

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

**IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE**  
***Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**LUCIANE RIBEIRO VIANA**

**SANTA MARIA, RS, BRASIL**

**2007**

**IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE**  
***Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS**

**por**

**Luciane Ribeiro Viana**

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

**Orientador: Agueda Castagna de Vargas**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**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

**IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi*  
E *Dietzia maris* EM BUBALINOS**

elaborada por  
**Luciane Ribeiro Viana**

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

**Comissão Examinadora:**

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

**Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)**

**Rosmari Hörner, Dra. (UFSM)**

**Santa Maria 28 de agosto de 2007.**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à minha mãe, Fátima, pelo carinho, apoio e incentivo que foram essenciais em todas as etapas da minha vida.

À minha avó Olívia, pela incansável companhia, dedicação e carinho a mim dispensados.

A meus irmãos Fabiane e Alex e ao meu pai Ayrton, pela torcida e grande carinho.

À professora Agueda pela oportunidade, paciência e por transmitir ensinamentos que levarei sempre comigo.

Às minhas amigas Niura, Fernanda, Daniele e Lilian pela amizade, confiança, apoio e por proporcionarem momentos agradáveis em suas companhias.

À Cristina, Sônia e Mateus pela amizade, orientação e pelas importantes colaborações em todas as etapas da confecção deste trabalho.

Ao Guilherme pelo auxílio na execução das análises e imprescindível ajuda na reunião e descrição dos resultados.

Ao professor Élgion, responsável pelo LABDROS, por permitir a realização dos seqüenciamentos neste laboratório, pela disponibilidade, pelas explicações e pela ajuda nas análises moleculares com ferramentas de bioinformática.

À Paloma, integrante do LABDROS pela simpatia e pela execução dos seqüenciamentos.

Ao Carlão, meu amor, por ser presente, apesar da distância, pelo conforto nas horas difíceis, por compreender o cansaço e o mau-humor, pela confiança, incentivo e por seu amor, que deixou tudo mais fácil.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

### **IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS**

AUTOR: LUCIANE RIBEIRO VIANA

ORIENTADOR: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 28 agosto de 2007.

A identificação bacteriana em laboratórios de microbiologia é realizada pela observação de um conjunto de fatores morfofisiológicos e genéticos. Alguns membros do grupo dos actinomicetos, como os gêneros *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia* e *Dietzia* possuem características fenotípicas semelhantes. Por consequência, a identificação microbiológica destes agentes pode enfrentar algumas dificuldades. Neste trabalho foram analisados 24 isolados bacterianos oriundos de leite e pele de búfalas (*Bubalus bubalis*), os quais foram previamente identificados como *Rhodococcus equi*, com o uso de um número restrito de testes fenotípicos considerados discriminatórios para a caracterização bacteriana. Com o auxílio de testes bioquímicos adicionais e de ferramentas moleculares objetivou-se neste estudo, realizar a caracterização desses isolados, bem como a diferenciação de outros microrganismos intimamente relacionados. Os resultados dos testes fenotípicos não permitiram identificar os isolados com clareza, uma vez que foram condizentes com dois gêneros relacionados, *Rhodococcus* e *Dietzia*. Apesar disso, esses resultados permitiram a separação dos isolados em três fenótipos distintos. Apenas um dos isolados foi comprovado como *R. equi* com a realização da PCR multiplex para esta espécie, por seqüenciamento e análise de fragmentos de DNA. Os demais isolados analisados somente puderam ser identificados com exatidão após o seqüenciamento do DNA, onde foram caracterizados como *Dietzia maris*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou maior resistência dos isolados de *D. maris* para oxacilina e a rifampicina, 96% e 87% respectivamente. O isolado de *R. equi*, apresentou resistência à amicacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina. Alerta-se para o risco da incorreta identificação dos isolados bacterianos pelo uso de análise diagnóstica baseada em testes fenotípicos, a fim de diferenciar *R. equi* e *D. maris* e para a necessidade de utilização de testes complementares para diferenciação destes microrganismos.

Palavras-chave: *Rhodococcus* sp.; *Dietzia* sp.; fenotípicos; seqüenciamento de DNA.

## **ABSTRACT**

MS Dissertation in Veterinary Medicine

Postgraduate Program in Veterinary Medicine

Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

### **PHENOTYPICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Rhodococcus equi* AND *Dietzia maris* IN BUFFALOES**

AUTHOR: LUCIANE RIBEIRO VIANA

ADVISER: AGUEDA CASTAGNA DE VARGAS

Data and place of the defense: August, 28<sup>th</sup>, 2007, Santa Maria, RS, Brazil

The bacterial identification in laboratories of microbiology is achieved by using several morphophysiological and genetic factors. Some members of the actinomycetes group, like the genera *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Nocardia* and *Dietzia* have similar phenotypical characteristics. As result of this, the laboratorial detection of these microorganisms is often faced with bacterial identification problems. The present work analyzed 24 bacterial isolates from milk and skin of buffalo females (*Bubalus bubalis*), which previously had been identified as *Rhodococcus equi*, by using a restricted number of phenotypical tests for bacterial characterization. Using additional biochemical tests and molecular tools, the goal of this study was to perform the characterization of these isolates, as well as the differentiation of other microorganisms closely related. The results of the phenotypical tests had not allowed distinguishing definitely the isolates, once that they demonstrated relationship with two correlated genera, *Rhodococcus* and *Dietzia*. Despite the fact, these results allowed the separation of the isolates in three distinct biotypes. Only one of the isolates was confirmed as *R. equi* through the PCR multiplex specifically for this specie, as well DNA sequencing and DNA fragment analysis. All the other isolates only could be precisely identified after the DNA sequencing, where they were characterized as *Dietzia maris*. The sensitivity profile to antimicrobials demonstrated the biggest resistance of the *D. maris* isolates to oxacillin and rifampin, 96% and 87% respectively. The *R. equi* isolate, presented resistance to amikacin, oxacillin, penicillin, rifampin and tetracycline. Alert for the risk of the incorrect identification of the bacterial isolates by using diagnostic analysis based on phenotypical tests in order to differentiate *R. equi* and *D. maris*, besides the necessity to use of complementary tests for differentiation of these microorganisms.

Key words: *Rhodococcus* sp., *Dietzia* sp.; phenotypic test; DNA sequencing.

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Características morfo-fisiológicas de <i>Rhodococcus equi</i> e <i>Dietzia maris</i> .....	21
--	----

## LISTA DE ANEXOS

ANEXO A – Taxonomia simplificada dos actinomicetos corineformes .....	52
ANEXO B – Características bioquímicas e similaridade dos fenótipos identificados com <i>Rhodococcus equi</i> e <i>Dietzia maris</i> .....	53
ANEXO C – Artigo .....	54



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	4
RESUMO .....	5
ABSTRACT .....	6
LISTA DE TABELAS .....	7
LISTA DE ANEXOS .....	8
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1. Búfalos .....	12
2.2. Gênero <i>Rhodococcus</i> .....	13
2.3. Importância Clínica de <i>R. equi</i> .....	14
2.4. Diagnóstico laboratorial de <i>R. equi</i> .....	16
2.5. Gênero <i>Dietzia</i> .....	17
2.6. Importância Clínica de <i>Dietzia</i> sp.....	18
2.7. Diagnóstico laboratorial de <i>Dietzia</i> sp.....	19
2.8. Diagnóstico diferencial de <i>Rhodococcus</i> sp. e <i>Dietzia</i> sp. ....	20
Tabela 1 – Características morfo-fisiológicas de <i>Rhodococcus equi</i> e <i>Dietzia maris</i> .....	21
3. CAPÍTULO 1 .....	22
IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE <i>Rhodococcus equi</i> E <i>Dietzia maris</i> EM BUBALINOS.....	23
Resumo .....	23
Abstract.....	24

Introdução .....	25
Material e Métodos .....	27
Isolados.....	27
Caracterização fenotípica .....	27
Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos .....	28
Extração do DNA bacteriano .....	28
PCR para caracterização do <i>R. equi</i> .....	29
Seqüenciamento de fragmentos de DNA dos isolados.....	29
Biotipificação e filogenia dos isolados.....	30
Resultados.....	30
Discussão .....	33
Conclusão.....	37
Referências.....	38
Tabela 1 – Características bioquímicas e moleculares dos fenótipos caracterizados nos isolados bacterianos de búfalas.....	42
Figura 1 - Relações filogenéticas entre isolados bacterianos de búfalos e microrganismos relacionados, baseadas na região 16S rRNA. Método: Neighbor-Joining. Teste de 1000 <i>bootstraps</i> (valores percentuais) .....	43
4. CONCLUSÃO.....	44
5. REFERÊNCIAS .....	45
6. ANEXOS .....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Os búfalos (*Bubalus bubalis*) tiveram origem na Ásia e atualmente encontram-se difundidos em todo o mundo. No Brasil, a bubalinocultura vem se expandindo no setor pecuário do país, graças a características dessa espécie como a capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais, rusticidade, longevidade, precocidade reprodutiva em relação aos bovinos, grande produção de leite e carne, elevadas taxas de natalidade e ainda a aptidão para o trabalho devido a sua docilidade, resistência e força. Este conjunto de fatores reduz os custos de produção e incentivam o crescimento do número de estabelecimentos pecuários com este tipo de criação (RAMOS, 2003).

Uma característica particular desta espécie deve-se ao fato de apresentarem a pele espessa e de tonalidade escura, o que faz com que atinjam o estresse térmico a temperaturas ambientais mais baixas, necessitando assim de lugares sombreados ou da presença de água ou lama para a termo-regulação corporal (RAMOS, 2003). Esse hábito, apesar de necessário para o seu bem estar, pode ser nocivo ao contexto epidemiológico de infecções e ao seu estado sanitário. Alguns microrganismos ambientais, já foram diagnosticados como agentes etiológicos em alguns casos de infecções em bubalinos (RAHMAN & BAXI, 1983). Atualmente, um número crescente de microrganismos telúricos, considerados oportunistas estão sendo diagnosticado em infecções, em várias espécies e principalmente em indivíduos imunocomprometidos e em casos de infecções hospitalares. Por estes motivos tornaram-se o foco de muitas pesquisas contemporâneas.

A identificação bacteriana em laboratórios é realizada pela observação de um conjunto de fatores que incluem aspectos morfológicos, bioquímicos, fisiológicos e genéticos. As provas bioquímicas são utilizadas para a diferenciação das bactérias principalmente quanto à capacidade de utilização de alguns açúcares e de metabolizar determinados aminoácidos presentes nos meios. No entanto, existem bactérias que apresentam crescimento fastidioso ou se mostram inertes às provas bioquímicas, dificultando assim, sua caracterização fenotípica e conseqüentemente impossibilitando o diagnóstico do agente bacteriano por essa metodologia (LASKER et al., 1992).

Entre os microrganismos telúricos estudados atualmente que possuem problemas na identificação fenotípica, inclui-se o gênero *Rhodococcus*, que possui grande importância na medicina veterinária e na medicina humana, pois ao *Rhodococcus equi* é atribuída a etiologia

de muitas pneumonias e abscessos pulmonares tanto em eqüinos como em humanos com o sistema imune debilitado. Cabe ressaltar que o número de casos diagnosticados em humanos vem aumentando principalmente em indivíduos HIV positivos. (TAKAI et al., 1993; BYRNE et al., 2001).

*R. equi* possui características fenotípicas muito semelhantes a bactérias de menor significado clínico, como por exemplo, a *Dietzia* (BIZET et al., 1997). Devido à ausência de reatividade a uma grande parte dos testes bioquímicos existentes, a diferenciação destes dois gêneros deve ser complementada por outras metodologias, que proporcionem resultados fidedignos, como por exemplo, as técnicas moleculares (RAINEY et l., 1995; REYES et al., 2006).

Metodologias como a PCR, seqüenciamento de DNA e análises filogenéticas estão sendo cada vez mais utilizadas na complementação de testes diagnósticos. É de fundamental importância para a identificação exata de microrganismos, a congruência entre resultados fenotípicos, genéticos e evolutivos, pois assim torna-se possível a determinação de características e funções, bem como a confiabilidade dos dados epidemiológicos gerados e a terapêutica e prognóstico, quando envolvidos em casos clínicos.

Tendo em vista a importância clínica emergente do *R. equi* e demais espécies relacionadas, tanto na medicina veterinária como na medicina humana, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar fenotipicamente e por métodos moleculares os isolados bacterianos que apresentaram perfil fenotípico semelhante ao *R. equi*, provenientes de amostras de pele e de leite de búfalas, definindo a susceptibilidade destes agentes aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de enfermidades causadas por *R. equi*.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Búfalos**

Também conhecido como búfalos d'água, búfalo de rio, búfalo indiano, búfalo de pântano, búfalo asiático ou búfalo malaio, o búfalo doméstico (*Bubalus bubalis*) teve sua origem no sul da Ásia e participa ativamente do setor produtivo de carne, leite ou trabalho,

por suas características intrínsecas de longevidade, adaptação às condições do meio e resistência às doenças infecto-contagiosas e parasitárias (RAMOS, 2003).

Segundo Oliveira et al. (2005) a população bubalina brasileira está distribuída cerca de 50% na Região Norte, 15% na Região Sudeste, 14% no Nordeste, 12% no Centro Oeste e 9% na Região Sul. Conforme Teixeira et al. (2005), a Itália é um dos países mais desenvolvidos na produção de leite de búfala e seus derivados. Silva et al. (2003) relatam que neste país se encontra a maior produção de leite de búfala da Europa e a sua quase totalidade é destinada à elaboração de queijo tipo *mozzarella*.

Os búfalos são particularmente intolerantes à radiação solar direta. Durante os períodos quentes do dia, os animais procuram poças de água ou lama para se refrescar e usualmente pastejam apenas nas horas mais frescas, principalmente durante a noite. Este tipo de comportamento lhes permite proteção dos raios solares e das queimaduras em função da cor preta de sua pele (RAMOS, 2003). Os animais passam mais de 60% do tempo ao sol, mormente, pastejando. Na sombra, na água ou em regiões alagadiças os principais comportamentos são de ruminação e ócio. Esse costume além de favorecer as trocas de calor, permitem a eliminação de ectoparasitas, pois ao chafurdarem nas poças, os ectoparasitas aderidos aos animais ficam presos aos torrões de lama que caem quando esta seca ou são derrubados quando os animais se coçam, esfregando-se em árvores, porteiras ou mourões de cerca (RAMOS, 2003).

Apesar do hábito de chafurdar na lama ser considerado saudável para o seu bem estar, pode trazer prejuízos no âmbito epidemiológico, pois microrganismos telúricos presentes na lama e na água são espalhados no ambiente em que circulam, podendo contaminar outros animais e até mesmo o homem. Comprovadamente microrganismos telúricos são relatados como etiologia em infecções, como por exemplo, o *R. equi* que já foi diagnosticado como agente causador de mastite em búfalos (RAHMAN & BAXI, 1983).

## **2.2. Gênero *Rhodococcus***

O *Rhodococcus* é o gênero bacteriano de maior importância clínica dentre os actinomicetos telúricos, e tem sido diagnosticado em todo o mundo, associado a doenças em diferentes espécies de animais e plantas (BELL et al., 1998). Este microrganismo pertence à classe dos actinomicetos, composta também pelos gêneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium*,

*Nocardia*, *Dietzia*, *Gordonia* e *Tsukamurella*, entre outros (ANEXO A). Existem aproximadamente 27 espécies de *Rhodococcus* separadas pela diversidade de metabolismo, aplicação industrial ou potencial em biorremediação (GYLES et al., 2004; PRESCOTT et al., 2004). As espécies existentes são: *Rhodococcus aetherivorans*, *Rhodococcus baikonurensis*, *Rhodococcus coprophilus*, *Rhodococcus corynebacterioides*, *Rhodococcus equi*, *Rhodococcus erythropolis*, *Rhodococcus fascians*, *Rhodococcus globerulus*, *Rhodococcus gordoniae*, *Rhodococcus imtechensis*, *Rhodococcus jostii*, *Rhodococcus koreensis*, *Rhodococcus kroppenstedtii*, *Rhodococcus maanshanensis*, *Rhodococcus marinonascens*, *Rhodococcus opacus*, *Rhodococcus percolatus*, *Rhodococcus phenolicus*, *Rhodococcus pyridinivorans*, *Rhodococcus rhodnii*, *Rhodococcus rhodochrous*, *Rhodococcus ruber*, *Rhodococcus triatoma*, *Rhodococcus tukisamuensis*, *Rhodococcus wratisbaviensis*, *Rhodococcus yunnanensis* e *Rhodococcus zopfii* (HOLT et al., 1994; EUZÉBY 1997). Dentre essas, são reconhecidos como patógenos o *R. equi*, em mamíferos e *R. fascians* em plantas (BELL et al., 1996).

O gênero *Rhodococcus* foi descrito pela primeira vez por Zopf em 1891, sendo que em 1977 ocorreram modificações para acomodar algumas cepas que apresentavam diferenças dos gêneros previamente estabelecidos *Nocardia*, *Corynebacterium* e *Mycobacterium* (BELL et al., 1996). Com os avanços nas técnicas utilizadas na classificação dos actinomicetos, este microrganismo foi então reclassificado dentro do gênero *Rhodococcus* (cocos com pigmento vermelho) (BELL et al., 1998).

O *R. equi*, é amplamente distribuído pelo ambiente e tem sido isolado de uma grande variedade de fontes incluindo solos, pedras, fezes e intestino de animais doentes e sadios (BELL et al., 1996). Este microrganismo apresenta requerimentos nutricionais simples para o seu desenvolvimento, os quais são supridos pelas fezes dos animais (PRESCOTT & HOFFMAN, 1993).

### **2.3. Importância Clínica de *R. equi***

*R. equi* é um patógeno intracelular facultativo, assim como as micobactérias, provoca o desenvolvimento de lesões piogranulomatosas nos animais graças à sua habilidade de sobreviver e multiplicar no interior dos macrófagos (TAKAI et al., 1996). Uma característica importante das espécies do gênero *Rhodococcus* é a presença do ácido micólico na parede

celular, o qual está relacionado com a capacidade do microrganismo em sobreviver a condições adversas de meio ambiente como ocorre, por exemplo, no interior dos macrófagos (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

Esta bactéria ocasiona broncopneumonia piogranulomatosa e enterite ulcerativa em potros com menos de seis meses de idade (TAKAI et al., 1996) e também abscessos cutâneos na região inguinal e celulite (PERDRIZET & SCOTT, 1987). O microrganismo pode ser isolado de bovinos e suínos, onde leva ao desenvolvimento de linfadenites, produzindo lesões semelhantes as da tuberculose. Bovinos, assim como caprinos, podem apresentar lesões granulomatosas no fígado (TAKAI et al., 1996 e SOEDERMANTO et al., 1997). Outras espécies animais que podem ser infectadas por *R. equi* são ovinos, cervídeos, bubalinos, felinos e caninos, onde promove alterações nos linfonodos e abscedação de feridas (HONDALUS, 1997).

Nos potros, a maior parte dos casos de pneumonia por este microrganismo ocorre no verão, época que coincide com a idade de maior sensibilidade dos animais e condições ambientais ótimas para disseminação do agente (PRESCOTT, 1991). *R. equi* tem sido considerado um patógeno oportunista para eqüinos, sendo que o aumento da susceptibilidade dos potros à infecção pode ser explicado por falhas na transferência da imunidade materna e pela imaturidade das células fagocitárias nos primeiros meses de vida do animal (TAKAI, 1997).

Embora a ampla distribuição do *R. equi* no ambiente eqüino, a doença clínica somente é encontrada em algumas propriedades. Isto reflete, provavelmente, diferenças nas condições ambientais, de manejo e na virulência dos isolados (GUIGUERRE & PRESCOTT, 1997). Entre os fatores de virulência desta bactéria podem ser citados os antígenos capsulares como o ácido micólico da parede celular, antígenos termorregulados codificados por plasmídeos associados à virulência (genes da família *vap*) (HONDALUS, 1997), e a presença de polissacarídeos e exoenzimas (“fator equi”). A combinação do aumento da susceptibilidade dos potros e os fatores de virulência do microrganismo são importantes na patogênese da enfermidade (TAKAI, 1997).

Em humanos, o *R. equi* tem sido considerado um importante agente de pneumonia, abscessos pulmonares e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, em especial nos portadores de HIV (HSUEH et al., 1998; SOEDERMANTO et al., 1998; BYRNE et al., 2001). Tem sido isolado também de indivíduos transplantados, com linfomas, insuficiência renal crônica, alcoolismo, tumores de fígado, leucemia, *diabetes mellitus* e outros casos de imunodeficiência. Estudos comprovaram que a infecção também pode ocorrer em hospedeiros

imunocompetentes (KEDLAYA, 2001). A fonte de infecção para estes indivíduos nem sempre pode ser determinada, uma vez que a maioria dos pacientes relata a ausência de contato com equinos (VERVILLE et al., 1994).

#### **2.4. Diagnóstico laboratorial de *R. equi***

O diagnóstico laboratorial do *R. equi* deve ser feito através de cultura bacteriológica combinada com o exame citológico do exsudato traqueobronquial de potros suspeitos de broncopneumonia (TAKAI et al., 1996). O isolamento do *R. equi* pode ser realizado em aerobiose a 37°C utilizando meios de enriquecimento, como o ágar sangue ovino 5% (QUINN et al., 1994; MURRAY, et al., 1995). O uso de meios seletivos como o Nanat, contendo ácido nalidíxico, novobiocina e telurito de sódio, são indicados para o isolamento bacteriano em amostras com grande contaminação, como as de fezes (WOOLCOCK et al., 1979). Os meios seletivos CAZ-NB (ágar ceftazidima-novobiocina) e TCP (trimethoprim, cefoperazone, polymyxin B), contêm antimicrobianos que inibem contaminantes e favorecem a seleção do *R. equi* (MAKRAI et al., 2005). O *R. equi*, não apresenta crescimento em meio seletivo como o ágar MacConkey.

Na coloração de Gram este organismo é observado na forma de cocos ou coco-bacilos gram positivos, pleomórficos e capsulados (MURRAY, et al., 1995; QUINN et al., 1994). As colônias clássicas do *R. equi* são viscosas, mucóides e coalescentes, apresentando tamanho de 2 a 4 mm. Algumas podem se apresentar menos mucóides e a presença de pigmento nas colônias raramente é observada em cultivos com menos de quatro dias. (PRESCOTT, 1991; VARGAS, 2001). Colônias de *R. equi* geralmente não produzem hemólise em ágar sangue ovino (QUINN et al., 1994), embora Pate et al. (2004) tenha descrito o isolamento de colônias hemolíticas. Provas bioquímicas, como a redução de nitrato a nitrito, presença das enzimas catalase, urease, e a utilização do ONPG (orthonitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyrannoside) (QUINN et al., 1994; BIZET et al., 1997) são utilizadas para identificação desse agente. O teste CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen Test) é uma das provas fenotípicas diferenciais para a identificação do microrganismo. Esta prova consiste na hemólise sinérgica do *Staphylococcus*  $\beta$  hemolítico com outro microrganismo que possua o fator CAMP (CHRISTIE et al., 1944).

Os métodos moleculares, como a PCR e o seqüenciamento de DNA vêm sendo amplamente utilizados para o diagnóstico e caracterização taxonômica de microrganismos



(MACPHERSON & MÜLLER, 2000). Entretanto, a utilização desta técnica em laboratórios de diagnóstico muitas vezes torna-se difícil devido ao seu custo e a necessidade de pessoal treinado para a sua realização. A amplificação do fragmento do gene que codifica a região 16S rRNA de *R. equi* e de fragmento do gene *vapA* pode ser muito útil na distinção de *R. equi* de outras bactérias intimamente relacionadas (TAKAI et al., 1995; BELL et al., 1996; SELTON et al., 1997). Entretanto, a identificação molecular de isolados de *R. equi* baseada unicamente na amplificação do gene *vapA* pode ser falha, uma vez que isolados ambientais desta bactéria podem não apresentar este gene associado à virulência. Contudo, esta técnica pode ser utilizada em estudos epidemiológicos bem como para determinar a virulência dos isolados de *R. equi* para potros e camundongos imunossuprimidos (HONDALUS, 1997; TAKAI et al., 1999). Uma técnica de PCR reunindo os genes *vapA* e *vapB* foi padronizada por Oldfield et al. (2004).

Diversos estudos apontam o seqüenciamento de fragmentos de DNA que codificam a região 16S rRNA como técnica definitiva na classificação taxonômica de microrganismos, especialmente daqueles onde as provas bioquímicas são inconclusivas.

Os métodos mais modernos de identificação do *Rhodococcus equi* incluem a análise das seqüências parciais de DNA do gene codificante do fragmento 16S rRNA, onde organismos com similaridade de 97% ou mais podem ser considerados da mesma espécie; ou a hibridização DNA-DNA, onde valores de 70% de associação definem a identidade da espécie (BELL et al., 1996).

## **2.5. Gênero *Dietzia***

O gênero *Dietzia* assim como o *Rhodococcus* também é composto de microrganismos considerados telúricos, que podem ser encontrados no solo, em sedimentos aquáticos e no intestino de carpas (*Cyprinus carpio*) (NESTERENKO et al., 1982; GOODFELLOW, 1994; YUMOTO et al., 2002). Até o momento na literatura são descritas cinco espécies diferentes de *Dietzia*, são elas: *Dietzia cinnamea*, *Dietzia kunjomensis*, *Dietzia maris*, *Dietzia natronolimnaea* e *Dietzia psychralcaliphila* (EUZÉBY, 1997).

Sette et al. (2006), estudando duas amostras distintas de petróleo, através da construção do 16S rRNA, biblioteca de genes e métodos de cultivos encontrou várias comunidades de bactérias. Conforme o mesmo autor, existem espécies capazes de degradar o

óleo, como *Leuconostoc* sp. e *Streptococcus* sp. e também aquelas incapazes de degradar o óleo, como a *Dietzia* spp. Mavilraj et al. (2006), baseado em testes fisiológicos, bioquímicos e em diferenças genótípicas propuseram uma nova espécie chamada *Dietzia kunjamensis*, isolada de um deserto Indiano. Brito et al. (2006), estudando amostras de manguezais da baía de Guanabara, RJ – Brasil, contaminados por óleo, encontrou através da análise do gene que codifica a região 16S rRNA 12 grupos distintos de bactérias. Os grupos com capacidade conhecida de degradar hidrocarbonetos encontrados por este autor foram *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Alcanivorax*, *Microbulbifer*, *Shingomonas*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*, *Dietzia* e *Gordonia*. Borzenkov et al. (2006) sugere que o melhor desempenho das bactérias degradadoras de hidrocarbonetos acontece entre 25 e 45°C.

Kleinstauber et al. (2006) analisando solos salinos em locais de extração de petróleo na Patagônia (Argentina), através de seqüenciamento do 16S rRNA, encontraram nos ambientes com pouco sal bactérias *Sphingomonas* spp. Nos ambientes com elevada quantidade de sal encontraram *Ralstonia* spp. e algumas bactérias halofílicas, incluindo *Halomonas*, *Dietzia* e *Alcanivorax*. Toth et al. (2006), estudando os gêneros bacterianos presentes em parasitas voadores responsáveis por grande parte de miíases em pássaros observaram vários organismos bacterianos, inclusive a *Dietzia maris*.

## **2.6. Importância Clínica de *Dietzia* spp.**

Os membros do gênero *Dietzia* não possuem significado clínico marcante, sendo classificados como patógenos oportunistas, encontrados em casos específicos de enfermidades em animais e humanos (BEMER-MELCHIOR et al., 1999; PIDOUX et al., 2001; REYES et al., 2006). Os casos raros de enfermidades associadas a este microrganismo envolvem indivíduos com estado imunitário reduzido, nos casos de imunossupressão por outras enfermidades ou com períodos prolongados de estresse o que reduz a imunidade destes indivíduos.

Alguns casos descritos na literatura citam o envolvimento de *Dietzia* sp. em casos de papilomatose humana (NATARAJAN et al., 2005). A identificação de *Dietzia maris* é descrita por meio de seqüenciamento do fragmento de DNA do gene que codifica o 16S rRNA a partir de uma biopsia de medula óssea de um paciente humano com prótese, sendo este o primeiro caso que relata a capacidade infectiva da *Dietzia maris* (PIDOUX et al.,

2001). A exemplo deste, tem-se a descrição da infecção na aorta de um humano por *Dietzia maris* (REYES et al., 2006). A *Dietzia cinnamea* foi isolada a partir de um *swab* perianal de uma paciente onde foi realizado o transplante da medula óssea; a classificação do agente foi obtida através do seqüenciamento de fragmentos do gene do 16S rRNA (YASSIN et al., 2006). Cabe ressaltar que os casos de infecção por este agente, resultam de contaminações ambientais.

## **2.7. Diagnóstico laboratorial de *Dietzia* spp.**

As espécies do gênero *Dietzia* são identificadas como células cocóides, gram positivas de cadeias curtas, não formadoras de esporos, que não possuem motilidade e apresentam pigmentos carotenóides. As colônias, pela presença deste pigmento, podem apresentar-se com diferentes tonalidades de laranja, são mucóides, convexas e um pouco irregulares (MISONO et al., 1989; WEID et al., 2007). São bactérias que apresentam crescimento lento e necessitam de 2 a 3 dias para sua visualização inicial (BIZET et al., 1994).

O comportamento fenotípico para os testes bioquímicos inclui as seguintes características: pesquisa de indol, vermelho de metila e teste de fosfatase negativo. Produz ácido pela utilização de frutose, glicerol e glicose, mas não pelo ribitol, arabinose, celobiose, galactiol, galactose, inositol, lactose, maltose, manitol,  $\alpha$ -metil-D-glucose, rafinose, ramnose, salicina, glucitol, sorbose, sacarose e xilose (NESTERENKO et al., 1982; GOODFELLOW, 1994). A confirmação da identificação com provas bioquímicas como, urease, ONPG e fermentação de açúcares, de *Dietzia* spp. é dificultada devido à inércia deste microorganismo frente a estas provas bioquímicas.

O diagnóstico molecular de *Dietzia* spp. pode ser realizado através da confirmação da presença de genes envolvidos na síntese de carotenóides. (TAO et al., 2007). Diversos estudos apontam o seqüenciamento de regiões do gene do 16S rRNA como técnica definitiva na classificação taxonômica de microrganismos, especialmente daqueles onde as provas bioquímicas não são conclusivas. Reyes et al. (2006), utilizou o método do seqüenciamento para diagnosticar um caso de infecção por *Dietzia* sp. localizado na aorta de um paciente humano.

## 2.8. Diagnóstico diferencial entre *Rhodococcus equi* e *Dietzia maris*

A diferenciação bioquímica entre o *Rhodococcus equi* e *Dietzia* sp. baseia-se na prova de ONPG que é utilizada para identificar bactérias fermentadoras tardias da lactose, onde o *Rhodococcus* sp. é positivo e *Dietzia* sp. é negativa. Não existem dados conclusivos na literatura sobre o comportamento fenotípico destes gêneros bacterianos. Bizet et al. (1997), identificando espécies de *Rhodococcus*, e *Dietzia maris* descreveu os seguintes testes: redução de nitrato, ONPG e urease, sendo que os resultados obtidos para o *Rhodococcus* foram respectivamente positivo, positivo e positivo e para a *Dietzia* sp foram respectivamente positivo, negativo e positivo. A Tabela 1 apresenta resultados de testes bioquímicos realizados para a diferenciação entre os dois gêneros bacterianos.

Outra ferramenta importante para a diferenciação entre as espécies dos gêneros *Rhodococcus* e *Dietzia* é a técnica de PCR a qual se mostra superior ao isolamento bacteriano (SELLON et al., 2001). Contudo, salienta-se a importância da confirmação do diagnóstico por seqüenciamento de DNA, quando a caracterização fenotípica e molecular for discrepante (REYES et al., 2006).

Tabela 1 – Características morfo-fisiológicas de *Rhodococcus equi* e *Dietzia maris*

Teste	<i>Rhodococcus equi</i>	<i>Dietzia maris</i>
Morfologia da colônia	Mucóide	Mucóide
Coloração da colônia	Salmão	Alaranjada
Coloração de Gram	Coco-bacilo gram positivo	Coco-bacilo gram positivo
CAMP <sup>1</sup>	Positivo	ND <sup>2</sup>
Pesquisa de Catalase	Positivo	Positivo
Pesquisa de Oxidase	Negativo	Negativo
Produção de Urease	Variável	Variável
KNO <sub>3</sub> <sup>3</sup>	Variável	Positivo
Utilização de ONPG <sup>4</sup>	Positivo	Negativo
Utilização de Glicose	Positivo	Variável
Utilização de Lactose	Negativo	Negativo
Utilização de Manitol	Variável	Negativo
Utilização de Maltose	Variável	Variável
Utilização de Ribose	Positivo	Negativo
Utilização de Inulina	Variável	Negativo
Utilização de Salicina	Variável	Negativo
Hidrólise de Esculina	Negativo	Negativo
Utilização de GOF <sup>5</sup>	Negativo	Negativo

Fonte adaptada: Quinn et al. (1994), Murray et al. (1995), Bizet et al. (1997), Pidoux, et al. (2001) e Yumoto, et al. (2002).

<sup>1</sup> CAMP – Christie, Atkins, Munch, Petersen Test); <sup>2</sup> ND - Dado não determinado; <sup>3</sup> KNO<sub>3</sub> – Teste de Redução do Nitrato; <sup>4</sup> ONPG - ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; <sup>5</sup> GOF- Glicose oxidativa-fermentativa.

### **3. CAPÍTULO 1**

#### **IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS**

Formato expandido do artigo a ser submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Vide ANEXO C – artigo final submetido)

## IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS

Luciane Ribeiro Viana<sup>1</sup>; Cristina Crewer<sup>3</sup>; Guilherme Drescher<sup>3</sup>; Andréia Lazzari<sup>4</sup>; Sônia Ávila Botton<sup>2</sup>; Mateus Matiuzi da Costa<sup>5</sup>; Élgion Lúcio da Silva Loreto<sup>2</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: lrvtche@hotmail.com

### Resumo

Neste trabalho foram analisados 24 isolados bacterianos oriundos de leite e pele de búfalas (*Bubalus bubalis*), os quais foram previamente identificados como *Rhodococcus equi* com o auxílio de fenotipia concisa. Testes fenotípicos complementares e ferramentas moleculares foram utilizadas com o objetivo de caracterizar estes isolados, bem como diferenciar estes de outros microrganismos intimamente relacionados. Com base nos resultados fenotípicos, observaram-se três fenótipos distintos, porém a identificação dos isolados foi inconclusiva. Apenas um dos isolados foi comprovado como sendo *R. equi* com a realização da PCR específico, seqüenciamento e a análise dos fragmentos de DNA. Os demais isolados só foram corretamente identificados pelo seqüenciamento do DNA, indicando tratar-se de *Dietzia maris*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou maior resistência dos isolados de *D. maris* para oxacilina (96%) e a rifampicina (87%). O isolado de *R. equi*, apresentou resistência à amicacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina. Alerta-se para o risco da incorreta identificação dos isolados baseados em testes fenotípicos e para a necessidade de utilização de testes complementares para diferenciação entre *R. equi* e *D. maris*.

Palavras chave: *Rhodococcus equi*, *Dietzia maris*, *Bubalus bubalis*, fenotipia, seqüenciamento de DNA.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS

<sup>3</sup> Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, SC.

<sup>4</sup> Universidade Pioneira de Integração Social, UPIS, DF.

<sup>5</sup> Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, PA.

**PHENOTYPICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Rhodococcus equi*  
AND *Dietzia maris* IN BUFFALOES**

**Abstract**

The present work analyzed 24 bacterial isolates from milk and skin of buffalos females (*Bubalus bubalis*), which previously had been identified as *Rhodococcus equi*, by using a restricted number of phenotypical tests for bacterial characterization. The goal of this study was to perform the characterization of these isolates, as well as the differentiation of other microorganisms closely related by using additional phenotypical tests and molecular tools. Based on the phenotypical results three different biotypes were obtained, however the identification of the isolates was inconclusive. Only one of the isolates was confirmed as *R. equi* through the PCR specifically for this specie, as well DNA sequencing and DNA fragment analysis. All the other isolates only could be precisely identified after the DNA sequencing, where they were characterized as *Dietzia maris*. The sensitivity profile to antimicrobials demonstrated the biggest resistance of the *D. maris* isolates to oxacillin and rifampin, 96% and 87% respectively. The *R. equi* isolate, presented resistance to amikacin, oxacillin, penicillin, rifampin and tetracycline. Alert for the risk of the incorrect identification of the bacterial isolates by using diagnostic analysis based on phenotypical tests in order to differentiate *R. equi* and *D. maris*, besides the necessity to use of complementary tests for differentiation of these microorganisms.

Key words: *Rhodococcus* sp., *Dietzia* sp., *Bubalus bubalis*, phenotypic test, DNA sequencing.



## Introdução

A bubalinocultura é uma atividade em crescimento no Brasil, apresentando vantagens em relação à criação de bovinos. Os búfalos (*Bubalus bubalis*) são bons produtores de leite e carne, resistentes às enfermidades, adaptam-se às diferentes condições ambientais, sendo considerados rústicos, precoces e longevos (RAMOS, 2003). Devido a sua pele espessa e escura, esses animais utilizam meios alternativos para manutenção da temperatura corporal, sendo as imersões em água e a lama os mais utilizados (ABLAS et al., 2006). Este hábito, entretanto, pode ser prejudicial ao seu estado sanitário, uma vez que o animal se torna susceptível aos agentes infecciosos presentes nestes ambientes.

O *Rhodococcus equi* é um microrganismo telúrico que se destaca como um patógeno oportunista, responsável por pneumonias e abscessos pulmonares tanto em animais como em humanos. Este agente, já foi relatado como causador de mastite em búfalos (RAHMAN; BAXI, 1983). É amplamente distribuído e está geralmente, associado a pneumonias piogranulomatosas, linfadenites mesentéricas, e enterocolites em eqüinos. Também pode estar associado a infecções em outras espécies como: bovinos, cervídeos, caprinos, ovinos, suínos, bubalinos, caninos, felinos e no homem. (RAHMAN; BAXI, 1983; PRESCOTT, 1991; TAKAI et al., 1993; BELL et al., 1996). Este microrganismo possui requerimentos nutricionais simples, podendo ser isolado de uma grande variedade de fontes incluindo solos, pedras, fezes e intestino de animais doentes e sadios (BELL et al., 1996). Na última década, o *R. equi* foi descrito em humanos como um importante agente de pneumonia, abscessos pulmonares e infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, em especial nos portadores de HIV (BYRNE et al., 2001). Estudos também comprovaram a infecção por este agente em indivíduos imunocompetentes (KEDLAYA et al., 2001). O *R. equi* apresenta plasmídeos que contém genes codificantes de proteínas associadas à virulência do

microrganismo, dentre as quais destacam-se a VapA e VapB. Esses genes *vapA* e *vapB* são particularmente úteis ao diagnóstico e caracterização molecular dos isolados de *R. equi* (OLDFIELD et al., 2004)

Alguns actinomicetos corineformes como o *R. equi*, *Dietzia* sp., *Gordonia* sp. e *Nocardia* sp. apresentam características morfo-fisiológicas muito similares, o que pode dificultar a diferenciação entre os gêneros microbianos (MURRAY et al., 1995; BIZET et al., 1997). Muitos laboratórios de microbiologia utilizam essencialmente os testes fenotípicos para a identificação do *R. equi*, sendo que o mais comumente empregado é o teste CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen Test), o qual é considerado diferencial para a caracterização deste agente (PRESCOTT et al., 1982; CARTER; COLE 1990). Apesar disto estudos recentes relatam que na apropriada identificação e diferenciação destes microrganismos, devem-se incluir técnicas de caracterização molecular (PIDOUX et al., 2001; REYES et al., 2006).

Métodos como a PCR e o seqüenciamento de DNA são amplamente utilizados como ferramentas auxiliares para o diagnóstico e análise filogenética dos microrganismos (MACPHERSON; MÜLLER, 2000). Diversos estudos apontam o seqüenciamento de fragmentos conservados de DNA dos genes codificadores da subunidade 16S do rRNA como uma técnica complementar na classificação taxonômica de microrganismos, especialmente daqueles onde as provas bioquímicas são inconclusivas (RAINEY et al., 1995; REYES et al., 2006).

Tendo em vista a importância clínica emergente do *R. equi* e demais espécies relacionadas, tanto na medicina veterinária como na medicina humana, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar fenotipicamente e por métodos moleculares os isolados bacterianos que apresentaram perfil fenotípico semelhante ao *R. equi*, provenientes de

amostras de pele e de leite de búfalas, definindo a susceptibilidade destes agentes aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de enfermidades causadas por *R. equi*.

## **Material e Métodos**

Os isolados utilizados neste estudo são provenientes do laboratório de bacteriologia da Universidade Pioneira de Integração Social (UPIS), Brasília, DF, onde foram identificados como *R. equi* pelos testes fenotípicos de rotina (CAMP, UREASE e redução de nitrato). Posteriormente foram enviados ao laboratório de bacteriologia da UFSM para caracterização molecular e avaliação de fatores de virulência deste agente. Diante da discordância entre os resultados obtidos, foram empregados testes fenotípicos complementares e moleculares para identificação dos microrganismos isolados.

### Isolados

No presente trabalho, foram analisados 24 isolados bacterianos oriundos de pele (14) e leite (10) de búfalas da raça Murrah as quais se encontravam em período seco ou em diferentes fases de lactação. Como controle das análises foi utilizada a cepa padrão ATCC 33701p+ de *R. equi*. Todas as bactérias utilizadas no experimento encontravam-se liofilizadas e estocadas a -20°C, sendo suspendidas em água destilada estéril antes da utilização.

### Caracterização fenotípica

Os isolados foram semeados em ágar sangue ovino 5% (Merck), incubados a 37°C por 48 horas. Após este período as colônias foram submetidas a testes fenotípicos descritos por

QUINN et al. (1994), MURRAY et al. (1995), BIZET et al. (1997), PIDOUX et al. (2001) e YUMOTO et al. (2002), os quais incluíram os testes de CAMP para a pesquisa do “fator equi”, catalase, oxidase, redução de nitrato, produção de urease, ONPG (ortho-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside) e utilização de carboidratos (glicose, lactose, manitol, maltose, ribose, esculina, salicina, inulina) em meio líquido em base de vermelho de fenol e GOF (glicose oxidativa-fermentativa) meio semi-sólido.

#### Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

O método de difusão em ágar (Kirby-Bauer modificado) foi utilizado para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos (BAUER, et al., 1966). As drogas antimicrobianas testadas foram: amicacina (30  $\mu$ g), amoxicilina (10 $\mu$ g), ampicilina (10  $\mu$ g), azitromicina (15 $\mu$ g), cefalexina (30 $\mu$ g), cefoperazona (75 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), gentamicina (10  $\mu$ g), norfloxacin (10 $\mu$ g), oxacilina (1 $\mu$ g), penicilina G (10UI), rifampicina (5 $\mu$ g) e tetraciclina (30 $\mu$ g). A seleção destes antimicrobianos baseou-se nos princípios ativos dos tratamentos comumente instituídos para animais acometidos por infecções pelo *R. equi*, segundo MURRAY et al. (1995) e BIZET et al. (1997).

#### Extração do DNA bacteriano

Os isolados foram cultivados em ágar BHI (Merck), incubados em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas. O DNA bacteriano foi extraído pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (ALLERS; LICHTEN, 2000), com algumas modificações sugeridas por GROFF (2005).

## PCR para caracterização do *R. equi*

A técnica de PCR multiplex para amplificação do fragmento do gene que codifica a região 16S rRNA específica do *R. equi* e de fragmento dos genes plasmídeos *vapA* e *vapB*, foram previamente descritas por COSTA et al. (2002) e OLDFIELD et al. (2004). Aliquotas dos produtos amplificados (7µl) foram submetidas à eletroforese a 100V por 30 minutos em um gel de agarose a 1 % e corado com brometo de etídeo.

## Seqüenciamento de fragmentos de DNA dos isolados

Um fragmento de aproximadamente 800pb correspondente a uma região do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico dos 24 isolados. Para amplificação foram empregados os *primers* universais 516F-5' - TGC CAG CAG CCG CGG TAA - 3' e 13R - 3' - AGG CCC GGG AAC GTA TTC AC - 5' (FREDRICKS; RELMAN, 1998). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µl, empregando 50 ng de DNA, 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 µM de cada nucleotídeo e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada por 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. à 48°C e 1 min. à 72°C, tendo uma extensão final de 7 min. à 72°C. Os fragmentos amplificados foram purificados com polietilenoglicol (PEG 8000) e submetido ao seqüenciamento automático em um equipamento MegaBace500 (Amershan Bioscience), A reação de terminação de cadeia foi implementada com o uso do kit DYEnamic ET (GE Helthcare). As seqüências obtidas foram analisadas quanto a qualidade dos nucleotídeos e similaridade, utilizando-se o programa STADEN (STADEN et al., 2000) e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank (BENSON et al., 2002), pelo programa BLASTn. Para um alto nível de qualidade das seqüências, admitiram-se índices de

confiança para cada nucleotídeo acima de 97% e níveis de identidade de seqüência acima de 93%, admitindo-se  $E = 1e-100$ .

### Fenotipificação e filogenia dos isolados

Para a fenotipificação os resultados da caracterização fenotípica foram submetidos à taxonomia numérica através do coeficiente de similaridade (MURRAY, et al., 1995).

As seqüências de DNA da região codificadora do 16S rRNA dos isolados, que apresentaram boa qualidade na avaliação das seqüências, foram submetidas à análise de filogenia, empregando-se como método de inferência filogenética Neighbor-joining implementado pelo programa MEGA 3.1 com teste de *bootstrap* de 1000 réplicas. Uma cepa padrão de *R. equi* (ATCC 33701p+) foi utilizada como grupo externo, juntamente com seqüências de *D. maris* (EF619415), *D. psychralcaliphila* (AY827943), *Nocardia* sp. (DQ925490), *Gordonia* sp. (DQ448777) e *Rhodococcus* sp. (EF612316) depositadas no GenBank.

### Resultados

Os 24 isolados oriundos de pele e leite de búfalas demonstraram em cultivo bacteriano em ágar sangue ovino 5% após 48h, crescimento de colônias mucóides com diferentes colorações (creme, laranja, salmão e rosa). A caracterização morfo-tintorial destas permitiu classificá-las como coco-bacilos pleomórficos, gram positivos. Todos os isolados apresentaram reação positiva para catalase e para o teste de CAMP, negativa para oxidase, utilização de GOF, inulina, manitol, lactose, salicina, ribose e esculina (Tab. 1).

Resultados variáveis foram observados em quatro (27%) dos 15 testes fenotípicos avaliados (urease, redução de nitrato, ONPG e glicose). Dentre os isolados, 23 (96%) apresentaram variação apenas em uma das provas bioquímicas (redução de nitrato) e somente uma demonstrou variação frente às análises de urease, ONPG, glicose e redução de nitrato (Tab. 1).

Os perfis fenotípicos possibilitaram a classificação dos isolados em três fenótipos, sendo um isolado (4%) pertencente ao fenótipo I, nove (38%) ao fenótipo II e 14 (58%) ao fenótipo III (Tab. 1). Com a análise de similaridade das características fenotípicas dos 24 isolados estudados com os padrões típicos de *R. equi* e actinomicetos relacionados, foi possível relacionar o isolado do fenótipo I com 93% de similaridade ao *Rhodococcus equi* e à *Dietzia maris*. O fenótipo II apresentou-se com similaridade de 100% à *D. maris* e 80% ao *R. equi*. Já o fenótipo III apresentou-se 93% e 80% similar à *D. maris* e *R. equi*, respectivamente. Também se observou que em 71% (5/7) dos isolados das diferentes coletas dos animais, os fenótipos foram equivalentes.

No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, vinte e três isolados (fenótipo II e III) foram sensíveis a amicacina, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefalexina, cefoperazona, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e tetraciclina. Resistência foi observada em 96% e 87% destes isolados frente à oxacilina e à rifampicina, respectivamente. Sensibilidade intermediária foi encontrada para a ciprofloxacina e a penicilina em 8,6% dos isolados. O isolado do fenótipo I (501/1P) apresentou perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos diferenciado das demais, sendo resistente à amicacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina, tendo resultado de sensibilidade intermediária apenas com cefalexina e sensível aos demais princípios testados.

Vinte e três isolados foram negativos para a amplificação do fragmento do gene que codifica a região 16S do rRNA de *R. equi* (fenótipo II e III), e o total dos isolados não

apresentaram os genes *vapA* e *vapB*. Dessa forma, a técnica de PCR identificou um (4%) isolado (fenótipo I) como *R. equi*.

O seqüenciamento de fragmentos da região conservada do gene 16S rRNA e a análise das seqüências determinou que os isolados não identificados pela PCR, pertenciam ao gênero *Dietzia*.

Uma vez que a qualidade de seqüências geradas pelo seqüenciamento automático apresenta heterogeneidade, primeiramente foram verificados o tamanho e a qualidade de seqüência necessários para um correto emprego como caráter diagnóstico. Para esta análise foi empregado o programa STADEN (STADEN et al., 2000). Determinou-se que o tamanho mínimo de seqüência a ser empregada corresponde a 250 pb com índice Phred acima de 20. Seqüências com qualidade inferiores a estas foram descartadas. Foi possível identificar 23 (96%) dos isolados estudados como *Dietzia maris*. Os fragmentos de DNA seqüenciados apresentaram valores de similaridade e identidade com as seqüências já existentes no GenBank que variaram de 93 a 99% com  $E = 1e^{-100}$ . Estes valores são suficientes para a identificação e o diagnóstico dos microrganismos estudados. O isolado que apresentou resultado positivo para *R. equi* pela técnica de PCR foi confirmado também pelo seqüenciamento do DNA.

A análise filogenética demonstrou a formação de um único ramo dos isolados de *Dietzia maris* que apresenta alta similaridade, evidenciada pelos curtos comprimentos dos ramos da árvore filogenética, entre os isolados dos fenótipos II e III agrupando-os juntamente com a cepa de *Dietzia maris* disponibilizada pelo GenBank. O isolado 501/1 P do fenótipo I foi agrupado com a cepa padrão de *Rhodococcus equi* (ATCC 33701p+) (Fig. 1).



## Discussão

Historicamente, a classificação das bactérias é baseada na similaridade das características fenotípicas como morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, patogenicidade, sorologia e ecologia. Os resultados morfofisiológicos dos 24 isolados avaliados neste estudo evidenciaram características muito similares, com perfis compatíveis a *R. equi* e a *D. maris* conforme descrições de CARTER; COLE, (1990), QUINN et al. (1994), MURRAY et al. (1995), BIZET et al. (1997) e YUMOTO et al. (2002). Segundo LASKER et al. (1992) e BIZET et al. (1997), o maior empecilho à classificação dos actinomicetos está associado à variabilidade e falta de características fenotípicas diferenciais, o que pode explicar a identificação inicial dos isolados como *R. equi* através da utilização de uma série bioquímica concisa (CAMP, Urease e Redução de Nitrato), comumente utilizada em laboratórios de diagnóstico. As reações positivas obtidas em todos os isolados no teste de CAMP, até então considerado como prova definitiva para a identificação do *R. equi* segundo PRESCOTT et al. (1982) e FINGER et al. (1996), corroboram com achados de LASKER et al. (1992) e indicam a fragilidade desta prova para a identificação de *R. equi* pois resultados positivos, até então não descritos, também foram encontrados nos isolados caracterizadas como *Dietzia maris*.

No presente trabalho, os distintos fenótipos obtidos evidenciaram a variabilidade fenotípica dos isolados dentro das espécies. A utilização da ribose apenas na cepa controle de *R. equi* (ATCC 33701p+), discorda da observação de BIZET et al. (1997), que relatam a utilização deste açúcar pelo *R. equi*, mas não pela *Dietzia maris*. A utilização da glicose também não se mostrou um teste discriminatório apesar de todos os isolados apresentarem resultados negativos, pois segundo BIZET et al. (1997) esta é uma característica variável. O teste da utilização do ONPG foi a única prova que demonstrou capacidade discriminatória entre *R. equi* e a *Dietzia maris* corroborando as sugestões de HOLT (1994) e BIZET et al.

(1997) para a necessidade de inclusão deste teste no diagnóstico laboratorial. Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram dois isolados de *R. equi* provenientes de javalis que não utilizaram o ONPG (dados não publicados). Esta observação ratifica a proposta de YOUNG (2001) de que a utilização de apenas uma prova na diferenciação entre dois gêneros bacterianos não é satisfatória para a identificação final. Conforme LASKER et al. (1992), são necessários de 107 a 129 testes bioquímicos para a identificação bioquímica eficiente do *R. equi*. Todavia, MARASCHIN (2007) expõe que apesar da utilização de vastas séries bioquímicas a identificação fenotípica de alguns gêneros permanecerá complexa e microrganismos só poderão ser identificados com o auxílio de técnicas genômicas e quimiotaxonômicas.

Com o emprego de testes fenotípicos adicionais, foi possível visualizar variações nos resultados fenotípicos das bactérias estudadas, as quais puderam ser comprovadas, pelos distintos perfis bioquímicos obtidos e apresentados na Tabela 1.

A resistência à oxacilina e rifampicina, observada nos isolados de *D. maris* discordam com resultados obtidos por BIZET et al. (1997) que relataram a sensibilidade de cepas de *D. maris* frente à rifampicina e oxacilina. Estes mesmos autores afirmam a possibilidade da utilização dos resultados de susceptibilidade aos antimicrobianos como ferramenta auxiliar na identificação bioquímica de bactérias corineformes. Observou-se também divergência no perfil de susceptibilidade observado do isolado identificado como *R. equi*, com resultados descritos por MURRAY et al. (1995) que alega a sensibilidade de cepas de *R. equi* frente à amicacina, oxacilina, rifampicina e tetraciclina.

Os resultados negativos para a amplificação do fragmento dos genes *vapA* e *vapB* evidenciaram a ausência de fatores de virulência no isolado de *R. equi* que normalmente estão associados a plasmídeos de virulência que conferem aos isolados diferentes níveis de patogenicidade. Este achado sugere sua origem ambiental, entretanto isolados avirulentos têm

sido associados a enfermidades no homem e nos animais (TAKAI et al., 1995; WEINSTOCK; BROW, 2002). Uma vez que os búfalos vivem em ambientes onde há uma grande disseminação de microrganismos telúricos admite-se a possibilidade da colonização da glândula mamária desses animais por bactérias dos gêneros *Dietzia* e *Rhodococcus*. Embora neste trabalho não tenha sido evidenciada a ocorrência de mastite nos animais avaliados, alerta-se para a necessidade de mais estudos para avaliação do potencial patogênico destes microrganismos. Conforme PIDOUX et al. (2001) e REYES et al. (2006) a *Dietzia maris* assim como o *R. equi* já foram encontrados em infecções de pacientes com o sistema imune debilitado (PIDOUX et al., 2001; WEINSTOCK; BROW, 2002).

A análise das seqüências da região conservada do gene que codifica o 16S rRNA permitiu classificar os isolados não identificados pela PCR como pertencentes ao gênero *Dietzia*. A técnica de análise de seqüências codificantes do 16S rRNA vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico de bactérias, cuja identificação bioquímica não é precisa (PIDOUX et al., 2001; REYES et al., 2006). Contudo esta técnica pode trazer erros, principalmente tendo em vista a troca de material genético entre microrganismos, bem como a reduzida qualidade nas seqüências obtidas (YOUNG, 2001). Para reduzir estes problemas as seqüências obtidas no presente estudo foram submetidas à análise de qualidade utilizando o pacote STADEN, conforme descrições de STADEN et al. (2000).

No presente estudo a filogenia mostrou-se útil na diferenciação entre gêneros bacterianos relacionados, evidenciada pela localização mais externa do grupo dos *Rhodococcus* sp. em relação aos demais isolados analisados.

A alta similaridade entre os isolados de *Dietzia maris* dos fenótipos II e III (dentro da mesma espécie) pode ser atribuída à origem comum dos isolados bem como as considerações de VIANEZ (2005) de que o 16S rRNA não é polimórfico o suficiente para diferenciação e inferências filogenéticas confiáveis em espécies muito relacionadas. As vantagens e

desvantagens destes métodos estão sujeitas a debates científicos, devido ao fato de que o risco de gerar resultados incorretos é maior na filogenia molecular computacional do que em muitos outros campos da ciência. Por vezes, o fator limitante neste tipo de análise não é o poder computacional, mas sim o entendimento que o pesquisador tem do que método computacional utilizado está fazendo com os seus dados.

A utilização de métodos fenotípicos e moleculares para identificação de bactérias é amplamente descrita na literatura (SOEDERMANTO et al., 1998; COSTA et al., 2004; NATARAJAN et al., 2005; SÁ E SILVA 2005). Bactérias corineformes pertencem ao grupo de microrganismos cujos métodos de diagnóstico convencionais, baseados exclusivamente nas características fenotípicas, são inconclusivos (BIZET et al., 1997). Desta forma tornam-se necessárias outras metodologias complementares, como a PCR e o seqüenciamento de DNA (BELL 1996; BIZET et al., 1997; PIDOUX et al., 2001). Estas metodologias, entretanto apresentam desvantagens relacionadas ao seu custo e critérios de interpretação. Em nosso estudo a análise de regiões conservadas do gene 16S rRNA permitiu a definitiva classificação dos organismos, auxiliando desta forma a identificação fenotípica. Apesar da utilização de testes fenotípicos complementares foram observadas variações nos resultados obtidos e insatisfatório discernimento. Desta forma alerta-se para o risco da incorreta identificação dos isolados, quando da utilização de testes diagnósticos fenotípicos diferenciais entre *R. equi* e *Dietzia* sp. Nossos achados corroboram as descrições de YOUNG (2001), o qual afirma que os métodos de taxonomia bacteriana devem passar por reformulações, substituindo a corrente monofásica (baseada em uma ou poucas características) e adotando a visão polifásica, onde vários critérios fenotípicos, genéticos e evolutivos devem ser combinados para a correta identificação dos microrganismos.

## Conclusão

Diante dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que: a *Dietzia maris* e o *Rhodococcus equi* estão presentes na microbiota da pele e no leite de búfalas, e possuem características morfo-fisiológicas muito semelhantes, sendo os testes fenotípicos rotineiramente utilizados insuficientes para a identificação e a diferenciação dos isolados. Testes de caracterização molecular como a PCR e o seqüenciamento de DNA são importantes ferramentas para complementar a classificação taxonômica e a filogenia microbiana, e devem ser utilizados quando os testes fenotípicos para a caracterização bacteriana são escassos.

## Referências

- ABLAS, D. et al. Comportamento de bubalinos a pasto frente a disponibilidade de sombra e água para imersão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOMETEOROLOGIA, 4., 2006, Ribeirão Preto. **Anais...**, Ribeirão Preto: 2006.
- ALLERS, T.; LICHTEN, M. A method for preparig genomic DNA that restrains brnch migration of Holliday junctions. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.2, 2000.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical**. v.45, p. 493 – 496, 1966.
- BELL, K.S., CHRISTOFI, N., AW, D.W.J. Indentification of *R. equi* using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.72-74, 1996.
- BENSON, D.A. et al. Genbank. **Nucleic Acid Research**, v. 30, p. 17-20, 2002.
- BIZET, C. et al. A. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests (“biotype-100” strips). **Research in Microbiology**, v.148, p. 799-809, 1997.
- 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.
- CARTER, G.R.; COLE, J. R.Jr. Actinomyces, Nocardia, Streptomyces, Dermatophilus, and Rhodococcus – PRESCOTT J.F. cap 22 p. 271-286, 1990. in **\_Diagnostic Procedures in Veterinary and Mycology**, 5ª edição, 1990.
- COSTA, M.M. et al. Utilização da técnica de PCR multiplex para caracterização molecular de isolados de *Rhodococcus equi* de haras da região de Bagé, RS, Brasil. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 23, 2002, Pirenópolis. **Anais...**, Pirenópolis: 112 p, p. 61, 2002.
- COSTA, M. M. et al. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated whith 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumonie* and related species. **Current Microbiology**, v. 48, p. 189-195, 2004.

FINGER, G.P. **Caracterização de amostras de *Rhodococcus equi* de eqüinos no Rio Grande do Sul.** 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

FREDRICKS, D.N. & RELMAN D. A. Sequencing of DNA bacteria by universal 16S rDNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n. 10, p. 2810-2816, 1998.

GROFF, A.C.M. **PCR para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.** 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

KEDLAYA, I., ING, M.B., WONG, S.S. *R. equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 39-47, 2001.

LASKER, B.A., BROWN, J.M., McNEIL, M.M. Identification and epidemiological typing of clinical and environmental isolates of the genus *R. equi* with use of a digoxigenin-labeled rDNA gene probe. **Clinical Infectious Diseases**. v 15, p. 223-233, 1992.

MACPHERSON, M.J.; MÜLLER, S.G. PCR The basics. 1 ed. New York: Ed. **Sringer-Verlag** New York Inc, 276 p. 2000.

MARASCHIN. M,M. **Identificação de bacilos gram positivos aeróbicos isolados de espécimes clínicos em um hospital escola.** 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MURRAY, P.R.et al. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. **ASM PRESS**. Washington D.C. cap 30 , p. 379-399, 1995.

NATARAJAN, S. et al. *Dietzia* strain X: a newly described *Actinomycete* isolated from confluent and reticulated papillomatosis. **British Journal Dermatology**, v.153, n.4, p.825-827, 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.

PIDOUX, O. et al. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2634-2636, 2001.

PRESCOTT, J.F. R. equi: An animal and Human pathogen. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 4, p. 20-34, 1991.

PRESCOTT, J.F., LASTRA, M., BARKSDALE, L. *Equi* factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 988-990, 1982.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed., 648p, 1994,

RAHMAN, H.; BAXI, K.K. *Corynebacterium equi* in mastitis in a buffalo. **The Veterinary Record**. v. 13, n.113(7), p. 167-168, 1983.

RAMOS, A.A. **Contribuição ao Estudo de Bubalinos – Palestras**. Botucatu, 305 p. 2003.

RAINEY, F.A. et al. *Dietzia*, a new Genus including *Dietzia maris* comb. Nov., Formerly *Rhodococcus maris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n. 1, p. 32-36, 1995.

REYES , G. et al. Type A aortic dissection associated with *Dietzia maris*. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v. 5, n. 5, p. 666-668, 2006.

SÁ E SILVA. **Comparação entre testes bioquímicos e análise da sequência parcial do gene hsp60 para a identificação de isolados de *Streptococcus equi***. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

SOEDERMANTO, I. et al. Pheno-and genotyping of *R. equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. **Research in Veterinary Science**, v.64, p.181-185, 1998.

STADEN, R., BEAL, K.F., BONFIELD, J.K. The Staden Package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115 – 130, 2000.

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

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, 1995.



VIANEZ, J.L.S.G. **Avaliação criteriosa das seqüências dos genes *rrn*, *rpob* e *gyrb* como ferramentas em taxonomia microbiana.** 73f. Dissertação (Bacharel em Microbiologia e Imunologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

WEINSTOCK, D.M.; BROWN, A.E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 34 (10), p. 1379 – 1385, 2002.

YOUNG, J.M. Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 945-953, 2001.

YUMOTO, I. et al. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.85-95, 2002.

Tabela 1 – Características bioquímicas e moleculares dos fenótipos caracterizados nos isolados bacterianos de búfalas

Isolados	Características bioquímicas									Fenótipos	Características moleculares		
	<sup>1</sup> CAMP/Catalase	Oxidase	<sup>2</sup> (L, M, I, S, E, GOF)	Urease	<sup>3</sup> KNO <sub>3</sub>	<sup>4</sup> ONPG	Glicose	Maltose	Ribose		<sup>5</sup> 16S rRNA <i>R. equi</i>	<sup>6</sup> <i>vapA</i> e <i>vapB</i>	Sequenciamento
T <sup>7</sup>	+ <sup>8</sup>	- <sup>9</sup>	-	+	+	+	+	-	+		+	+	<i>R. equi</i>
009/3 L <sup>10</sup>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
009/4 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
056/19 P <sup>11</sup>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
056/10 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
061/53 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
068/82 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
068/84 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
096/37 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/9 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/11 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/21 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/31 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
336/81 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
501/1 P	+	-	-	+	+	+	+	-	-	I	+	-	<i>R. equi</i>
501/7 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
501/24 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
501/28 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
501/44 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1035/13 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1057/26 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1057/32 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1058/83 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1101/16 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
1101/25 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>

<sup>1</sup> CAMP – Christie, Atkins, Munch, Petersen Test; <sup>2</sup> Açúcares: L= Lactose; M= Manitol; I=Inulina; S= Salicina; E=Esculina; GOF= glicose oxidativa-fermentativa; <sup>3</sup> KNO<sub>3</sub> – Teste de Redução do Nitrato; <sup>4</sup> ONPG - ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; <sup>5</sup> PCR do fragmento do gene que codifica para a região 16S do rRNA de *R. equi*; <sup>6</sup> PCR de fragmentos dos genes plasmidiais *vapA* e *vapB*; <sup>7</sup> T+: amostra referência de *Rhodococcus equi* (ATCC 33701p+); <sup>8</sup> + reação positiva; <sup>9</sup> - reação negativa; <sup>10</sup> L: leite; <sup>11</sup> P: Pele.

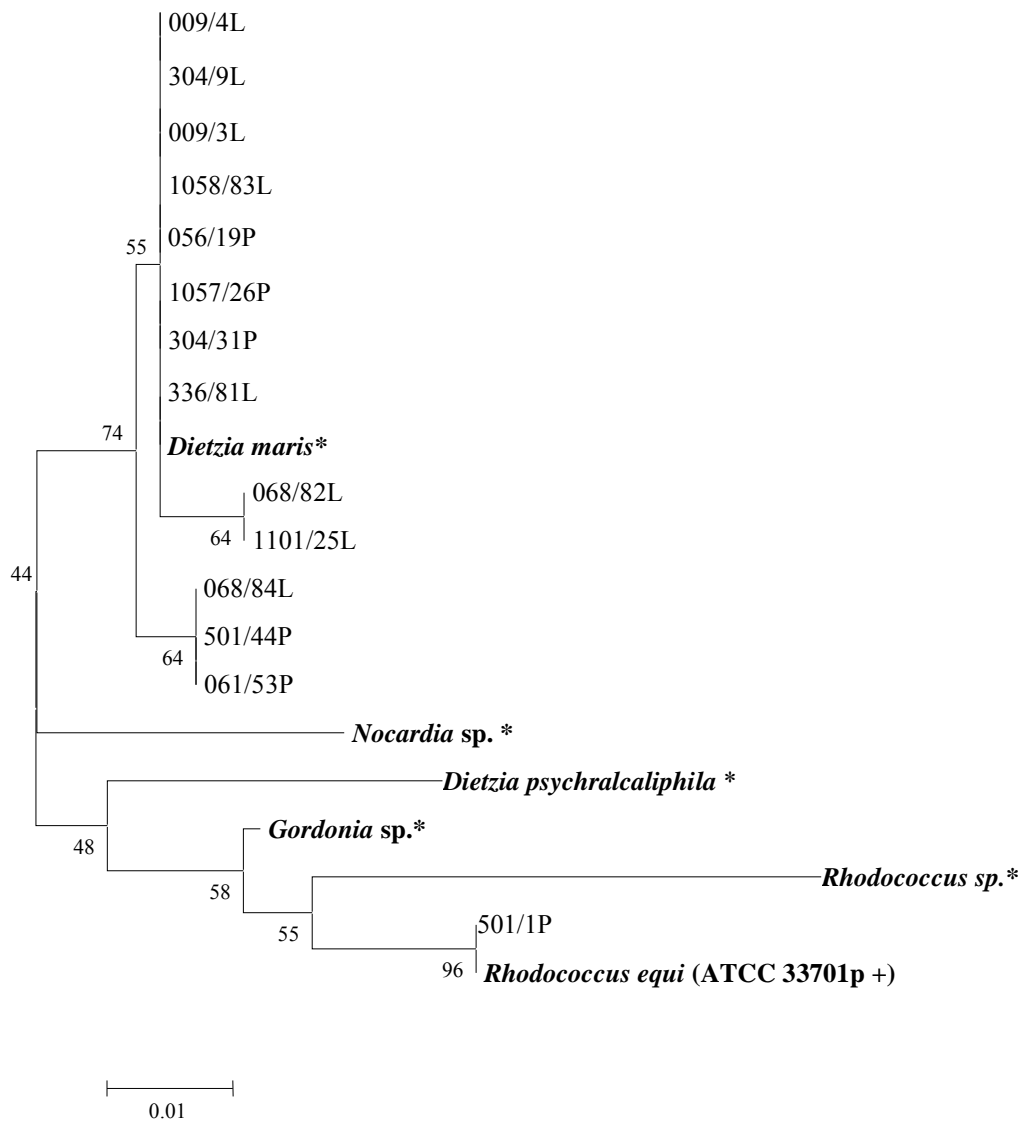


Figura 1 - Relações filogenéticas entre isolados bacterianos de búfalos e microrganismos relacionados, baseadas na região 16S rRNA. Método: Neighbor-Joining. Teste de 1000 *bootstraps* (valores percentuais)

\*seqüências obtidas no GenBank

## 4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que:

A diferenciação de microrganismos relacionados ao *Rhodococcus equi* pertencentes à classe dos actinomicetos com base apenas em testes fenotípicos é dificultada pela ausência de testes diferenciais entre os mesmos.

A variabilidade fenotípica observada nos isolados bacterianos, oriundos de leite e pele de búfalas, permite a identificação de três fenótipos diferentes.

As ferramentas moleculares utilizadas neste trabalho permitiram a identificação do isolado do fenótipo I como *Rhodococcus equi* e do fenótipo II e III como *Dietzia maris*.

*Dietzia maris* e *Rhodococcus equi* estão presentes na microbiota da pele de búfalas.

O isolado de *Rhodococcus equi* identificado, não apresentou os genes de virulência *vapA* e *vapB*.

O isolado de *Rhodococcus equi* avaliado apresentou maior resistência aos antimicrobianos do que de *Dietzia maris*.

A *Dietzia maris* apresenta teste de CAMP positivo, não sendo esta característica útil na distinção com o *Rhodococcus equi*.

## 5. REFERÊNCIAS

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

BELL, K.S.; CHRISTOFI, N.; AW, D.W. Identification of *R. equi* using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.72-74, 1996.

BEMER-MELCHIOR, P. et al. Bacteremia due to *Dietzia maris* in an immunocompromised patient. **Clinical Infection Disease**, v.29, n.5, p.1338-1340, 1999.

BIZET, C. et al. A. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("biotype-100" strips). **Research in Microbiology**, v.148, p.799-809, 1997.

BORZENKOV, I.A. et al. [The properties of hydrocarbon-oxidizing bacteria isolated from the oilfields of Tartazan, Western Siberia, and Vietnam]. **Mikrobiologiya**, v.75, n.1, p.82-89, 2006.

BRITO, E. M. et al. Characterization of hydrocarbonoclastic bacterial communities from mangrove sediments in Guanabara Bay, Brazil. **Research in Microbiology**. v.157, n.8, p.752-762, 2006.

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.

CHRISTIE, R.; ATKINS, N.E.; MUCH-PETERSEN, E. A note on a lytic phenomenon shown by group streptococci. **The Australian Journal of Experimental Biology**, v.22, p.197-200, 1944.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 15 jun. 2007.

GOODFELLOW, M. Genus *Rhodococcus*. In: P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J.G. Holt. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 9º Ed. Williams & Wilkins Co., 1994.

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

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

HOLT, J.G. Nocardioforms actinomycetes. In: **Bergey's Manual of determinative Bacteriology**. 9<sup>o</sup> Ed. Williams & Wilkins, 1994.

HONDALUS, M.K. Pathogenesis and virulence of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.56, n.3-4, p.257-268, 1997.

HSUEH, P.R. et al. Report of a invasive *R. equi* infections in Taiwan, with an emphasis on the emergence of multi-drug resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v.27, p.370-375, 1998.

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

KLEINSTEUBER, S. et al. Population dynamics within a microbial consortium during growth on diesel fuel in saline environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.5, p. 3531-3542, 2006.

LASKER, B.A., BROWN, J.M., McNEIL, M.M. Identification and epidemiological typing of clinical and environmental isolates of the genus *R. equi* with use of a digoxigenin-labeled rDNA gene probe. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p. 223-233. 1992.

MACPHERSON, M.J.& MÜLLER, S.G. PCR The basics. 1 ed. New York: Ed. **Sringer-Verlag** New York Inc, 276 pp. 2000.

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, 2005.

MAVILRAJ, S. et al. *Dietzia kunjamensis* sp. nov., isolated from the Indian Himalayas. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.1667-1671, 2006.

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

MISONO, H. et al. Purification and Characterization of a Dimeric Phenylalanine Dehydrogenase from *Rhodococcus maris* K-18. **Journal of bacteriology**, v.171, n.1, p.30-36, 1989.

MURRAY, P.R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 6 ed. ASM PRESS. Washington D.C. cap 30, p.379-399, 1995

NATARAJAN, S. et al. *Dietzia* strain X: a newly described *Actinomycete* isolated from confluent and reticulated papillomatosis. **The British Journal of Dermatology**, v.153, n.4, p.825-827, 2005.

NESTERENKO, O.A. et al. *Rhodococcus luteus* nom. nov. and *Rhodococcus maris* nom. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.1-4, 1982.

OLIVEIRA, R.P.S. **Condições Microbiológicas e Avaliação da Pasteurização em Amostras de Leite Comercializados no Município de Piracicaba-SP**. São Paulo: USP, 2005, 81f. Dissertação (Mestre em Ciências), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2005.

PATE, M. et al. Haemolytic *Rhodococcus equi* Isolated from a Swine Lymph Node with Granulomatous Lesions. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v.51, p.249-250, 2004.

PERDRIZET, J.A; SCOTT, D.W. Cellulitis and subcutaneous abscesses caused by *Rhodococcus equi* infection in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.190, n.12, p.1559-1561, 1987.

PIDOUX, O. et al. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. **Journal of clinical Microbiology**, v.39, n.7, p.2634-2636, 2001.

PRESCOTT, J. F.& HOFFMAN, A. M. *Rhodococcus equi*. In: TRAUB-DARGATZ, J.L. **The Veterinary Clinics of North America**, v.9, n.2, p. 375-384, 1993.

PRESCOTT, J.F. *R. equi*: An animal and Human pathogen. **Clinical of Microbiology Reviews**, v.4, p.20-34, 1991.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*. In: **Pathogenesis of bacterial infections of animals**. PRESCOTT, C.L., THOEN, C.O., PRESCOTT, J.F., SONGER, J.G. 3rd Edition. Blackwell Publishing, Ames, IA. 2004

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed.,648p, 1994.

RAHMAN, H., BAXI, K.K. *Corynebacterium equi* in mastitis in a buffalo. **The Veterinary Record**, v. 13, n.113(7), p. 167 – 168, 1983.

RAMOS, A.A. **Contribuição ao Estudo de Bubalinos – Palestras**. Botucatu, 305p, 2003.

RAINEY, F.A. et al. *Dietzia*, a new Genus including *Dietzia maris* comb. Nov., Formerly *Rhodococcus maris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n. 1, p. 32-36, 1995.

REYES, G. et al. Type A aortic dissection associated with *Dietzia maris*. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v.5, n. 5, p.666-668, 2006.

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

SELLON, D.C. et al. Comparasion of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.4, p.1289-1293, 2001.

SETTE, L.D. et al. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs form a southern offshore Brazilian basin. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.91, n.3, p.253-266, oct 2006.

SILVA, M. S. T. et al. **Programa de incentivo a criação de búfalos por pequenos produtores –PRONAF**. Belém, 2003. Disponível em: < <http://www.cpatu.embrapa>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

SOEDERMANTO, I. et al. Indentification and epidemiological relationship of *R. equi* isolated from cases of Lymphadenitis in cattle. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v.286, p.457-467, 1997.



SOEDERMANTO, I. et al. Pheno-and genotyping of *R. equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. **Research in Veterinary Science**, v.64, p.181-185, 1998.

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

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, 1995.

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

TAKAI, S. et al. Restriction fragment length polymorphism of virulence plasmids in *R. equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3417-3420, 1999.

TAO, L.; YAO, H.; CHENG, Q. Genes from *Dietzia sp.* for synthesis of C(40) and C(50) beta-cyclic carotenoids. **Gene**, v.386, p.90-97, 2007.

TEIXEIRA, L.V.; BASTIANETTO, E.; OLIVEIRA, D.A.A. Leite de Búfala na Indústria de Produtos Lácteos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p.96-100, 2005.

TOTH, E. M. et al. Bacteria isolated from the different developmental stages and larval organs of the obligate parasitic fly, *Wohlfahrtia magnifica* (Diptera: Sarcophagidae). **Microbial Ecology**, v.51, n.1, p.13-21, 2006.

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**. 2º Ed. Varela, 2001.

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

WEID, I. et al. Identification and biodegradation potential of a novel strain of *Dietzia cinnamea* isolated from a petroleum-contaminated tropical soil. **Sistematic and Applied Microbiology**, v. 30, n.4, p.331-339, 2007.

WOOLCOCK, J.B.; FARMER, A.M.T.; MUTIMER, M.D. Selective medium for *Corynebacterium equi* isolation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.9, n.6, p.640-642, 1979.

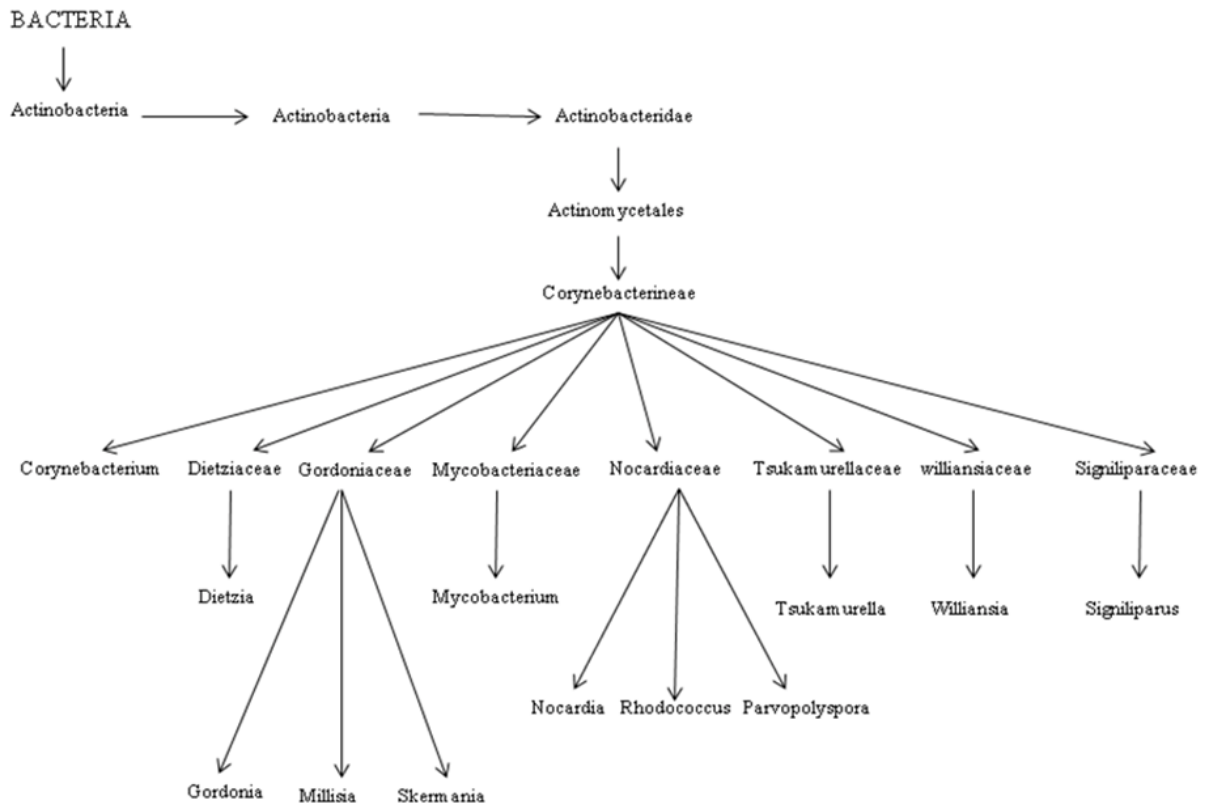
YASSIN, A.F.; HUPFER, H.; SCHAAL, K.P. *Dietzia cinnamea* sp. nov., a novel species isolated from a perianal swab of a patient with a bone marrow transplant. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.56, p.641-645, 2006.

YUMOTO, I. et al. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.52, p.85-95, 2002.

ZOPF, W. Uber Ausscheidung Von Fettfarbstoffen (Lipochromen) Seitens Gewisser Spaltpilze. **Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v.9, p.22-28, 1891.

## **6. ANEXOS**

## ANEXO A – Taxonomia simplificada dos actinomicetos corineformes



Fonte: Adaptada do Web Site:

[www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=85007&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=85007&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock)

**ANEXO B –Características bioquímicas e similaridade dos fenótipos identificados com *Rhodococcus equi* e *Dietzia maris***

Fenótipo	<sup>1</sup> CAMP/Catalase	Oxidase	Urease	<sup>2</sup> KNO <sub>3</sub>	<sup>3</sup> ONPG	Glicose	Maltose	Ribose	<sup>4</sup> (L, M, I, S, E, GOF)	Nº de isolados	<i>R. equi</i>		<i>D. maris</i>	
											Nº	%	Nº	%
I	+	-	+	+	+	+	-	-	-	1	14/15	93	13/14	93
II	+	-	-	+	-	-	-	-	-	9	12/15	80	14/14	100
III	+	-	-	-	-	-	-	-	-	14	12/15	80	13/14	93

<sup>1</sup> CAMP – Christie, Atkins, Munch, Petersen Test; <sup>2</sup> KNO<sub>3</sub> – Teste de Redução do Nitrato; <sup>3</sup> ONPG - ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; <sup>4</sup> Açúcares: L= Lactose; M= Manitol; I=Inulina; S= Salicina; E=Esculina; GOF= glicose oxidativa-fermentativa

**ANEXO C – Artigo**

**IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* E  
*Dietzia maris* EM BUBALINOS**

Versão final submetida ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

## IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE *Rhodococcus equi* E *Dietzia maris* EM BUBALINOS

Luciane Ribeiro Viana<sup>1</sup>; Cristina Crewer<sup>3</sup>; Guilherme Drescher<sup>3</sup>; Andréia Lazzari<sup>4</sup>; Sônia Ávila Botton<sup>2</sup>; Mateus Matiuzi da Costa<sup>5</sup>; Élgion Lúcio da Silva Loreto<sup>2</sup>, Agueda Castagna de Vargas<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Av. Roraima, 1000, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: lrvtche@hotmail.com

### Resumo

Neste trabalho foram analisados 24 isolados bacterianos oriundos de leite e pele de búfalas (*Bubalus bubalis*), os quais foram previamente identificados como *Rhodococcus equi* com o auxílio de fenotipia concisa. Testes fenotípicos complementares e ferramentas moleculares foram utilizadas com o objetivo de caracterizar estes isolados, bem como diferenciá-los de outros microrganismos intimamente relacionados. Com base nos resultados fenotípicos, observaram-se três fenótipos distintos, porém a identificação dos isolados foi inconclusiva. Apenas um dos isolados foi comprovado como sendo *R. equi* com a realização da PCR específico, seqüenciamento e a análise dos fragmentos de DNA. Os demais isolados só foram corretamente identificados pelo seqüenciamento do DNA, indicando tratar-se de *Dietzia maris*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos revelou maior resistência dos isolados de *D. maris* para oxacilina (96%) e a rifampicina (87%). O isolado de *R. equi*, apresentou resistência à amicacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina. Alerta-se para o risco da incorreta identificação dos isolados baseados em testes fenotípicos e para a necessidade de utilização de testes complementares para diferenciação entre *R. equi* e *D. maris*.

Palavras chave: *Rhodococcus equi*, *Dietzia maris*, *Bubalus bubalis*, fenotipia, seqüenciamento de DNA.

---

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, RS

<sup>3</sup> Universidade do Oeste de Santa Catarina, UNOESC, SC.

<sup>4</sup> Universidade Pioneira de Integração Social, UPIS, DF.

<sup>5</sup> Fundação Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, PA.

## PHENOTYPICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Rhodococcus equi* AND *Dietzia maris* IN BUFFALOES

### Abstract

The present work analyzed 24 bacterial isolates from milk and skin of buffalos females (*Bubalus bubalis*), which previously had been identified as *Rhodococcus equi*, by using a restricted number of phenotypical tests for bacterial characterization. The goal of this study was to perform the characterization of these isolates, as well as the differentiation of other microorganisms closely related by using additional phenotypical tests and molecular tools. Based on the phenotypical results three different biotypes were obtained, however the identification of the isolates was inconclusive. Only one of the isolates was confirmed as *R. equi* through the PCR specifically for this specie, as well DNA sequencing and DNA fragment analysis. All the other isolates only could be precisely identified after the DNA sequencing, where they were characterized as *Dietzia maris*. The sensitivity profile to antimicrobials demonstrated the biggest resistance of the *D. maris* isolates to oxacillin and rifampin, 96% and 87% respectively. The *R. equi* isolate, presented resistance to amikacin, oxacillin, penicillin, rifampin and tetracycline. Alert for the risk of the incorrect identification of the bacterial isolates by using diagnostic analysis based on phenotypical tests in order to differentiate *R. equi* and *D. maris*, besides the necessity to use of complementary tests for differentiation of these microorganisms.

Key words: *Rhodococcus* sp., *Dietzia* sp., *Bubalus bubalis*, phenotypic test, DNA sequencing.

### Introdução

O *Rhodococcus equi* é um microrganismo telúrico que se destaca como um patógeno oportunista, responsável por pneumonias e abscessos pulmonares tanto em animais como em humanos. É amplamente distribuído e está geralmente, associado a pneumonias piogranulomatosas em eqüinos. Também pode estar associado a infecções em outras espécies como: bovinos, cervídeos, caprinos, ovinos, suínos, bubalinos, caninos, felinos e no homem. (PRESCOTT, 1991; TAKAI et al., 1993; BELL et al., 1996). Este microrganismo possui requerimentos nutricionais simples, e pode ser isolado de uma grande variedade de fontes (BELL et al., 1996). Na última década, o *R. equi* foi descrito em humanos como um importante agente infeccioso em pacientes imunocomprometidos (BYRNE et al., 2001),



podendo ser também, agente de infecção em indivíduos imunocompetentes (KEDLAYA et al., 2001).

Alguns actinomicetos corineformes como o *R. equi*, *Dietzia* sp., *Gordonia* sp. e *Nocardia* sp. apresentam características morfo-fisiológicas muito similares, o que pode dificultar a diferenciação entre os gêneros microbianos (BIZET et al., 1997). Muitos laboratórios de microbiologia utilizam essencialmente os testes fenotípicos para a identificação do *R. equi*, sendo que o mais comumente empregado é o teste CAMP (Christie, Atkins, Munch, Petersen Test), o qual é considerado diferencial para a caracterização deste agente (PRESCOTT et al., 1982; CARTER; COLE 1990).

Métodos como a PCR e o seqüenciamento de DNA são amplamente utilizados como ferramentas auxiliares para o diagnóstico e filogenia dos microrganismos com perfis fenotípicos similares (MACPHERSON; MÜLLER, 2000).

Tendo em vista a importância clínica emergente do *R. equi* e demais espécies relacionadas, tanto na medicina veterinária como na medicina humana, o presente trabalho teve por objetivo caracterizar fenotipicamente e por métodos moleculares os isolados bacterianos que apresentaram perfil fenotípico semelhante ao *R. equi*, provenientes de amostras de pele e de leite de búfalas, definindo a susceptibilidade destes agentes aos antimicrobianos comumente utilizados no tratamento de enfermidades causadas por *R. equi*.

## **Material e Métodos**

### **Isolados**

No presente utilizou-se 24 isolados bacterianos da Universidade Pioneira de Integração Social (UPIS), Brasília, DF, oriundos de pele (14) e leite (10) de búfalas da raça Murrah as quais se encontravam em diferentes fases de lactação. Estes isolados foram identificados como *R. equi* pelos testes fenotípicos de rotina (CAMP, produção de urease e redução de nitrato). Posteriormente estes isolados foram enviados ao laboratório de bacteriologia da UFSM, Santa Maria, RS, para caracterização molecular e avaliação de fatores de virulência deste agente. Diante da discordância entre os resultados obtidos, foram empregados testes fenotípicos complementares e moleculares para identificação dos microrganismos isolados.

Como controle das análises foi utilizado a cepa padrão ATCC 33701p+ de *R. equi*. Todas as bactérias utilizadas no experimento encontravam-se liofilizadas e estocadas a -20°C, sendo suspensas em água destilada estéril antes da utilização.

### Caracterização fenotípica

Os isolados foram semeados em ágar sangue ovino 5% (Merck), incubados a 37°C por 48 horas. Após este período as colônias foram submetidas a testes fenotípicos descritos por QUINN et al. (1994), MURRAY et al. (1995), BIZET et al. (1997), PIDOUX et al. (2001) e YUMOTO et al. (2002), os quais incluíram os testes de CAMP para a pesquisa do “fator equi”, pesquisa de catalase e oxidase, redução de nitrato, produção de urease, utilização do ONPG (ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside) e utilização de carboidratos (glicose, lactose, manitol, maltose, ribose, esculina, salicina, inulina) em meio líquido em base com vermelho de fenol e GOF (glicose oxidativa-fermentativa) em meio semi-sólido.

### Fenotipificação

Para a avaliação de diferentes fénótipos os resultados da caracterização bioquímica foram submetidos à taxonomia numérica através do coeficiente de similaridade (MURRAY, et al., 1995).

### Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

O método de difusão em ágar (Kirby-Bauer modificado) foi utilizado para avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos (BAUER, et al., 1966) e como ferramenta auxiliar na identificação (BIZET et al., 1997). As drogas antimicrobianas testadas foram: amicacina (30 µg), amoxicilina (10µg), ampicilina (10 µg), azitromicina (15µg), cefalexina (30µg), cefoperazona (75µg), ciprofloxacina (5µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10 µg), norfloxacina (10µg), oxacilina (1µg), penicilina G (10UI), rifampicina (5µg) e tetraciclina (30µg). A seleção destes antimicrobianos baseou-se nos princípios ativos dos tratamentos comumente instituídos para animais acometidos por infecções pelo *R. equi*, segundo MURRAY et al. (1995) e BIZET et al. (1997).

### Extração do DNA bacteriano

Os isolados foram cultivados em ágar BHI (Merck), incubados em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas. O DNA bacteriano foi extraído pelo método do CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) (ALLERS; LICHTEN, 2000), com algumas modificações sugeridas por GROFF (2005).

### PCR para caracterização do *R. equi*

A técnica de PCR multiplex para amplificação do fragmento do gene que codifica a região 16S rRNA específica do *R. equi* e de fragmento dos genes plasmídeos *vapA* e *vapB*, foram previamente descritas por COSTA et al. (2002) e OLDFIELD et al. (2004). Aliquotas dos produtos amplificados (7µl) foram submetidas à eletroforese a 100V por 30 minutos em um gel de agarose 1 % e corado com brometo de etídeo.

### Seqüenciamento de fragmentos de DNA dos isolados

Um fragmento de aproximadamente 800pb correspondente a uma região do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA foi amplificado por PCR a partir do DNA genômico dos 24 isolados. Para amplificação foram empregados *primers* universais (FREDRICKS; RELMAN, 1998). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 25 µl, empregando 50 ng de DNA, 20 pmol de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 µM de cada nucleotídeo e 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação foi realizada por 40 ciclos de 30 seg. a 94°C, 30 seg. à 48°C e 1 min. à 72°C, tendo uma extensão final de 7 min. à 72°C. Os fragmentos amplificados foram purificados com polietilenoglicol (PEG 8000) e submetidos ao seqüenciamento automático em um equipamento MegaBace500 (Amershan Bioscience). A reação de terminação de cadeia foi implementada com o uso do kit DYEnamic ET (GE Healthcare). As seqüências obtidas foram analisadas quanto a qualidade dos nucleotídeos e similaridade, utilizando-se o programa STADEN (STADEN et al., 2000) e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank (BENSON et al., 2002), pelo programa BLASTn. Para um alto nível de qualidade das seqüências, admitiram-se índices de confiança para cada nucleotídeo acima de 97% e níveis de identidade de seqüência acima de 93%, admitindo-se  $E = 1e-100$ .

## Resultados

Os 24 isolados demonstraram em cultivo bacteriano em ágar sangue ovino 5% após 48h, crescimento de colônias mucóides com diferentes colorações (creme, laranja, salmão e rosa). A caracterização morfo-tintorial destas permitiu classificá-las como coco-bacilos pleomórficos, gram positivos. Todos os isolados apresentaram reação positiva para catalase e para o teste de CAMP, negativa para oxidase, utilização de GOF, inulina, manitol, lactose, salicina, ribose e esculina (Tab. 1).

Resultados variáveis foram observados em quatro (27%) dos 15 testes fenotípicos avaliados (produção de urease, redução de nitrato, utilização de ONPG e utilização de glicose

em meio líquido). Dentre os isolados, 23 (96%) apresentaram variação apenas em uma das provas bioquímicas (redução de nitrato) e somente um demonstrou variação frente às análises da produção de urease, utilização de ONPG, utilização de glicose e redução de nitrato (Tab. 1).

Os resultados fenotípicos possibilitaram a classificação dos isolados em três fenótipos, sendo um isolado (4%) pertencente ao fenótipo I, nove (38%) ao fenótipo II e 14 (58%) ao fenótipo III (Tab. 1). Com a análise de similaridade das características fenotípicas dos 24 isolados estudados com os padrões típicos de *R. equi* e actinomicetos relacionados, foi possível relacionar o isolado do fenótipo I com 93% de similaridade ao *Rhodococcus equi* e à *Dietzia maris*. O fenótipo II apresentou-se com similaridade de 100% à *D. maris* e 80% ao *R. equi*. Já o fenótipo III apresentou-se 93% e 80% similar à *D. maris* e *R. equi*, respectivamente. Também se observou que em 71% (5/7) dos isolados das diferentes coletas dos animais, os fenótipos foram equivalentes.

No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, vinte e três isolados (fenótipos II e III) foram sensíveis a amicacina, amoxicilina, ampicilina, azitromicina, cefalexina, cefoperazona, eritromicina, gentamicina, norfloxacin e tetraciclina. Resistência foi observada à oxacilina (96%) e à rifampicina (87%). Sensibilidade intermediária foi encontrada para a ciprofloxacina e a penicilina em 8,6% dos isolados. O isolado do fenótipo I apresentou perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos diferenciado dos demais, sendo resistente à amicacina, oxacilina, penicilina, rifampicina e tetraciclina, tendo resultado de sensibilidade intermediária apenas com cefalexina e sensível aos demais princípios testados.

Vinte e três isolados foram negativos para a amplificação do fragmento do gene que codifica a região 16S do rRNA de *R. equi* (fenótipo II e III), e o total dos isolados não apresentaram os genes *vapA* e *vapB*. Dessa forma, a técnica de PCR identificou um (4%) isolado (fenótipo I) como *R. equi*.

O seqüenciamento de fragmentos da região conservada do gene 16S rRNA e a análise das seqüências determinou que os isolados não identificados pela PCR, pertenciam ao gênero *Dietzia*.

Uma vez que a qualidade de seqüências geradas pelo seqüenciamento automático apresenta heterogeneidade, primeiramente foram verificados o tamanho e a qualidade de seqüência necessários para um correto emprego na identificação. Para esta análise foi empregado o programa STADEN (STADEN et al., 2000). Determinou-se que o tamanho mínimo de seqüência a ser empregada corresponde a 250 pb com índice Phred acima de 20. Seqüências com qualidade inferiores a estas foram descartadas. Foi possível identificar 23

(96%) dos isolados estudados como *Dietzia maris*. Os fragmentos de DNA seqüenciados apresentaram valores de similaridade e identidade com as seqüências já existentes no GenBank que variaram de 93 a 99% com  $E = 1e^{-100}$ . O isolado que apresentou resultado positivo para *R. equi* pela técnica de PCR foi confirmado também pelo seqüenciamento do DNA.

## Discussão

Historicamente, a classificação das bactérias é baseada na similaridade das características fenotípicas como morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, patogenicidade, sorologia e ecologia. Os resultados morfofisiológicos dos 24 isolados avaliados neste estudo evidenciaram características muito similares, com perfis compatíveis a *R. equi* e a *D. maris* conforme descrições de CARTER; COLE, (1990), MURRAY et al. (1995) e BIZET et al. (1997). Segundo LASKER et al. (1992) e BIZET et al. (1997), o maior empecilho à classificação dos actinomicetos está associado à variabilidade e falta de características fenotípicas diferenciais, o que pode explicar a identificação inicial dos isolados como *R. equi* através da utilização de uma série bioquímica concisa (CAMP, produção de urease e redução de nitrato), comumente utilizada em laboratórios de diagnóstico. As reações positivas obtidas em todos os isolados no teste de CAMP, até então considerado como prova definitiva para a identificação do *R. equi* segundo PRESCOTT et al. (1982) e FINGER et al. (1996), corroboram com achados de LASKER et al. (1992) e indicam a fragilidade desta prova para a identificação de *R. equi* pois resultados positivos, até então não descritos, também foram encontrados nos isolados caracterizados como *D. maris*.

No presente trabalho, os distintos fenótipos obtidos evidenciaram a variabilidade fenotípica dos isolados dentro das espécies. A utilização da ribose apenas na cepa controle de *R. equi* (ATCC 33701p+), discorda da observação de BIZET et al. (1997), que relatam a utilização deste açúcar pelo *R. equi*, mas não pela *D. maris*. A utilização da glicose também não se mostrou um teste discriminatório apesar de todos os isolados apresentarem resultados negativos, pois segundo BIZET et al. (1997) esta é uma característica variável. O teste da utilização do ONPG foi a única prova que demonstrou capacidade discriminatória entre *R. equi* e a *D. maris* corroborando as sugestões de HOLT (1994) e BIZET et al. (1997) para a necessidade de inclusão deste teste no diagnóstico laboratorial. No entanto, estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa evidenciaram dois isolados de *R. equi* provenientes de javalis que não utilizaram o ONPG (dados não publicados). Esta observação ratifica a proposta de YOUNG (2001) de que a utilização de apenas uma prova na diferenciação entre

dois gêneros bacterianos não é satisfatória para a identificação final. Conforme LASKER et al. (1992), são necessários de 107 a 129 testes bioquímicos para a identificação bioquímica eficiente do *R. equi*. Todavia, MARASCHIN (2007) expõe que apesar da utilização de vastas séries bioquímicas a identificação fenotípica de alguns gêneros permanecerá complexa e microrganismos só poderão ser identificados com o auxílio de técnicas complementares.

Com o emprego de testes fenotípicos adicionais, foi possível visualizar variações nos resultados fenotípicos das bactérias estudadas, as quais puderam ser comprovadas, pelos distintos perfis bioquímicos obtidos e apresentados na Tabela 1.

A resistência à oxacilina e rifampicina, observada nos isolados de *D. maris* discordam com resultados obtidos por BIZET et al. (1997) que relataram a sensibilidade de cepas de *D. maris* frente à rifampicina e oxacilina. Não sendo este teste uma ferramenta útil na identificação destes microorganismos corineformes. Observou-se também divergência no perfil de susceptibilidade observado do isolado identificado como *R. equi*, com resultados descritos por MURRAY et al. (1995) que alega a sensibilidade de cepas de *R. equi* frente à amicacina, oxacilina, rifampicina e tetraciclina.

Os resultados negativos para a amplificação do fragmento dos genes *vapA* e *vapB* evidenciaram a ausência de fatores de virulência no isolado de *R. equi* que normalmente estão associados a plasmídeos de virulência que conferem aos isolados diferentes níveis de patogenicidade. Este achado sugere sua origem ambiental, entretanto isolados avirulentos têm sido associados a enfermidades no homem e nos animais (TAKAI et al., 1995; WEINSTOCK; BROW, 2002). Uma vez que os búfalos vivem em ambientes onde há uma grande disseminação de microrganismos telúricos admite-se a possibilidade da colonização da glândula mamária desses animais por bactérias dos gêneros *Dietzia* e *Rhodococcus*. Embora neste trabalho não tenha sido evidenciada a ocorrência de mastite nos animais avaliados, alerta-se para a necessidade de mais estudos para avaliação do potencial patogênico destes microrganismos. Conforme PIDOUX et al. (2001) e REYES et al. (2006) a *D. maris* assim como o *R. equi* já foram encontrados em infecções de pacientes com o sistema imune debilitado (PIDOUX et al., 2001; WEINSTOCK; BROW, 2002).

A análise das seqüências da região conservada do gene que codifica o 16S rRNA permitiu classificar os isolados não identificados pela PCR como pertencentes ao gênero *Dietzia*. A técnica de análise de seqüências codificantes do 16S rRNA vem sendo amplamente utilizada no diagnóstico de bactérias, cuja identificação bioquímica não é precisa (PIDOUX et al., 2001; REYES et al., 2006). Contudo esta técnica pode trazer erros, principalmente tendo em vista a troca de material genético entre microrganismos, bem como a reduzida qualidade

nas seqüências obtidas (YOUNG, 2001). Para reduzir estes problemas as seqüências obtidas no presente estudo foram submetidas à análise de qualidade utilizando o pacote STADEN (STADEN et al., 2000).

A utilização de métodos fenotípicos e moleculares para identificação de bactérias é amplamente descrita na literatura (SOEDERMANTO et al., 1998; COSTA et al., 2004). Bactérias corineformes pertencem ao grupo de microrganismos cujos métodos de diagnóstico convencionais, baseados exclusivamente nas características fenotípicas, são inconclusivos (BIZET et al., 1997). Desta forma tornam-se necessárias outras metodologias complementares, como a PCR e o seqüenciamento de DNA (BIZET et al., 1997; PIDOUX et al., 2001). Estas metodologias, entretanto apresentam desvantagens relacionadas ao seu custo e critérios de interpretação. Em nosso estudo a análise de regiões conservadas do gene 16S rRNA permitiu a definitiva classificação dos organismos, auxiliando desta forma a identificação fenotípica. Apesar da utilização de testes fenotípicos complementares foram observadas variações nos resultados obtidos e insatisfatório discernimento. Desta forma alerta-se para o risco da incorreta identificação dos isolados, quando da utilização de testes diagnósticos fenotípicos diferenciais entre *R. equi* e *Dietzia* sp. Nossos achados corroboram as descrições de YOUNG (2001), o qual afirma que os métodos de taxonomia bacteriana devem passar por reformulações, substituindo a corrente monofásica (baseada em uma ou poucas características) e adotando a visão polifásica, onde vários critérios fenotípicos, genéticos e evolutivos devem ser combinados para a correta identificação dos microrganismos.

## **Conclusão**

Diante dos resultados obtidos neste trabalho é possível concluir que: a *Dietzia maris* e o *Rhodococcus equi* estão presentes na microbiota da pele e no leite de búfalas, e possuem características morfo-fisiológicas muito semelhantes, sendo os testes fenotípicos rotineiramente utilizados insuficientes para a identificação e a diferenciação dos isolados. A *Dietzia maris* apresenta teste de CAMP positivo, não sendo esta característica útil na distinção com o *Rhodococcus equi*. Testes de caracterização molecular como a PCR e o seqüenciamento de DNA são importantes ferramentas para complementar a caracterização microbiana, e devem ser utilizados quando os testes fenotípicos para a classificação bacteriana são escassos.

## Referências

- ALLERS, T.; LICHTEN, M. A method for preparing genomic DNA that restrains branch migration of Holliday junctions. **Nucleic Acids Research**, v.28, n.2, 2000.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical**, v.45, p.493 – 496, 1966.
- BELL, K.S., CHRISTOFI, N., AW, D.W.J. Identification of *R. equi* using the polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, p.72-74, 1996.
- BENSON, D.A. et al. Genbank. **Nucleic Acid Research**, v. 30, p. 17-20, 2002.
- BIZET, C. et al. A. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests (“biotype-100” strips). **Res. Microbiology**, v.148, p.799-809, 1997.
- 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.
- CARTER, G.R.; COLE, J. R.Jr. Actinomyces, Nocardia, Streptomyces, Dermatophilus, and Rhodococcus – PRESCOTT J.F. cap 22, p. 271-286, 1990. in **\_Diagnostic Procedures in Veterinary and Mycology**. 5ª edição, 1990.
- COSTA, M.M. et al. Utilização da técnica de PCR multiplex para caracterização molecular de isolados de *Rhodococcus equi* de haras da região de Bagé, RS, Brasil. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, 23, 2002, Pirenópolis. **Anais....**, Pirenópolis: 112 p, p. 61, 2002.
- COSTA, M. M. et al. Evaluation of PCR based on gene *apxIVA* associated with 16S rDNA sequencing for the identification of *Actinobacillus pleuropneumonie* and related species. **Current Microbiology**, v.48, p.189-195, 2004.



FINGER, G.P. **Caracterização de amostras de *Rhodococcus equi* de eqüinos no Rio Grande do Sul.** 98f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996.

FREDRICKS, D.N.; RELMAN D. A. Sequencing of DNA bacteria by universal 16S rDNA PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.10, p.2810-2816, 1998.

GROFF, A.C.M. **PCR para o diagnóstico da Campilobacteriose Genital Bovina.** 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2005.

KEDLAYA, I., ING, M.B., WONG, S.S. *R. equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.39-47, 2001.

LASKER, B.A., BROWN, J.M., McNEIL, M.M. Identification and epidemiological typing of clinical and environmental isolates of the genus *R. equi* with use of a digoxigenin-labeled rDNA gene probe. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p.223-233, 1992.

MACPHERSON, M.J.; MÜLLER, S.G. PCR The basics. 1 ed. New York: Ed. **Springer-Verlag** New York Inc, 276 p., 2000.

MARASCHIN. M, M. **Identificação de bacilos gram positivos aeróbicos isolados de espécimes clínicos em um hospital escola.** 86f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MURRAY, P.R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. **ASM PRESS**. Washington D.C. cap 30 , p.379-399, 1995.

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.

PIDOUX, O. et al. Molecular identification of a *Dietzia maris* hip prosthesis infection isolate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n.7, p. 2634-2636, 2001.

PRESCOTT, J.F. R. *equi*: An animal and Human pathogen. **Clinical of Microbiology Reviews**, v. 4, p. 20-34, 1991.

PRESCOTT, J.F., LASTRA, M., BARKSDALE, L. *Equi* factors in the identification of *Corynebacterium equi* Magnusson. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 988-990, 1982.

QUINN, P.J. et al. **Clinical veterinary Medicine**, London: Mosby-Year ed., 648p, 1994.

RAINEY, F.A. et al. *Dietzia*, a new Genus including *Dietzia maris* comb. Nov., Formerly *Rhodococcus maris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n. 1, p. 32-36, 1995.

REYES , G. et al. Type A aortic dissection associated with *Dietzia maris*. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery**, v.5, n. 5, p.666-668, 2006.

SOEDERMANTO, I. et al. Pheno-and genotyping of *R. equi* isolated from faeces of healthy horses and cattle. **Research in Veterinary Science**, v.64, p.181-185, 1998.

STADEN, R., BEAL, K.F., BONFIELD, J.K. The Staden Package, 1998. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 115 – 130, 2000.

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

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, 1995.

WEINSTOCK, D.M.; BROWN, A.E. *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 15, n. 34 (10), p. 1379 – 1385, 2002.

YOUNG, J.M. Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p. 945-953, 2001.

YUMOTO, I. et al. *Dietzia psychralcaliphila* sp. nov., a novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. **Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p. 85-95 2002.

Tabela 1 – Características bioquímicas e moleculares dos fenótipos caracterizados nos isolados bacterianos de búfalas

Isolados	Características bioquímicas									Fenótipos	Características moleculares		
	<sup>1</sup> CAMP/Catalase	Oxidase	<sup>2</sup> (L, M, I, S, E, GOF)	Urease	<sup>3</sup> KNO <sub>3</sub>	<sup>4</sup> ONPG	Glicose	Maltose	Ribose		<sup>5</sup> 16S rRNA <i>R. equi</i>	<sup>6</sup> <i>vapA</i> e <i>vapB</i>	Seqüenciamento
T <sup>7</sup>	+ <sup>8</sup>	- <sup>9</sup>	-	+	+	+	+	-	+		+	+	<i>R. equi</i>
009/3 L <sup>10</sup>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
009/4 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
056/19 P <sup>11</sup>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
056/10 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
061/53 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
068/82 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
068/84 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
096/37 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/9 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/11 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/21 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
304/31 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
336/81 L	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
501/1 P	+	-	-	+	+	+	+	-	-	I	+	-	<i>R. equi</i>
501/7 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
501/24 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
501/28 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
501/44 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1035/13 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1057/26 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1057/32 P	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1058/83 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>
1101/16 P	+	-	-	-	+	-	-	-	-	II	-	-	<i>D. maris</i>
1101/25 L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	III	-	-	<i>D. maris</i>

<sup>1</sup> CAMP – Christie, Atkins, Munch, Petersen Test; <sup>2</sup> Açúcares: L= Lactose; M= Manitol; I=Inulina; S= Salicina; E=Esculina; GOF= glicose oxidativa-fermentativa; <sup>3</sup> KNO<sub>3</sub> – Teste de Redução do Nitrato; <sup>4</sup> ONPG - ortho-nitrophenyl-b-D-galactopyranoside; <sup>5</sup> PCR do fragmento do gene que codifica para a região 16S do rRNA de *R. equi*; <sup>6</sup> PCR de fragmentos dos genes plasmideais *vapA* e *vapB*; <sup>7</sup> T+: amostra referência de *Rhodococcus equi* (ATCC 33701p+); <sup>8</sup> + reação positiva; <sup>9</sup> - reação negativa; <sup>10</sup> L: leite; <sup>11</sup> P: Pele.