode contribuir para o controle da enfermidade (PRESCOTT & HOFFMANN, 1993; CHAFFIN et al., 2003; COHEN et al., 2005).

3. CAPÍTULO 1

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Rhodococcus equi* FROM FOALS BY MULTIPLEX PCR FOR VAP GENES

Fernanda Monego, Agueda Castagna de Vargas

Artigo submetido à revista Current Microbiology

Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farm by multiplex PCR for *vap* gene family

Abstract

This study evaluated molecular characteristic of *R. equi* (*Rhodococcus equi*) isolates obtained from horses and standardized by PCR multiplex assay, which amplifies the *vap* gene family (*vapA, B, C, D, E, F, G e H*). One hundred eighty *Rhodococcus equi* isolates from different sources: healthy horse's feces (112), soil (12), stalls (23) and clinical isolates (33) of horse-breeding farms, were studied. The technique was standardized and confirmed by sequencing of amplified *vap* gene family controls. Thirty-two (17.8%) *R. equi* isolates evaluated were positive for *vapA* gene and carried at least three another *vap* genes associated. All 147 isolates from equine feces, stalls and soil from horse-breeding farms did not demonstrate any virulence-associated proteins genes. Thirty-two (97.0%) out of 33 clinical equines isolates were positive to multiplex PCR assay for *vap* gene family and demonstrated six molecular profile, 100% with *vapA, vapD and vapG* genes, 86.6% *vapF*, 76,6% *vapH*, 43.3% *vapC*, 36.6% *vapE* and none *vapB*. The most frequent molecular profile was *vap A, D, F, G* and *H* present in 37.5% of strains. Moreover, there was no possibility of demonstrating a molecular epidemiological pattern for *R. equi* isolates from each horse-breeding farm studied. Thus this technique allows the identification of eight *vap genes* family (*vapA, B, C, D, E, F, G e H*), it is a practical an efficient method of conducting clinical and epidemiological studies on *R. equi* isolates.

Key-words: *Rhodococcus equi*; *vap* genes; PCR multiplex; foals; feces.

Introduction

Rhodococcus equi is a gram-positive and a facultative intracellular pathogen, associated to suppurative bronchopneumonia, lymphadenitis and enteritis in foals, usually on

the first months of life [26]. This organism has been recognized as an opportunistic pathogen in both immunocompetent and immunocompromised humans, specially causing infection in HIV infected patients [13, 15].

Finding out virulent plasmids and antigens in *R. equi* have a great importance to enlighten epidemiological and pathogenic aspects of this disease in equines. These antigens are responsible for suppression of phagolysosomal activity, intracellular survival and replication in macrophages cells [2,6]. The discovery of virulence-associated antigens allowed the virulence of *R. equi* strains classification in at least three levels [21]. Virulent and intermediately virulent *R. equi* presented virulence-associated antigens VapA (15-17kDa) and VapB (20-kDa) respectively. In contrast, non-virulent *R. equi* strains show no virulence-associated antigens nor contain plasmid DNA [18]. All *R. equi* isolates virulent from mouse and foals contain a large plasmid that is highly correlated with VapA protein expression. The *vapB* gene has been described on isolates from pigs [26] and human isolates [24]. The greatest advancement in understanding *R. equi* pathogenesis has been the description of a novel *vap* genes family. Sequencing of the virulence plasmid showed a putative pathogenicity island, i.e., a family novel of nine *vap* genes (*vapA, B, C, D, E, F, G, H e I*). However the importance of this gene besides *vapA*, need be investigated because their roles in virulence are not clear.

The PCR technique has potential to identify virulent *R. equi* through the amplification of gene sequences which are unique for virulence plasmids, and useful not only in epidemiological investigations but also for early infection diagnosis [25]. This method was compared to other tests such as plasmid analyses, protein pattern and pathogenicity for mouse and showed advantages in differentiating virulent and non-virulent isolates [10].

Little is known about the epidemiological characteristics of *vap* genes family carried by *R. equi* isolates. This research aim to characterization of *vap* gene family (*vapA, B, C, D,*

E, F, G e H) in *R. equi* isolates from Brazilian horse-breeding farm by multiplex PCR assay standardization.

Materials and Methods

Bacterial samples and growth conditions. One hundred-eighty *R. equi* isolates from Bacteriology Lab Collection, at Federal University of Santa Maria, Brazil, were selected and analysed in this work. The bacterial reference strains used in this study were *R. equi* ATCC 33701 (*vap A, vap C, vap D, vap E, vap F, vapG e vapH*) and a clinical isolate from human (*vapB*). The bacteria were stored at -20°C, transferred to ovine blood agar (5%) and incubated at 37°C for 48 h.

One hundred and eighty samples of seven horse-breeding farms (Fig. 1) from South of Brazil were used, 178 (98,8%) were from Bagé city, one (0,6%) from São Borja city and one (0,6%) from Foz do Iguaçu city, (Fig. 1). We evaluated 112 (62.2%) isolates from healthy horses feces, 33 (18.6%) from clinical samples of equines, 23 (12.8%) from horse-breeding farms and 12 (6.7%) from soil. Of 33 clinical isolates analyzed, 20 (60.6%) were obtained from lung, three (9.1%) from tracheal wash, two (6.0%), from inguinal abscess, two (6.0%) from lymph nodes, two (6.0%) from abdominal cavity, one (3.0%) from subcutaneous abscess, one (3.0%) from nasal discharge, one (3.0%) from joint secretion and one (3.0%) from mammary gland.

DNA Preparation. DNA was isolated from *R. equi* by lyses with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) following Sambrook and Roussel [19] with minor modification (the bacterial culture was previously digested with 5µL of proteinase K (20mg/mL) for 60 min at 37°C).

PCR assay for 16S rRNA of *R. equi*. The PCR assay was perform according with procedures described by Krewer et al [10]. The amplification products (15µl) was submitted

to a 1,0% gel agarosis electrophoresis for 40 min at 100 V. DNA fragment was visualized by UV fluorescence after staining with ethidium bromide.

Multiplex PCR assay for *vap* gene family. The primers for PCR amplification were designed with Vector NTI 8.0 software (InforMax Inc. 2002) based on sequences published at GenBank (Table 1). PCR amplification was performed as described previously by Takai et al [25] with some modifications. The samples were subjected to 30 cycles of amplification in a thermal cycler. The cycling conditions consisted of denaturation for 90 seg at 94°C, primer annealing for 1 min at 55°C, and extension for 2 min at 72°C, following the final extension of 10 min at 72°C. For each reaction were used 4 µl (50ng) of DNA preparation in a 25µl reaction mixture containing 10 mM Tris, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 mM (each) deoxynucleoside triphosphates, 1 µM each primer (30 pmol) and 1 U of *Taq* DNA polymerase.

Sequencing. The control strains were sequenced in an automatic auto sequencer (MegaBace 500). Each *vap* gene was separately submitted to PCR and the products obtained were purified with polietilenoglicol (PEG 8000). The sequences were submitted to a consensus analyses based on reliability presented on the cromatograms obtained and by using Staden Package Gap 4 program [20]. Afterwards, samples were compared to *vap* gene sequences stored at GenBank by ChromasPro program, version 1.34.

Statistical analysis. The data analysis was perform comparing two larger groups using of qui-square test and Fisher exact test for small samples. The level of significance was established at a *P* value of 0.05.

Results

The 180 isolates analyzed with PCR procedure, amplified a 16S rRNA sequence and showed a 458 pb product characteristic of *R. equi*.

The DNA sequence from amplifications of *vap* gene family of the controls, presented Phred above 20 showing similarity with *vap* gene already existent at GenBank, which had a variability of 93 to 100%, with $E=1e^{-100}$, confirming the PCR accuracy for the genes evaluated.

Thirty-two (17.8%) *R. equi* isolates evaluated were positive for *vapA* gene and carried at least three another *vap* genes associated. All 147 isolates from equine feces, stalls and soil from horse-breeding farms did not demonstrate any virulence-associated antigen genes. Thirty-two (97.0%) out of 33 clinical equines isolates were positive for at least four *vap* gene and demonstrated six molecular profile (Fig. 1). One (3.0%) out of 33 clinical isolates was negative for *vap* gene.

The positive multiplex PCR assay for *vap* gene family demonstrated 100% of isolates with *vapA*, *vapD* and *vapG* genes, 86.6% *vapF*, 76,6% *vapH*, 43.3% *vapC*, 36.6% *vapE* and none *vapB*, (data not shown). The most frequent molecular profile of *vap* gene family was *vap A, D, F, G* and *H* present in 37.5% of positive strains. The *vap* gene family molecular profile of seven horse-breeding farms did not demonstrate an epidemiological pattern for *R. equi* isolates from each horse-breeding farm studied (Fig. 1).

Discussion

The significant presence of *vapA* gene in *R. equi* foals clinical isolates demonstrated the virulence potential of the strains. This was according with previous studies that describe the virulence in majority of isolates from foals [27,10]. Jain et al showed a mutant *R. equi* which had a lack at five *vap* genes (*vapA, C, D, E e F*). This strain was attenuated for virulence in mice and failed replication in macrophages, but when complemented with *vapA* restored full virulence, whereas complementation with *vapC, vapD* or *vapE* didn't restore the

virulence [9]. These results may suggest that *vapA* gene function is irreplaceable for *R. equi* virulence in equines, therefore founded practically in all virulent isolates.

The absence of *vap* genes in one clinical case agrees with other reports, whose samples were out of virulent plasmids but caused disease in human and animals [3,12]. Other bacterial virulence factors like capsular antigens, cholesterol oxidase and fosfolipase C enzymes, and micolic acid from cellular membrane can interact to develop this disease [7]. Others genes who potentially codes interaction proteins with the host [28], are important for developing the pathology in equines which isolates from *R. equi* do not report *vap* gene. Guiguère et al [4] showed that *R. equi* strains containing *vapA* in absence of other virulent genes were avirulent for foals. Based on this data it could be suggested that although important to *R. equi* pathology, *vapA* need to interact with other plasmid genes to concur to cause this disease. Otherwise, there is not only the presence of plasmids containing *vap* genes family that causes *R. equi* pathology

None out of 32 isolates *vapA* positive shows *vapB* gene that agree with Takai et al [24] statement that clinical isolates express VapA or VapB, but not both proteins and presumably carried the gene for only one of them. Other researches reported that strains from horses bring up only *vapA* gene [16,12]. However, an experimental study which had a strain containing *vapB* caused a disease similar to virulent strains when inoculated by trachea [29]. VapC, VapD and VapE are structurally around 50% similar to VapA and VapB. Consequently, VapC, VapD and VapE must have divergent functions in respect to VapA [2]. The different functions of Vap proteins can explain the presence of others *vap* genes in association to *vapA*, so each gene has a special action in illness.

The majority positive samples for any *vap* gene came from a region with acid soil pH 4,7 – 5,6 [11] which can contribute to increase the virulent strains within *R. equi* population [1,14], but despite of this all isolates from equine feces, stalls and soil from horse-breeding

farms were negative for *vap* genes. Other study analyzed nine isolates came out environment and they were negative for both *vapA* and *vapB* genes [16]. However, Makrai et al [12] showed 26 (54,2%) soil samples positive for *vapA*, but not for *vapB*, indicating that farm environment studied was heavily contaminated with virulent *R. equi*. The samples collected from stalls and equine feces, in our study, were taken during hot and dry seasons, so it didn't answer to ideal conditions of temperature and humidity for maintaining microorganism virulence. An inappropriate environment and culture condition excludes phenotypic for virulence due to plasmid loss [21].

The molecular profile of *vap* gene family found in our study presented *vapA*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapG* and *vapH* genes. Data indicate that *vapA*, *vapD* and *vapG* are the most biologically relevant *vap* genes, because they are preferentially induced during infection in natural host [8]. This can explain the presence of these genes on 32 isolates obtained from illness equine and bring to believe that genes presented on this study contributed to the development of this disease.

Byrne et al [2] only demonstrated isolates positive for *vapA*, *vapC*, *vapD*, and *vapE* genes. These results indicated greater variability on *vap* genes family distribution and it can be explained by samples length, which represents a bigger geographic region. These would suggest that probably there is no genetic region highly conserved in virulent plasmids for *R. equi*.

The *vap* gene molecular profile of seven horse-breeding farms did not demonstrate an epidemiological pattern for each one. Sample size in our study was too small to permit any significant conclusion concerning to distribution of molecular profile and isolates sources.

The multiplex PCR assay for *vap* gene family allowed identification and characterization of virulent isolates in only one step of reaction, representing such a big advantage in comparison to Halbert et al [5] diagnoses methodology, which allows

identification of *R. equi* strains and simultaneously evaluates the presence of *vapA* gene. The PCR technique has potential for identifying virulent *R. equi* rapidly by amplification of gene sequences who are unique for virulent plasmids, and it will be useful not only in epidemiological investigations but also in early diagnosis [23].

Thus this is the first analyses involving identification of eight *vap* gene family, realized with *R. equi* isolates at Brazil. After obtaining six different molecular patterns, more epidemiological studies will be necessary to correlate this molecular results and disease occurrence.

Acknowledgements

This research has been funded by the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico, CNPq/ Brazil grant 471694/2007-0 and Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Fapergs/ Brazil grant 07/50917.0.

References

- [1] Benoit S et al. (2001) Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *R. equi* during acid tolerance response. Res Microbiol, 152:439-449 as listed on page 2 [2] BYRNE B A et al. (2001) Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. Infect Immun, 69:650-656 as listed on page 2, 6, 7 [3] Cantor C H et al. (1998). Vap-A negative *Rhodococcus equi* in a dog with necrotizing pyogranulomatous hepatitis, osteomyelitis, and myositis. J Vet Diagn Invest, 10: 297-300 as listed on page 6. [4] Giguère S et al.(1999) Role of the 85 Kb plasmid and plasmid encoded virulence protein A in intracellular survival and virulence of *R. equi*. Infect Immun, 67: 3548-57 as listed on page 6 [5] Halbert N D et al. (2005) Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the *vapA* gene. Am J Vet Res., 66:1380-1385 as listed on page 7 [6] Hondalus M K, Mosser D M (1994) Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. Infect Immun, 62:4167-4175 as listed on page 2 [7]

Hondalus M K (1997) *Rhodococcus equi*: Pathogenesis and virulence. *Vet Microbiol*, 56:257-268 as listed on page 6 [8] Jacks S, Giguère S, Prescott J F (2007) In Vivo Expression of and Cell-Mediated Immune Responses to the Plasmid-Encoded Virulence-Associated Proteins of *Rhodococcus equi* in Foals. *Clin vac immun*, 14:369–374 as listed on page 7 [9] Jain S, Bloom B R, Hondalus M K (2003) Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Mol Microbiol*, 50:115–128 as listed on page 5 [10] Krewer C C (2008) Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in south of Brazil by multiplex PCR. *Braz J Microbiol*, 39:1-6 as listed on page 2, 3, 5 [11] Lazzari A et al. (1997) Aspectos epidemiológicos do *Rhodococcus equi* em equinos do município de Bagé, RS, Brasil. *Cien Rural*, 27:441-446 as listed on page 6 [12] Makrai L et al.(2002) Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet Microbiol*, 88: 377-384 as listed on page 6 [13] Mizuno F S, Sakamoto M, Yoshikawa M K. (2005) VapB-positive *Rhodococcus equi* infection in an HIV-infected patient in Japan- *J Infect Chemother*, 11:37-40 as listed on page 2 [14] Muscatello G et al. (2006) Associations between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the Epidemiology of *R. equi* Pneumonia on Australian Thoroughbred Farms. *Appl Environm Microbiol*, 72:6152-6160 as listed on page 6 [15] Napoleão F et al. (2005) Pyogenic Liver Abscess Due to *Rhodococcus equi* in an Immunocompetent Host. *J Clin Microbiol*, 43:1002-1004 as listed on page 2 [16] Oldfield C et al. (2004) Rapid determination of *vapA/vapB* genotype in *Rhodococcus equi* using a differential polymerase chain reaction method. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 85:317-326 as listed on page 6 [17] Ribeiro M G et al. (2005) Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, and a new variant, 87-kb Type III. *Comp immun microbial infect dis*, 28:53-61 as listed on page 2 [18] Sambrook R, Russel D W (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3 ed., New York,

Cold Spring Harbor Laboratory Press as listed on page 3 [19] Staden R, Beal K F, Bonfield J K (2000) The Staden Package. *Meth Mol Biol*, 132:115 – 130 as listed on page 4 [20] Takai S, Sekisaki T, Osawa A (1991) Association between a large plasmid and 15-17 kDa antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun*, 59:4056-4060 as listed on page 2 [21] Takai S et al. (1995a) Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15- to 17-Kilodalton antigens. *J Clin Microbiol*, 33:1624-1627 as listed on page 8 [22] Takai S et al. (1995b) Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. *J Infect Dis*, 172:1306-11 as listed on page 2 [23] Takai S et al. (1995c) Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15-to 17-Kilodalton antigens. *J Clin Microbiol*, 33:1624-1627 as listed on page 2, 4 [24] Takai S et al. (1996a) Isolation of virulent and intermediately virulent *R. equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. *J Vet Med Sci*, 58:669-672 as listed on page 2 [25] Takai S et al.(1996b) Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pig. *J Clin Microbiol*, 34:1034-1037 as listed on page 5 [26] Takai S et al.(2000a) DNA Sequence and Comparison of Virulence Plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect Immun*, 68:6840 – 6847 as listed on page 6 [27] Takai S et al. (2000b) Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20kDa protein (VapB) in foals. *Vet Microbiol*, 76:71-80 as listed on page 6.

TABLE 1. Primers utilized on multiplex PCR for *vap* gene family amplification.

<i>Identification</i>	<i>GeneBank</i>	<i>Sequence</i>	<i>size</i>	<i>T_m</i>
	<i>Access</i>		<i>(pb)</i>	<i>(°C)</i>
VAPF-F	AF116907	AGAATATGCCTGGTATGGGC	350	50,8
VAPF-R	AF116907	TCGTCGTATAGCTGCTGCAG	350	51,7
VAPD-F	AF118814	GGTGGTGCATGTCAGAATG	400	53,5
VAPD-R	AF118814	TGGAACGTCTTGCCCTTCTT	400	53,7
VAPG-F	AF116907	TCATTGCCACCCTCCGGTTC	450	55,7
VAPG-R	AF116907	GCGAACGCGGAAACTTCAAT	450	56,6
VAPH-F	AF116907	AATTCCTATCAAGGACAGC	500	45,1
VAPH-R	AF116907	ATACCGATTACGGAGCTCAC	500	48,5
VAPA-F	AF116907	ACAAGACGGTTTCTAAGGCG	550	51,3
VAPA-R	AF116907	TTGTGCCAGCTACCAGAGCC	550	55,2
VAPE-F	AF116907	ATATGACGACCGTTCACAAG	600	47,3
VAPE-R	AF116907	CTCCGATGCCCACCAAATA	600	54,9
VAPB-F	RER20KDAVA	GAATTCGAAAGCGCAAAGGT	650	53,7
VAPB-R	RER20KDAVA	TTCCGTGAACATCGTACTGC	650	50,9
VAPC-F	AF116907	GGGTCGTCCATCCAAATCGA	700	56,8
VAPC-R	AF116907	GGTCAGGCCTATCACCTTG	700	53,4

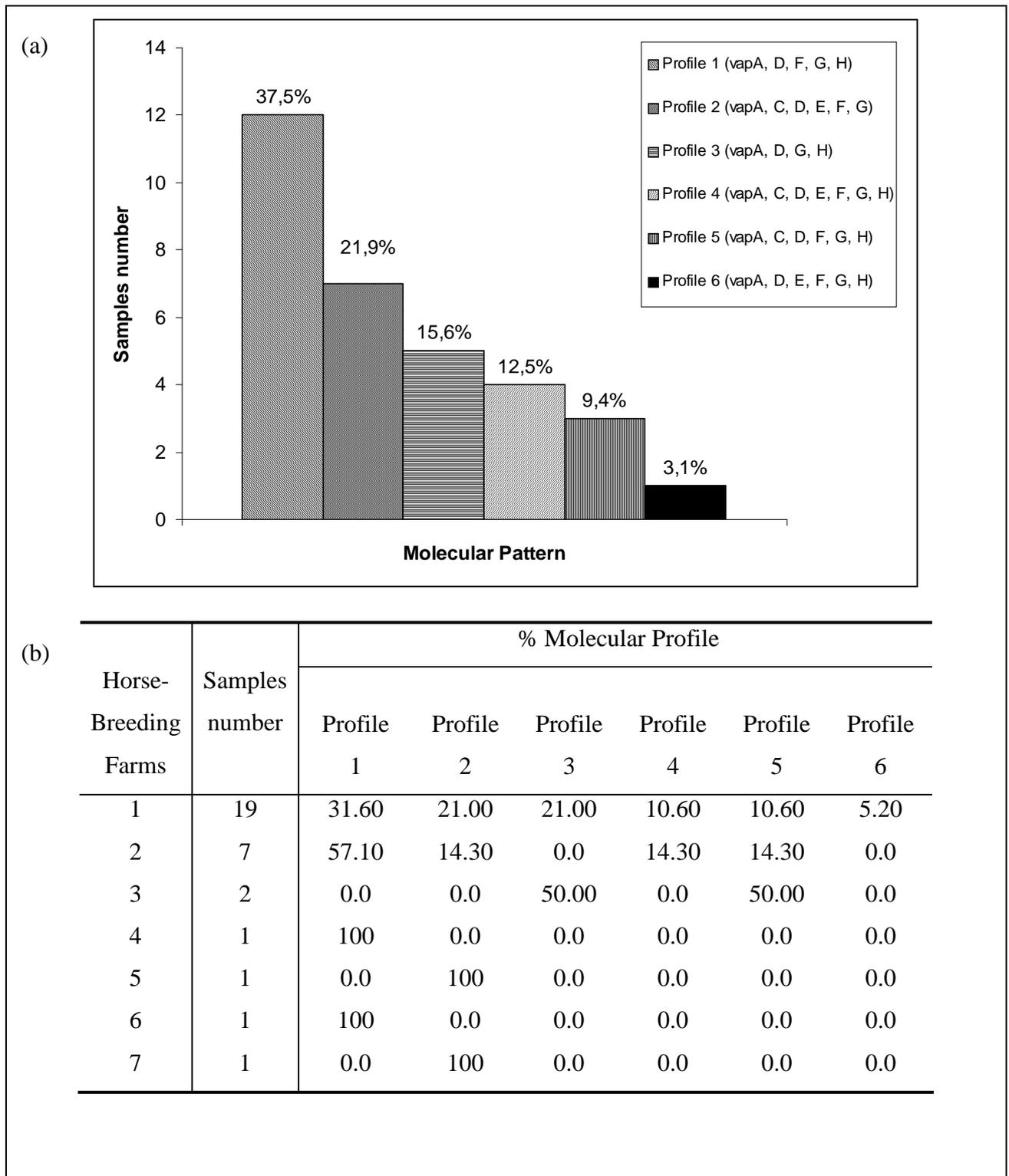


FIGURA 1. (a) Molecular profile obtained by *vap* genes family amplifying in 32 *R. equi* isolates. (b) Molecular samples frequency of *vap* genes family founded on isolates obtained on the seven studied farms.

4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

A PCR multiplex descrita tem potencial para ser utilizada na identificação de genes associados à virulência em amostras de *R. equi*.

A padronização desta técnica é um método eficaz para condução de estudos clínicos e epidemiológicos.

A caracterização molecular permitiu observar que existem diferenças nos isolados quanto à presença de genes *vap*.

Os padrões moleculares nos estabelecimentos não diferem estatisticamente quanto a presença dos diferentes genes *vap*.

5. REFERÊNCIAS

BELL, K.S. et al. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 72-74, 1996.

BELL, K.S. et al. The genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, n.2, p. 195-210, 1998.

BENOIT, S. et al. Induction of *vap* genes encoded by the virulence plasmid of *R. equi* during acid tolerance response. **Research Microbiology**, v. 152, p. 439-449, 2001.

BENOIT, S. et al. H₂O₂, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 3768–3776, 2002.

BYRNE, B. A. et al. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. **Infections and Immunity**, v. 69, n.2, p. 650-656, 2001.

CANTOR, C.H. et al. Vap-A negative *Rhodococcus equi* in a dog with necrotizing pyogranulomatous hepatitis, osteomyelitis, and myositis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 10, p. 297-300, 1998.

CHAFFIN, M.K. et al. Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia on farms with endemic infections. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 223, n. 12, p. 1797-9, 2003.

CHANTER, N. et al. Streptococci and enterococci as animal pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 82, p. 110-109, 1997.

COHEN, N.D. et al. Farm characteristics and management practices associated with development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 226, n.3, p. 404-413, 2005.

COSTA, M.M. et al. *Rhodococcus equi*: Pesquisa de fatores de virulência em isolados clínicos e ambientais obtidos em seis Haras da região de Bagé – RS, Brasil. *Rhodococcus equi*: Pesquisa de fatores de virulência em isolados clínicos e ambientais obtidos de seis haras da região de Bagé, RS, Brasil. In: XIV JORNADA ACADÊMICA INTEGRADA, 1999, Santa Maria. XIV Jornada Acadêmica Integrada. 1999.

DONISI, A., M. et al *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected patients. **AIDS**, v. 10, p. 359–362, 1996.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.

Capturado em 20/01/2008. Disponível on-line: 2002 <http://www.fao.org/>

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment and prevention of *Rhodococcus equi* infections in foals. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 313-334, 1997.

GIGUÈRE, S. et al. Performance of five serological assays for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 241-245, 2003.

GYLES, C.L.; THOEN, C.; PRESCOTT, J.F. Pathogenesis of Bacterial Infections in animals. **Blackwell Publishing**, 456 p. 2004.

HALBERT, N.D. et al. Evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Rhodococcus equi* and the vapA gene. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 8, p. 1380-1385, 2005.

HARRINGTON, J.R. et al. Evaluation of a real-time quantitative polymerase chain reaction assay for detection and quantitation of virulent *Rhodococcus equi*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 5, p. 755-761, 2005.

HOLT, J.G. *et al.*, Nocardioforms actinomycetes. In: **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. 9 ed. Willians & Wilkins, 1994.

HONDALUS, M. K.; D. M. MOSSER. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 4167–4175, 1994.

HONDALUS, M.K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v. 56, p. 257-268, 1997.

JACKS S.; GIGUÈRE S.; PRESCOTT J. F. In Vivo Expression of and Cell-Mediated Immune Responses to the Plasmid-Encoded Virulence-Associated Proteins of *Rhodococcus equi* in Foals. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 4, p. 369–374, 2007.

KEDLAYA, I.; ING, M.B.; WONG, S.S. *Rhodococcus equi* Infections in Immunocompetent Host: Case Report and Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 39-47, 2001.

KREWER, C. C. Padronização da reação da polimerase em cadeia (PCR) multiplex para os isolados de *Rhodococcus equi*. 2006. Dissertação de mestrado em biologia. Curso de Pós-Graduação em biologia celular e molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 54 p.

LAZZARI A. et al. Aspectos epidemiológicos do *Rhodococcus equi* em eqüinos do município de Bagé, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 3, p. 441-446, 1997.

MAKRAI, L. et al. Characterization of Virulence Plasmids and Serotyping of *Rhodococcus equi* Isolates from Submaxillary Lymph Nodes of Pigs in Hungary. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1246-1250, 2005a.

MAKRAI, L et al. Comparison of selective media for the isolation of *Rhodococcus equi* and description of a new selective plating medium. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 53, n. 3, p. 275-285, 2005b.

MEIJER, W.G.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. **Veterinary Research**, v. 35, p. 383-396, 2004.

MIZUNO, Y. et al. VapB-positive *Rhodococcus equi* infections in an HIV-infected patient in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 11, p. 37-40, 2005.

MUSCATELLO, G. et al. Associations between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the Epidemiology of *R. equi* Pneumonia on Australian Thoroughbred Farms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 6152-6160, 2006.

NAPOLEÃO, F. et al. Pyogenic Liver Abscess Due to *Rhodococcus equi* in an Immunocompetent Host. **Journal of clinical Microbiology**, v. 43, n.2, p. 1002-1004, 2005.

OLDFIELD, C. et al. Rapid determination of vapA/vapB genotype in *Rhodococcus equi* using a differential polymerase chain reaction method. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, n. 4, p. 317-326, 2004.

PATE, M. et al. Haemolytic *Rhodococcus equi* Isolated from a Swine Lymph Node with Granulomatous Lesions. **Journal of veterinary medicine**, v. 51, p. 249-250, 2004.

POLIDORE, M.; HAAS, A. VapI, a new member of *Rhodococcus equi* vap family. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p.299-304, 2006.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 12, p. 2696-2700, 1991.

PRESCOTT, J.F.; HOFFMAN, J.F. *Rhodococcus equi*. *Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, v. 9, n. 2, p. 375-385, 1993.

QUINN, P.J. et al. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus*. In: **Veterinary Microbiology and Microbial Diseases**. Artmed, 1994, p. 137-143.

RAHMAN T.; PEREIRA V.; PRESCOTT F.J. In vitro and intra-macrophage gene expression by *Rhodococcus equi* strain 103. **Veterinary Microbiology**, v. 110, p. 131-140, 2005.

REN, J.; J. F. PRESCOTT. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Veterinary Microbiology**, v. 94, p. 167-182, 2003.

RIBEIRO, M.G. et al. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, and a new variant, 87-kb Type III. **Comparative immunology microbiology & infectious diseases**, v. 28, p. 53-61, 2005.

SÁ e SILVA, M. COMPARAÇÃO ENTRE TESTES BIOQUÍMICOS E ANÁLISE DA SEQUÊNCIA PARCIAL DO GENE *hsp60* PARA A IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS DE *Streptococcus equi*. Santa Maria: UFSM, 2005, 47p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

SELLON, D.C. et al. Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, n. 11, p. 1232-1237, 1997.

SOEDERMANTO I. et al. Identification and further characterization of *Rhodococcus equi* isolated from cases of lymphadenitis in cattle. **Zentralbl Bakteriol**, v. 286, n.4, p. 457-467, 1997.

TAKAI, S.; SEKISAKI, T.; OSAWA, A. Association between a large plasmid and 15-17 kDa antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v. 59, p. 4056-4060, 1991.

TAKAI S. et al. Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from lesions of infected foals. **Bull Equine Research Institute**, v. 30, p. 9-14, 1993.

TAKAI, S.; SASAKI, Y.; IKEDA, T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n.2, p. 457-460, 1994a.

TAKAI, S. et al. Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.39, n.1-2, p. 187-192, 1994b.

TAKAI S.; SASAKI Y.; TSUBAKI S. *Rhodococcus equi* infections in foals – current concepts and implication for future research. **Journal Equine Science**, v. 6, n.4, p. 105-119, 1995a.

TAKAI, S. et al. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15-to 17-Kilodalton antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1624-1627, 1995b.

TAKAI, S. et al. Isolation of virulent and intermediately virulent *R. equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.58, n.7, p. 669-672, 1996.

TAKAI, S. et al. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 1034-1037, 1996a.

TAKAI, S. et al. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 58, n.7, p. 669-672, 1996b.

TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p.167-176, 1997.

TAKAI, S. et al. DNA Sequence and Comparison of Virulence Plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. **Infection and Immunity**, v. 68, n.12, p. 6840 – 6847, 2000.

TAN, C. et al. Molecular characterization of a lipid-modified virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 59, n.1, p. 51-9, 1995.

TAOUJI S. et al. Serum and mucosal antibodies of infected foals recognized two distinct epitopes of Vap A of *Rhodococcus equi*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 34: 299-306, 2002.

VARGAS, A. Infecções por *Rhodococcus equi*. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; MENDEZ, A.M.C.; LEMOS, R.A.A. *Doenças de Ruminantes e Equinos*. 2ª Edição, Varela, 2001.

VERVILLE T.D. et al. *Rhodococcus equi* infections of humans. **Medicine**, v. 73, n. 3, p. 119-132, 1994.

VIANA, L. R. Identificação fenotípica e molecular de *Rhodococcus equi* e *Dietzia maris* em bubalinos. 2007. Dissertação de mestrado em Medicina Veterinária. Curso de Pós-Graduação em medicina veterinária. Universidade Federal de Santa Maria. 68 p.

WADA, R. et al. Pathogenicity and virulence of *Rhodococcus equi* in foals following intratracheal challenge. **Veterinary Microbiology**, v. 56, n. 3-4, p. 301-12, 1997.

WOLCOOK, J.B.; FARMER, A.T.; MULTIMER, M.D. Selective medium for *Corynebacterium equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n.5, p. 640-642, 1979.

6. APÊNDICE

APÊNDICE A – Amostras de *R. equi* utilizadas no estudo

Haras	Identificação	Origem	Haras	Identificação	Origem
1	54/97	Linfonodo	1	506/95	Fezes
	80/99	Pulmão		506/95	Fezes
	557/96	Pulmão		506/95	Fezes
	353/93	Pulmão		506/95	Fezes
	489/95	Pulmão		506/95	Fezes
	025/03	Cavidade Abdominal		506/95	Fezes
	400/02	Abscesso Subcutâneo		506/95	Fezes
	412/02	Pulmão		506/95	Fezes
	411/02	Linfonodo		506/95	Fezes
	485/99	Secreção articular		506/95	Fezes
	85/00	Pulmão		506/95	Fezes
	96/93	Cavidade abdominal		506/95	Fezes
	389/93	Pulmão		506/95	Fezes
	561/99	Pulmão		506/95	Fezes
	703/06	Lavado Traqueal		506/95	Fezes
	558/06	Swab nasofaringeano		506/95	Fezes
	164/94	Pulmão		506/95	Fezes
	459/95	Swab		506/95	Fezes
	459/95	Swab		506/95	Fezes
	459/95	Swab		506/95	Fezes
	480/95	Swab		506/95	Fezes
20/96	Swab	506/95	Fezes		
20/96	Swab	288/07	Pulmão		

APÊNDICE A – Amostras de *R. equi* utilizadas no estudo

Haras	Identificação	Origem	Haras	Identificação	Origem
2	54/98	Pulmão	2	490/95	Fezes
	583/98	Pulmão		490/95	Fezes
	452/01	Pulmão		490/95	Fezes
	473/02	Pulmão		490/95	Fezes
	535/04	Lavado Traqueal		490/95	Fezes
	535/04	Lavado Traqueal		490/95	Fezes
	481/05	Gl. mamária		490/95	Fezes
	490/95	Solo		490/95	Fezes
	490/95	Solo		490/95	Fezes
	490/95	Solo		490/95	Fezes
	490/95	Fezes		490/95	Fezes
	490/95	Fezes		490/95	Fezes
	490/95	Fezes		490/95	Fezes
	490/95	Fezes		490/95	Fezes
	490/95	Fezes		490/95	Swab
	490/95	Fezes		490/95	Swab
	490/95	Fezes		490/95	Swab
	490/95	Fezes		490/95	Swab

