



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE**  
**ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

**MESTRADO ACADÊMICO**

**ALYSSON PAULO DOS SANTOS GODOI**

**Caracterização de *Rhodococcus equi* isolados de potros enfermos em um haras do  
Agreste de Pernambuco**

**GARANHUNS**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AGRESTE DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE  
ANIMAIS DE PRODUÇÃO**

**MESTRADO ACADÊMICO**

**ALYSSON PAULO DOS SANTOS GODOI**

**Caracterização de *Rhodococcus equi* isolados de potros enfermos em um haras do Agreste de Pernambuco**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Mendonça

**Linha de Pesquisa:** Sanidade de Animais de Produção

GARANHUNS

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade Federal do Agreste de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas (SIB-UFAPE)

G588c Godoi, Alysson Paulo dos Santos  
Caracterização de *Rhodococcus equi* isolados de potros enfermos em um haras do Agreste de Pernambuco / Alysson Paulo dos Santos Godoi. – Garanhuns, PE, 2024.  
72 f. : il. color.

Orientador(a): Marcelo Mendonça.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, Garanhuns, PE, BR-PE, 2024.

Inclui referências.

1. biofilme 2. Cavalos - Doenças 3. Infecção 4. Equino 5. Contaminação microbiana I. Mendonça, Marcelo (orient.) II. Universidade Federal do Agreste de Pernambuco Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção III. Título

CDD 636.10896

**ALYSSON PAULO DOS SANTOS GODOI**

**Caracterização de *Rhodococcus equi* isolados de potros enfermos em um haras do Agreste de Pernambuco**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção, da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Reprodução de Animais de Produção.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Mendonça

**Linha de Pesquisa:** Sanidade de Animais de Produção.

Aprovado em 28 / 02 / 24

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Marcelo Mendonça

UFAPE

---

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

UNIVASF

---

Profa. Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti

UFSM

Dedico este trabalho aos que, por  
acaso ou por destino, por aqui passem,  
lembrem-se, é só o começo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço sinceramente a todas as pessoas e instituições que contribuíram para a realização deste trabalho de dissertação. Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão ao meu orientador, Marcelo Mendonça, cuja sábia orientação, apoio constante, incentivo e paciência foram fundamentais para a conclusão deste estudo e minha edificação como pessoa e profissional. Obrigado pelos conselhos e dedicação, os quais foram essenciais para moldar este trabalho e para o meu desenvolvimento acadêmico e profissional.

Gostaria também de agradecer à banca examinadora, composta pelos professores: Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa e a Profa. Dra. Juliana Felipetto Cargnelutti, bem como aos membros suplentes: Profa. Dra. Paula Fonseca Finger e o Dr. Marcos Roberto Alves Ferreira por dedicarem seu tempo e expertise na avaliação deste trabalho e por seus valiosos comentários e sugestões, que contribuíram significativamente para sua qualidade.

Meus sinceros agradecimentos também vão para o Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro e à doutoranda Gilvannya Gonçalves de Sobral, pela importante contribuição na construção desse trabalho. Gostaria também de registrar o meu imenso agradecimento ao mestrando Júlio César da Silva Vieira em dispender seu tempo no suporte do desenvolvimento dos testes de antibiograma, que foram de grande ajuda e esclarecimento. Meu profundo agradecimento à Profa. Dra. Elizabete Rodrigues da Silva pelos conselhos, orientação e auxílios durante o desenvolvimento das atividades, bem como pela sua excelente atuação como coordenadora do programa que foram de imensa importância no andamento desse trabalho.

Não posso deixar de reconhecer o apoio incondicional da minha família e amigos, que estiveram ao meu lado durante todo o processo, oferecendo seu amor, compreensão e encorajamento. Seu apoio foi fundamental para superar os desafios e obstáculos encontrados ao longo do caminho.

Por fim, expresso minha gratidão a todas as fontes de inspiração, autores, pesquisadores e profissionais cujo trabalho e contribuições foram fundamentais para a elaboração deste estudo.

Este trabalho não seria possível sem o apoio e contribuições de cada uma dessas pessoas e instituições. A todos, meu mais profundo obrigado.

*"As coisas são muito mais do que parecem, e o tempo é mais do que é." (R.R. Tolkien, "O Senhor dos Anéis: A Sociedade do Anel".)*

## RESUMO

A rodococose equina é a principal enfermidade respiratória em potros de até 5 meses. Seu agente etiológico, *Rhodococcus equi*, um cobobacilo aeróbico Gram-positivo intracelular, possui diversos fatores de virulência, no entanto, em isolados equinos, a presença de um plasmídeo pVAPA é um fator central. Estes abrigam uma ilha de patogenicidade, apresentando genes codificadores das proteínas da família Vap (*virulence associated proteins*). A resistência antimicrobiana aos macrolídeos tem aumentado com o passar dos anos, sendo o gene *erm(46)* provado como responsável pela resistência em *R. equi* a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) e, também, demonstrou possuir capacidade de transferência entre microrganismos. A produção de biofilme é outro importante fator, pois células de *R. equi* presentes nos biofilmes apresentaram tolerância antimicrobiana de até dez vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) observadas nas células livres. Embora seja uma doença sabidamente encontrada em todo território brasileiro, as pesquisas de identificação e caracterização de isolados concentram-se nas regiões sul e sudeste. No Nordeste, observa-se a ausência de dados acerca da caracterização molecular de *R. equi*. O artigo científico teve como objetivo caracterizar fenotipicamente e molecularmente 4 isolados de *R. equi* oriundos de potros no estado de Pernambuco. Todos os isolados foram identificados como *R. equi* através de testes bioquímicos e amplificação do gene *choE* e sequenciamento do 16S rRNA. Observou-se via PCR que 3 isolados (Rhodo2, 3 e 4) foram positivos para *vapA*, *-C*, *E*, *-F*, *-H* e *traA* e *vapA*, *-C*, *-D*, *E*, *-F*, *-H* e *traA*, respectivamente. O isolado Rhodo1 não apresentou gene de virulência em decorrência da provável perda do plasmídeo por seguidas passagens a 37°C. Ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, todos os isolados foram suscetíveis aos macrolídeos, rifampicina e gentamicina. Nenhum isolado apresentou o gene *erm(46)*, responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) em *R. equi*. Entretanto, todos os isolados formaram biofilme, sendo produtores moderados (Rhodo1, 2) e produtores fracos (Rhodo3, 4). Esta caracterização molecular demonstrou pela primeira vez a presença do plasmídeo de virulência em cepas de *R. equi* e sua capacidade de formação de biofilme no Nordeste do Brasil.

**Palavras-chave:** Rodococose; *vapA*; resistência antimicrobiana; *erm(46)*; biofilme.

## ABSTRACT

Equine rhodococcosis is the main respiratory illness in foals up to 5 months old. Its etiological agent, *Rhodococcus equi*, an intracellular Gram-positive aerobic coccobacillus, possesses several virulence factors; however, in equine isolates, the presence of a pVAPA plasmid is a key factor. These plasmids harbor a pathogenicity island, containing genes encoding proteins of the Vap (virulence-associated proteins) family. Antimicrobial resistance to macrolides has increased over the years, with the *erm(46)* gene proven to be responsible for resistance in *R. equi* to macrolides, lincosamides, and streptogramins B (MLSB), and also demonstrating the ability to transfer between microorganisms. Biofilm production is another important factor, as *R. equi* cells present in biofilms showed antimicrobial tolerance up to ten times the minimum inhibitory concentrations (MICs) observed in free cells. Although it is a disease known to be found throughout the Brazilian territory, research on the identification and characterization of isolates is concentrated in the southern and southeastern regions. In the Northeast, there is a lack of data on the molecular characterization of *R. equi*. The scientific article aimed to characterize phenotypically and molecularly 4 isolates of *R. equi* from foals in the state of Pernambuco. All isolates were identified as *R. equi* through biochemical tests and amplification of the *choE* gene and sequencing of the 16S rRNA. It was observed via PCR that 3 isolates (Rhodo2, 3, and 4) were positive for *vapA*, *-C*, *E*, *-F*, *-H*, and *traA*, and *vapA*, *-C*, *-D*, *E*, *-F*, *-H*, and *traA*, respectively. Isolate Rhodo1 did not present a virulence gene due to the probable loss of the plasmid after successive passages at 37°C. In the antimicrobial sensitivity test, all isolates were susceptible to macrolides, rifampicin, and gentamicin. No isolate presented the *erm(46)* gene, responsible for resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins B (MLSB) in *R. equi*. However, all isolates formed biofilm, being moderate producers (Rhodo1, 2) and weak producers (Rhodo3, 4). This molecular characterization demonstrated for the first time the presence of the virulence plasmid in *R. equi* strains and their ability to form biofilm in the Northeast of Brazil.

**Keywords:** Rhodococcosis; *vapA*; antimicrobial resistance; *erm(46)*; biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Lesões granulomatosas em pulmão de potro.....	16
Figura 2 –	Plasmídeos de virulência em <i>R. equi</i> .....	24
Figura 3 -	Distribuição dos subtipos do plasmídeo pVAPA no mundo....	30

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Subtipos identificados do plasmídeo pVAPA de <i>R. equi</i> .....	30
Quadro 2 -	Protocolos terapêuticos mais comumente utilizados no tratamento da rodococose equina.....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	15
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	RODOCOCOSE EQUINA.....	15
3.2	CARACTERÍSTICAS E ISOLAMENTO.....	18
<b>3.2.1</b>	<b>Características adaptativas de nicho</b> .....	19
<b>3.2.2</b>	<b>Nomenclatura</b> .....	20
<b>3.2.3</b>	<b>Isolamento e identificação de espécie</b> .....	21
3.3	PLASMÍDEOS E VIRULÊNCIA.....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Virulência mediada por plasmídeos</b> .....	23
<b>3.3.2</b>	<b>Estrutura plasmidial, mecanismo de ação e especificidade</b> .....	23
<b>3.3.3</b>	<b>Regulação dos genes da ilha de patogenicidade e Perda e reaquisição dos plasmídeos</b> .....	28
<b>3.3.4</b>	<b>Plasmídeo PVAPA – subtipos e prevalência</b> .....	29
3.4	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	31
3.5	FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	36
3.6	<i>Rhodococcus equi</i> – SUA PRESENÇA E PESQUISA NO NORDESTE.....	41
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	44
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO – Caracterização fenotípica e molecular de <i>Rhodococcus equi</i> isolados de potros na região do Agreste de Pernambuco</b> .....	56

## 1 INTRODUÇÃO

Agente etológico da enfermidade, *Rhodococcus equi* é uma bactéria intracelular facultativa, Gram-positiva, aeróbica e imóvel, apresentando crescimento em forma de micélio, o qual se divide em células em formato de cocos ou cocobacilos e forma colônias de coloração laranja-salmão (Vázquez-Boland e Meijer., 2019; Haubenthal *et al.*, 2023). Atualmente, três tipos de plasmídeo foram identificados em cepas oriundas de diferentes espécies animais: PVAPA, isolado em equinos, PVAPB, isolado em suínos e PVAPN isolados comumente de ruminantes. Estudos demonstraram a estrutura do PVAPA, que possui uma ilha de patogenicidade de 27.536 pb contendo sete genes de proteínas associadas à virulência (Vap) agrupados em três genes (*vapA*, *vapC* e *vapD*), um par com um gene e um pseudogene (*vapE* e *vapF*) e outros dois localizados independentemente (*vapG* e *vapH*) (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Letek *et al.*, 2008; Vázquez-Boland e Meijer, 2019; Ganderton *et al.*, 2023). Dessas proteínas da família Vap, VapA possui um importante papel na sobrevivência e multiplicação do patógeno no interior de macrófagos, sendo semelhante em estrutura às outras proteínas vap, de função ainda incerta (Letek *et al.*, 2008; Willingham-Lane, Coulson e Hondalus., 2018; Ganderton *et al.*, 2023).

Nas últimas décadas diversos autores têm observado um aumento na prevalência da resistência antimicrobiana em isolados de *R. equi* especialmente aos macrolídeos e à rifampicina, princípios ativos comumente utilizados, isolados ou em combinação na terapêutica dos animais acometidos. O gene *erm(46)* foi identificado como responsável à resistência a esses princípios ativos e está presente num plasmídeo que demonstrou capacidade de transferência entre cepas de *R. equi* e outros gêneros de bactérias, o que representa um risco de disseminação entre cepas e propriedades (Huber *et al.*, 2018b; Álvarez-Narváez *et al.*, 2021).

Além disso, a formação de biofilme, identificada em cepas de *R. equi* também pode representar um desafio no tratamento da enfermidade em animais acometidos, uma vez que trabalhos demonstraram um aumento da tolerância a antibióticos em células presentes nos biofilmes em até dez vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) observadas nas células livres, o que poderia favorecer a sobrevivência de cepas que possuam essa capacidade, levando a uma persistência do quadro infeccioso (Hall-Stoodley e Stoodley, 2009; Gressler *et al.* 2015; Rampacci *et al.*, 2019; Bujold, Lani e sanz, 2019).

O primeiro relato de infecção por *R. equi* no Brasil foi feito no ano de 1959, em um quadro de mastite em égua (Lacerda e Veiga, 1959), sendo o primeiro surto de rodococose

equina com manifestação clínica respiratória em potros realizado somente no ano de 1970 no estado do Rio de Janeiro (Langenegger, Neves e Langenegger, 1970). Desde então, diversos trabalhos no país ao longo dos anos relataram o isolamento do patógeno em equinos, humanos e diversas espécies de animais. Entretanto, a grande maioria das pesquisas se concentra nas regiões Sul e Sudeste do país (Monego *et al.*, 2009; Gressler *et al.*, 2015a; Gressler *et al.*, 2015b; Oliveira *et al.*, 2019; Espíndola *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2005). As demais regiões contam com um número reduzido de trabalhos, no caso da região Nordeste, os dados disponíveis indicam a existência de poucos trabalhos, não havendo até o momento nenhum relato de caracterização molecular dos isolados encontrados (Neto, 2012; Dorneles *et al.*, 2012; Julio, 2013; Nascimento, 2016; Silva, 2017; Calou, 2023).

Em razão disso, o objetivo do presente trabalho consistiu na caracterização fenotípica e molecular de 4 isolados de *R. equi*, oriundos de 4 potros que apresentaram uma sintomatologia clínica compatível com um quadro de rodococose equina, tratados com azitromicina em associação com rifampicina, sem melhora clínica, evoluindo a óbito. A identificação e caracterização de isolados virulentos de *R. equi* circulantes no Nordeste brasileiro bem como de seu perfil de suscetibilidade antimicrobiana e capacidade de formação de biofilme, é de enorme importância devido à ausência relativa de estudos acerca do tema em razão da grande população de equinos presente na região e sua importância na economia e cultura locais. Não obstante a isso em razão do potencial zoonótico do agente etiológico, o presente trabalho visa também contribuir à Saúde Pública no âmbito da Saúde Única.

Realizou-se a identificação fenotípica dos isolados por meio de testes de Gram, catalase, urease e CAMP. Posteriormente por meio de reações de polimerase em cadeia (PCR) uniplex, realizou-se a identificação a nível de espécie mediante amplificação do gene cromossomal *choE* e caracterização molecular dos genes de virulência mediante pesquisa dos genes da família *vap* (*vapA*, *-B*, *-C*, *-D*, *-E*, *-F*, *-H*) e *traA*, bem como a pesquisa do gene *erm(46)*. Além disso, realizaram-se os testes de sensibilidade a antimicrobianos através da técnica de disco-difusão para eritromicina, claritromicina, azitromicina, rifampicina, gentamicina e doxiciclina e a realização de testes de formação de biofilme em placas de 96 poços durante 24, 48 e 72h.

No primeiro capítulo deste trabalho consta uma revisão de literatura sobre *Rhodococcus equi*, sua caracterização e isolamento, virulência e plasmídeos, resistência antimicrobiana, formação e biofilmes e sua presença no nordeste brasileiro. O segundo capítulo consiste no artigo desenvolvido a partir da pesquisa científica, no qual relata-se o

isolamento e caracterização fenotípica e molecular dos isolados oriundos de 4 potros enfermos no Agreste de Pernambuco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Realizar a identificação fenotípica e molecular de isolados de *Rhodococcus equi* colhidos de potros que vieram a óbito no Agreste de Pernambuco.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar reações de Polimerase em Cadeia (PCR) para pesquisa do gene cromossomal *choE* para identificação molecular dos 4 isolados a nível de espécie;
- Realizar reações de Polimerase em Cadeia (PCR) para pesquisa dos genes associados à virulência *vapa*, *vapB*, *vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapF*, *vapH* e *traA*;
- Pesquisar o perfil fenotípico de resistência antimicrobiana a drogas efetivas *in vitro* e de comumente utilizadas no tratamento da rodococose equina mediante teste de sensibilidade a antimicrobianos nos isolados;
- Pesquisar a capacidade de formação de biofilme nos isolados.

## **3. CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 RODOCOCOSE EQUINA**

A equideocultura no Brasil é uma atividade econômica que movimenta milhões de reais por ano e encontra-se em constante crescimento, sustentando e financiando uma rede de infraestrutura, postos de trabalho e pesquisa científica, principalmente nas áreas de reprodução e infectologia, cada vez mais abrangente. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2022), o Brasil possui um rebanho de mais de 5,8 milhões de equinos. Dada a importância da atividade econômica para a sociedade e o tamanho do rebanho no país, as enfermidades representam importantes prejuízos econômicos à atividade. Dentre essas enfermidades, as que acometem o sistema respiratório são o segundo grupo com maior prevalência nos equinos, mais notadamente as de etiologia bacteriana. Em relação aos potros, a rodococose equina merece especial atenção em razão de seu grande impacto financeiro devido à perda de desempenho esportivo nos animais acometidos e a alta mortalidade de animais acometidos em propriedades endêmicas, bem como em detrimento dos custos de tratamento e prevenção e à falta de uma vacina comercial.

A rodococose equina é a causa mais comum de broncopneumonia granulomatosa subaguda ou crônica em potros com menos de 5 meses de idade, apresentando uma evolução subaguda a crônica. Entretanto, cavalos adultos podem ser acometidos em caso de algum comprometimento do sistema imune (Hines, 2014; Sanz, 2023). Dados obtidos através de exame ultrassonográfico evidenciam que em fazendas endêmicas, a maioria dos animais acometidos (acima de 50% da população de potros) desenvolvem uma forma subclínica da enfermidade, apresentando focos de consolidação ou abscedação pulmonar em uma frequência maior do que à de animais que apresentam a forma clínica, indicando que, sem tratamento, 70% a 85% dos potros permanecerão subclínicos com posterior cicatrização das lesões pulmonares. No entanto, em até 25% dos acometidos as lesões irão progredir culminando com a manifestação da forma clínica da enfermidade, sendo necessário tratamento (Chaffin *et al.*, 2012; Venner *et al.*, 2012).

Apesar de poder afetar outros órgãos, a rodococose equina tem como apresentação clínica mais frequente o desenvolvimento de uma broncopneumonia supurativa granulomatosa crônica com abscedação extensa (Rakowska *et al.*, 2020), tal como evidenciado na Figura 1.

Figura 1 – Lesões granulomatosas em pulmão de potro



Fonte: Acervo pessoal. Lesões granulomatosas em parênquima pulmonar de potro com quadro clínico grave de rodococose equina que veio a óbito.

Como na maioria dos quadros clínicos infecciosos, os primeiros sinais clínicos são inespecíficos e consistem frequentemente em febre, e letargia. À medida que a enfermidade progride, aumento do esforço respiratório (alargamento das narinas), tosse, secreção nasal e taquipneia inicialmente não aparente em repouso podem estar presentes (Chaffin *et al.*, 2011; Megid *et al.*, 2016; Sanz, 2023). Em uma porcentagem menor de potros afetados, a infecção pode prosseguir sem remissão das lesões, ainda que estabelecidas as medidas terapêuticas adequadas. Esses potros podem ser encontrados mortos ou apresentando dificuldade respiratória aguda com febre alta sem sinais prévios (Vázquez-Boland *et al.*, 2013).

Lesões extrapulmonares podem estar presentes e não são incomuns podendo afetar diversos outros sistemas, inclusive simultaneamente. Essas lesões são comumente denominadas na literatura de EPD (do inglês *extrapulmonary disorders*) (Huber *et al.*, 2018a; Sanz, 2023). As lesões intestinais são as mais comumente encontradas, chegando a 50% de incidência nos potros com pneumonia causada por *R. equi*, sendo um critério negativo na avaliação do prognóstico do paciente (Reuss *et al.*, 2009; Vázquez-Boland *et al.*, 2013). O desenvolvimento das lesões intestinais pode ser causado em razão da ingestão de alimento contaminado, de secreções contaminadas ou por meio da disseminação secundária de focos pulmonares (Megid *et al.*, 2016; Vázquez-Boland *et al.*, 2013). Outras lesões extrapulmonares menos comuns associadas à disseminação metastática do patógeno relatadas são: pericardite, endocardite, celulite, dermatite, abscessos subcutâneos, linfadenopatia periférica, empiema de bolsa gutural, pleurite, sinusite, linfangite ulcerativa, miosite, estomatite, piometra e onfalite (Reuss *et al.*, 2009; Wilkes *et al.*, 2016; Huber *et al.*, 2018b).

Em um estudo retrospectivo realizado por Oliveira *et al.* (2019), analisando achados clínicos e patológicos da infecção por *Rhodococcus equi* em 20 potros com idade média de 60 dias de 1997 a 2012, provenientes de quatro fazendas de reprodução em Porto Alegre, encontrou que a maioria dos animais apresentou sinais respiratórios (11/20 [55%]), sendo que outros sinais observados foram hipertermia (10/20 [50%]), aumento de volume articular (6/20 [30%]), prostração (4/20 [20%]), distúrbios locomotores (3/20 [15%]) e diarreia (3/20 [15%]). Ao exame de necrópsia foram encontradas lesões de pneumonia piogranulomatosa (19/20 [95%]), acompanhada ou não por linfadenite piogranulomatosa (10/20 [50%]), enterocolite ulcerativa (5/20 [25%]), e osteomielite piogranulomatosa (3/20 [15%]).

Segundo Reuss *et al.* (2009), alguns fatores de risco são significativamente associados com a presença de EPDs incluem: duração dos sinais clínicos antes da admissão, leucocitose e neutrofilia, ainda potros com EPDs podem apresentar maior frequência cardíaca e

concentração de ureia sanguínea do que potros sem EPD. Além de serem de difícil diagnóstico *ante mortem*, e piorarem o prognóstico do animal acometido. O prognóstico é considerado de reservado a bom, contudo, tende a ser desfavorável nos casos (a) infecções septicêmicas, (b) potros com manifestação clínica entre 45 e 60 dias e (c) em animais com diagnóstico e/ou instituição tardia do tratamento (Megid *et al.*, 2016). Como apontado por Rakowska *et al.* (2020), a taxa de sobrevivência pode alcançar até 80% quando instituída, apresentando médias estimadas em 60-70% quando instituído tratamento bem-sucedido.

### 3.2 CARACTERÍSTICAS E ISOLAMENTO

*Rhodococcus equi* é um microrganismo intracelular facultativo, Gram-positivo com uma alta relação G+C, aeróbico e imóvel, apresentando crescimento em forma de micélio, o qual se divide em células em formato de cocos ou cocobacilos e forma colônias de coloração laranja-salmão (Vázquez-Boland e Meijer., 2019; Haubenthal *et al.*, 2023).

O gênero *Rhodococcus* está inserido na ordem *Actinomycetales*, na qual, também estão incluídos outros gêneros de importância clínica, como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* (Collins *et al.*, 1982; Gürtler e Seviour, 2010; Vázquez-Boland *et al.*, 2013; Higgins e Huber, 2023). As espécies patogênicas desses gêneros são comumente denominadas como Bacilo álcool-ácido resistentes (BAAR), por conta da fraca fixação de corantes em razão da presença de um envelope celular rico em lipídios contendo ácido micólico. O ácido micólico forma uma bainha espessa e hidrofóbica semelhante a uma “membrana externa” que protege os actinomicetos de agressões externa, sendo importante para a sobrevivência em condições hostis, inclusive dentro de macrófagos (Sutcliffe *et al.*, 2010; Higgins e Huber, 2023; Erol *et al.*, 2021).

Esse gênero possui até o momento 58 espécies descritas, e muitos deles são importantes para os setores ambiental, farmacêutico e energético em razão de seu potencial de aplicabilidade na microbiologia industrial devido à sua versatilidade metabólica e capacidade de biodegradar diversos compostos químicos (Larkin *et al.*, 2005, Van Der Geize e Dijkhuizen, 2004; Prescott *et al.*, 2022). Os plasmídeos geralmente são os codificadores dessas atividades metabólicas diversas das espécies do gênero possuindo características adaptativas específicas desse nicho, sendo comumente isoladas de ambientes poluídos (Larkin *et al.*, 2010, McLeod *et al.*, 2006). No entanto, apenas duas espécies de *Rhodococcus* são reconhecidas por ocasionar enfermidades, *Rhodococcus fascians*, que causa doença nas folhas das plantas e *R. equi* (Stes *et al.*, 2013).

### 3.2.1 Características adaptativas de nicho

Assim como as outras espécies pertencentes ao mesmo gênero, *R. equi* possui adaptações de nicho que lhe permitem um metabolismo flexível em decorrência dos locais em que se encontra, sendo saprofítico no ambiente, e parasítico na infecção e sobrevivência em diferentes hospedeiros animais (Haubenthal *et al.*, 2023; Huber *et al.*, 2018c). Em sua forma de vida saprófita, assim como outras do gênero é uma bactéria telúrica, sendo o solo considerado a principal fonte de infecção para potros (Cohen, 2014) e o esterco herbívoro como seu substrato de crescimento, o que poderia explicar sua abundância no habitat da fazenda (Vázquez-Boland *et al.*, 2013; Takai *et al.*, 2022). Takai *et al.* (2022) relataram o isolamento de *R. equi* do conteúdo gastrointestinal de minhocas (família *Megascolecidae*) e do solo circundante oriundo de pastagens de fazendas de criação de cavalos e chiqueiros ao ar livre, o que evidencia a importância do solo no ciclo de vida desse patógeno. Tal fator deve-se ao fato de que esta espécie, multiplica-se primariamente no esterco herbívoro e na mucosa colonizada do intestino grosso, e se espalha no habitat da fazenda, presumivelmente por meio do ciclo fecal-oral (Muscatello *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2013; Vázquez-Boland *et al.*, 2013).

Uma característica peculiar de *R. equi* é a ausência de genes codificadores do fosfoenol piruvato, um componente do sistema de transporte de carboidratos (PTS) o que indica um metabolismo proeminentemente assacarolítico (Kämpfer *et al.*, 2014). Entre as actinobactérias, a ausência de homólogos de PTS é rara, sendo ausentes também no *Mycobacterium tuberculosis* (Letek *et al.*, 2010). O que indica que a perda desses genes pode estar associada à adaptação ao parasitismo intracelular neste grupo bacteriano (Vázquez-Boland e Meijer., 2019). Outras características metabólicas importantes relatadas são que *R. equi* possui capacidade de biossintetizar todos os aminoácidos e crescer vigorosamente quando fornecido apenas nitrogênio inorgânico, um ácido orgânico ou um ácido graxo como fonte de carbono e tiamina, sendo capaz de crescer tendo a ureia como única fonte de nitrogênio. Além disso, o patógeno possui capacidade de respiração anaeróbica via desnitrificação e assimilação de nitrogênio a partir do nitrato/nitrito (Letek *et al.*, 2010; Vázquez-Boland e Meijer, 2019). Tais adaptações no perfil metabólico conferem vantagens adaptativas importantes, pois é adequado tanto para a vida no tecido piogranulomatoso, rico em lipídios derivados da membrana e pobre em aminoácidos, açúcares e oxigênio; e para a sobrevivência e multiplicação no intestino grosso e no esterco onde há uma presença massiva de ácidos orgânicos nos equinos (Vázquez-Boland e Meijer, 2019; Vázquez-Boland, Sanz,

Prescott, 2022). Além disso, *R. equi* não pode crescer sem a presença de tiamina e uma vez que foi observada a ausência de *thiC*, gene envolvido na síntese de tiamina em *Rhodococcus*, o que demonstra uma especialização de nicho uma vez que esse composto está presente em abundância no intestino e no solo rico em esterco devido à disponibilidade de tiamina sintetizada pela microbiota local, bem como se estaria provavelmente disponível durante a infecção (Letek *et al.*, 2010).

No entanto, apesar de sua ampla disseminação, presente no intestino de equinos, esterco, solo e até no ar de estábulos, a manifestação de enfermidade não ocorre na mesma prevalência, ocorrendo clinicamente em alguns potros ou como um problema sério em fazendas consideradas endêmicas. Diversos trabalhos na segunda metade do século passado tentaram responder essa questão, que começou a ser respondida no início dos anos 90 com o implemento de novas técnicas, à época, que observara que a capacidade de virulência das cepas estaria associada a plasmídeos (Prescott, 1991; Takai *et al.*, 1991).

### 3.2.2 Nomenclatura

O microrganismo foi inicialmente isolado na Suécia por Magnusson em 1923 (Magnusson, 1923), e então nomeado como *Corynebacterium equi*. No entanto, após análises genômicas e fenotípicas, no ano de 1977 um novo gênero foi criado e a espécie renomeada para *Rhodococcus equi* (Goodfellow e Alderson, 1977). Contudo, sua classificação permaneceu problemática até recentemente, em razão de que alguns estudos apontaram que *R. equi* e *Corynebacterium hoagii* (Morse 1912) poderiam ser sinônimos heterotípicos (Suzuki, Kaneko e Komagata, 1981; Vázquez-Boland *et al.*, 2020).

No ano de 2014, Kämpfer e colaboradores (Kämpfer *et al.*, 2014), realizaram a descrição de *Rhodococcus defluvii* mediante análises taxonômicas polifásicas, as quais incluíram as cepas tipo *C. hoagii* ATCC 7005 e *R. equi* ATCC 6939. Os autores identificaram *R. equi* ATCC 6939 e *C. hoagii* ATCC 7005 como sendo pertencentes à mesma espécie, em razão da alta similaridade das sequências de 16s rRNA. Além disso, como foram analisadas outras espécies do gênero *Rhodococcus*, os autores descartaram a proposta de reclassificação de *R. equi* em um novo gênero *Prescotella* que vinha sendo proposto (Sangal *et al.*, 2022), em razão de não encontrarem diferenças quimiotaxonômicas ou separação filogenética baseada no sequenciamento do 16S rDNA das espécies analisadas. O que foi ratificado por estudos filogenômicos detalhados que situaram inequivocamente *R. equi* dentro de uma das principais linhas de descendência rodocócica (Anastasi *et al.*, 2016; Vázquez-Boland *et al.*, 2019).

Contudo, em razão de *C. hoagii* ser sido nomeado primeiro, em 2014 *R. equi* acabou por ser renomeado *Rhodococcus hoagii* (Kämpfer *et al.*, 2014). Todavia, o trabalho realizado por Vázquez-Boland *et al.*, (2020), apontou que existiam diversas razões para que essa alteração de nomenclatura fosse descartada, como o fato de que os primeiros relatos de *C. hoagii* descreveram características que são difíceis de conciliar com as características conhecidas de *R. equi*, mais marcadamente a capacidade de fermentar rapidamente dextrose (glicose) e sacarose (sacarose), além da origem incerta do tipo *C. hoagii* mantido em diversas coleções bacterianas indicando que provavelmente um isolado de *C. equi* foi depositado erroneamente (em algum momento na década de 1950) como *C. hoagii* ATCC 7005, que então se tornou a cepa padrão da espécie, levando a análises errôneas. Em razão disso, ano de 2022 por decisão da Comissão Judicial do Comitê Internacional de Sistemática de Procariontes (*Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes*) a espécie voltou a denominada *Rhodococcus equi*, porque a mudança de nome foi proposta em razão desse engano (Oren *et al.*, 2022).

### 3.2.3 Isolamento e identificação de espécie

Para o isolamento do agente etiológico, diversos autores utilizam o ágar-sangue ovino a 5%, desfibrinado, em condições de aerobiose, entre 48 e 72h. Nesse meio, as colônias de *R. equi* apresentam um aspecto mucoide e brilhante e coloração branca-acinzentada, adquirindo coloração salmão característica em períodos de incubação prolongados (72h), não apresentando halo de hemólise e possuindo geralmente 1 a 2 mm de diâmetro após 48 h (Megid, *et al.*, 2016). Possuindo uma temperatura ótima de isolamento de 30 °C, podendo ser incubado a 37 °C (Takai *et al.*, 1991). Alguns meios seletivos, podem ser utilizados no isolamento, especialmente em amostras muito contaminadas, como solo e fezes, em razão de serem mais seletivos que os meios de rotina, tais como o CAZ-NB (ágar ceftazidima, novobiocina e ciclo-hexamida), NANAT (ácido nalidíxico, novobiocina, ciclo-hexamida e telurito de potássio), TVP (trimetoprima, vancomicina, polimixina B e telurito de potássio) e TCP (trimetoprima, cefoperazona, ciclo-hexamida, telurito de potássio e polimixina B) (Megid, *et al.*, 2016; Javed, *et al.*, 2017).

Para a identificação fenotípica de *R. equi*, algumas provas diferenciais devem ser realizadas. O teste mais utilizado por diversos autores em laboratório é o teste de Christie, Atkins, Munch e Petersen (*CAMP test*), o qual tem como finalidade a observação da presença do fator citolítico, chamado fator equi, responsável pela hemólise sinérgica observada quando

essa cepa é estriada ao lado de uma cepa hemolítica, sendo utilizadas mais comumente uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* ou de *Listeria monocytogenes*, a qual forma uma área indicadora (hemolítica) na região de intersecção em formato de “seta”; uma vez que *R. equi* estimula a hemólise através da enzima COX, codificada pelo gene *choE* (Fokina *et al.*, 2022; Da Silva, *et al.*, 2012; Zúñiga *et al.*, 2023). Sendo a execução desse teste sempre recomendada como forma de identificação presuntiva, uma vez que não ainda não houve relatos de isolados de *R. equi* descrito como CAMP negativo. Todos os isolados analisados no presente estudo apresentaram resultado positivo ao teste de CAMP. Décadas atrás, na ausência de testes moleculares, o CAMP teste era utilizado como o teste de identificação padrão para *R. equi* devido ao seu grau de acurácia (Prescott, 1991). Segundo descrito em Quinn e colaboradores (2005), algumas provas bioquímicas como o teste de fermentação de açúcares também podem ser realizadas para a identificação do patógeno, o qual mostra-se incapaz de fermentar açúcares como glicose, maltose e sacarose, porém demonstra capacidade de reduzir nitrato a nitrito e produzir urease.

Com o advento das técnicas de biologia molecular, diversos trabalhos nos últimos anos têm realizado a identificação do agente por meio da Reação de cadeia da Polimerase (PCR), em razão de uma maior agilidade e praticidade em relação às técnicas de identificação bioquímicas. Nesse sentido, Ladrón *et al.* (2003) realizaram um ensaio de PCR tendo como gene alvo o gene cromossomal *choE*, e em seus resultados observaram que todos os isolados inicialmente identificados bioquimicamente como *R. equi*, apresentaram um resultado positivo de PCR, que se correlacionou com um alto grau de conservação do gene *choE*. Além disso nenhum dos isolados não *R. equi* usados no estudo apresentou resultado positivo, incluindo actinomicetos produtores de colesterol oxidase. Tal resultado estabeleceu esse gene como um rápido e confiável alvo para a confirmação desse agente etiológico via PCR, e de fato, diversos estudos posteriormente realizados o utilizaram com essa finalidade (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007).

Outros fatores importantes associados ao isolamento e cultivo de *R. equi* em laboratório diz respeito a diferenças no crescimento entre cepas virulentas portadoras de pVAPA (tópico 3.3) e cepas sem plasmídeo (*plasmid cured*). Takai *et al.* (1994) relataram que a uma temperatura de 38°C, cepas de *R. equi* contendo plasmídeo replicaram-se mais lentamente que as cepas avirulentas, e assim foram gradualmente substituídas por células sem plasmídeos. No entanto, a uma temperatura de 30°C não foi observada diferença de crescimento entre os dois tipos de cepa.

### 3.3 PLASMÍDEOS E VIRULÊNCIA

#### 3.3.1 Virulência mediada por plasmídeos

Décadas atrás, antes do avanço das pesquisas moleculares, os trabalhos que analisavam a capacidade de *R. equi* em causar doença em animais sugeriam que, o desenvolvimento da enfermidade em diferentes animais de propriedades distintas poderia estar relacionado a variâncias genéticas entre as populações de cavalos na sua capacidade de resistir à infecção ou diferenças entre as cepas do patógeno na sua capacidade de iniciar a doença (Takai *et al.*, 1986; Yager, 1987; Takai *et al.*, 1991). Takai *et al.* (1991) em seu trabalho estabeleceu que a presença de um plasmídeo de tamanho aproximado de 85kb seria essencial para a virulência com a expressão de antígenos de 15 a 17kDa em isolados do agente, através da observação do desenvolvimento de enfermidade entre cepas com e sem a presença desse plasmídeo. Nesse sentido outros trabalhos conformaram que a perda deste plasmídeo resulta na incapacidade de causar doenças em potros e de se replicar em macrófagos *in vitro* e em tecidos de camundongos *in vivo* (Hondaluz *et al.*, 1994; Guiguère *et al.*, 1999).

Após a descoberta do pVAPA em cepas obtidas de equinos, outros dois tipos de plasmídeos foram descobertos, nas últimas décadas. Em 1995, Takai *et al.* identificaram a presença de outro plasmídeo circular isolado de linfonodos de suínos denominado pVAPB (Takai *et al.*, 1995; Takai *et al.*, 1996). E mais recentemente, outro plasmídeo foi descoberto, porém, diferentemente dos dois anteriores, este apresenta uma estrutura linear, sendo comumente associado a isolados de ruminantes, denominado pVAPN ocasionando lesões granulomatosas nos pulmões, rins, fígado e linfonodos mesentéricos e abomasais de bovinos e caprinos (Valero-Rello *et al.*, 2015; Nakagawa *et al.*, 2018; Takai *et al.*, 2023).

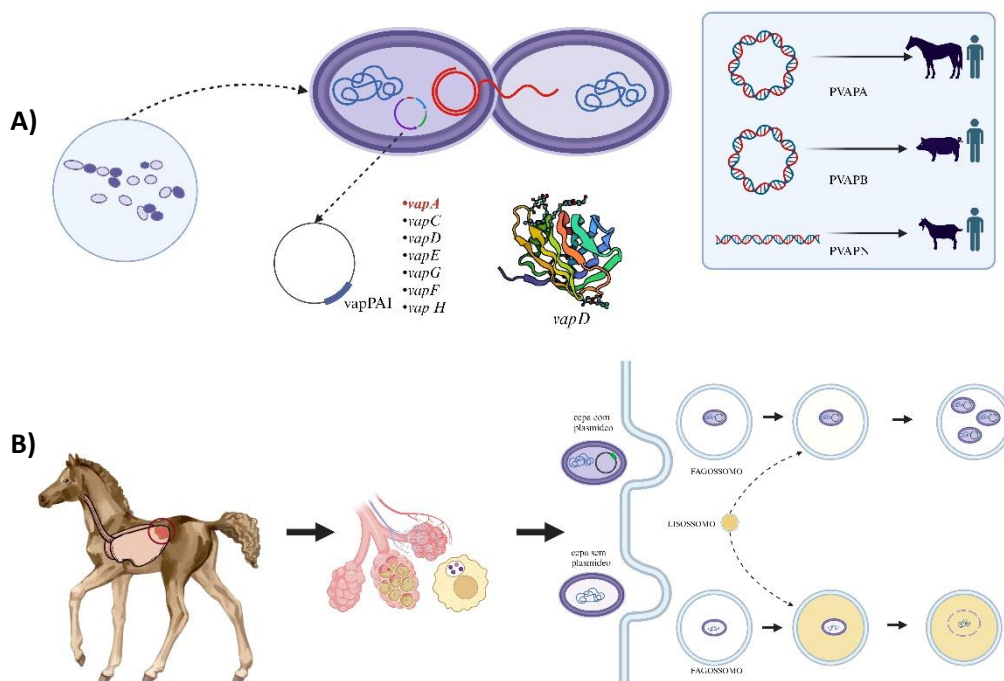
#### 3.3.2 Estrutura plasmidial, mecanismo de ação e especificidade

Takai *et al.* (2000) sequenciaram e analisaram a estrutura genética dos plasmídeos de virulência das cepas *R. equi* ATCC 33701 e 103. Observou-se a presença de 64 quadros de leitura abertos (ORFs), além da de uma ilha de patogenicidade de 27.536pb contendo sete genes de proteínas associadas à virulência (*vap*), incluindo *vapA*. Observou-se também que esses genes são homólogos, partilhando um elevado grau de similaridade de sequência, em particular nos seus domínios carboxi-terminais (Takai *et al.*, 2000; Jain, Bloom e Hondalus, 2003; Coulson *et al.*, 2015). Além disso, os autores encontraram que genes *vap* estão

localizados em uma seqüência de 19kb em sete subregiões, em uma direção positiva, com exceção de *vapG*. *vapA*, *vapC* e *vapD* são agrupados muito próximos um com o outro, e *vapE* e *vapF* são imediatamente adjacentes. Já *vapG* e *vapH* estão presentes como genes individuais (Takai *et al.*, 2000). No entanto, Letek *et al.* (2008) identificou que a ilha de patogenicidade codifica apenas seis proteínas Vap completas (*vapA*, -*C*, -*D*, -*E*, -*G* e -*H*), sendo também presente 3 seqüências de genes *vap* exibindo vários graus de degeneração: *vapF*, *vapI* e outro pseudogene *vap* altamente corrompido (*vapX*).

Como relatado acima, até o presente momento foram descritos três tipos de plasmídeo de virulência em *R. equi*, possuindo as seguintes proteínas da família vap: os plasmídeos circulares pVAPA, que é associado a isolados equinos, e codifica *VapA*, *VapC*, *VapD*, *VapE*, *VapG* e *VapH* (Figura 2a); e os pseudogenes *vapF*, *I* e *X*, conforme descrito anteriormente; pVAPB, comumente associado a isolados suínos, e codifica *VapB*, *VapJ*, *VapK1*, *VapK2*, *VapL* e *VapM*; e mais recentemente o pVAPN associados a isolados de ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) e humanos, um plasmídeo linear, que codifica *VapN*, *VapO*, *VapP*, *VapR* e *VapS* e o pseudogene *VapQ* (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Letek *et al.*, 2008; Vázquez-Boland e Meijer, 2019; Ganderton *et al.*, 2023).

Figura 2 - Plasmídeos de virulência em *R. equi*.



(A) Esquema demonstrando transferência do plasmídeo de virulência entre cepas virulentas e avirulentas. No quadro, estão presentes os tipos de plasmídeos identificados em *R. equi* sendo o PVAPA oriundo de equinos e humanos; PVAPB, oriundo de suínos e humanos e PVAPN oriundo de suínos e humanos. Abaixo encontram-se dispostas as proteínas codificadas pelo

PVAPA e uma estrutura tridimensional do vapD. (b) Esquema demonstrando as diferenças na progressão da enfermidade entre cepas de *R. equi* com e sem plasmídeo. Cepas virulentas, ao serem fagocitadas apresentam a capacidade de sobreviver no interior de macrófagos por meio da perturbação das organelas endocíticas, impedindo a queda do pH, levando a uma multiplicação do patógeno no interior das células hospedeiras; enquanto cepas avirulentas (sem a presença do plasmídeo), não apresentam a mesma capacidade, o que acaba por resultar na queda do pH no interior do fagossomo, o que leva à morte da bactéria. Figura criada pelo autor com BioRender®.

Ao sequenciar isolados oriundos de equinos e suínos, Letek *et al.* (2008) observaram que pVAPA e pVAPB são variantes de um mesmo plasmídeo ancestral que diferem na estrutura da ilha de patogenicidade, enquanto o mais recentemente descoberto pVAPN é um plasmídeo linear provavelmente originado de um ancestral comum com pVAPA, apresentando uma estrutura de ilha de patogenicidade específica (Figura 2a) (Valero-Rello *et al.*, 2015; MacArthur *et al.*, 2017). Até o momento não foram encontrados relatos na literatura científica de plasmídeos que são comumente encontrados em uma espécie serem identificados em cepas de *R. equi* isoladas de outra espécie animal, o que indica que o sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel importante na exclusão de plasmídeos não adaptados àquela espécie (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Vázquez-Boland e Meijer, 2019; Ganderton *et al.*, 2023). Diversas análises moleculares já realizadas não foram capazes de estabelecer uma correlação entre o genótipo cromossômial de *R. equi* e o hospedeiro, no entanto, foram capazes de demonstrar a possibilidade de troca ativa dos plasmídeos pVAPA/B/N entre a população de *R. equi*, com uma consequente capacidade de mudança de hospedeiro (Anastasi *et al.*, 2016; MacArthur *et al.*, 2016; MacArthur *et al.*, 2017).

A estrutura desse plasmídeo de virulência compartilha homologia com outros plasmídeos conjugativos encontrados em outras espécies do gênero, no caso em espécies ambientais não patogênicas. Tais plasmídeos, neste último caso são responsáveis pela codificação de vias catabólicas ou de desintoxicação em suas regiões variáveis, que corresponderiam à ilha de patogenicidade em *R. equi*. Em razão dessa forte homologia na estruturação desses plasmídeos, que conferem aos rodococos características metabólicas específicas, acredita-se que a ocorrência de eventos de transferência horizontal de genes constituiu uma parte central na evolução do genoma de *R. equi* incorrendo em processos de ganho/perda de genes permitindo com que a espécie fosse capaz de sobreviver no interior de macrófagos (Letek *et al.* 2010; Anastasi *et al.* 2016).

Contrastando com a sua seletividade para certas espécies animais, os três plasmídeos adaptados ao hospedeiro são comumente encontrados em isolados humanos (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Anastasi *et al.*, 2016). Isto sugere que os animais são a fonte de infecção para as pessoas, o que evidencia o papel de *R. equi* como um patógeno zoonótico (Figura 2a) (Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Vázquez-Boland *et al.*, 2010, 2013).

O mecanismo de ação do plasmídeo de virulência ainda não está totalmente elucidado, porém, sabe-se que *R. equi* é fagocitado por macrófagos alveolares pulmonares e fica contido em um vacúolo interno chamado *vacúolo contendo R. equi* (RCV) em que a bactéria que possui o vapPAI sobrevive e começa a se multiplicar, resultando em necrose da célula hospedeira (Luhrmann *et al.*, 2004; Fernandez-Mora *et al.*, 2005; Sydor *et al.*, 2013; Rofe *et al.*, 2017). Diferentes estudos apontam que na progressão da enfermidade em equinos o *vapA* tem uma importância central, uma vez que, cepas com um plasmídeo mutante sem o gene codificante da proteína não são capazes de sobreviver no interior dos macrófagos e não causam doença (Jain, Bloom e Hondaluz, 2003; Coulson *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2018).

Quanto à função desempenhada pelos genes da família *vap*, nos últimos anos diversos trabalhos buscaram avaliar o papel das principais proteínas da família comumente isoladas de cada espécie animal, especialmente *vapA*, a qual permanece ligada à superfície bacteriana diferente de outros vaps que acabam por ser liberados no lúmen do fagossomo durante a infecção (VapC, -D e -E) (Byrne *et al.*, 2001; Giguère *et al.*, 1999; Jain *et al.*, 2003; Von Bargen *et al.*, 2019; Wright *et al.*, 2018). Rofe *et al.* (2017) demonstraram que a proteína VapA causa perturbação nas organelas endocíticas tardias com organelas endolisossomais inchadas em razão da atividade reduzida da Catepsina B e um acúmulo de LBPA, LC3 e Rab7, o que seria indicativo de uma perda da função endolisossomal, ou seja, perda de endolisossomas funcionais. Von Bargen *et al.* (2019) demonstrou que a proteína VapA participa da exclusão do complexo vacuolar-ATPase bombeador de prótons dos fagossomas e causa a permeabilização da membrana, o que resulta em um fagossomo com pH neutro. Dado que a fusão do lisossomo e a redução do pH é considerado um importante mecanismo bactericida dos macrófagos, essa manutenção do pH neutro permitiria a multiplicação de *R. equi* no RCV (Figura 2b) (Szulc-Dąbrowska *et al.*, 2020).

Enquanto *vapA* desempenha um papel central em cepas isoladas de equinos, esse gene não está presente em infecções naturais de outras espécies suscetíveis. No entanto, outros genes parecem desempenhar uma função semelhante na definição da virulência de cada um dos outros dois tipos de plasmídeos já identificados (Ganderton *et al.*, 2023). Willingham-

Lane, Coulson e Hondalus (2018) observaram que em isolados portadores de pVAPB, os genes *vapK1* e *vapK2*, que diferem apenas em um aminoácido, são essenciais para a virulência em suínos. Além disso, nesse mesmo estudo foi observado que após a inserção das proteínas VapK em um plasmídeo pVAPA onde a proteína VapA havia sido removida, e por consequência sua virulência atenuada, proteínas VapK do plasmídeo do tipo pVAPB poderiam restaurar a capacidade de replicação da cepa pVAPA modificada. Já no plasmídeo pVAPN, o gene *vapN* é que desempenha um papel central na virulência da cepa (Letek *et al.*, 2008; Willingham-Lane, Coulson e Hondalus., 2018; Ganderton *et al.*, 2023).

Ainda no que diz respeito ao papel central que uma determinada proteína parece desempenhar na virulência, recentemente Ganderton *et al.* (2023) em uma análise molecular envolvendo edição de plasmídeos, observaram que as proteínas VapA, VapK e VapN neutralizaram o pH lisossomal e reduziram a atividade da hidrolase lisossomal, também sendo observada em menor grau em *vapB*. Além disso, observaram também que uma perda de virulência da cepa mediante deleção do gene *vapA* poderia ser recuperada pela inserção dos genes *vapK* ou *vapN*. Eles observaram também que cada proteína específica apresentou uma atividade diferencial entre si, com a maior atividade neutralizadora encontrada em *VapN*, depois *VapA* e *K* e, finalmente, *VapB*. Dessa forma, demonstrou-se que a produção de *VapA* pode ser substituída por *vapK* e *B* ou *vapN*, conseqüentemente, os mecanismos moleculares que *vapA* utiliza para neutralizar a acidez lisossomal também devem ser vistos em *vapN* e *K*.

Ainda não está esclarecido se cinco genes *Vap* restantes (*vapC*, *vapD*, *vapE*, *vapG* e *vapH*) desempenham algum papel no parasitismo de macrófagos (Coulson *et al.*, 2015; Rakowska *et al.*, 2020). No entanto, apenas a presença de *vapA* não seria suficiente para o desenvolvimento da enfermidade nos animais acometidos, uma vez que outros genes presentes no plasmídeo também revelaram ser importantes no processo patogênico. Coulson *et al.* (2015) em seu trabalho revelaram que além de *vapA*, os genes *virR* e *virS* que estão presentes no operon *VirR*, que integra os genes já referidos além de *vapH*, *icgA* e *orf7*, são capazes de alterar a expressão de genes cromossomais envolvidos no desenvolvimento da infecção os quais atuam em processos de transporte, produção de energia e metabolismo celular, permitindo que a bactéria cresça no ambiente hostil da célula hospedeira. Outro gene presente no plasmídeo também está envolvido na adaptação da bactéria ao ambiente intracelular, o gene *icgA* que codifica uma proteína de transporte, que, quando da sua expressão, reduz a taxa de crescimento intracelular de *R. equi*, resultando em aumento da

viabilidade dos macrófagos, permitindo que o patógeno residir mais tempo em macrófagos, sem causar sua morte por necrose (Wang *et al.*, 2014).

### 3.3.3 Regulação dos genes da ilha de patogenicidade e perda e reaquisição dos plasmídeos

Diferentes estudos analisando plasmídeos de virulência identificaram que expressão não é uniforme e constante, tal como o esperado, e se adapta de acordo com o habitat em que o microrganismo se encontra. Byrne *et al.* (2007) observaram em seu trabalho que os genes de virulência plasmidial são fracamente expressos numa temperatura de 30°C e a pH 8,0, o que simularia as condições ambientais presentes no modo de vida saprofítico do patógeno. No entanto, possuem um pico de atividade na temperatura de 37–38°C com o pH a 6,5. O principal efeito na expressão do plasmídeo de *R. equi* parece ser exercido pela temperatura e pensa-se que estas condições seriam análogas às vias de sinalização ativadas pelo patógeno durante a sua transição do modo de vida ambiental para o intracelular. Benoit *et al.* (2002) observaram em um ensaio realizado com suspensão de culturas em peróxido de hidrogênio, que *R. equi* em comparação com outras bactérias, mostrou uma resistência excepcionalmente elevada, resultando em um aumento significativo da transcrição dos genes *vap*, especificamente *vapA*, *vapD* e *vapG*, que reproduz o estresse oxidativo dentro dos macrófagos ativados. Como mencionado acima, dois genes reguladores codificados no operon *vir* do PAI, *virR* e *virS*, são importantes para a expressão do gene de virulência *vap* PAI, mas ainda não está muito bem esclarecido se e como eles contribuem para a modulação exercida, pelas alterações de temperatura, pH e estresse oxidativo (PRESCOTT *et al.*, 2022). Outro fator que parece ativar a expressão de proteínas da família *vap* é o baixo teor de ferro livre, um sinal conhecido como “assinatura do hospedeiro” no controle da virulência bacteriana (Ren e Prescott 2003; Prescott *et al.*, 2022).

Takai *et al.* (1994) observaram que ao realizar diversas passagens de cepas positivas para o plasmídeo de virulência, incubadas a 37°C ocorreu uma atenuação destas que foram originalmente isoladas de infecções pulmonares de potros. Outro dado importante é que em estudos analisando a prevalência de *R. equi* no ambiente de criação, cepas isoladas do solo apresentam índices positivos muito menores em relação à prevalência que aqueles observados em cepas isoladas de animais, especialmente animais enfermos (Madrigal, 2016; Gressler 2018; Witkowski, 2019; Takai *et al.*, 2022). Essas observações indicam que plasmídeo de virulência de *R. equi* é facilmente perdido na ausência de seleção do hospedeiro além de que,

certos fatores como temperatura e pH desempenham um importante papel na preservação da virulência das cepas isoladas (Takai *et al.*, 1994; Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Vázquez-Boland e Meijer, 2019). Em contrapartida, o plasmídeo parece ser facilmente readquirido via conjugação, segundo o observado no trabalho de Tripathi *et al.* (2012), onde as evidências apontaram que o plasmídeo de virulência poderia ser transferido de cepas positivas de *R. equi* (doadoras) para cepas de *R. equi* livres de plasmídeo (receptoras) em uma alta frequência e que a transmissão do plasmídeo restabeleceu a capacidade de crescimento intracelular em macrófagos. No que concerne aos mecanismos moleculares dessa capacidade de reaquisição, os pesquisadores observaram que o gene *traA*, que codifica uma relaxase do tipo MOBf (TrwC) presente no vapPAI possui papel central, uma vez que a deleção desse gene aboliu a transferência do plasmídeo, enquanto a reversão da mutação restaurou a transmissibilidade do plasmídeo (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009; Tripathi *et al.*, 2012).

Dessa forma, as evidências indicam a existência de um processo dinâmico em que onde as cepas ao infectar um hospedeiro suscetível têm um estímulo muito grande à expressão do vapPAI ocasionando uma sobrecarga e, na ausência de seleção positiva mediada pelo hospedeiro, o plasmídeo é perdido (Takai *et al.*, 1994; Ocampo-Sosa *et al.*, 2007; Vázquez-Boland *et al.*, 2013) e um vez no ambiente, onde predominam cepas sem plasmídeo, esse pode ser facilmente readquirido através do processo de conjugação, permitindo a adaptação à vida saprófita no ambiente e parasítica de diferentes hospedeiros animais (Tripathi *et al.*, 2012; Alvarez-Narvaez e Sanchez, 2023).

### **3.3.4 Plasmídeo pVAPA – subtipos e prevalência**

Diversos estudos epidemiológicos ao redor do mundo, empregando a técnica de enzimas de restrição, observaram que os plasmídeos pVAPA isolados de cepas virulentas apresentavam padrões de digestão diferentes entre si, bem como diferentes tamanhos. Em razão disso, os plasmídeos foram classificados em tipos e subtipos, de acordo com o seu tamanho e padrão de digestão. Atualmente foram encontrados 14 subtipos distintos de pVAPA, que parecem possuir uma prevalência determinada geograficamente (Ribeiro *et al.*, 2005; Takai *et al.*, 2023). O quadro 1 elenca os subtipos de plasmídeos já isolados, bem como suas fontes, autores e ano de publicação.



ocorrência de 23 tipos de plasmídeos em cepas virulentas de *R. equi* positivas para pVAPB, de origem não-equina isoladas de humanos, suínos e javalis (MAKRAI *et al.*; 2002; MAKRAI *et al.*, 2008).

Quanto à pesquisa molecular de plasmídeos de virulência em *R. equi*, Ocampo-Sosa *et al.* (2007) sugeriram o sistema de tipagem “TRAVAP”, baseado em PCR baseado em 3 marcadores genéticos presentes no pVAP: *traA*, *vapA* e *vapB*. Nesse esquema, as cepas são classificadas em 4 categorias:  $traA^+/vapA^+B^-$ ,  $traA^+/vapA^-B^+$ ,  $traA^+/vapAB^-$  e  $traA^-/vapAB^-$ . Esse trabalho ao analisar mais de 200 isolados de *R. equi* identificou um tropismo aparente de *vapA* em equinos, sendo o tipo  $traA^+/vapA^+B^-$  mais comum observado na espécie, *vapB* em suínos, sendo o tipo  $traA^+/vapA^-B^+$  mais encontrado e em bovinos o tipo  $traA^+/vapAB^-$  mais encontrado, os autores não citaram o *vapN*, pois esse gene ainda não havia sido sequenciado quando da elaboração do artigo (Valero-Rello *et al.*, 2015).

### 3.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Assim como outros actinomicetos, *R. equi* é um patógeno intracelular. Em razão disso, o tratamento da enfermidade apresenta desafios específicos que merecem atenção. Vários princípios ativos antimicrobianos demonstraram possuir atividade inibitória frente a cepas de *R. equi* em estudos realizados *in vitro*, no entanto, quando estes testes passam a ser realizados *in vivo* as taxas de efetividades não são consideradas altas o suficiente e portanto, esses princípios ativos passam a não ser adequados ao tratamento (Giguère, 2017; Rakowska *et al.*, 2020). As razões pelas quais esse fenômeno ocorre envolvem devem-se à baixa capacidade de captação ou penetração celular e nas lesões piogranulomatosas, onde as células permanecem quiescentes e viáveis, levando à persistência da infecção (Vázquez-Boland *et al.*, 2013). Além disso, *R. equi* também apresenta resistência intrínseca a diversos princípios ativos, assim como outras espécies do gênero, em razão de apresentar um ciclo de vida ambiental e telúrico. Letek *et al.* (2010) observaram que *R. equi* 103S possui uma série de determinantes de resistência a antibióticos, incluindo aminoglicosídeos fosfotransferases, 10  $\beta$ -lactamases e quatro sistemas de efluxo multidrogas. Com exceção de um gene HGT, todos esses genes são intrínsecos, ou seja, ocorrem naturalmente, em vez de aquisições recentes associadas a antibioticoterapia médica. Aliado ao fato de que alguns princípios ativos só podem ser destinados ao tratamento humano, as opções de princípios ativos na antibioticoterapia da rodococose equina acabam sendo limitadas (Giguère *et al.*, 2017; Mercer e Davis, 2019;

Rakowska *et al.*, 2020; Bordin *et al.*, 2022)

Desde o sucesso na sua aplicação a partir na década de 1980 e no início de 2000, a antibioticoterapia mais comumente empregada no tratamento da rodococose equina em potros consiste na combinação de dois princípios ativos: um macrolídeo associado à rifampicina (McCracken e Slovis, 2009) (Quadro 2). Uma medida profilática implementada pela primeira vez nos Estados Unidos no início dos anos 2000, a antibioticoterapia preventiva mediante exame ultrassonográfico em potros que apresentem alguma evidência de lesão abscedativa pulmonar, visa reduzir as taxas de letalidade e evitar a progressão da enfermidade em propriedades endêmicas (Huber *et al.*, 2018b; Álvarez-Narváez *et al.*, 2021). No entanto, como observado, a maioria dos animais que apresentam alguma lesão não chega a desenvolver a forma clínica da enfermidade, apresentando uma resolução do quadro sem necessidade de tratamento (Huber *et al.*, 2018b). Além disso, Venner *et al.* (2013), em um estudo analisando a eficácia do tratamento antimicrobiano generalizado de potros com abscessos pulmonares subclínicos demonstraram que esse método foi ineficaz na redução da incidência de pneumonia.

**Quadro 2.** Protocolos terapêuticos mais comumente utilizados no tratamento da rodococose equina.

Princípio ativo	Dose	Duração recomendada
<b>Rifampicina</b>	5mg/kg, via oral, 2x ao dia	4–9 semanas
<b>Eritromicina</b>	25mg/kg, via oral, 3x ao dia	
<b>Rifampicina</b>	5mg/kg, via oral, 2x ao dia	3–12 semanas
<b>Clarithromicina</b>	7.5 mg/kg via oral, 2x ao dia	
<b>Rifampicina</b>	10mg/kg, via oral, 1x ao dia	6 semanas
<b>Azitromicina</b>	10mg/kg, via oral, 1x ao dia	
<b>Doxiciclina apenas</b>	10mg/kg, via oral, 2x ao dia	6 semanas
<b>Doxiciclina</b>	10mg/kg, via oral, 2x ao dia	6 semanas
<b>Azitromicina</b>	5mg/kg, via oral, 1x ao dia	
<b>Tulatromicina apenas</b>	2.5mg/kg, intramuscular, 1x por semana	6 semanas
<b>Gamitromicina apenas</b>	6mg/kg, intramuscular, 1x por semana	6 semanas

FONTE: adaptado de Rakowska *et al.* (2020).

Apesar de comum, essa prática vem sendo desencorajada em razão de sua associação com o desenvolvimento de cepas de *R. equi* multirresistentes (MRRE) (Huber *et al.*, 2019; Álvarez-Narváez *et al.*, 2020; Álvarez-Narváez *et al.*, 2021). Álvarez-Narváez *et al.* (2020) realizaram um estudo de análise do microbioma fecal e resistoma de potros com pneumonia subclínica por *R. equi* tratados com a associação de macrolídeo e rifampicina (MR) ou

maltolato de gálio (MaG). No trabalho, os autores relataram que o tratamento com MR aumentou em quantidade e diversidade de genes associados à resistência antimicrobiana nas fezes dos animais tratados, além de diminuir significativamente a abundância e diversidade da microbiota fecal. Dessa forma o trabalho demonstrou que o uso generalizado de macrolídeos e rifampicina em fazendas de cavalos resulta na propagação da resistência aos macrolídeos não só em *R. equi*, como também em microrganismos comensais, os quais acabam por ser eliminados no ambiente, onde podem persistir e potencialmente infectar ou colonizar cavalos e outros animais.

Um importante trabalho sobre a prevalência da resistência antimicrobiana em *R. equi* é o desenvolvido por Huber *et al.* (2019), realizado em isolados obtidos de potros apresentando sintomatologia clínica no estado de Kentucky, EUA entre 1995 e 2017, no qual os autores observaram que a prevalência de *R. equi* resistente à meticilina (MRRE) aumentou significativamente com o passar dos anos. O estudo avaliou o perfil de susceptibilidade *in vitro* à eritromicina para 2.169 isolados, e rifampicina em 1.688 isolados. Observou-se que entre 1995 e 2006, a proporção de isolados resistentes de *R. equi* foi de 0,7% para eritromicina e 2,3% para rifampicina entanto que entre 2007 e 2017, a prevalência foi de 13,6% e 16,1% respectivamente.

No entanto, em outros países a prevalência de MRRE parece ser menor que aquelas encontradas nos EUA. Duchesne *et al.* (2019) analisaram a evolução da suscetibilidade antimicrobiana de patógenos equinos isolados de amostras clínicas de 2006 a 2016, e observaram que a prevalência da resistência a macrolídeos e a rifampicina em *R. equi* não mostrou tendências de aumento durante o período estudado, estando entre 0 e 13% e 0 e 9%, respectivamente. No Brasil, Girardini *et. al* (2013) analisaram o perfil de resistência antimicrobiana de 67 isolados de *R. equi* de oriundos de amostras clínicas de equinos, humanos e ambientais provenientes do Rio Grande do Sul e do Rio de Janeiro, e foi observado que as amostras clínicas de equinos apresentaram as maiores taxas de resistência à penicilina (86,7%) e lincomicina (30%), no entanto, apresentaram índices de resistência baixos para claritromicina (3,3%), eritromicina (6%) e azitromicina (6,7%). , um trabalho posterior realizado em isolados provenientes de amostras clínicas (n=15), de solo (n=15), de fezes (n=9) e de instalações (n=5), coletados em fazendas de criação de equinos, no Rio Grande do Sul, Brasil, entre 1991 e 2013 relatou que todos os isolados apresentaram um perfil de sensibilidade à azitromicina e claritromicina; no entanto, 27% (12/44) apresentaram sensibilidade intermediária à eritromicina (Gressler *et al.*, 2014a).

O desenvolvimento da resistência antimicrobiana aos macrolídeos em *R. equi* assim como em outros microrganismos Gram-positivos pode ocorrer através de dois mecanismos principais, via alteração conformacional do sítio-alvo de ligação do princípio ativo através da metilação do do rRNA; ou através da taxa de depuração aumentada por meio de efluxo ativo (Anastasi *et al.*, 2015). A maioria dos genes de resistência aos macrolídeos encontram-se associados a elementos genéticos móveis, como plasmídeos, possuindo a capacidade de se espalhar entre estirpes, espécies e o ecossistema bacteriano (Anastasi *et al.*, 2015).

A metilação do rRNA, é catalisada meio de enzimas metiltransferases codificadas por genes da metilase resistente à eritromicina (*erm*), o qual, resulta em resistência cruzada aos macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) em razão de compartilharem locais de ligação sobrepostos na subunidade 50S do ribossomo, enquanto a linezolida se liga à subunidade ribossômica 50S (Skinner, Cundliffe, e Schmidt, 1983; Poehlsgaard, Douthwaite, 2005; Anastasi *et al.*, 2015). As enzimas *erm* diferem conforme adicionam um ou dois grupos metil à posição N6 do nucleotídeo A2058 no rRNA (Poehlsgaard, Douthwaite, 2005).

No caso de *R. equi*, Anastasi *et al.* (2015) realizaram a primeira caracterização molecular da resistência a MLSB nessa espécie, ao identificar o gene *erm(46)* como responsável pela resistência nas cepas estudadas, presente em um plasmídeo extracromossomal conjugativo conhecido como pRErm46. Observou-se também no mesmo estudo que a transferência e expressão do gene para uma cepa de *R. equi* previamente sensível a MLSB induziu à resistência a esses princípios ativos, mas não a outras classes de agentes antimicrobianos. Identificou-se que gene *erm(46)* faz parte de um elemento transponível de 6,9kb, denominado *TnRErm46*, que é transportado pelo plasmídeo de resistência conjugativa pRErm46 (Álvarez-Narváez *et al.*, 2019). Esse plasmídeo demonstrou capacidade de transferência via conjugação para cepas de *R. equi* suscetíveis a MLSB, apresentando altas frequências de transferência variando de  $3 \times 10^{-3}$  a  $1 \times 10^{-2}$  (Anastasi *et al.*, 2015). Além da capacidade de transferência horizontal a cepas de *R. equi* sensíveis, Álvarez-Narváez *et al.* (2020) demonstraram através de experimentos *in vitro* que o plasmídeo demonstrou ser capaz de ser transferido via conjugação a diferentes membros do gênero *Rhodococcus*, bem como bactérias dos gêneros *Nocardia* e *Arthrobacter* spp. em frequências consideravelmente altas. Os autores observaram também que o pRErm46 também foi capaz de ser transferido horizontalmente em experimentos de conjugação em solo e esterco equino, em frequências mais baixas que as observadas entre cepas *in vitro* após incubação prolongada em uma faixa de temperatura de 22 a 30°C, mas não a 37°C, demonstrando a potencialidade de transmissão

do plasmídeo no ambiente de criação dos cavalos. Além disso, as cepas conjugadas foram capazes de transferir de volta o plasmídeo de resistência a *R. equi* (Álvarez-Narváez *et al.*, 2020).

Outro fator importante acerca do *TnRErm46* é que há evidências da presença de múltiplas cópias do plasmídeo nos genomas de cepas MRRE, inclusive no plasmídeo de virulência pVAPA, o que aumenta o risco do gene de resistência antimicrobiana ser transferido horizontalmente, uma vez que o processo de perda e reaquisição do plasmídeo de virulência é facilmente readquirido por cepas de *R. equi* como demonstrado acima (Álvarez-Narváez *et al.*, 2019; Vázquez-Boland e Meijer, 2019; Álvarez-Narváez *et al.*, 2021). Tais achados evidenciam o grande potencial de risco que a disseminação de cepas de MRRE tem em razão de sua capacidade de disseminação horizontal, associada à perda e reaquisição dos plasmídeos de virulência, além disso, sua capacidade de ser transmitida a microrganismos ambientais, os que poderiam atuar como reservatórios para o gene de resistência no meio ambiente, possuindo a capacidade de transmiti-lo a cepas de *R. equi* sensíveis. Dessa forma torna-se claro a potencialidade do impacto grave que a disseminação do *erm(46)* possui na rodococose equina e nas medidas profiláticas (Álvarez-Narváez *et al.*, 2021).

Outro mecanismo envolvido na resistência às drogas comumente utilizadas no tratamento da rodococose equina, o efluxo de agentes antimicrobianos macrólidos é mediado através de bombas de efluxo (EP) (Roberts, 2008; Anastasi *et al.*, 2015; Rampacci *et al.*, 2021). Essas proteínas dependentes de ATP são responsáveis por bombear os agentes antimicrobianos para fora da célula ou da membrana celular, diminuindo a concentração no princípio ativo no citoplasma, reduzindo assim a taxa de ligação deste com os ribossomos bacterianos, permitindo com que sua função seja preservada (Anastasi *et al.*, 2015). Assim como outros microrganismos resistentes, a célula rodocócica poderia ser capaz de expulsar antimicrobianos através das EP, no entanto, os mecanismos de resistência ao efluxo ainda não foram completamente descritos (Rampacci *et al.*, 2021). O primeiro relato da expressão do mecanismo de efluxo em *R. equi*, codificado através do gene *req\_39680*, foi realizado por Gressler *et al.*, (2014)b, sendo observada a expressão fenotípica do mecanismo de efluxo em 20% dos isolados utilizando brometo de etídio (EtBr). Recentemente, um trabalho realizado por Rampacci *et al.* (2021) trouxe um maior entendimento acerca dos mecanismos de efluxo em *R. equi*. O trabalho em questão realizou a criação de uma nova cepa (EtBr25) a partir do *R. equi* ATCC 33701 por meio do estímulo com concentrações crescentes de EtBr, conhecido intercalante de DNA que é tóxico a nível celular (Couto *et al.*, 2008). A partir dessa nova

cepa, os autores relataram que *R. equi* EtBr25 mostrou um aumento da tolerância ao EtBr e nas concentrações inibitórias mínimas (MIC) de azitromicina e ciprofloxacina quatro vezes maiores que os MICs de *R. equi* ATCC 33701, no entanto, as combinações de azitromicina/rifampicina ou a rifampicina isoladamente pareceram ser afetadas pelo aumento do efluxo observado na cepa mutante. No entanto esse aumento observado nas MICs e a suscetibilidade ao EtBr foram revertidos através da administração dos antibióticos associados a inibidores da bomba de efluxo (EPI) (Rampacci *et al.*, 2021). Dessa forma, o trabalho pôde demonstrar a ocorrência do mecanismo de depuração de macrolídeos através de EP, evidenciando que esse mecanismo, ainda que menos importante que o primeiro, pode desempenhar um papel no surgimento de MRRE.

Quanto aos métodos de pesquisa sobre a resistência antimicrobiana em *R. equi*, os mais comumente utilizados são o teste de microdiluição (MD) em caldo e o teste de disco-difusão (DD) (Da Silva e Silva, 2023). O teste de microdiluição é definido pelas diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2018) contidas no documento M24: *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*. Contudo, atualmente não existem critérios de limite aprovados para testes de suscetibilidade de *R. equi* em isolados de equinos, a interpretação comumente é feita a partir de critérios interpretativos humanos baseados em MIC (Erol *et al.*, 2021). Quanto ao método DD, não há até o presente momento uma padronização dos testes de sensibilidade para *Rhodococcus equi* adotando esse método. No entanto, diversos trabalhos adotaram seguiram os critérios de interpretação aceitos para *Staphylococcus aureus* (Kedlaya, Ing e Wong, 2001; Silva *et al.*, 2010; Giguère *et al.*, 2010; Girardini *et al.*, 2013; Berghaus *et al.*, 2015). Berghaus *et al.* (2015) realizou um trabalho comparando os métodos: E-test, DD e MD, no qual observou-se uma concordância entre as categorias de “suscetível”, “intermediário” e “resistente” que variou entre 85,1 e 100%.

### 3.5 FORMAÇÃO DE BIOFILME

As bactérias podem apresentar duas formas de vida na natureza, na forma planctônica ou agregada. Na primeira, as bactérias estão dispostas no ambiente na forma células únicas, independentes e flutuantes. Já na segunda, os microrganismos estão organizados em agregados microbianos denominados biofilmes (Sauer *et al.*, 2022). O biofilme pode ser definido como um agregado de células bacterianas fixadas a uma superfície e revestidas

por uma matriz polimérica (Costerton *et al.*, 1999; Tremblay, Hathroubi, Jacques, 2014). Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) (2012) (Vert, 2012), o biofilme pode ser definido como um agregado de microrganismos nos quais células que estão frequentemente incorporadas em uma matriz autoproduzida de substância polimérica extracelular (EPS) aderem umas às outras e/ou a uma superfície. Quanto à superfície de adesão, as bactérias podem aderir facilmente a uma superfície biótica ou abiótica (Tremblay, Hathroubi, Jacques, 2014).

Ao que indicam as evidências, a formação de biofilme é uma característica antiga de organismos procarióticos, uma vez que existem evidências de formação de biofilme no início do registro fóssil em ambientes hidrotermais datados em 3,3 a 3,4 bilhões de anos de idade (Hall-Stoodley, Costerton, e Stoodley, 2004). Tal surgimento, tão antigo no processo evolutivo bacteriano e sua conservação, observada em diversas cepas bacterianas atuais, indica a importância que o biofilme tem como mecanismo de proteção de colônias. Essa importância se traduz nos possíveis papéis desempenhados por essa estrutura, tal como homeostase frente às condições extremas e adversas do ecossistema primitivo (temperaturas extremas, pH e exposição à luz ultravioleta (UV)), permitindo às cepas dotadas dessa capacidade de produção, o desenvolvimento de interações complexas entre células e estabelecendo um microambiente favorável ao desenvolvimento de vias de sinalização e motilidade quimiotática observado em diversas espécies bacterianas atuais (Hall-Stoodley, Costerton, e Stoodley, 2004).

A capacidade de sinalização que as células bacterianas formadoras de biofilme possuem é um fator central uma vez que o biofilme apresenta estruturas tridimensionais complexas e variáveis de acordo com as características do ambiente no qual este se forma. Em razão disso observou-se que bactérias presentes na estrutura demonstram um comportamento coordenado. Além de que, o biofilme frequentemente constitui-se como uma comunidade bacteriana funcionalmente heterogênea em condições ambientais (Stoodley *et al.*, 2002; Hall-Stoodley, Costerton, e Stoodley, 2004; Hall-Stoodley e Stoodley, 2009). Essa sinalização é o que permite que as bactérias respondam fenotipicamente ao seu ambiente através da detecção e sinalização às demais. Em razão desse mecanismo, diversos outros estão presentes e permitem essa heterogeneidade tridimensional e química, além da capacidade de avaliação densidade celular, denominada *quorum sensing*, que desempenha um papel importante nos mecanismos de dispersão celular e produção de fatores de virulência (Sauer *et al.*, 2002; Fux,

Wilson e Stoodley, 2004; Hall-Stoodley, Costerton, e Stoodley, 2004; Jensen *et al.*, 2007; Hall-Stoodley e Stoodley, 2009).

Embora a produção de biofilme seja uma característica antiga, o primeiro estudo sobre a existência dessa estrutura foi o realizado por Marrie, Nelligan e Costerton (1982). Curiosamente, o primeiro relato da formação de biofilmes também é o primeiro relato da capacidade de produção deste por bactérias patogênicas. Nesse caso específico, o biofilme estava presente no eletrodo do marca-passo em um paciente que sofria de bacteremia recorrente, causada por *Staphylococcus aureus* (Marrie, Nelligan e Costerton, 1982; Sauer *et al.*, 2022).

Desde então, os biofilmes foram identificados em uma variedade de infecções, desde a presença em catéteres a infecções crônicas, como as observadas na fibrose cística, periodontite e inflamações recorrentes em próteses ósseas e tecidos adjacentes (Hall-Stoodley, Costerton, e Stoodley, 2004; Hall-Stoodley, e Stoodley, 2009; Sauer *et al.*, 2022). Diversos agente etiológicos associados a infecções crônicas foram já isolados, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* na pneumonia por fibrose cística, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* na otite média crônica, *Staphylococcus aureus* na rinosinusite crônica e *Escherichia coli* enteropatogênica em infecções recorrentes do trato urinário (Hall-Stoodley, e Stoodley, 2009).

A complexidade metabólica e estrutural do biofilme ocasiona diversas características presentes em quadros infecciosos dessa natureza. A característica mais marcante em infecções onde há a presença de biofilme é a resistência aumentada aos compostos antimicrobianos e persistência da infecção apesar da resposta imune continuada do hospedeiro (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Lenz *et al.*, 2008; Sauer *et al.*, 2022). Estima-se que, devido ao processo de tolerância que agentes bacterianos possuem em biofilmes concentrações de até 1.000 vezes mais seriam necessárias à inibição desses agentes do que outros da mesma espécie apresentando-se na sua forma planctônica (Costerton *et al.*, 1999; Mah e O'Toole, 2001).

Foram observados alguns fatores que podem levar ao aumento da resistência aos antimicrobianos no biofilme. Demonstrou-se a possível presença de zonas anóxicas e ácidas no interior dos aglomerados de biofilme em virtude do desenvolvimento de gradientes (de Beer e Stoodley, 1995; de Beer Stoodley e Lewandowski., 1997; Stoodley *et al.*, 2008), as quais, em razão da relativa baixa concentração de nutrientes pode resultar em um estado de dormência semelhante a uma fase estacionária dentro do biofilme, o que poderia ocasionar a resistência geral dos biofilmes aos antibióticos (Walters *et al.*, 2003; Fux *et al.*, 2004;

Hall-Stoodley, e Stoodley, 2009). Além disso, a matriz, predominantemente formada por EPS, poderia retardar a capacidade e velocidade de penetração dos princípios ativos até as partes mais internas da estrutura, possibilitando a indução de genes de resistência nas células localizadas mais internamente (Jefferson *et al.*, 2005). Outro fator apontado por Hall-Stoodley, e Stoodley (2009) seria a possibilidade de ligação e/ou desativação dos princípios ativos por polímeros e enzimas degradadoras presentes na matriz (Walters *et al.*, 2003; Bagge *et al.*, 2004).

Diversos estudos buscaram identificar genes ou fatores responsáveis pela capacidade de formação de biofilme por cepas bacterianas, através de cepas mutantes *knock out*. No entanto, observou-se que a formação de biofilme não é dependente de um único gene, sendo um mecanismo que apresenta redundância das vias envolvidas. Identificou-se que genes responsáveis pela regulação ou expressão de proteínas de adesão à superfície, pili e flagelos e especialmente os envolvidos com a produção de EPS seriam importantes na manifestação da capacidade de produção (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Letek *et al.* (2010) ao realizarem o sequenciamento genômico de *R. equi*, observaram a presença de uma ilha genômica contendo genes potencialmente responsáveis pela síntese extracelular de polissacarídeos (EPS). Como visto acima, a presença de EPS é um fator importante na capacidade de formação de biofilme (Donlan & Costerton 2002), o que levantou a possibilidade de que, assim como outras bactérias pudesse ser capaz de formar biofilmes (Gressler *et al.*, 2015a). A capacidade de formação de biofilmes por *R. equi* foi relatada pela primeira vez por Akhrass *et al.* (2012), que identificaram que cepas de *R. equi* foram capazes de formar biofilmes na superfície de cateteres de poliuretano em pacientes humanos internados. Após a descoberta da formação de biofilme por cepas de *R. equi* em humanos, outros autores relataram a formação de biofilme de cepas isoladas de equinos apresentando quadro clínico, de fezes de animais e do solo (Remuzgo-Martínez *et al.* 2013; Gressler *et al.*, 2015; Bujold, Lani e Sanz, 2019; Rampacci *et al.*, 2019). Gressler *et al.* (2015) avaliando amostras obtidas de cavalos na região Sul do país, observou que 80,5% dos isolados de amostras fecais e 63% dos isolados de amostras obtidas *post-mortem* de animais acometidos foram positivos para formação de biofilme.

Pouco se sabe ainda sobre a patogenia da forma de vida sésil de *R. equi* no hospedeiro. No entanto, Orme (2014) observou que células micobacterianas, podem ser capazes de aderir ao epitélio alveolar pulmonar após sua entrada no sistema respiratório, e então desenvolver parte de seu ciclo como um patógeno extracelular aderido ao parênquima,

ao invés de serem fagocitados. Nesse sentido, observou-se que dentro de granulomas primários nos pulmões de porquinhos-da-índia experimentalmente infectados com *M. tuberculosis*, foi observada uma borda acelular adjacente à borda da necrose central mineralizante contendo bactérias tolerantes a medicamentos em microcolônias com características semelhantes a biofilmes (Lenaerts *et al.*, 2007). Além disso, constatou-se que o biofilme, formado por micobactérias que contêm uma matriz extracelular rica em ácidos micólicos livres, abriga uma população tolerante a medicamentos (Ojha *et al.*, 2008) a qual poderia ser responsável pela doença reativação (Rampacci *et al.*, 2019). O agente etiológico da rodococose equina pode apresentar um mecanismo semelhante, uma vez que Rampacci *et al.* (2019) observaram em seu estudo que os isolados clínicos de *R. equi* parecem ser capazes de aderir ao epitélio pulmonar de uma maneira comparável à de cepas de *Staphylococcus aureus*.

O aumento da tolerância a antibióticos presente nos biofilmes também é visto nos formados por *R. equi*. Gressler *et al.* (2015) testaram três antimicrobianos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) em concentrações pelo menos 4 vezes maiores que as concentrações inibitórias mínimas (MICs) de cada um deles e observaram que estes não foram capazes de erradicar *R. equi* no biofilme mesmo em concentrações mais elevadas. No que se refere à formação de biofilme e tratamento, Rampacci *et al.* (2019) observaram que, rodococos tratados preventivamente com antibióticos de escolha para tratamento da rodococose produziram uma massa de biofilme inversamente proporcional à concentração de azitromicina. Observaram também que o tratamento de biofilmes pré-formados com azitromicina produziu maior inibição e dissolução a longo prazo dos biofilmes de *R. equi* do que a rifampicina, sendo o efeito anti-biofilme aumentado quando da terapia combinada de ambos. No entanto, também foi observado um aumento na resistência aos antimicrobianos, uma vez que o aumento das concentrações MIC dos medicamentos em dez vezes, sozinhos ou em combinação, não foi capaz de erradicar completamente os biofilmes pré-formados de *R. equi*.

Outros fatores também parecem influenciar na formação do biofilme em *R. equi*. Bujold, Lani e Sanz (2019) em um estudo com 12 cepas de alta e baixa taxa de passagem (incluindo as cepas 103+; 103S portanto um plasmídeo *green fluorescent protein* (GFP); ATCC 33701 e ATCC 33701 sem o plasmídeo PVAPA) de *R. equi*, embora houvesse diferença nas velocidades de crescimento e tamanho de colônias entre os dois tipos de cepas, os autores observaram que todas elas foram positivas para a formação de biofilme. Ademais, relatou-se

que a perda do VAP não afetou a taxa de formação de biofilme de 33701, indicando que a maioria dos genes associados ao biofilme são de fato codificados cromossomicamente e não por meio de plasmídeo. No entanto, foi relatado que a adição de glicose aumentou a formação de biofilme em amostras fecais, mas não em amostras clínicas (Gressler *et al.*, 2015), o que pode ser aplicado em testes de formação de biofilme em cepas isoladas de casos clínicos. Apesar da baixa quantidade de trabalhos analisando a formação de biofilme em *R. equi*, os dados até o momento disponíveis indicam que, tal como ocorre em outras bactérias patogênicas, cepas que possuem essa capacidade representam um grande desafio para o tratamento da rodococose nos hospedeiros acometidos. Os resultados dos trabalhos consultados corroboram com a possibilidade que a produção de biofilme desempenha um papel importante no desenvolvimento de um sistema de tolerância a antibióticos no agente etiológico, dessa maneira persistindo de forma quiescente e, eventualmente, contribuindo a uma cronicidade do quadro infeccioso.

### 3.6 *Rhodococcus equi* – SUA PRESENÇA E PESQUISA NO NORDESTE

Segundo dados do IBGE (2022) a região Nordeste do Brasil possui mais de 1.340.000 equinos, o que corresponde a cerca de 23% de todo o rebanho nacional. A criação de equinos na região movimenta recursos econômicos importantes, além de estar atrelada a manifestações culturais e históricas. Um grande exemplo disso é a vaquejada, presente na região desde o século XVIII (Lima, 2006), que atualmente movimenta mais de R\$ 164 milhões por ano e emprega permanentemente 1.430 pessoas (Lima, 2016; Torres *et al.*, 2020). Em razão do tamanho do rebanho e da atividade econômica envolvida na criação dos animais, a ocorrência de enfermidades ocasiona prejuízo econômico aos criadores e risco aos tratadores, no caso de zoonoses.

Dentre as enfermidades de equinos, as doenças infecciosas que envolvem o sistema respiratório estão entre as patologias mais comuns encontradas em cavalos (Espíndola *et al.*, 2022). No Brasil, existem diversas pesquisas acerca da rodococose e seu agente etiológico. Contudo, a grande maioria se concentra nas regiões Sul e Sudeste do país (Monego *et al.*, 2009; Gressler *et al.*, 2015a; Gressler *et al.*, 2015b; Oliveira *et al.*, 2019; Espíndola *et al.*, 2022; Silveira *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2005). Inclusive, com descobertas importantes acerca da virulência, como a descoberta do subtipo 87kb III (Ribeiro *et al.*, 2005), o primeiro relato de formação de biofilme (Gressler *et al.*, 2015) e o primeiro relato da expressão do

mecanismo de efluxo em *R. equi* (Gressler *et al.*, 2014b). Contudo, nas regiões norte e nordeste do país há uma ausência de estudos sobre *R. equi*, especialmente acerca da caracterização molecular dos isolados, bem como de sua presença.

No melhor do nosso conhecimento, e de acordo com os mecanismos de busca consultados (Periódicos-CAPES; PubMed®; Google Scholar®; Wiley Online Library®, etc), acerca da rodocose equina foram encontrados quatro trabalhos que identificaram *R. equi* como agente etiológico. No estudo realizado por Nascimento (2016) atribui-se a *R. equi* a causa etiológica de uma pneumonia granulomatosa difusa e lesões ulcerativas intestinais em um potro da raça Quarto de Milha de 6 meses de idade. Contudo, o diagnóstico foi feito apenas com base nas características epidemiológicas, clínicas e patológicas observadas, sem que houvesse o cultivo do agente bacteriano e sua caracterização molecular.

No segundo estudo encontrado, realizado por Calou (2023), o qual analisou casos de broncopneumonia em cavalos que apresentavam sinais de doença respiratória, relatou *R. equi* como agente etiológico de uma pneumonia em um potro de 4 meses de idade, o qual foi confirmado por meio de cultura bacteriana em ágar sangue ovino (5%) e realização de teste de CAMP. Contudo, também não foi realizada a caracterização molecular do isolado. Esses dois trabalhos citados foram realizados no estado da Paraíba.

Os outros dois trabalhos (Neto, 2012; Julio, 2013) consistiram em dois relatos de caso de rodocose equina, porém, nenhum dos trabalhos realizou a caracterização molecular e investigação de genes de virulência e/ou resistência antimicrobiana. Além de equinos, *R. equi* foi isolado também em outras espécies animais. Dorneles *et al.* (2012) realizou testes de reação em cadeia da polimerase de consenso intergênico repetitivo enterobacteriano (ERIC-PCR) em um isolado de campo de *R. equi*, porém não informou a localidade geográfica desse isolado em específico no estudo. O trabalho realizado por Silva, (2017) consistiu de um relato de caso de uma infecção multissistêmica causada por *R. equi* em um caprino no estado da Bahia, contudo, não foi realizada a pesquisa de genes de virulência sendo o diagnóstico realizado através das características histológicas e da marcação positiva de anticorpos anti-*R. equi*, pela técnica de imunohistoquímica.

A ausência relativa de trabalhos sobre a rodocose equina na região Nordeste do país, bem como a ausência de trabalhos descrevendo a caracterização molecular de *R. equi* é preocupante, dado que trabalhos indicando sua presença em estados da região estão disponíveis, a caracterização dos isolados para fatores de virulência, resistência antimicrobiana e formação de biofilmes poderia ser de grande valia como uma ferramenta de

controle epidemiológico, visando não só a Medicina Veterinária e a equideocultura como o contexto amplo da Saúde Única, uma vez que o potencial zoonótico isolados virulentos de *R. equi* representam um risco à sociedade.

## REFERÊNCIAS

- AL AKHRASS, F.; AL WOHOUSH, I.; CHAFTARI, A. M.; REITZEL, R.; JIANG, Y.; GHANNOUM, M.; RAAD, I. *Rhodococcus* bacteremia in cancer patients is mostly catheter related and associated with biofilm formation. **PLoS One**, 7(3), e32945, 2012.
- ÁLVAREZ-NARVÁEZ, S.; GIGUÈRE, S.; ANASTASI, E.; HEARN, J., SCORTTI, M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Clonal confinement of a highly mobile resistance element driven by combination therapy in *Rhodococcus equi*. **MBio**, 10(5), 10-1128, 2019.
- ÁLVAREZ-NARVÁEZ, S.; GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L. J.; DAILEY, C.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Horizontal spread of *Rhodococcus equi* macrolide resistance plasmid pRErm46 across environmental actinobacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 86(9), e00108-20, 2020.
- ÁLVAREZ-NARVÁEZ, S.; HUBER, L.; GIGUÈRE, S.; HART, K. A.; BERGHAUS, R. D.; SANCHEZ, S.; COHEN, N. D. Epidemiology and molecular basis of multidrug resistance in *Rhodococcus equi*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 85(2), 10-1128, 2021.
- ALVAREZ-NARVAEZ, S.; SANCHEZ, S. Exploring the Accessory Genome of Multidrug-Resistant *Rhodococcus equi* Clone 2287. **Antibiotics**, v. 12, n. 11, p. 1631, 2023.
- ANASTASI, E.; GIGUERE, S.; BERGHAUS, L. J.; HONDALUS, M. K.; WILLINGHAM-LANE, J. M.; MACARTHUR, I.; COHEN, N. D.; ROBERTS, M.C; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Novel transferable *erm* (46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 70(12), 3184-3190, 2015.
- ANASTASI, E., MACARTHUR, I., SCORTTI, M., ALVAREZ, S., GIGUERE, S., & VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Pangenome and phylogenomic analysis of the pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*. **Genome biology and evolution**, 8(10), 3140-3148, 2016.
- BAGGE, N.; HENTZER, M.; ANDERSEN, J. B.; CIOFU, O.; GIVSKOV, M.; HØIBY, N. Dynamics and spatial distribution of  $\beta$ -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48(4), 1168-1174, 2004.
- BENOIT, S.; BENACHOUR, A.; TAOUJI, S.; AUFRAY, Y.; HARTKE, A. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, which causes macrophage-related stress, triggers induction of expression of virulence-associated plasmid determinants in *Rhodococcus equi*. **Infection and immunity**, 70(7), 3768-3776, 2002.
- BERGHAUS, L. J.; GIGUÈRE, S.; GULDBECH, K.; WARNER, E.; UGORJI, U.; BERGHAUS, R. D. Comparison of Etest, disk diffusion, and broth macrodilution for in vitro susceptibility testing of *Rhodococcus equi*. **Journal of clinical microbiology**, 53(1), 314-318, 2015.
- BORDIN, A. I.; HUBER, L.; SANZ, M. G.; COHEN, N. D. *Rhodococcus equi* foal pneumonia: Update on epidemiology, immunity, treatment and prevention. **Equine Veterinary Journal**, 54(3), 481-494, 2022.

- BUJOLD, Adina R.; LANI, Nicholas R.; SANZ, Macarena G. Strain-to-strain variation of *Rhodococcus equi* growth and biofilm formation in vitro. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2019.
- BYRNE, G. A.; RUSSELL, D. A.; CHEN, X.; MEIJER, W. G. Transcriptional regulation of the *virR* operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **Journal of bacteriology**, 189(14), 5082-5089, 2007.
- CALOU, I. M. O. L. *et al.* Aspergilose sistêmica em potros com broncopneumonia no brejo paraibano. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal da Paraíba**, Brasil, 2023.
- CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D.; BLODGETT, G.P.; SYNDERGAARD, M. Evaluation of ultrasonographic screening methods for early detection of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals **J. Equine Vet. Sci.**, 32, pp. S20-S21, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Susceptibility testing of mycobacteria, *Nocardia* spp., and other aerobic actinomycetes, 3rd ed, CLSI standard document M24. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2018.
- COHEN, N.D.; CHAFFIN, M.K.; KUSKIE, K.R.; SYNDERGAARD, M.K.; BLODGETT, G.P.; TAKAI, S. Association of perinatal exposure to airborne *Rhodococcus equi* with risk of pneumonia caused by *R. equi* in foals **Am. J. Vet. Res.**, 74, pp. 102-109, 2013.
- COHEN, N. D. *Rhodococcus equi* foal pneumonia. **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 30, n. 3, p. 609-622, 2014.
- COLLINS, M.D.; GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D.E. A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and related taxa **J. Gen. Microbiol.**, 128, pp. 129-149, 1982.
- COULSON, G.B.; MIRANDA-CASOLUENGO, A. A.; MIRANDA-CASOLUENGO, R.; WANG, X.; OLIVER, J.; WILLINGHAM-LANE, J.M.; MEIJER, W.G.; HONDALUS, M.K. Transcriptome Reprogramming by Plasmid-Encoded Transcriptional Regulators Is Required for Host Niche Adaption of a Macrophage Pathogen. **Infect. Immun.**, 83, 3137–3145, 2015.
- COUTO, I.; COSTA, S. S.; VIVEIROS, M.; MARTINS, M.; AMARAL, L. Efflux-mediated response of *Staphylococcus aureus* exposed to ethidium bromide. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, 62(3), 504-513, 2008.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.
- DA SILVA, P.; BARRETO SANTOS, A.; NAKAMURA SATO, D.; OTERO SILVA, J.; CAZENTINI MEDEIROS, M.; MACHADO CARNEIRO, A.; FUJIMURA LEITE, C. Phenotypic and genotypic characterization of *Rhodococcus equi* isolated from sputum. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 16(5), 409-415, 2012.
- DA SILVA, P.; SILVA, J. O *Rhodococcus equi*: an approach to the methodology of presumptive identification and tests of sensitivity to antimicrobials. **International Journal of**

**Health Science.** v. 3, n. 72, pp. 1-18, 2023.

DE BEER, D.; STOODLEY, P. Relation between the structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. **Water Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 11-18, 1995.

DE BEER, D.; STOODLEY, P.; LEWANDOWSKI, Z. Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. **Biotechnology and bioengineering**, v. 53, n. 2, p. 151-158, 1997.

DE LACERDA J. P. G., VEIGA J. S. M. Mastite em égua, causada pelo *Corynebacterium equi*. **Revista Da Faculdade de Medicina Veterinária**, Universidade de São Paulo;6:321, 1959.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DORNELES, E. M. S. ; SANTANA, J. A. ; ANDRADE, G. I ; SANTOS, E. L. S. ; GUIMARÃES, A. S. ; Mota, R.A. ; SANTOS, A. S. ; MIYOSHI, A. ; AZEVEDO, V. ; GOUVEIA, A. M. G. ; LAGE, A. P. ; HEINEMANN, M. B. . Short Communication Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from goats using ERIC-PCR. **Genetics and Molecular Research** , v. 11, p. 2051-2059, 2012.

DUCHESNE, R.; CASTAGNET, S.; MAILLARD, K.; PETRY, S.; CATTOIR, V.; GIARD, J. C.; LEON, A. *In vitro* antimicrobial susceptibility of equine clinical isolates from France, 2006–2016. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 19, 144-153, 2019.

EROL, E.; SCORTTI, M.; FORTNER, J.; PATEL, M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. Antimicrobial Resistance Spectrum Conferred by pRErm46 of Emerging Macrolide (Multidrug)-Resistant *Rhodococcus equi*. **J Clin Microbiol.** Sep 20;59(10):e0114921. doi: 10.1128/JCM.01149-21. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34319806; PMCID: PMC8451426, 2021.

ESPÍNDOLA, J. P.; MACHADO, G.; DIEHL, G. N.; DOS SANTOS, L. C.; DE VARGAS, A. C.; GRESSLER, L. T. Culturable microbial population from the upper respiratory tract of 1,010 clinically healthy horses in southern Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, 114, 103946, 2022.

FERNANDEZ-MORA, E.; POLIDORI, M.; LUHRMANN, A.; SCHAIBLE, U.E.; HAAS, A. Maturation of *Rhodococcus equi*-containing vacuoles is arrested after completion of the early endosome stage. **Traffic**, 6, pp. 635-653, 2005.

FOKINA, V. V.; KARPOV, M. V.; KOLLEROV, V. V.; BRAGIN; E. Y.; EPIKTETOV, D. O.; SVIRIDOV, A. V.; DONOVA, M. V. Recombinant extracellular cholesterol oxidase from *Nocardioides simplex*. **Biochemistry (Moscow)**, 87(9), 903-915, 2022.

FUX, C. A.; WILSON, S.; STOODLEY, P.. Detachment characteristics and oxacillin resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm emboli in an in vitro catheter infection model. 2004.

HINES, M.T. *Rhodococcus equi* in Equine Infectious Diseases, 2<sup>a</sup> ed. ; Sellon, DC, Long, MT, Eds. ; Elsevier: St. Louis, MO, EUA.; p. 294. ISBN 978-1-4557-0891-8, 2014.

GANDERTON, T. R.; GHETE, D.; HOGG, K.; PARK, G. J.; BAUMANN, C. G.; WILKINSON, A. J.; PRYOR, P. R. Commonality of Virulence-Promoting Function in *Rhodococcus equi* Virulence Associated Proteins (Vaps). **Cellular Microbiology**, 2023.

GARCILLÁN-BARCIA, María Pilar; FRANCIÀ, María Victoria; DE LA CRUZ, Fernando. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. **FEMS microbiology reviews**, v. 33, n. 3, p. 657-687, 2009.

GIGUÈRE, S.; HONDALUS, M.K.; YAGER, J.A.; DARRAH, P.; MOSSER, D.M.; PRESCOTT J.F. Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi* **Infect. Immun.**, 67, pp. 3548-3557, 1999.

GIGUÈRE, S.; LEE, E.; WILLIAMS, E.; COHEN, N. D.; CHAFFIN, M. K.; HALBERT, N.; SLOVIS, N. M. Determination of the prevalence of antimicrobial resistance to macrolide antimicrobials or rifampin in *Rhodococcus equi* isolates and treatment outcome in foals infected with antimicrobial-resistant isolates of *R. equi*. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 237(1), 74-81, 2010.

GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L. J.; WILLINGHAM-LANE, J. M. Antimicrobial resistance in *Rhodococcus equi*. **Microbiology Spectrum**, v. 5, n. 5, p. 10.1128/microbiolspec. arba-0004-2016, 2017.

GOODFELLOW, M.; ALDERSON, Grace. The actinomycete-genus *Rhodococcus*: a home for the 'rhodochrous' complex. **Microbiology**, v. 100, n. 1, p. 99-122, 1977.

GIRARDINI, L. K.; GRESSLER, L. T.; COSTA, M. M. D.; BOTTON, S. D. A.; PELLEGRINI, D. D. C. P.; VARGAS, A. C. D. Susceptibility profile of Brazilian *Rhodococcus equi* isolates to different antimicrobial classes and the presence of *vapA* gene. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33, 735-740, 2013.

GRESSLER, L. T.; SILVEIRA, B. P. D.; SCHWAB, M. L.; VARGAS, A. C. D.; PÖTTER, L.; BOTTON, S. D. A. Susceptibility profile of Brazilian *Rhodococcus equi* isolates against azithromycin, clarithromycin and erythromycin. **Ciência Rural**, 45, 680-683, 2014.

GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. C. D.; COSTA, M. M. D.; PÖTTER, L.; SILVEIRA, B. P. D.; SANGIONI, L. A.; BOTTON, S. D. A. Genotypic and phenotypic detection of efflux pump in *Rhodococcus equi*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 45, 661-665, 2014.

GRESSLER, L. T.; VARGAS, A. C. D.; COSTA, M. M. D.; SUTILI, F. J.; SCHWAB, M.; PEREIRA, D. I. B.; BOTTON, S. D. A. Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 35, 835-841, 2015.

GRESSLER, L. T.; MACHADO, G.; DA SILVEIRA, B. P.; COHEN, N. D.; CORBELLINI, L. G.; LEOTTI, V. B.; DIEHL, G.N.; DOS SANTOS; L.C.; DE VARGAS, A. C. Prevalence of *Rhodococcus equi* from the nasal cavity of 1010 apparently healthy horses. **Equine veterinary journal**, 50(5), 667-671, 2018.

GÜRTLER, V.; SEVIOUR, R.J. Systematics of members of the genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow *et al.*, 1998 – the past, present and future H.M. Alvarez (Ed.), *Biology of Rhodococcus*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 1-28, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HALL-STOODLEY, Luanne; STOODLEY, Paul. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, v. 11, n. 7, p. 1034-1043, 2009.

HAUBENTHAL, T.; HANSEN, P.; KRÄMER, I.; GINDT, M.; JÜNGER-LEIF, A.; UTERMÖHLEN, O.; HAAS, A. Specific preadaptations of *Rhodococcus equi* cooperate with its Virulence-associated protein A during macrophage infection. *Molecular Microbiology*, 119(3), 285-301, 2023.

HIGGINS, C.; HUBER, L. *Rhodococcus equi*: challenges to treat infections and to mitigate antimicrobial resistance. *Journal of Equine Veterinary Science*, p. 104845, 2023.

A- HUBER, L.; GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L.; HANAFI, A.; VITOSH-SILLMAN, S.; CZERWINSKI, S. Development of septic polysynovitis and uveitis in foals experimentally infected with *Rhodococcus equi*. *PloS One*, 13(2), E0192655, 2018.

B - HUBER, L.; GRESSLER, L.T.; SANZ, M.G.; GARBADE, P.; VARGAS, Á.; SILVEIRA, B.P. Monitoring Foals by Thoracic Ultrasonography, Bacterial Culture, and PCR: Diagnostic of *Rhodococcus equi* Subclinical Pneumonia in South of Brazil. *J. Equine Vet. Sci*, 2018, 60, 104–108.e1.

C- HUBER, L. GIGUÈRE, S.; BERGHAUS, L. J.; HANAFI, A.; RYAN, C. Fecal shedding of *Rhodococcus equi* in mares and foals after experimental infection of foals and effect of composting on concentrations of *R. equi* in contaminated bedding. *Veterinary microbiology*, v. 223, p. 42-46, 2018.

HUBER, L.; GIGUÈRE, S., SLOVIS, N. M.; CARTER, C. N.; BARR, B. S., COHEN, N. D.; SMITH, J. L. ELAM, J.; EROL, E.; LOCKE, S. J.; PHILLIPS, E. D.; SMITH J. L. Emergence of resistance to macrolides and rifampin in clinical isolates of *Rhodococcus equi* from foals in central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 63, n. 1, p. 10.1128/aac. 01714-18, 2019.

HONDALUS, Mary K.; MOSSER, David M. Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infection and immunity*, v. 62, n. 10, p. 4167-4175, 1994.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa da Pecuária Municipal. **Brasil**, 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/equino/br>. Acesso em: 02 dez. 2023.

JAIN, S.; BLOOM, B. R.; HONDALUS, M. K. Deletion of *vapA* encoding virulence associated protein A attenuates the intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *Molecular microbiology*, v. 50, n. 1, p. 115-128, 2003.

JENSEN, P. Ø.; BJARNSHOLT, T.; PHIPPS, R.; RASMUSSEN, T. B.; CALUM, H.; CHRISTOFFERSEN, L.; HØIBY, N. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, 153(5), 1329-1338, 2007.

JEFFERSON, K. K.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2467-2473, 2005.

JÚLIO, A. H. N. Infecção por *Rhodococcus equi* em potro: relato de caso. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária), **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Brasil, 2013.

KÄMPFER, P.; DOTT, W.; MARTIN, K.; GLAESER, S.P. *Rhodococcus defluvii* sp. nov., isolated from wastewater of a bioreactor and formal proposal to reclassify [*Corynebacterium hoagii*] and *Rhodococcus equi* as *Rhodococcus hoagii* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 64, 755–761, 2014.

LANGENEGGER, J.; NEVES, I. P.; LANGENEGGER, C. H. Ocorrência da corinebacteriose em potros no Estado do Rio de Janeiro. **Pesqui Agropecu Bras**;5:473–6, 1970.

LARKIN, M.J.; KULAKOV, L.A.; ALLEN, C.C. Biodegradation and *Rhodococcus*—masters of catabolic versatility. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 16, pp. 282-290, 2005.

LARKIN, M.J.; KULAKOV, L.A.; ALLEN, C.C.R. Genomes and plasmids in *Rhodococcus* H.M. Alvarez (Ed.), *Biology of Rhodococcus*, **Springer**, Berlin, Heidelberg, pp. 73-90, 2010.

LETEK, M.; OCAMPO-SOSA, A. A.; SANDERS, M.; FOGARTY, U.; BUCKLEY, T.; LEADON, D. P.; GONZÁLEZ, P.; SCORTTI, M.; MEIJER, W. G.; PARKHILL, J.; BENTLEY, S.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Evolution of the *Rhodococcus equi vap* pathogenicity island seen through comparison of host-associated *vapA* and *vapB* virulence plasmids. *Journal of bacteriology*, 190(17), 5797-5805, 2008.

LETEK, M.; GONZALEZ, P.; MACARTHUR, I.; RODRIGUEZ, H.; FREEMAN, T.C., VALERO-RELLO, A.; *et al.* The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. **PLoS Genetics**, 6(9), e1001145, 2010.

LIMA, R. A. S. *et al.* Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: **CEPEA/ESALQ/USP**, 2006.

LIMA, R. A. S. *et al.* Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo. Brasília: **MAPA**, 2016.

LUHRMANN, A.; MAUDER, N.; SYDOR, T.; FERNANDEZ-MORA, E.; SCHULZE-LUEHRMANN, J.; TAKAI, S.; HAAS, A. Necrotic death of *Rhodococcus equi*-infected macrophages is regulated by virulence-associated plasmids. **Infect. Immun.**, 72, pp. 853-862, 2004.

MADRIGAL, R.G.; SHAW, S.D.; WITKOWSKI, L.A.; SISSON, B.E.; BLODGETT, G.P.; CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D. Use of Serial Quantitative PCR of the VapA Gene of

*Rhodococcus equi* in Feces for Early Detection of *R. equi* Pneumonia in Foals. **J. Vet. Intern. Med.**, 30, 664–670, 2016.

MACARTHUR, I.; PARREIRA, V. R.; LEPP, D.; MUTHARIA, L. M.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; PRESCOTT, J. F. The sensor kinase MprB is required for *Rhodococcus equi* virulence. **Veterinary microbiology**, v. 147, n. 1-2, p. 133-141, 2011.

MACARTHUR, I. Analysis of *Rhodococcus equi* surface-associated survival determinants identified in the genome and their exploitation as vaccine targets. 2016.

MACARTHUR, I.; ANASTASI, E.; ALVAREZ, S.; SCORTTI, M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Comparative genomics of *Rhodococcus equi* virulence plasmids indicates host-driven evolution of the vap pathogenicity island. **Genome Biology and Evolution**, 9(5), 1241-1247, 2017.

MAGNUSSON H. Spezifische infektiöse Pneumoniae beim Fohlen. Ein Neuer Eiterreger beim **Pferd Arch. Wiss. Prakt. Tierheilkd.**, 50, pp. 22-37, 1923.

MAH, T. C.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in microbiology**, v. 9, n. 1, p. 34-39, 2001.

MARRIE, T. J.; NELLIGAN, J.; COSTERTON, J. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. **Circulation**, v. 66, n. 6, p. 1339-1341, 1982.

MCCRACKEN, J. L.; SLOVIS, N. M. Use of thoracic ultrasound for the prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia on endemic farms. **Proc Am Assoc Equine Pract** (Vol. 55, pp. 38-44), 2009.

MCLEOD, M.P.; WARREN, R.L.; HSIAO, W.W.; ARAKI, N.; MYHRE, M.; FERNANDES, C.; MIYAZAWA, D.; WONG, W.; LILLQUIST, A.L.; WANG, D.; DOSANJH, M.; HARA, H.; PETRESCU, A.; MORIN, R.D.; YANG, G.; STOTT, J.M.; SCHEIN, J.E.; SHIN, H.; SMAILUS, D.; SIDDIQUI, A.S.; MARRA, M.A.; JONES, S.J.; HOLT, R.; BRINKMAN, F.S.; MIYAUCHI, K.; FUKUDA, M.; DAVIES, J.E.; MOHN, W.W.; ELTIS, L.D. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 103, pp. 15582-15587, 2006.

MEGID J.; RIBEIRO M. G.; PAES A. C. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia. Rio de Janeiro: **Roca**, 2016.

MERCER, M. A.; DAVIS, J. L. Clinical insights: Antimicrobials in an age of resistance. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. 6, p. 711-713, 2019.

MONEGO, F.; MABONI, F.; KREWER, C.; VARGAS, A.; COSTA, M.; LORETO, E. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the vap gene family. **Current microbiology**, 58, 399-403, 2009.

MUSCATELLO, G.; LEADON, D.P.; KLAYT, M.; OCAMPO-SOSA, A.; LEWIS, D.A.; FOGARTY, U.; BUCKLEY, T.; GILKERSON, J.R.; MEIJER, W.G.; VAZQUEZ-BOLAND

J.A. *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of ‘rattles’ **Equine Vet. J.**, 39, pp. 470-478, 2007.

NAKAGAWA, R.; MOKI, H.; HAYASHI, K.; OONIWA, K.; TOKUYAMA, K.; KAKUDA, T.; ... TAKAI, S. A case report on disseminated *Rhodococcus equi* infection in a Japanese black heifer. **Journal of Veterinary Medical Science**, 80(5), 819-822, 2018.

NASCIMENTO, M. J. R. do. Rodococose em potro diagnosticada no Sertão Paraibano. Trabalho de Conclusão de Curso, Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, **Universidade Federal de Campina Grande -Brasil**, 2016.

Neto, H. L. S. V. Rodococose Equina: Relato de Caso. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - **Universidade Federal Rural de Pernambuco**, Brasil, 2012.

OCAMPO-SOSA, A. A.; LEWIS, D. A.; NAVAS, J.; QUIGLEY, F.; CALLEJO, R.; SCORTTI, M.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* based on *traA*, *vapA*, and *vapB* virulence plasmid markers. **The Journal of infectious diseases**, 196(5), 763-769, 2007.

OLIVEIRA, L.; WATANABE, T.; BOABAID, F.; WOUTERS, F.; WOUTERS, A.; BANDARRA, P.; DRIEMEIER, D. Clinical and pathological findings of *Rhodococcus equi* infection in foals. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 39(11), 849-857, 2019.

OREN, A. et al. (Ed.). International code of nomenclature of prokaryotes. Prokaryotic code (2022 revision). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 73, n. 5a, p. 005585, 2023.

POEHLSCGAARD, Jacob; DOUTHWAITE, Stephen. The bacterial ribosome as a target for antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 870-881, 2005.

QUINN, P.J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C. Gênero *Rhodococcus* In: *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.334-345.

RAKOWSKA, A.; CYWINSKA, A.; WITKOWSKI, L. Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. **Animals** 10, 1910, 2020.

RAMPACCI, E.; MARENZONI, M. L.; GIOVAGNOLI, S.; PASSAMONTI, F.; COLETTI, M.; PIETRELLA, D. Phenotypic characterization of *Rhodococcus equi* biofilm grown in vitro and inhibiting and dissolving activity of azithromycin/rifampicin treatment. **Pathogens**, 8(4), 284, 2019.

RAMPACCI, E.; MARENZONI, M. L.; CANNALIRE, R.; PIETRELLA, D.; SABATINI, S.; GIOVAGNOLI, S.; FELICETTI, T.; PEPE M.; PASSAMONTI, F. Ethidium bromide exposure unmasks an antibiotic efflux system in *Rhodococcus equi*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 76(8), 2040-2048, 2021.

- REN, J.; PRESCOTT, J. F. Analysis of virulence plasmid gene expression of intra-macrophage and in vitro grown *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **Veterinary microbiology**, v. 94, n. 2, p. 167-182, 2003.
- REUSS, S.M.; CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D. Extrapulmonary disorders associated with *Rhodococcus equi* infection in foals: 150 cases (1987–2007) *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 235, pp. 855-863, 2009.
- REMUZGO-MARTÍNEZ, S.; PILARES-ORTEGA, L.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, L.; ARANZAMENDI-ZALDUNBIDE, M.; PADILLA, D.; ICARDO, J. M., RAMOS-VIVAS, J. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Rhodococcus equi* infection. **Journal of medical microbiology**, 62(8), 1144-1152, 2013.
- RIBEIRO, M. G.; SEKI, I., YASUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85-kb type I, 87-kb type I, and a new variant, 87-kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, 28(1), 53-61, 2005.
- ROFE, A.P.; DAVIS, L.J.; WHITTINGHAM, J.L.; LATIMER-BOWMAN, E.C.; WILKINSON, A.J.; PRYOR, P.R.O. *Rhodococcus equi* Virulence Protein VapA Disrupts Endolysosome Function and Stimulates Lysosome Biogenesis. **Microbiol. Abra**, 6, 2017.
- SANGAL, Vartul et al. A stable home for an equine pathogen: valid publication of the binomial *Prescottella equi* gen. nov., comb. nov., and reclassification of four rhodococcal species into the genus *Prescottella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 72, n. 9, p. 005551, 2022.
- SANZ, Macarena G. *Rhodococcus equi*—What is New This Decade? **Veterinary Clinics: Equine Practice**, v. 39, n. 1, p. 1-14, 2023.
- SAUER, K.; STOODLEY, P.; GOERES, D. M.; HALL-STOODLEY, L.; BURMØLLE, M.; STEWART, P. S.; BJARNSHOLT, T. The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation. **Nature Reviews Microbiology**, 20(10), 608-620, 2022.
- SILVA, P. D.; MIYATA, M.; SATO, D. N.; SANTOS, A. C. B.; MENDES, N. H.; LEITE, C. Q. F. *Rhodococcus equi* isolation from sputum of patients with suspected tuberculosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105, p. 199-202, 2010.
- SILVA, W. S. Infecção multissistêmica por *Rhodococcus equi* em um caprino: relato de caso. Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade Federal do Recôncavo da Bahia**, Brasil, 2017.
- STES, E.; FRANCIS, I.; PERTRY, I.; DOLZBLASZ, A., DEPUYDT, S., & VEREECKE, D. The leafy gall syndrome induced by *Rhodococcus fascians*. **FEMS microbiology letters**, 342(2), 187-194, 2013.
- SKINNER, R.; CUNDLIFFE, E.; SCHMIDT, F. J. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. **The Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 20, p. 12702-12706, 1983.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, 56(1), 187-209, 2002.

STOODLEY, P., WEFEL, J., GIESEKE, A., DEBEER, D., VON OHLE, C. Biofilm plaque and hydrodynamic effects on mass transfer, fluoride delivery and caries. **The Journal of the American Dental Association**, 139(9), 1182-1190, 2008.

SUTCLIFFE, I.C.; BROWN, A.K.; DOVER, L.G. The rhodococcal cell envelope: composition, organisation and biosynthesis H.M. Alvarez (Ed.), *Biology of Rhodococcus*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 29-71, 2010.

SYDOR, T.; VON BARGEN, K.; HSU, F.F.; HUTH, G.; HOLST, O.; WOHLMANN, J.; BECKEN, U.; DYKSTRA, T.; SOHL, K.; LINDNER, B.; PRESCOTT, J.F.; SCHAIBLE, U.E.; UTERMÖHLEN, O.; HAAS, A. Diversion of phagosome trafficking by pathogenic *Rhodococcus equi* depends on mycolic acid chain length **Cell. Microbiol.**, 15, pp. 458-473, 2013.

SUZUKI, K.; KANEKO, T.; KOMAGATA, K. Deoxyribonucleic acid homologies among coryneform bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 1981.

SZULC-DĄBROWSKA, L.; BOSSOWSKA-NOWICKA, M.; STRUZIK, J.; TOKA, F.N. Cathepsins in bacteria-macrophage interaction: defenders or victims of circumstance? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 10, 601072, 2020.

TAKAI, S.; NARITA, K.; ANDO, K.; TSUBAKI, S. Ecology of *Rhodococcus* (*Corynebacterium*) *equi* in soil on a horse-breeding farm. **Veterinary microbiology**, 12(2), 169-177, 1986.

TAKAI, S., SEKIZAKI, T., OZAWA, T., SUGAWARA, T., WATANABE, Y., & TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15-to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and immunity**, 59(11), 4056-4060, 1991.

TAKAI, S.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. **Veterinary microbiology**, 39(1-2), 187-192, 1994.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OZAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15-to 17-kilodalton antigens. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(6), 1624-1627, 1995.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; KAMISAWA, K.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. **Microbiology and immunology**, 40(8), 591-594, 1996.

TAKAI, S.; CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; HARA, M.; NAKAMURA, M.; KAKUDA, T., MARTENS, R. J. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, 13(6), 489-494, 2001.

- TAKAI, S.; HINES, S. A.; SEKIZAKI, T.; NICHOLSON, V. M.; ALPERIN, D. A.; OSAKI, M.; TAKAMATSU, D.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, K.; OGINO, N.; KAKUDA, T.; DAN, H.; PRESCOTT, J. F. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. **Infection and immunity**, 68(12), 6840-6847, 2000.
- TAKAI, S.; SUDO, M.; SAKAI, M.; SUZUKI, K.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; SUZUKI, Y. Isolation of *Rhodococcus equi* from the gastrointestinal contents of earthworms (family *Megascolecidae*). **Letters in Applied Microbiology**, 74(1), 27-31, 2022.
- TAKAI, S.; SUZUKI, Y.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; RIBEIRO, M. G.; MAKRAI, L.; WITKOWSKI, L.; COHEN, N.; SEKIZAKI, T Short Review: Geographical distribution of equine-associated pVAPA plasmids in *Rhodococcus equi* in the world. **Veterinary Microbiology**, p. 109919, 2023.
- TORRES, P. B.; SANTIAGO, J. M.; Lucena, J. E. C.; LIMA, G. S.; Melo, D. S. A., Moraes, A. V. M.; SILVA, A. C.; BEZERRA, D. G. N. Characterizing the vaquejada horse herd in the brazilian state of Pernambuco. **Bioscience Journal**, 36(6), 2020.
- TREMBLAY, Yannick DN; HATHROUBI, Skander; JACQUES, Mario. Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 78, n. 2, p. 110-116, 2014.
- TRIPATHI, V. N.; HARDING, W. C.; WILLINGHAM-LANE, J. M.; HONDALUS, M. K. Conjugal transfer of a virulence plasmid in the opportunistic intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. **Journal of bacteriology**, 194(24), 6790-6801, 2012.
- VALERO-RELLO, A.; HAPESHI, A.; ANASTASI, E.; ALVAREZ, S.; SCORTTI, M.; MEIJER, W. G.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*. **Infection and immunity**, 83(7), 2725-2737, 2015.
- VAN DER GEIZE, R.; DIJKHUIZEN, L. Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.7, pp. 255-261, 2004.
- VÁZQUEZ-BOLAND, JA; GIGUÈRE, S.; HAPESHI, A.; MACARTHUR, I .; ANASTASI, E .; VALERO-RELLO, A. *Rhodococcus equi*: The Many Facets of a Pathogenic Actinomycete. **Veterin. Microbiol.**, 167, 9–33, 2013.
- VÁZQUEZ-BOLAND, José A.; MEIJER, Wim G. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? **Molecular microbiology**, v. 112, n. 1, p. 1-15, 2019.
- VÁZQUEZ-BOLAND, José A.; SCORTTI, Mariela; MEIJER, Wim G. Conservation of *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow and Alderson 1977 and rejection of *Rhodococcus hoagii* (Morse 1912) Kämpfer *et al.* 2014. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 3572, 2020.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; SANZ, M. G.; & PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*. **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 715-735, 2022.

VENNER, M.; ASTHEIMER, K.; LAMMER, M.; GIGUÈRE, S. Efficacy of mass antimicrobial treatment of foals with subclinical pulmonary abscesses associated with *Rhodococcus equi* **J. Vet. Intern. Med.**, 27, pp. 171-176, 2012.

VENNER, M.; ASTHEIMER, K.; LÄMMER, M.; GIGUERE, S. Efficacy of mass antimicrobial treatment of foals with subclinical pulmonary abscesses associated with *Rhodococcus equi*. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 1, p. 171-176, 2013.

VERT, M., DOI, Y., HELLWICH, K. H., HESS, M., HODGE, P., KUBISA, P., RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, 84(2), 377-410, 2012.

VON BARGEN, K.; SCRABA, M.; KRÄMER, I.; KETTERER, M.; NEHLS, C.; KROKOWSKI, S.; REPNIK, U.; WITTLICH, M.; MAASER, A.; ZAPKA, P.; BUNGE, M.; SCHLESINGER, M.; HUTH, G.; KLEES, A.; HANSEN, P.; JESCHKE, A.; BENDAS, G.; UTERMÖHLEN, O.; GRIFFITHS, G.; GUTSMANN, T.; WOHLMANN J.; HAAS, A. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. **Cellular Microbiology**, 21(1), e12958, 2019.

YAGER, J. A. The pathogenesis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. **Veterinary microbiology**, v. 14, n. 3, p. 225-232, 1987.

WALTERS III, M. C.; ROE, F.; BUGNICOURT, A.; FRANKLIN, M. J.; STEWART, P. S. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 47(1), 317-323, 2003.

WANG, X.; COULSON, G. B.; MIRANDA-CASOLUENGO, A. A.; MIRANDA-CASOLUENGO, R.; HONDALUS, M. K.; MEIJER, W. G. *IcgA* is a virulence factor of *Rhodococcus equi* that modulates intracellular growth. **Infection and immunity**, 82(5), 1793-1800, 2014.

WILKES, E.; HUGHES, K.; KESSELL, A.; RAIDAL, S. Successful management of multiple extrapulmonary complications associated with *Rhodococcus equi* pneumonia in a foal. **Equine Veterinary Education**, 28(4), 186-192, 2016.

WILLINGHAM-LANE, J. M.; COULSON, G. B.; HONDALUS, M. K. Identification of a VapA virulence factor functional homolog in *Rhodococcus equi* isolates housing the pVAPB plasmid. **PLoS one**, v. 13, n. 10, p. e0204475, 2018.

WITKOWSKI, L. Treatment and prevention of *Rhodococcus equi* in foals. **Vet. Rec.**, 185, 16-18, 2019.

WRIGHT, L. M.; CARPINONE, E. M.; BENNETT, T. L.; HONDALUS, M. K.; STARAI, V. J. VapA of *Rhodococcus equi* binds phosphatidic acid. **Molecular microbiology**, 107(3), 428-444, 2018.

ZÚÑIGA, M. P.; BADILLO, E.; ABALOS, P.; VALENCIA, E. D.; MARÍN, P.; ESCUDERO, E.; GALECIO, J. S. Antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi* strains isolated from foals in Chile. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 39(9), 231, 2023.

#### **4. CAPÍTULO II - ARTIGO CIENTÍFICO**

**Caracterização fenotípica e molecular de *Rhodococcus equi* isolados de potros na região do Agreste de Pernambuco.**

1 Article

# 2 **Caracterização fenotípica e molecular de** 3 ***Rhodococcus equi* isolados de potros na região do** 4 **Agreste de Pernambuco**

## DESTAQUES

- Primeira caracterização molecular de *R. equi* no nordeste do Brasil.
- Perfil fenotípico de resistência antimicrobiana a MLSB.
- Ensaio de formação de biofilme de cepas de virulentas de *R. equi* em potros.
- Ausência do gene *erm(46)* em cepas de *R. equi* no nordeste do Brasil.

5  
6  
7 **Resumo:** Importante enfermidade respiratória em potros, a rodococose equina é causada pelo  
8 *Rhodococcus equi*, uma bactéria intracelular que possui como principal fator de virulência um plasmídeo  
9 que abriga genes codificadores das proteínas da família Vap, sendo VapA a de maior importância em  
10 isolados equinos. Além disso, outros fatores observados em cepas de *R. equi*, a resistência antimicrobiana  
11 e a produção de biofilme podem representar desafios importantes ao tratamento de animais acometidos. O  
12 objetivo deste estudo foi caracterizar quatro isolados de *R. equi* oriundos de potros no estado de  
13 Pernambuco. Todos os isolados foram identificados como *R. equi* através de testes bioquímicos e  
14 amplificação do gene *choE*. Observou-se via PCR que 3 isolados (Rhodo2, 3 e 4) foram positivos para  
15 *vapA*, -C, E, -F, -H e *traA* e *vapA*, -C, -D, E, -F, -H e *traA*, respectivamente. O isolado Rhodo1 não  
16 apresentou gene de virulência em decorrência da provável perda do plasmídeo por seguidas passagens a  
17 37°C. Ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, todos os isolados foram suscetíveis aos macrolídeos,  
18 rifampicina e gentamicina. Nenhum isolado apresentou o gene *erm(46)*, responsável pela resistência a  
19 macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) em *R. equi*. Entretanto, todos os isolados  
20 formaram biofilme, sendo produtores moderados (Rhodo1, 2) e fracos (Rhodo3, 4) o que poderia estar  
21 associado a um aumento na tolerância antimicrobiana. Esta caracterização molecular demonstrou pela  
22 primeira vez a presença do plasmídeo de virulência em isolados de *R. equi* e sua capacidade de formação  
23 de biofilme no Nordeste do Brasil.

24 **Palavras-chave:** *Rhodococcus equi*; Resistência antimicrobiana; Biofilme; *vapA*; *erm(46)*.

25  
26 **Abstract:** Equine rhodococcosis is an important respiratory disease in foals caused by *Rhodococcus equi*,  
27 an intracellular bacterium that harbors a plasmid encoding Vap family proteins, with VapA being the most  
28 important in equine isolates. Additionally, other factors observed in *R. equi* strains, such as antimicrobial  
29 resistance and biofilm production, may pose significant challenges to the treatment of affected animals. The  
30 aim of this study was to characterize phenotypically and molecularly four isolates of *R. equi* from four foals  
31 in the state of Pernambuco. All isolates were identified as *R. equi* through biochemical tests and  
32 amplification of the *choE* gene. PCR analysis revealed that three isolates (Rhodo2, 3, and 4) were positive  
33 for *vapA*, -C, E, -F, -H, and *traA*, and *vapA*, -C, -D, E, -F, -H, and *traA*, respectively. Isolate Rhodo1 did not  
34 present virulence genes due to the probable loss of the plasmid after successive passages at 37°C. In  
35 antimicrobial sensitivity testing, all isolates were susceptible to macrolides, rifampicin, and gentamicin.  
36 None of the isolates carried the *erm(46)* gene responsible for macrolide, lincosamide, and streptogramin B  
37 (MLSB) resistance in *R. equi*. However, all isolates formed biofilms, with moderate producers (Rhodo1, 2)  
38 and weak producers (Rhodo3, 4), which could be associated with an increase in antimicrobial tolerance.  
39 This molecular characterization demonstrated, for the first time, the presence of the virulence plasmid in *R.*  
40 *equi* strains and their ability to form biofilms in Northeast Brazil.

**Keywords:** *Rhodococcus equi*; antimicrobial resistance; Biofilm; *vapA*; *erm(46)*.

## INTRODUÇÃO

*Rhodococcus equi* é um microrganismo intracelular facultativo, Gram-positivo aeróbico e imóvel, apresentando formato de cocos ou cocobacilos e colônias mucóides, não hemolíticas, de coloração rosa-salmão [1–3]. Pertencente à ordem *Actinomycetales*, é relacionado a outros gêneros de importância médica, como *Corynebacterium*, *Mycobacterium* e *Nocardia* [1,4–6]. Agente etiológico da rodococose equina, causa mais comum de broncopneumonia granulomatosa subaguda ou crônica em potros com menos de 5 meses de idade, nas últimas décadas diversos trabalhos demonstraram a capacidade de *R. equi* em causar doença em humanos, especialmente indivíduos imunocomprometidos [6–11].

Diversos fatores de virulência estão envolvidos na capacidade de determinadas cepas causarem doença em humanos e animais [12,13]. No entanto, o fator central responsável pela virulência em isolados de potros enfermos é a presença de um plasmídeo de 85-90 kb que possui em sua estrutura uma ilha de patogenicidade de 27.536 pb, contendo sete genes de proteínas associadas à virulência (*Vap*) agrupados em três genes (*vapA*, *vapC* e *vapD*), um par com um gene e um pseudogene (*vapE* e *vapF*) e outros dois localizados independentemente (*vapG* e *vapH*) [14–17]. Os genes *vapB* e *vapN* estão presentes em um plasmídeo circular comumente isolado de suínos e um plasmídeo não-circular comumente isolado de ruminantes, respectivamente [2,17,18].

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm relatado o surgimento e o aumento na prevalência de isolados *R. equi* resistente a macrolídeos e a rifampicina [6,19–21] sendo estes princípios ativos, isolados ou em combinação, as drogas comumente empregadas no tratamento da rodococose em equinos. O gene *erm(46)* foi identificado como responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) em isolados de *R. equi* [22]. Além disso, o plasmídeo que contém o gene demonstrou possuir capacidade de ser transferido via conjugação entre cepas de *R. equi* e outras espécies presentes no solo, além de poder ser readquirido pela cepa [22,23], o que é preocupante em virtude do risco de disseminação da resistência antimicrobiana entre cepas e propriedades.

A formação de biofilme é um importante fator de virulência em diversos gêneros de microrganismos. Estudo realizado com *R. equi* demonstrou que esse patógeno foi capaz de formar biofilmes na superfície de cateteres de poliuretano em pacientes humanos internados [24]. Após esse relato, outros autores comprovaram a formação de biofilme em cepas isoladas de fezes, solo e de casos clínicos de equinos [25–28]. A formação de biofilme por *R. equi* pode ter implicações clínicas importantes, uma vez que esses estudos demonstraram um aumento da tolerância a antibióticos em células presentes nos biofilmes em até dez vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) observadas nas células livres [27,28].

O primeiro relato de infecção por *R. equi* no Brasil foi feito no ano de 1959, em um quadro de mastite em égua [29], sendo o primeiro surto de rodococose equina com manifestação clínica respiratória em potros realizado somente no ano de 1970 no estado do Rio de Janeiro [30]. Desde então, diversos trabalhos no país ao longo dos anos relataram o isolamento do patógeno em equinos, humanos e diversas espécies de animais [31–35]. No entanto, a grande maioria dos trabalhos científicos concentra-se nas regiões sul e sudeste do país, havendo apenas a publicação de poucos trabalhos, no melhor do nosso conhecimento, relatando o isolamento de *R. equi* nas regiões norte e nordeste do país [36–42].

Portanto, o presente trabalho teve o objetivo de realizar a caracterização molecular de 4 isolados identificados como *R. equi* oriundos de potros que vieram a óbito no agreste do estado de Pernambuco, Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostras

Quatro amostras foram coletadas em uma propriedade destinada a criação e reprodução de equinos localizada no estado de Pernambuco, situado na região Nordeste do Brasil entre os meses de março e novembro de 2019. Quatro potros, de idade 1,5 a 3 meses que apresentaram sintomatologia clínica compatível com um quadro de rodococose equina durante 23-30 dias, tratados com azitromicina e rifampicina, sem melhora clínica, resultando em óbito. Durante a necropsia dos animais foi realizada assepticamente a coleta de conteúdo purulento das lesões granulomatosas presentes nos pulmões dos animais. As quais foram acondicionadas em tubos de ensaio estéreis e enviadas para processamento no

laboratório de Pesquisa em Microbiologia e Imunologia (LAPEMI) da Universidade Federal do Agreste de Pernambuco.

### Isolamento e Caracterização Fenotípica

O isolamento e a caracterização fenotípica dos isolados de *R. equi* foram realizados de acordo como descrito por Javed et al., (2013), com pequenas modificações [43]. As amostras provenientes da necrópsia dos potros foram inoculadas em ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas aerobicamente a 37°C por 48 horas. Os isolados bacterianos que apresentaram colônias pequenas, lisas, brilhantes e não hemolíticas após 24 h de incubação, e posteriormente tornaram-se maiores, de aspecto mucóide e coloração rosa-salmão às 48h, foram selecionados para a realização dos testes bioquímicos. A confirmação inicial dos isolados como *R. equi* foi feita pela demonstração da morfologia celular típica em esfregaços corados por Gram. Todos os quatro isolados de *R. equi* obtidos durante o estudo foram caracterizados bioquimicamente por meio do teste de catalase e teste de Christein-Atkin-Munch-Peterson (CAMP) usando a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como cepa indicadora, teste de urease e teste de fermentação de açúcares. As cepas, *R. equi* ATCC 33701 P+ (*vapA* positivo) e as cepas *R. equi* ATCC 6939 e *R. equi* ATCC 33701 P- (*vapA* negativo) foram utilizadas como controle positivo nos testes.

### Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

O teste de suscetibilidade a antimicrobianos foi realizado por meio do método de disco difusão de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI VET01-A4) [44]. Em razão da leitura ser realizada às 24h, o ágar Mueller-Hinton foi enriquecido de sangue ovino a 5%, para melhorar o crescimento dos isolados de *R. equi* e permitir uma melhor medição dos halos de inibição no tempo correto. Os antimicrobianos avaliados nesse estudo foram eritromicina, claritromicina, azitromicina, rifampicina, gentamicina e doxiciclina (Cecon, SP, Brasil), em razão de seu potencial inibidor em *R. equi* realizados em testes *in vitro* [45] e em razão de que a combinação de um macrolídeo associado à rifampicina ser a terapia de escolha mais frequente para o tratamento de animais acometidos [46].

Até o presente momento não existem critérios interpretativos aprovados pelo CLSI para testes de suscetibilidade de cepas de *R. equi* isoladas de animais. Em razão disso, foram utilizados os critérios adotados por Berghaus *et al.*, (2015) [47] (Tabela 1). Foram utilizadas como cepas controle dos testes, as cepas *S. aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, como negativos e as cepas *R. equi* ATCC 6939 e *R. equi* ATCC 33701 P+ como controle positivo.

**Tabela 1.** Critérios interpretativos utilizados para classificação de isolados de *R. equi* nos antimicrobianos descritos. Adaptado de Berghaus *et al.* [47]

Antimicrobianos <sup>1</sup>	Breakpoint (mm)		
	Suscetível	Intermediário	Resistente
Azitromicina (15mcg)	≥18	14-17	≤13
Claritromicina (15mcg)	≥18	14-17	≤13
Eritromicina (15mcg)	23	14-22	≤13
Doxiciclina (30 mcg)	≥16	13-15	≤12
Gentamicina (10mcg)	≥16	13-15	≤12
Rifampicina (5mcg)	≥20	17-19	≤16

<sup>1</sup> Em razão de ainda não existirem critérios interpretativos aprovados pelo CLSI para testes de susceptibilidade em cepas de *R. equi*, foram utilizados critérios interpretativos do CLSI para *Staphylococcus aureus*, conforme o realizado no trabalho de referência [47].

### Ensaio de PCR

#### Extração de DNA

Os isolados foram cultivados em caldo Infusão Cérebro Coração (Brain, Heart infusion - BHI, KASVI) por 48h então 1mL da cultura foi passada para um microtubo de ensaio e centrifugado a 7000rpm por 3 min em microcentrifuga. A extração do DNA bacteriano do pellet foi realizada por meio do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, USA) segundo as instruções do fabricante. A quantidade e a qualidade

do DNA foram determinadas por meio de espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro GENESYS 10S Series (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) e por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corados com DSView Nucleic Acid Stain (Sinapse Inc.).

## PCR

Foram realizados testes de PCR para a caracterização dos isolados de *R. equi* para os genes *choE*, genes da família *vap*, *traA* e *erm(46)*. Os primers utilizados em cada reação de PCR e suas fontes estão descritos na Tabela 2. Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador Bio-gener GE9612T-S (Bio-Gener, Hangzhou, China), utilizando o kit FIREPoI™ Master Mix Ready to Load (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia), com as concentrações recomendadas pelo fabricante. A cepa *R. equi* ATCC 33701 P+ e as cepas *R. equi* ATCC 6939 e *R. equi* ATCC 33701 P- foram utilizadas como controles positivo e negativos dos genes plasmidiais de virulência, respectivamente. Os produtos obtidos de cada reação de PCR foram revelados através da eletroforese em gel de agarose a 1%, acrescido de corante DNA Sybr Safe (Invitrogen, USA) e visualizada em aparelho fotodocumentador UV (Dual Intensity UV Transilluminator Labnet - DyNA).

**Tabela 2.** Primers dos genes usados na caracterização molecular dos isolados de *R. equi*.

Gene	Primers <sup>1</sup>	Sequência	Tamanho (bp)	Referência
<i>choE</i>	COX-F	GTCAACAACATCGACCAGGCG	959	[48]
	COX-R	CGAGCCGTCCACGACGTACAG		
<i>vapA</i>	VAPA-F	ACAAGACGGTTTCTAAGGCG	550	[49]
	VAPA-R	TTGTGCCAGCTACCAGAGCC		
<i>vapB</i>	VAPB-F	GAATTCGAAAGCGCAAAGGT	650	[49]
	VAPB-R	TTCCGTGAACATCGTACTGC		
<i>vapC</i>	VAPC-F	GGGTCGTCCATCCAAATCGA	700	[49]
	VAPC-R	GGTCAGGCCTATCACCCCTTG		
<i>vapD</i>	VAPD-F	GGTGGTGCGATGTCAGAATG	400	[49]
	VAPD-R	TGGAACGTCTTGCCCTTCTT		
<i>vapE</i>	VAPE-F	ATATGACGACCGTTCACAAG	600	[49]
	VAPE-R	CTCCGATGCCACCAAATA		
<i>vapF</i>	VAPF-F	AGAATATGCCTGGTATGGGC	350	[49]
	VAPF-R	TCGTCTATAGCTGCTGCAG		
<i>vapH</i>	VAPH-F	AATTCCTATCAAGGACAGC	500	[49]
	VAPH-R	ATACCGATTACGGAGCTCAC		
<i>vapN</i>	VAPN-F	GGTACTGCAGGCAACTGCTA	425	[50]
	VAPN-R	GAGCTGCTACTACCGTGGTC		
<i>traA</i>	TRAA-F	AGAGTTCATGCGTGACAACG	959	[51]
	TRAA-R	GTCCACAGGTCACCGTTCTT		

Gene	Primers <sup>1</sup>	Sequência	Tamanho (bp)	Referência
<i>erm(46)</i>	ERM46-F	GTCGATACGATCGTCGACCT	501	[22]
	ERM46-R	GTGTGGACGAAGGTGCTGTA		
16S rRNA	27-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1350	[52]
	1492-R	GGTACCTTGTTACGACTT		

<sup>1</sup> Cada primer de cada gene foi testado em uma PCR uniplex.

### Gene *choE*

Para identificação a nível de espécie, teve-se como alvo o gene cromossomal *choE*, que gera um amplicon com 959bp. As temperaturas da reação de PCR para a seguiram as recomendadas por um trabalho anterior [48].

### Família *vap* e *traA*

Foram pesquisados os genes da família *vap* (*vapA*, *vapB*, *vapC*, *vapD*, *vapH* e *vapM*) e o pseudogene *vapF* para caracterização molecular dos plasmídeos de virulência em PCR uniplex de metodologia empregada por Monego *et al.*[49]. A cepa *R. equi* ATCC 33701 P+ e as cepas *R. equi* ATCC 6939 e *R. equi* ATCC 33701 P- foram utilizadas como controles positivo e negativos, respectivamente.

A PCR para o gene *traA* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ocampo-Sosa *et al.*, [51]

### Gene *erm(46)*

Para pesquisa do gene *erm(46)*, realizou-se a reação de PCR segundo a metodologia relatada por Anastasi *et al.* [22], no entanto, infelizmente não havia a disponibilidade de isolados de *R. equi* conhecidamente resistentes a ou mais agentes antimicrobianos macrolídeos. Não foi utilizado controle positivo em virtude da ausência de cepa positiva para o gene.

### PCR e sequenciamento do 16S

A análise da região rRNA 16S foi realizada pelo método de amplificação por PCR utilizando os primers universais 27F e 1492R (Tabela 2). A reação de PCR para amplificação do gene foi realizada de acordo com o descrito por Hongoh *et al.*,[53]. Para fins de purificação do produto de PCR foi utilizado FIREPol Master Mix (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (Solis Biodyne, Tartu, Estonia) com as concentrações recomendadas pelo fabricante. Os produtos da reação de PCR foram observados tal como descrito acima.

Os produtos resultantes da reação de PCR foram então purificados com o Kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Cytiva, UK) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificados foram enviadas para o Departamento de Genética da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) para sequenciamento genético. A edição e análise das sequências foram realizadas utilizando o software Bioedit (/ Informer Technologies, Inc.) e o alinhamento das sequências consenso através do pacote MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis; Version 11.0.13).

### Teste de Formação de Biofilme

A avaliação da formação de biofilme foi realizada de acordo com a metodologia empregada por Bujold, Lani e Sanz [26], com modificações. Para padronização do inóculo inicial de ~10<sup>5</sup> UFC/mL, foi realizado um ensaio de diluição seriada dos isolados em caldo BHI por 24h. Realizou-se o procedimento em cada um dos 4 isolados e das cepas controle em tubos de ensaio contendo PBS até a concentração de 10<sup>-5</sup>, sendo inoculados por meio da técnica de *spread plate* em placas contendo ágar Mueller-Hinton nas concentrações 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup> em duplicata. Padronizado o inóculo, 100 µL de cultura bacteriana de cada

1 isolado a 0h pós-inoculação foram adicionados a seis poços em paralelo de uma placa de 96 poços  
2 (Greiner Bio-One, Brasil). A cepa *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle positivo, sendo  
3 adicionada no mesmo volume em dez poços. Para fins de controle negativo, foi adicionado caldo BHI  
4 estéril em outros dez poços por placa para obter um branco para a realização dos cálculos. Para fins de  
5 controle intraespecífico, as cepas *R. equi* ATCC 6939, *R. equi* ATCC 33701 P+ e *R. equi* ATCC 33701 P-  
6 foram utilizadas nos testes. Três placas de 96 poços foram inoculadas de maneira idêntica para o teste, e  
7 incubadas a 37 ° C durante 24, 48 ou 72 horas. Após o período de incubação respectivo de cada placa,  
8 procedeu-se a remoção do caldo por sucção suave e inversão em papel toalha. Posteriormente, os poços  
9 foram fixados termicamente a 56 °C durante 20 min, e então corados com violeta de cristal (0,1%). Em  
10 seguida, lavados 3 a 5 vezes com água destilada (até a água ficar limpa), secos ao ar e descorados com  
11 etanol a 70%. A absorbância foi medida a 595nm usando um leitor de microplacas Asys UVM 340  
12 (Biochrom, Cambridge, UK). Além disso, quatro poços vazios por placa foram corados com cristal violeta,  
13 a fim de confirmar que o material plástico não reteve o corante. Os testes foram realizados em triplicata  
14 para cada momento de mensuração.

15 Para a interpretação e classificação dos resultados dos isolados, foi utilizado o critério estabelecido  
16 por um estudo publicado anteriormente, que avaliava a produção de biofilme em *Staphylococcus* sp. [54]  
17 com modificações. A partir da medição da densidade óptica (OD) de cada poço, a OD de corte (ODc) foi  
18 definido no valor de três desvios padrão acima da OD média do controle negativo. Os resultados dos  
19 isolados foram interpretados da seguinte forma:

- 20 (1) não produtoras de biofilme ( $OD \leq ODc$ );
- 21 (2) fracas produtoras de biofilme ( $ODc < DO \leq 2 \times ODc$ );
- 22 (3) moderadas produtoras de biofilme ( $2 \times ODc < DO \leq 4 \times ODc$ );
- 23 (4) fortes produtoras de biofilme ( $4 \times ODc < OD$ ).

24 Para uma maior uniformização da média de cada isolado, retirou-se da realização dos cálculos a  
25 maior e a menor mensuração da OD dos poços de cada isolado e controles de cada uma das placas em  
26 cada dia de mensuração.

## 27 RESULTADOS

### 28 Necrópsia

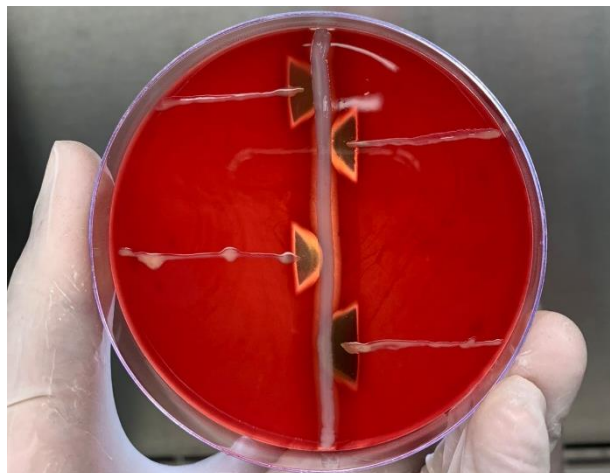
29 Ao exame necroscópico, todos os animais apresentaram o mesmo padrão de alteração da cavidade  
30 torácica (Figura 1). À abertura da cavidade mediante rebatimento das costelas, observou-se a presença  
31 disseminada de grânulos no parênquima pulmonar, que, ao corte, apresentavam-se repletos de pus. O  
32 parênquima pulmonar apresentava áreas atelectásicas na região dorsal. Não foram observadas alterações  
33 em outros órgãos em nenhum dos animais.



34 **Figura 1.** Pulmão de potro com suspeita de rodococose equina evidenciando a presença de múltiplas lesões  
35 granulares disseminadas a coalescentes, com conteúdo purulento ao corte.

### 36 Identificação bioquímica

1 Todos os isolados, assim como as cepas de referência, apresentaram morfologia de cocobacilos  
 2 Gram-positivos. Nos testes bioquímicos apresentaram os resultados: catalase positivo, urease positivo e  
 3 CAMP teste positivo (Imagem 2).  
 4



5 **Figura 2.** Isolados de *R. equi* com resultado positivo ao Teste de CAMP (estriadas em sentido horizontal)  
 6 evidenciando o característico halo de hemólise em forma de seta na zona de intersecção da colônia de  
 7 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (estriada em sentido vertical).

### 8 Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos

9 Os resultados da medição dos halos estão dispostos na Tabela 3. Neste presente estudo, nenhum dos  
 10 isolados apresentou perfil de resistência a nenhum dos princípios ativos avaliados segundo os intervalos  
 11 de referência adotados.  
 12  
 13

14 **Tabela 3.** Resultados em milímetros dos diâmetros observados no TSA dos isolados de *R. equi*.

Antimicrobianos <sup>1</sup>	Diâmetro da zona de inibição			
	Rhodo 1	Rhodo 2	Rhodo 3	Rhodo 4
Azitromicina	30	34	31	31
Clarithromicina	40	44	42	40
Eritromicina	36	38	39	36
Doxiciclina	25	29	25	24
Gentamicina	32	32	37	34
Rifampicina	29	33	37	37

15 <sup>1</sup> Os diâmetros da zona de inibição foram observados após 24h de incubação.  
 16  
 17

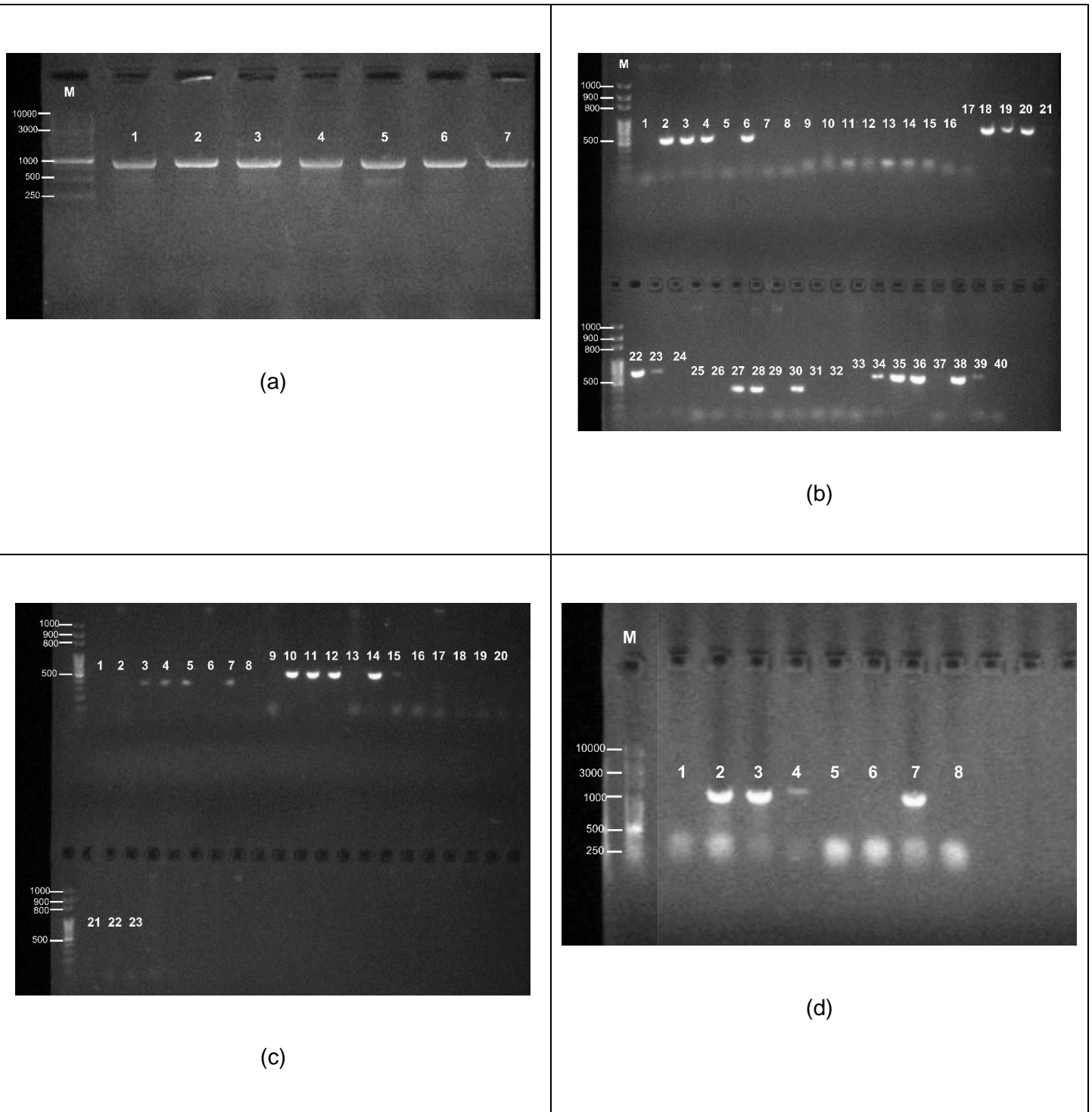
### 17 Sequenciamento do rRNA 16S

18 Todos os isolados apresentaram um amplicon de aproximadamente 1350 bp. O alinhamento de  
 19 sequência em pares foi realizado utilizando a ferramenta de alinhamento de sequência de nucleotídeos em  
 20 pares acessível na página da web do EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). As sequências foram  
 21 analisadas utilizando o serviço BLAST [55] do National Center for Biotechnology Information (Bethesda,  
 22 Md.; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). As sequências do gene 16S dos quatro isolados foram identificadas  
 23 como sendo da espécie de *Rhodococcus equi*.  
 24

### 25 Análises de presença de genes por PCR

26 Os quatro isolados estudados, assim como as cepas controle de *R. equi*, foram positivos para o gene  
 27 cromossomal *choE* em razão da presença do amplicon de 959 pb no gel de agarose (1%), dessa maneira  
 28 todos os isolados foram identificados como *R. equi* (Figura 3a).

1 A presença do plasmídeo de virulência também foi observada, a partir da confirmação da amplificação  
 2 dos genes plasmidiais. Quanto aos genes da família *vap*, a amostra Rhodo 1 não apresentou resultado  
 3 positivo para nenhuma das proteínas nem para o gene *traA* (Figura 3b-d). O outros 3 isolados, assim como  
 4 o controle positivo, foram positivos para os genes da família *vap*, e o gene *traA*. Contudo, o isolado Rhodo  
 5 2 não demonstrou a presença do gene *vapD* (Figura 3 b).  
 6



7 **Figura 3.** Imagens dos géis de agarose (1%). **A** – Produtos da reação de PCR para o gene *choE*. Todos os isolados,  
 8 incluindo as cepas de referência apresentaram resultado positivo para o gene cromossomal; 1 - Rhodo 1; 2 - Rhodo  
 9 2; 3 – Rhodo 3; 4 – Rhodo 4; 5 – *R. equi* ATCC 6939; 6 – *R. equi* ATCC 33701 P+; 7– *R. equi* ATCC 33701 P-;  
 10 marcador 1 Kb DNA Ladder Ready To Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). **B** – Resultados da reação de PCR para  
 11 os genes *vapA*, *vapB*, *vapC*, *vapD* e *vapE*. Dos quatro isolados, o Rhodo 1 não demonstrou a amplificação de  
 12 nenhum gene da família *vap*, e o Rhodo 2, não demonstrou amplificação do *vapD*; 1 a 8- *vapA*; 9 a 16- *vapB*; 17 a  
 13 24- *vapC*; 25 a 32- *vapD*; 33 a 40- *vapE*; 1, 9, 17, 25, 33- Rhodo 1; 2, 10, 18, 26, 34 – Rhodo 2; 3, 11, 19, 27, 35 –  
 14 Rhodo 3; 4, 12, 20, 28, 36 – Rhodo 4; 5, 13, 21, 29, 37 – *R. equi* ATCC 6939; 6, 14, 22, 30, 38 – *R. equi* ATCC 33701  
 15 P+; 7, 15, 23, 31, 39 – *R. equi* ATCC 33701 P-; 8, 16, 24, 32, 40 – branco; marcador 100bp DNA Ladder Ready To

1 Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonia). **C** – Resultados da reação de PCR para os genes *vapF*, *vapH* e *erm(46)*. À  
 2 exceção do Rhodo 1, todos os outros 3 isolados apresentaram produtos dos genes *vap*. Nenhum dos isolados  
 3 apresentou amplificação do gene *erm(46)*. 1 a 8- *vapF*; 9 a 16- *vapH*; 17 a 24- *erm(46)*; 1, 9, 17 - Rhodo 1; 2, 10, 18 –  
 4 Rhodo 2; 3, 11, 19– Rhodo 3; 4, 12, 20– Rhodo 4; 5, 13, 21– *R. equi* ATCC 6939; 6, 14, 22– *R. equi* ATCC 33701 P+;  
 5 7, 15, 23– *R. equi* 103-; 8, 16, 24– branco; marcador 100bp DNA Ladder Ready To Load (Solis Biodyne, Tartu,  
 6 Estonia). **D** - Resultados da reação de PCR para o gene *traA*. À exceção do Rhodo 1 e dos controles negativos,  
 7 todos os outros isolados apresentaram produtos. 1 - Rhodo 1; 2 - Rhodo 2; 3 – Rhodo 3; 4 – Rhodo 4; 5 – *R. equi*  
 8 ATCC 6939; 6 – *R. equi* ATCC 33701 P+; 7– *R. equi* ATCC 33701 P-; 8 – branco; marcador 1 Kb DNA Ladder Ready  
 9 To Load (Solis Biodyne, Tartu, Estonia).

10 Quanto à presença de genes de resistência antimicrobiana nos isolados clínicos, nenhum dos 4  
 11 isolados estudados apresentou positividade para o gene plasmidial *erm(46)*. O que vai de acordo ao  
 12 observado na realização dos testes de resistência fenotípicos, onde não se observaram halos de inibição  
 13 compatíveis com um perfil de resistência.

## 14 Formação de Biofilme

15 Os resultados das médias das mensurações de cada cepa e controles, bem como os pontos de corte  
 16 e faixas de interpretação dos três dias do experimento estão dispostos nas Tabelas 4 e 5,  
 17 respectivamente. De acordo com os critérios de avaliação, a às 24h as médias de todos dos isolados, à  
 18 exceção do *R. equi* 103+, foram classificadas como fraca produção de biofilme.

19 Às 48h, todos dos isolados apresentaram uma elevação da DO média, e o isolado Rhodo 1 passou a  
 20 apresentar uma formação moderada de biofilme, assim como o controle positivo, *S. aureus* ATCC 25923.  
 21 No entanto, as cepas *R. equi* ATCC 33701 P+ e *R. equi* ATCC 33701 P-, de acordo com os critérios  
 22 interpretativos adotados, não apresentaram formação do biofilme.

23 Às 72h observou-se as maiores DO's médias de todos os isolados. Os isolados Rhodo 1, Rhodo 2 e a  
 24 cepa controle *R. equi* ATCC 33701 P- apresentaram uma formação moderada de biofilme, enquanto os  
 25 isolados Rhodo 3 e 4 apresentaram uma fraca formação. O controle positivo apresentou uma alta  
 26 formação de biofilme.

27 Dessa forma, os resultados indicam que todos dos isolados foram produtores de biofilme. O ensaio  
 28 ainda demonstrou haver variação na capacidade de formação entre os isolados clínicos estudados, em  
 29 razão de que, às 72h, dois dos quatro isolados clínicos estudados demonstraram ser produtores  
 30 moderados e os outros dois isolados fracos produtores.

31 **Tabela 4.** Médias das densidades óticas dos isolados e cepas de referência e pontos de corte em cada mensuração  
 32 do ensaio de formação de biofilme.

Isolados <sup>1</sup>	Médias		
	24h	48h	72h
Rhodo 1	0,087	0,143	0,271
Rhodo 2	0,065	0,073	0,223
Rhodo 3	0,072	0,082	0,092
Rhodo 4	0,091	0,067	0,07
<i>R. equi</i> ATCC 6939	0,08	0,074	0,089
<i>R. equi</i> ATCC 33701 P+	0,052	0,061	0,128
<i>R. equi</i> ATCC 33701 P-	0,059	0,063	0,213
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,082	0,138	0,295
Controle Negativo	0,049	0,056	0,055

33 <sup>1</sup> As médias foram calculados a partir dos valores observados em cada poço, para maior uniformidade dos valores  
 34 foram excluídos o maior e o menor valor dos poços de cada cepa em cada dia de mensuração. Todos os isolados  
 35 clínicos foram produtores de biofilme. As maiores médias de cada isolado foram observadas às 72h do ensaio.

**Tabela 5.** Pontos de corte e faixas de interpretação de cada momento de mensuração do ensaio de formação de biofilme.

Classificação <sup>1</sup>	Faixas de interpretação		
	24h	48h	72h
Ponto de corte	<b>0,053</b>	<b>0,066</b>	<b>0,069</b>
Não produtor	≤ 0,053	≤ 0.066	≤ 0.069
Fraco	0,053 < Odt ≤ 0,106	0.066 < Odt ≤ 0,132	0.069 < Odt ≤ 0,138
Moderado	0,106 < Odt ≤ 0,212	0,132 < Odt ≤ 0,264	0,138 < Odt ≤ 0,276
Forte	Odt > 0,212	Odt > 0,264	Odt > 0,276

<sup>1</sup> O ponto de corte de cada mensuração foi calculado a partir do desvio padrão dos valores das OD's dos poços do controle negativo (C-) e então multiplicados por três e somados à média do C- para sua obtenção. Os valores das faixas de classificação dos isolados variaram de acordo com o ponto de corte medidos em cada dia do ensaio, calculados de acordo com o descrito na metodologia.

## DISCUSSÃO

Considerado um patógeno emergente [56], *Rhodococcus equi* foi identificado como agente etiológico em diversas espécies, incluindo humanos [20,31,33,35,49,50]. A classificação das cepas de *R. equi* se dá em virulentas ou não virulentas a partir da presença ou ausência do plasmídeo associado à virulência [14]. Até o presente momento, foram identificados três tipos de plasmídeo, pVAPA, pVAPB e pVAPN, sendo o primeiro identificado em isolados de equinos [57]. Cepas sem plasmídeo demonstraram não ser capazes de sobreviver no interior de macrófagos e causar doença em hospedeiros. Além disso, o plasmídeo pVAPA demonstrou capacidade de transferência entre isolados virulentos e avirulentos *in vitro* [58]. Dessa maneira, a pesquisa da presença do plasmídeo é de grande importância em virtude de sua capacidade patogênica e zoonótica. Trabalhos anteriores na região nordeste realizaram a identificação de *R. equi* como agente etiológico de quadros de pneumonia clínica em potros [40–42], no entanto, nenhum dos trabalhos realizou a caracterização molecular dos isolados, apenas sendo diagnosticados por meio de testes fenotípicos.

Apenas 1 dos isolados estudados não apresentou genes que estão contidos no plasmídeo de virulência, estando ausente nas reações de PCR do isolado Rhodo 1. O *vapA* é o principal gene envolvido no desenvolvimento de virulência em cepas de *R. equi* patogênicas isoladas de equinos enfermos, visto que foi demonstrado que o gene expressa uma proteína que permanece ligada à superfície bacteriana diferente de outros Vaps que acabam por ser liberados no lúmen do fagossomo durante a infecção (VapC, -D e -E) [59]. Essa proteína é responsável por causar disfunção nas organelas endocíticas [60], além de estar envolvida na neutralização do pH do fagossomo através da participação da exclusão do complexo vacuolar-ATPase bombeador de prótons dos fagossomos e causar a permeabilização da membrana [61], essa perda da função endolisossomal e manutenção do pH neutro permitiria a multiplicação de *R. equi* no RCV [17].

A ausência desses genes no isolado Rhodo 1 pode ter sido ocasionada em razão de uma possível perda do plasmídeo de virulência, em razão do mesmo ter sido isolado a mais tempo que os demais, resultando em uma maior taxa de passagem do isolado, somado ao fato de que os isolados foram incubados durante os testes de identificação fenotípica a uma temperatura de 37°C. Um trabalho realizado por Takai *et al* [62] demonstrou que ao realizar diversas passagens de cepas positivas para o plasmídeo de virulência, incubadas a 37°C ocorreu uma atenuação destas que foram originalmente isoladas de infecções pulmonares de potro. Dessa maneira, a literatura científica indica que plasmídeo de virulência de *R. equi* é possivelmente perdido na ausência de seleção do hospedeiro além de que, certos fatores como temperatura e pH desempenham um importante papel na preservação da virulência das cepas isoladas [1,2,18,62,63].

Os genes *vapB* e *vapN* não foram encontrados em nenhuma das amostras estudadas. Sendo o primeiro comumente presente em cepas isoladas de suínos [51,64,65] e o segundo comumente isolado de ruminantes [17,50]. Até o momento não foram encontrados relatos na literatura de plasmídeos que são comumente encontrados em uma espécie serem identificados em cepas de *R. equi* isoladas de outra espécie animal, o que indica que o sistema imunológico do hospedeiro desempenha um papel importante na exclusão de plasmídeos não adaptados àquela espécie [2,17,51]. Em contraste, os três tipos de plasmídeo foram isolados de pacientes humanos infectados com o agente patogênico, indicando que os animais podem atuar como uma possível fonte de infecção [11,17,18,51].

O gene *vapD* estava ausente no isolado Rhodo 2, e presente nos isolados Rhodo 3 e 4. E os demais genes *vap* (-C, -E, -H e o pseudogene *vapF*) foram identificados nos três isolados. Um estudo molecular de isolados de *R. equi* realizado no Sul do Brasil, encontrou que os 32 isolados virulentos encontrados demonstraram seis perfis moleculares: 100% apresentavam os genes *vapA*, *vapD* e *vapG*, 86,6% *vapF*, 76,6% *vapH*, 43,3% *vapC*, 36,6% *vapE* e nenhum *vapB* [49]. Em outro estudo posterior, realizado em amostras obtidas de potros na Índia, todos os 28 isolados foram positivos para *vapA*, C, D, E, F, G e H e negativos para o gene *vapB* [66]. No entanto, nenhum dos estudos isolou uma cepa que não apresentasse o *vapD* no plasmídeo de virulência. Apesar da função do gene *vapA* ser mais bem definida, ainda não está esclarecido se os cinco genes *vap* restantes (-C, -D, -E, -G e -H) desempenham algum papel na sobrevivência ou multiplicação no interior de macrófagos [59,67–70]. Análises cristalográficas de VapB, VapD e VapG observaram que as proteínas Vap possuem duas regiões principais na sua estrutura, os resíduos C-terminais altamente conservados formam uma cadeia de oito cadeias em formato  $\beta$ -barril, enquanto a região N-terminal das proteínas é pouco conservada entre si [68,70], a qual apresenta cavidades ou sulcos óbvios que poderiam representar um local de ligação que forneceria pistas sobre sua função ainda incerta [68]. No entanto, a pesquisa desses genes pode ser importante uma vez que foi relatado que os anticorpos que reconhecem o VapA não reagem de forma cruzada com os Vaps C, D ou E recombinantes, o que indica que os Vaps podem ser distinguidos imunologicamente [59]. Quanto ao gene *traA*, os isolados Rhodo 1, 2 e 3 apresentaram resultado, positivo. O gene *traA* codifica uma relaxase do tipo MOBf (TrwC) [71] presente no *vapPAI* e possui função na transferência do plasmídeo entre cepas demonstrando um papel central no processo de reaquisição do plasmídeo por cepas avirulentas de *R. equi* [72]. Dessa maneira, a presença desse gene nas cepas virulentas indica sua capacidade de disseminação para cepas não-virulentas presentes no ambiente de criação dos equinos.

No que concerne à resistência antimicrobiana, nenhuma das cepas isoladas neste estudo foi considerada resistente aos princípios ativos avaliados no teste de suscetibilidade. Observada pela primeira vez nos anos 90, a resistência aos macrolídeos vem apresentando um aumento consistente na prevalência segundo indica um estudo retrospectivo que analisou perfil de susceptibilidade *in vitro* de mais de 2.169 isolados para eritromicina e 1.688 isolados para rifampicina, relatando que no período de 1995 a 2006, a proporção de isolados resistentes de *R. equi* foi de 0,7% para eritromicina e 2,3% para rifampicina enquanto que entre 2007 e 2017, a prevalência foi de 13,6% e 16,1% respectivamente. No entanto, as prevalências parecem ser menores em outros países sendo encontrados índices na França entre 0 e 9% para rifampicina e 0 e 13% para macrolídeos [21]. Um trabalho realizado no sul do Brasil com amostras clínicas (n=15), de solo (n=15), de fezes (n=9) e de instalações (n=5), coletados em fazendas de criação de equinos entre 1991 e 2013 relatou que todos os isolados foram sensíveis à azitromicina e claritromicina; no entanto, 27% (12/44) apresentaram sensibilidade intermediária à eritromicina [19]. Outro trabalho, realizado no sudeste do país, analisou 42 cepas isoladas de pneumonia piogranulomatosa, lavado bronquiolar (e linfadenite mesentérica em potros, relatou que todos os isolados foram sensíveis à azitromicina [73]. Tais resultados encontrados em outras regiões do país corroboram com o encontrado nos isolados estudados neste presente estudo, indicando a suscetibilidade de isolados de *R. equi* no Brasil.

Os achados no teste fenotípico de suscetibilidade a antimicrobianos corroboram com o encontrado nos testes moleculares, uma vez que nenhum dos isolados clínicos apresentou amplificação do gene *erm(46)*. Presente em um plasmídeo extracromossomal conjugativo conhecido como pRErm46, o gene foi identificado como sendo responsável pela resistência a macrolídeos, lincosamidas e estreptograminas B (MLSB) em isolados de *R. equi* [22,23,74]. O mecanismo de ação envolvido na resistência consiste na metilação do rRNA, a qual é catalisada meio de enzimas metiltransferases codificadas pela família de genes *erm* [75]. A importância da presença desse gene consiste na capacidade de transferência que o plasmídeo que contém o gene demonstrou via conjugação para cepas de *R. equi* e outras espécies em altas frequências, o que indica a potencialidade de transmissão do plasmídeo no ambiente de criação dos cavalos [23]. A ausência do *erm(46)* em cepas isoladas de potros na região nordeste do Brasil é de grande valor epidemiológico em razão de seu grande potencial de disseminação, o que dificultaria a terapêutica dos animais acometidos, gerando perdas econômicas importantes aos produtores.

Todos os isolados de *R. equi* foram capazes de formar biofilme. De acordo com os critérios de avaliação adotados, às 24h de incubação, todas as cepas formaram biofilmes fracos, à exceção do *R. equi* ATCC 33701 P+. Às 48h, o isolado Rhodo 1 e o controle positivo (*S. aureus* ATCC 25923) apresentaram uma formação moderada de biofilme. Às 72h, o isolado Rhodo 2 também foi classificado como produtor moderado de biofilme, bem como a cepa *R. equi* ATCC 33701 P-, enquanto o controle positivo apresentou uma forte formação de biofilme. A capacidade de formação de biofilme é considerada um fator de

1 virulência em patógenos bacterianos em razão de que as células presentes nessa estrutura demonstram  
2 resistência aumentada aos compostos antimicrobianos e persistência da infecção apesar da resposta  
3 imune continuada do hospedeiro [76–78]. Biofilmes formados por *R. equi* demonstraram a ocorrência  
4 desse fenômeno. Um trabalho realizado com cepas isoladas no sul do Brasil observou que nenhuma das  
5 concentrações de três antimicrobianos (azitromicina, claritromicina e eritromicina) testados em pelo menos  
6 4 vezes as concentrações inibitórias mínimas (MICs) para bactérias na forma planctônica, não foi capaz de  
7 destruir completamente *R. equi* no biofilme [28]. Esse aumento na tolerância também foi observado em um  
8 trabalho realizado na Itália, que relatou que o aumento das concentrações MIC de antimicrobianos em dez  
9 vezes, sozinhos ou em combinação, não foi capaz de erradicar completamente os biofilmes pré-formados  
10 de *R. equi* [27]. Os resultados dos trabalhos consultados corroboram com a possibilidade que a produção  
11 de biofilme desempenha um papel importante no desenvolvimento de um sistema de tolerância a  
12 antibióticos no agente etiológico, dessa maneira persistindo de forma quiescente e, eventualmente,  
13 contribuindo a uma cronicidade do quadro infeccioso. Dessa maneira, ao observar os dados disponíveis,  
14 pode-se concluir que ainda que os antibióticos sejam efetivos no controle das infecções, a tolerância  
15 aumentada, apresentada pelas bactérias produtoras de biofilme, uma vez que este já foi formado,  
16 representam um grave desafio ao tratamento dos animais acometidos.  
17

## 18 CONCLUSÃO

19  
20 No melhor do nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a realizar a caracterização molecular de  
21 isolados de *R. equi* na região nordeste do Brasil, uma vez que os trabalhos já publicados encontrados que  
22 relataram o isolamento de cepas [36–42] realizaram o diagnóstico do agente etiológico somente por meio  
23 de testes fenotípicos e bioquímicos. Dessa maneira, evidenciamos pela primeira vez a presença isolados  
24 de *R. equi* positivos para o gene de virulência *vapA* em potros no nordeste brasileiro. Ainda que o número  
25 de isolados estudados não seja suficiente para estabelecer correlações epidemiológicas estatisticamente  
26 significativas, os resultados aqui relatados são de grande importância uma vez que demonstram a  
27 existência do plasmídeo de virulência na região, bem como a capacidade de formação de biofilme por  
28 parte dos isolados, especialmente em razão da escassez de trabalhos sobre o tema no Norte e Nordeste  
29 do país.  
30

31 **Financiamento:** Agradecimento a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela  
32 concessão de bolsa de mestrado de Alysson Paulo dos Santos Godoi.

33 **Reconhecimentos:** Agradecemos ao Professor Dr. Mateus MatiuZZi da Costa a disponibilização e envio das cepas  
34 *Rhodococcus equi* ATCC 33701 P+ e ATCC 33701 P-.

35 **Conflitos de Interesse:** Os autores declaram não haver nenhum conflito de interesses.

## 36 REFERÊNCIAS

- 37 [1] Vázquez-Boland JA, Giguère S, Hapeshi A, MacArthur I, Anastasi E, Valero-Rello A. *Rhodococcus equi*: The  
38 many facets of a pathogenic actinomycete. *Vet Microbiol* 2013;167:9–33.  
39 <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2013.06.016>.
- 40 [2] Vázquez-Boland JA, Meijer WG. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what's in a name? *Mol*  
41 *Microbiol* 2019;112:1–15. <https://doi.org/10.1111/MMI.14267>.
- 42 [3] Aslam MW, Lau SF, Chin CSL, Ahmad NI, Rahman NA, Kuppusamy K, et al. Clinicopathological and radiographic  
43 features in 40 cats diagnosed with pulmonary and cutaneous *Rhodococcus equi* infection (2012–2018). *J*  
44 *Feline Med Surg* 2020;22:774–90.  
45 [https://doi.org/10.1177/1098612X19886395/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\\_1098612X19886395-FIG8.JPEG](https://doi.org/10.1177/1098612X19886395/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177_1098612X19886395-FIG8.JPEG).
- 46 [4] Collins MD, Goodfellow M, Minnikin DE. A survey of the structures of mycolic acids in *Corynebacterium* and  
47 related taxa. *J Gen Microbiol* 1982;128:129–49. [https://doi.org/10.1099/00221287-128-1-](https://doi.org/10.1099/00221287-128-1-129/CITE/REFWORKS)  
48 [129/CITE/REFWORKS](https://doi.org/10.1099/00221287-128-1-129/CITE/REFWORKS).
- 49 [5] Görtler V, Seviour RJ. Systematics of Members of the Genus *Rhodococcus* (Zopf 1891) Emend Goodfellow et al.  
50 1998 2010:1–28. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-12937-7_1).
- 51 [6] Higgins C, Huber L. *Rhodococcus equi*: Challenges to Treat Infections and to Mitigate Antimicrobial Resistance.  
52 *J Equine Vet Sci* 2023;127:104845. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2023.104845>.

- [7] Giguère S. Treatment of Infections Caused by *Rhodococcus equi*. *Veterinary Clinics of North America - Equine Practice* 2017;33:67–85. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2016.11.002>.
- [8] Sanz MG. *Rhodococcus equi*—What is New This Decade? *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 2023;39:1–14. <https://doi.org/10.1016/J.CVEQ.2022.11.002>.
- [9] Takai S, Sasaki Y, Ikeda T, Uchida Y, Tsubaki S, Sekizaki T. Virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *J Clin Microbiol* 1994;32:457–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.32.2.457-460.1994>.
- [10] Stranahan LW, Plumlee QD, Lawhon SD, Cohen ND, Bryan LK. *Rhodococcus equi* Infections in Goats: Characterization of Virulence Plasmids. *Vet Pathol* 2018;55:273–6. <https://doi.org/10.1177/0300985817747327>.
- [11] Takai S, Sawada N, Nakayama Y, Ishizuka S, Nakagawa R, Kawashima G, et al. Reinvestigation of the virulence of *Rhodococcus equi* isolates from patients with and without AIDS. *Lett Appl Microbiol* 2020;71:679–83. <https://doi.org/10.1111/LAM.13386>.
- [12] Letek M, González P, MacArthur I, Rodríguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, et al. The Genome of a Pathogenic *Rhodococcus*: Coaptive Virulence Underpinned by Key Gene Acquisitions. *PLoS Genet* 2010;6:e1001145. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1001145>.
- [13] Anastasi E, MacArthur I, Scortti M, Alvarez S, Giguère S, Vázquez-Boland JA. Pangenome and Phylogenomic Analysis of the Pathogenic Actinobacterium *Rhodococcus equi*. *Genome Biol Evol* 2016;8:3140–8. <https://doi.org/10.1093/GBE/EVW222>.
- [14] Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S. Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 1991;59:4056–60. <https://doi.org/10.1128/IAI.59.11.4056-4060.1991>.
- [15] Takai S, Suzuki Y, Sasaki Y, Kakuda T, Ribeiro MG, Makrai L, et al. Short review: Geographical distribution of equine-associated pVAPA plasmids in *Rhodococcus equi* in the world. *Vet Microbiol* 2023;287:109919. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2023.109919>.
- [16] Takai S, Hines SA, Sekizaki T, Nicholson VM, Alperin DA, Osaki M, et al. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. *Infect Immun* 2000;68:6840–7. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.12.6840-6847.2000/ASSET/5BE88E20-BE29-4BEB-8BD5-C7BCFD60C547/ASSETS/GRAPHIC/II1200596003.JPEG>.
- [17] Ganderton TR, Ghete D, Hogg K, Park GJ, Baumann CG, Wilkinson AJ, et al. Commonality of Virulence-Promoting Function in *Rhodococcus equi* Virulence Associated Proteins (Vaps). *Cell Microbiol* 2023;2023. <https://doi.org/10.1155/2023/9141112>.
- [18] Vázquez-Boland JA, Sanz MG, Prescott JF. *Rhodococcus equi*. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* 2022:715–35. <https://doi.org/10.1002/9781119754862.CH33>.
- [19] Gressler LT, Silveira BP da, Schwab ML, Vargas AC de, Pötter L, Botton S de A. Susceptibility profile of Brazilian *Rhodococcus equi* isolates against azithromycin, clarithromycin and erythromycin. *Ciência Rural* 2015;45:680–3. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20140746>.
- [20] Girardini LK, Gressler LT, Costa MM da, Botton S de A, Pellegrini D da CP, Vargas AC de. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana e presença do gene vapA em *Rhodococcus equi* de origem humana, ambiental e equina. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013;33:735–40. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013000600008>.
- [21] Huber L, Giguère S, Slovis NM, Carter CN, Barr BS, Cohen ND, et al. Emergence of Resistance to Macrolides and Rifampin in Clinical Isolates of *Rhodococcus equi* from Foals in Central Kentucky, 1995 to 2017. *Antimicrob Agents Chemother* 2019;63. <https://doi.org/10.1128/AAC.01714-18>.
- [22] Anastasi E, Giguère S, Berghaus LJ, Hondalus MK, Willingham-Lane JM, MacArthur I, et al. Novel transferable *erm* (46) determinant responsible for emerging macrolide resistance in *Rhodococcus equi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2015:dkv279. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv279>.
- [23] Alvarez-Narvaez S, Giguere S, Berghaus LJ, Dailey C, Vazquez-Boland JA. Horizontal Spread of *Rhodococcus equi* Macrolide Resistance Plasmid pRErm46 across Environmental Actinobacteria. *Appl Environ Microbiol* 2020;86. <https://doi.org/10.1128/AEM.00108-20>.
- [24] Al Akhrass F, Al Wohoush I, Chaftari AM, Reitzel R, Jiang Y, Ghannoum M, et al. *Rhodococcus* Bacteremia in Cancer Patients Is Mostly Catheter Related and Associated with Biofilm Formation. *PLoS One* 2012;7:e32945. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0032945>.
- [25] Remuzgo-Martínez S, Pílares-Ortega L, Álvarez-Rodríguez L, Aranzamendi-Zaldunbide M, Padilla D, Manuel Icardo J, et al. Induction of proinflammatory cytokines in human lung epithelial cells during *Rhodococcus equi* infection. *J Med Microbiol* 2013;62:1144–52. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.056234-0/CITE/REFWORKS>.

- [26] Bujold AR, Lani NR, Sanz MG. Strain-to-strain variation of *Rhodococcus equi* growth and biofilm formation in vitro. BMC Res Notes 2019;12:1–6. <https://doi.org/10.1186/S13104-019-4560-1/FIGURES/1>.
- [27] Rampacci E, Marenzoni ML, Giovagnoli S, Passamonti F, Coletti M, Pietrella D. Phenotypic Characterization of *Rhodococcus equi* Biofilm Grown In Vitro and Inhibiting and Dissolving Activity of Azithromycin/Rifampicin Treatment. Pathogens 2019, Vol 8, Page 284 2019;8:284. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS8040284>.
- [28] Gressler LT, Vargas AC de, Costa MM da, Sutili FJ, Schwab M, Pereira DIB, et al. Biofilm formation by *Rhodococcus equi* and putative association with macrolide resistance. Pesquisa Veterinária Brasileira 2015;35:835–41. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015001000003>.
- [29] Lacerda JPG de, Veiga JSM. Mastite em égua, causada pelo *Corynebacterium equi*. Revista Da Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo 1959;6:321. <https://doi.org/10.11606/issn.2318-5066.v6i3p321-328>.
- [30] Langenegger J, Neves IP, Langenegger CH. Ocorrência da corinebacteriose em potros no Estado do Rio de Janeiro. Pesqui Agropecu Bras 1970;5:473–6.
- [31] Ribeiro MG, Takai S, Guazzelli A, Lara GHB, da Silva AV, Fernandes MC, et al. Virulence genes and plasmid profiles in *Rhodococcus equi* isolates from domestic pigs and wild boars (*Sus scrofa*) in Brazil. Res Vet Sci 2011;91:478–81. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.09.022>.
- [32] Ari J, Hill<sup>1</sup> G, Benesi FJ, Luís Finkler Da Silveira<sup>1</sup> A, Biesdorf SM, Medeiros MG, et al. Pub. 73 Infecção fatal por *Rhodococcus equi* em caprinos no Sul do Brasil Fatal *Rhodococcus equi* Infection in Goats in Southern Brazil 2015;43:73.
- [33] Portilho FVR, Paes AC, Megid J, Hataka A, Neto RT, Headley SA, et al. *Rhodococcus equi* pVAPN type causing pneumonia in a dog coinfecting with canine morbillivirus (distemper virus) and *Toxoplasma gondii*. Microb Pathog 2019;129:112–7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.048>.
- [34] Lechinski de Paula C, Silveira Silva RO, Tavanelli Hernandez R, Nardi Júnior G de, Babboni SD, Trevizan Guerra S, et al. First Microbiological and Molecular Identification of *Rhodococcus equi* in Feces of Nondiarrheic Cats. Biomed Res Int 2019;2019:1–9. <https://doi.org/10.1155/2019/4278598>.
- [35] Ribeiro MG, Lara GHB, da Silva P, Franco MMJ, de Mattos-Guaraldi AL, de Vargas APC, et al. Novel bovine-associated pVAPN plasmid type in *Rhodococcus equi* identified from lymph nodes of slaughtered cattle and lungs of people living with HIV/AIDS. Transbound Emerg Dis 2018;65:321–6. <https://doi.org/10.1111/tbed.12785>.
- [36] Nascimento MJR do. Rodococose em potro diagnosticada no Sertão Paraibano. Monograph. Universidade Federal de Campina Grande, 2016.
- [37] Langenegger CH, Langenegger J. Linfadenites cervicais tuberculosas e pseudotuberculosas em suínos de abate de Pernambuco. Pesqui Agropecu Bras 1974;9:33–40.
- [38] Dorneles EMS, Santana JA, Andrade GI, Santos ELS, Guimarães AS, Mota RA, et al. Short Communication Molecular characterization of *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolated from goats using ERIC-PCR. Genetics and Molecular Research 2012;11:2051–9. <https://doi.org/10.4238/2012.August.6.9>.
- [39] Silva WS. Infecção multissistêmica por *Rhodococcus equi* em um caprino: relato de caso. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2017.
- [40] Calou IMOL. Aspergilose sistêmica em potros com broncopneumonia no brejo paraibano. Monograph. Universidade Federal da Paraíba, 2023.
- [41] Neto HLSV. Rodococose Equina: Relato de Caso. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2012.
- [42] Júlio AHN. Infecção por *Rhodococcus equi* em potro: relato de caso. Monograph. Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2013.
- [43] Javed R, Taku AK, Sharma RK, Badroo GA. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates in equines. Vet World 2017;10:6–10. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.6-10>.
- [44] VET01-A4 Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard-Fourth Edition 2013.
- [45] Riesenber A, Feßler AT, Erol E, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Böse R, et al. MICs of 32 antimicrobial agents for *Rhodococcus equi* isolates of animal origin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2014;69:1045–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt460>.
- [46] Rakowska A, Cywinska A, Witkowski L. Current Trends in Understanding and Managing Equine Rhodococcosis. Animals 2020, Vol 10, Page 1910 2020;10:1910. <https://doi.org/10.3390/ANI10101910>.

- [47] Berghaus LJ, Giguère S, Guldbach K, Warner E, Ugorji U, Berghaus RD. Comparison of Etest, Disk Diffusion, and Broth Macro-dilution for In Vitro Susceptibility Testing of *Rhodococcus equi*. J Clin Microbiol 2015;53:314. <https://doi.org/10.1128/JCM.02673-14>.
- [48] Ladrón N, Fernández M, Agüero J, González Zörn B, Vázquez-Boland JA, Navas J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the choE gene. J Clin Microbiol 2003;41:3241–5. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.7.3241-3245.2003>.
- [49] Monego F, Maboni F, Krewer C, Vargas A, Costa M, Loreto E. Molecular characterization of *Rhodococcus equi* from horse-breeding farms by means of multiplex PCR for the vap gene family. Curr Microbiol 2009;58:399–403. <https://doi.org/10.1007/S00284-009-9370-6/FIGURES/2>.
- [50] Bryan LK, Alexander ER, Lawhon SD, Cohen ND. Detection of vapN in *Rhodococcus equi* isolates cultured from humans. PLoS One 2018;13:e0190829. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0190829>.
- [51] Ocampo-Sosa AA, Lewis DA, Navas J, Quigley F, Callejo R, Scortti M, et al. Molecular Epidemiology of *Rhodococcus equi* Based on traA, vapA, and vapB Virulence Plasmid Markers. J Infect Dis 2007;196:763–9. <https://doi.org/10.1086/519688>.
- [52] Turner S, Pryer KM, Miao VPW, Palmer JD. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. Journal of Eukaryotic Microbiology, vol. 46, Society of Protozoologists; 1999, p. 327–38. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>.
- [53] Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M, Kudo T. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. FEMS Microbiol Lett 2003;221:299–304. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00218-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00218-0).
- [54] Darwish SF, Asfour HAE. Investigation of biofilm forming ability in staphylococci causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. The Scientific World Journal 2013;2013. <https://doi.org/10.1155/2013/378492>.
- [55] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403–10. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- [56] Algammal A, Hetta HF, Mabrok M, Behzadi P. Editorial: Emerging multidrug-resistant bacterial pathogens “superbugs”: A rising public health threat. Front Microbiol 2023;14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1135614>.
- [57] Vázquez-Boland JA, Meijer WG. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: what’s in a name? Mol Microbiol 2019;112:1–15. <https://doi.org/10.1111/MMI.14267>.
- [58] Stoughton W, Poole T, Kuskie K, Liu M, Bishop K, Morrissey A, et al. Transfer of the Virulence-Associated Protein A-Bearing Plasmid between Field Strains of Virulent and Avirulent *Rhodococcus equi*. J Vet Intern Med 2013;27:1555–62. <https://doi.org/10.1111/jvim.12210>.
- [59] Byrne BA, Prescott JF, Palmer GH, Takai S, Nicholson VM, Alperin DC, et al. Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. Infect Immun 2001;69:650–6. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.650-656.2001>.
- [60] Rofe AP, Davis LJ, Whittingham JL, Latimer-Bowman EC, Wilkinson AJ, Pryor PR. The *Rhodococcus equi* virulence protein VapA disrupts endolysosome function and stimulates lysosome biogenesis. Microbiologyopen 2017;6:e00416. <https://doi.org/10.1002/MBO3.416>.
- [61] von Barga K, Scraba M, Krämer I, Ketterer M, Nehls C, Krokowski S, et al. Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor. Cell Microbiol 2019;21:e12958. <https://doi.org/10.1111/CMI.12958>.
- [62] Takai S, Sugawara T, Watanabe Y, Sasaki Y, Tsubaki S, Sekizaki T. Effect of growth temperature on maintenance of virulent *Rhodococcus equi*. Vet Microbiol 1994;39:187–92. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90099-X](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90099-X).
- [63] Byrne GA, Russell DA, Chen X, Meijer WG. Transcriptional Regulation of the *virR* Operon of the Intracellular Pathogen *Rhodococcus equi*. J Bacteriol 2007;189:5082–9. <https://doi.org/10.1128/JB.00431-07>.
- [64] Willingham-Lane JM, Coulson GB, Hondalus MK. Identification of a VapA virulence factor functional homolog in *Rhodococcus equi* isolates housing the pVAPB plasmid. PLoS One 2018;13:e0204475. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204475>.
- [65] Letek M, Ocampo-Sosa AA, Sanders M, Fogarty U, Buckley T, Leadon DP, et al. Evolution of the *Rhodococcus equi* vap Pathogenicity Island Seen through Comparison of Host-Associated vapA and vapB Virulence Plasmids. J Bacteriol 2008;190:5797. <https://doi.org/10.1128/JB.00468-08>.

- 1 [66] Chhabra S, Kumar Khurana S, Kumar Kapoor pradeep, Singha hariSanKar, Singh Y, Khirbat riCha, et al.  
2 Characterization of *Rhodococcus equi* Isolates from Foals with Respiratory Problems using a Multiplex PCR for  
3 the vap Genes 2015. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2015/3.1s.28.32>.
- 4 [67] Coulson GB, Agarwal S, Hondalus MK. Characterization of the role of the pathogenicity island and vapG in the  
5 virulence of the intracellular actinomycete pathogen *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 2010;78:3323–34.  
6 <https://doi.org/10.1128/IAI.00081-10>.
- 7 [68] Okoko T, Blagova E V., Whittingham JL, Dover LG, Wilkinson AJ. Structural characterisation of the virulence-  
8 associated protein VapG from the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol* 2015;179:42–52.  
9 <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.027>.
- 10 [69] Coulson GB, Miranda-CasoLuengo AA, Miranda-CasoLuengo R, Wang X, Oliver J, Willingham-Lane JM, et al.  
11 Transcriptome Reprogramming by Plasmid-Encoded Transcriptional Regulators Is Required for Host Niche  
12 Adaption of a Macrophage Pathogen. *Infect Immun* 2015;83:3137–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.00230-15>.
- 13 [70] Whittingham JL, Blagova E V., Finn CE, Luo H, Miranda-CasoLuengo R, Turkenburg JP, et al. Structure of the  
14 virulence-associated protein VapD from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. *Acta Crystallogr D Biol*  
15 *Crystallogr* 2014;70:2139–51. <https://doi.org/10.1107/S1399004714012632>.
- 16 [71] Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de La Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in  
17 plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev* 2009;33:657–87. [https://doi.org/10.1111/j.1574-](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x)  
18 [6976.2009.00168.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00168.x).
- 19 [72] Tripathi VN, Harding WC, Willingham-Lane JM, Hondalus MK. Conjugal transfer of a virulence plasmid in the  
20 opportunistic intracellular actinomycete *Rhodococcus equi*. *J Bacteriol* 2012;194:6790–801.  
21 <https://doi.org/10.1128/JB.01210-12>.
- 22 [73] Ribeiro MG, Paes AC, Listoni FJP. Minimal inhibitory concentration of azithromycin in *Rhodococcus equi* strains  
23 isolated from foals. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2006;58:1244–6. [https://doi.org/10.1590/S0102-](https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600041)  
24 [09352006000600041](https://doi.org/10.1590/S0102-09352006000600041).
- 25 [74] Álvarez-Narváez S, Giguère S, Cohen N, Slovis N, Vázquez-Boland JA. Spread of Multidrug-Resistant  
26 *Rhodococcus equi*, United States - Volume 27, Number 2—February 2021 - *Emerging Infectious Diseases*  
27 *journal - CDC. Emerg Infect Dis* 2021;27:529–37. <https://doi.org/10.3201/EID2702.203030>.
- 28 [75] Roberts MC. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes.  
29 *FEMS Microbiol Lett* 2008;282:147–59. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01145.x>.
- 30 [76] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. *Cell Microbiol* 2009;11:1034–43.  
31 <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>.
- 32 [77] Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious  
33 diseases. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>.
- 34 [78] Sauer K, Stoodley P, Goeres DM, Hall-Stoodley L, Burmølle M, Stewart PS, et al. The biofilm life cycle:  
35 expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat Rev Microbiol* 2022;20:608–20.  
36 <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>.
- 37  
38  
39



© 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).