

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS**

**ISOLAMENTO DE BACTERÍOFAGOS LÍTICOS PARA *Rhodococcus sp***

**Valesca Peter dos Santos**

**Porto Alegre**

**2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS**

**ISOLAMENTO DE BACTERIOFAGOS LITICOS PARA *Rhodococcus sp***

**Valesca Peter dos Santos**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do grau de Doutor em  
Medicina Animal – Equinos.**

**Orientador: Prof. Dra. Petra Garbade**

**Porto Alegre**

**2016**

**Valesca Peter dos Santos**

**ISOLAMENTO DE BACTERIOFAGOS LITICOS PARA *Rhodococcus sp***

Aprovada em 10/11/2016

APROVADO POR:

---

Prof. Dra. Petra Garbade  
Orientadora e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Carlos Antônio Mondino Silva  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Flávio De La Corte  
Membro da Comissão

*Dedico este trabalho a meus pais Ari da Silva dos Santos (in memoriam) e Eliane Simões Peter dos Santos (in memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Minha eterna gratidão ao professor Marcos Gomes que, com sua dedicação e entusiasmo, me apresentou o mundo dos fagos e foi o grande incentivador deste trabalho. Obrigada pelo inestimável conhecimento transmitido e pelos agradáveis momentos de convívio.

Agradeço a minha orientadora Dra. Petra Garbade, pela confiança, amizade e pela liberdade na produção do trabalho.

Ao Dr. Jarbas Castro Jr. por me amparar psicologicamente na execução do trabalho, por me guiar na metodologia científica e, principalmente, por não me deixar desistir nas horas difíceis.

A Clori Muratore Castro que me ajuda em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados filhos Bernardo e Gustavo Castro por darem sentido a tudo na minha vida, por suportarem minhas ausências e me encherem de alegria nesta trajetória.

À colega Leticia Glessler (UFSM/RS), pela sempre pronta ajuda com as amostras de *R. equi* para PCR.

Aos colegas e amigos do Labacvet/UFRGS por me ajudarem na execução de todas as etapas do trabalho.

Ao Dr. Jorge Gerdau Johannpeter, por disponibilizar a propriedade para a obtenção de amostras, pelo incentivo e pelo carinho.

## RESUMO

O *Rhodococcus equi* é uma das principais causas de pneumonia piogranulomatosa e linfadenite em potros de 1-6 meses de idade, resultando em alta morbidade e muitas vezes em óbito. Em propriedades endêmicas, a enfermidade é responsável por gerar altos custos para tratar e prevenir a doença. Com o objetivo de propor uma alternativa para o controle ambiental do *Rhodococcus equi*, foi aplicado um protocolo para isolamento de bacteriófagos. Foram isoladas 14 amostras de bacteriófagos, obtidas do ambiente de criação de cavalos. Estas apresentaram capacidade de lisar *in vitro* amostras de campo de *Rhodococcus equi* com diferentes intensidades. O resultado obtido nos possibilita sugerir que os fagos podem ser uma alternativa natural para a redução da bactéria no ambiente.

**Palavras-chave:** *Rhodococcus equi*. Linfadenite. Pneumonia. Equinos.

## **ABSTRACT**

*Rhodococcus equi* is an important cause of pyogranulomatus pneumonia and lymphadenitis in foals 1-6 months of age, resulting in high morbidity and often mortality. In endemic properties, the disease is responsible for generating high costs to treat and prevent disease. In order to propose an alternative to the environmental control of *Rhodococcus equi*, a protocol for isolation of bacteriophages was applied. Fourteen bacteriophage samples were isolated obtained from horse breeding environment. They showed capacity to lyse in vitro *Rhodococcus equi* field samples with different sensitivities. The results obtained allows us to suggest the phage as a natural alternative to reducing *R. equi* population.

**Keywords:** *Rhodococcus equi*. Lymphadenitis. Pneumonia. Equine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	<i>Rhodococcus</i> semeados em placa de meio TSA (Tryptic Soy Agar.....	26
Figura 2 –	Resultado de PCR para gênero <i>Rhodococcus</i> e AvpA.....	26
Figura 3 –	Ação lítica do fago HJ sobre o cultivo de <i>Rhodococcus equi</i> 3.....	29
Gráfico 1 –	Leitura da Absorbância Óptica de solução de bacteriana Re3 com adição de bacteriófago HJ (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE) em espectrofômetro com comprimento de onda de 600 nm.....	29
Gráfico 2 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (Re1) com adição de bacteriófago Q (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE) em espectrofômetro com comprimento de onda de 600 nm.....	30
Gráfico 3 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (Re 4) com adição de bacteriófago L (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE).....	31
Gráfico 4 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (ATCC 13701) com adição de bacteriófago K (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE).....	32
Gráfico 5 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (LTB) com adição de bacteriófago AP (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE).....	33
Gráfico 6 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (602/07) com adição de bacteriófago F (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE).....	34
Gráfico 7 –	Leitura da Absorbância de soluções de amostras de <i>Rhodococcus equi</i> (1339/95) com adição de bacteriófago F (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE).....	35
Imagem 1 –	Fago AP.....	36
Imagem 2 –	Fago AP.....	36
Imagem 3 –	Fago HJ.....	36



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	–	Produção do tampão: reagentes e quantidades.....	22
Tabela 2	–	Origem das amostras de <i>Rhodococcus sp.</i> e resultado do PCR.....	25
Tabela 3	–	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos.....	27
Tabela 4	–	Procedência das amostras.....	27
Tabela 5	–	Sensibilidade dos hospedeiros aos bacteriófagos.....	28
Tabela 6	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (Re 3).....	30
Tabela 7	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (Re 1).....	30
Tabela 8	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (Re 4).....	31
Tabela 9	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (ATCC 13701).....	32
Tabela 10	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> LTB.....	33
Tabela 11	–	Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (602/07).....	34
Tabela 12	–	Relação entre Absorvância Óptica e Concentração Bacteriana de <i>Rhodococcus equi</i> (1339/95).....	35

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>PROBLEMA E HIPÓTESE.....</b>	<b>12</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>4.1</b>	<b>Bacteriófagos.....</b>	<b>14</b>
<b>4.2</b>	<b>História.....</b>	<b>14</b>
<b>4.3</b>	<b>A estrutura dos bacteriófagos.....</b>	<b>15</b>
<b>4.4</b>	<b>Terapia com bacteriófagos.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5</b>	<b>Rodococose.....</b>	<b>17</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
<b>5.1</b>	<b>Amostra hospedeira.....</b>	<b>19</b>
<b>5.2</b>	<b>Isolamento dos bacteriófagos.....</b>	<b>20</b>
5.2.1	Coleta de material.....	20
5.2.2	Enriquecimento.....	20
5.2.3	Teste para a presença de bacteriófagos.....	21
5.2.4	Determinação dos hospedeiros por <i>spot test</i> .....	21
5.2.5	Purificação dos bacteriófagos.....	22
5.2.6	Determinação da concentração dos fagos.....	22
5.2.7	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos bacteriófagos.....	23
5.2.8	Microscopia eletrônica.....	24
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6.1</b>	<b>Amostra hospedeira.....</b>	<b>25</b>
<b>6.2</b>	<b>Bacteriófagos.....</b>	<b>27</b>
6.2.1	Ação lítica dos bacteriófagos.....	28
6.2.2	Curva de atuação dos bacteriófagos.....	29
<b>6.3</b>	<b>Imagem de microscopia eletrônica de transmissão.....</b>	<b>36</b>
<b>7</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>9</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>41</b>

<b>10</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>49</b>
<b>11</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>66</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>67</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os bacteriófagos, ou apenas fagos, são vírus que infectam e destroem bactérias. Na medicina atual, eles são utilizados principalmente nos países do leste europeu como uma alternativa ao uso de antimicrobianos. Os estudos com bacteriófagos ganharam destaque recentemente em função do aumento do aparecimento de infecções resistentes aos antimicrobianos tradicionais.

A incidência de rodococose em potros está diretamente relacionada à ocorrência simultânea de temperatura ambiental mais elevada e maior concentração de organismos sensíveis. Este desequilíbrio ambiental a favor das bactérias poderia ser equacionado com a utilização de bacteriófagos específicos para *Rhodococcus equi* a fim de reduzir a carga bacteriana em períodos e locais específicos como uma estratégia de prevenção de ocorrência da doença.

## 2 PROBLEMA E HIPÓTESE

**Problema:** definir um protocolo de isolamento para bacteriófagos de *Rhodococcus sp.*  
Verificar a ação lítica *in vitro* de bacteriófagos isolados para *Rhodococcus equi*.

**Hipótese:** o ambiente de criação de equinos, principalmente em propriedades endêmicas, possui alta contaminação ambiental por *Rhodococcus sp.*;

O ambiente de criação de cavalos possui alta carga de bacteriófagos cujo hospedeiro é o *Rhodococcus equi*.

Os bacteriófagos tem poder bactericida *in vitro* capaz de sugerir seu uso no ambiente para controle da carga bacteriana.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Buscar alternativas para reduzir a incidência de pneumonia por *Rhodococcus equi* em propriedades endêmicas através da utilização de fagos.

#### 3.2 Objetivos específicos

5. Definir um protocolo para isolamento de fagos líticos para *R. equi*
2. Isolar e caracterizar o *Rhodococcus equi* em uma propriedade endêmica.
3. Testar *in vitro* a ação lítica dos fagos isolados para *Rhodococcus equi*.
4. Isolar cepas de *Rhodococcus equi*;
5. Testar *in vitro* as cepas de *Rhodococcus* suscetíveis aos bacteriófagos isolados.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 Bacteriófagos

Os bacteriófagos foram descobertos independentemente por F. W. Twort, em 1915, e F. D'Herelle, em 1917. Twort publicou, em 1915, a alteração de aspecto de algumas colônias da bactéria *Micrococcus sp.*: as colônias de coloração esbranquiçada, leitosa e opaca transformaram-se em colônias translúcidas. Como esta aparência se transmitia e por não conseguir isolar bactérias nesta nova formação, Twort deduziu que haviam sido lisadas e chamou o fenômeno de “transmissão lítica” (SUMMERS, 2001, 2005; ON NA INVISIBLE..., 2011).

D'Herelle e Smith (1922) vislumbraram uma potencial aplicação dos bacteriófagos no tratamento de doenças bacterianas. Na era pré-antibiótico, a pesquisa com bacteriófagos ganhou importância como uma alternativa ao tratamento de infecções bacterianas, pois poucos tratamentos para infecções bacterianas estavam disponíveis (GILL, HYMAN, 2010).

Os bacteriófagos estão presentes nos oceanos, solo, no ar, na água que bebemos, na comida que comemos. São as entidades mais abundantes na Terra: estima-se que haja um total de  $10^{30}$  a  $10^{32}$  bacteriófagos que desempenham uma função essencial na regulação do balanço microbiano de todos os ecossistemas onde estão presentes.

### 4.2 História

Vírus são onipresentes e extremamente abundantes nos ecossistemas microbianos da água, solo e sedimentos. A onipresença dos vírus em todos os ambientes resulta em contato direto com todos os organismos, virtualmente todo o tempo (GÓRSKI; WEBER-DABROWSKA, 2005), com possibilidade de isolamento quase contínuo de bacteriófagos provenientes de ambientes apropriados, onde seus hospedeiros proliferem (STONE 2002; SULAKVELIDZE; KUTTER, 2005).

Os vírus foram o último grupo microbiano a ser examinado através de observação direta. A primeira contagem de vírus em amostras de água revelou que estes são os microorganismos mais abundantes na Terra. Com quantidades variando entre  $10^4$  a  $10^8$  vírus.ml<sup>-1</sup>, os vírus superam o número de bactérias coexistentes em 10 vezes no ambiente aquático. Embora os estudos em ambientes aquáticos sejam a primeira indicação da difusão dos vírus nos ecossistemas microbianos, a ocorrência de vírus no meio aquático é

insignificante comparada ao solo e sedimento aquático. Os primeiros relatos de contagem direta de solo apareceram em 2003. Em amostras pequenas de solo a carga viral variou entre  $10^8$  a  $10^9$  vírus por grama de solo com quantidades maiores aparecendo em solos úmidos de florestas e quantidades menores em solos manejados para cultivo agrícola. As contagens diretas de vírus dos sedimentos aquáticos apresentam quantidades 10 a 100 vezes maiores que as de solo. A observação mais baixa de vírus em sedimentos aquáticos é igual à quantidade mais alta no solo  $\sim 10^9$  vírus.ml<sup>-1</sup>. Apesar desta abundância, a aplicação de microscopia e genética molecular para o estudo da ecologia viral geralmente necessitam do isolamento e concentração das partículas víricas em pequenos volumes (GUTTMAN; RAYA; KUTTER, 2005).

### 4.3 A Estrutura dos bacteriófagos

Bacteriófagos são estruturas complexas que carregam seu genoma de uma bactéria suscetível para outra comandando a produção de novos fagos. Cada partícula viral (vírion) contém o genoma (DNA ou RNA) envolto por uma proteína ou lipoproteína ou capsídeo. A combinação de ácido nucleíco e capsídeo forma o nucleocapsídeo. Cada um possui uma bactéria hospedeira ou grupo de bactérias hospedeiras (GUTTMAN; RAYA; KUTTER, 2005).

Os fagos, como todos os vírus, são parasitas absolutos. Embora carreguem toda a informação para direcionar a reprodução em um hospedeiro apropriado, eles não possuem o maquinário necessário para geração de energia nem ribossomos para a síntese de proteínas (GUTTMAN; RAYA; KUTTER, 2005).

A diversidade dos fagos torna-se bastante óbvia após análises genômicas que revelam organização em mosaico e propensão à recombinação, assim como um grande pool gênico inexplorado, possivelmente o maior do mundo (LIMA-MENDEZ *et al.*, 2008). Mais de 95% dos fagos descritos na literatura são do tipo Caudovírus. São vírus cuja composição é aproximadamente a metade composta por uma fita de DNA e metade formada por proteína com cabeça icosaédrica. As três principais famílias de fagos são definidas pela morfologia da cauda: 60% dos fagos caracterizados pertencem à família *Siphoviridae*, com caudas longas e flexíveis, 25% são da família *Myoviridae* com caudas duplas e contráteis e 15% são *Podoviridae* com caudas curtas e grossas. Existem 10 famílias de bacteriófagos descritas que não apresentam cauda. Elas são diferenciadas pela forma, cobertura lipídica ou pelo material genético. Os fagos também podem ser divididos em duas classes de acordo com o estilo de



vida: virulentos ou temperados. Os virulentos somente podem se multiplicar através de ciclo lítico (a partícula viral se adsorve na superfície da célula hospedeira e injeta seu genoma, monopoliza o metabolismo do hospedeiro para a produção de novos fagos). A célula hospedeira por sua vez, sofre lise minutos ou horas mais tarde, liberando muitos novos fagos. Os fagos temperados por sua vez, quando infectam o hospedeiro podem optar por dois ciclos. Após infectar um hospedeiro, o fago pode iniciar um ciclo lítico que resulta na lise da célula e liberação de novos fagos. Alternativamente, dependendo do tipo do fago, da cepa hospedeira e das condições ambientais, o fago infectante pode entrar no ciclo lisogênico. O genoma do fago assume um estado quiescente chamado de pró-fago, geralmente se integrando ao genoma da célula hospedeira ou mantendo-se como plasmídeo. Ele pode permanecer desta forma indefinidamente sendo replicado junto com a célula hospedeira. Estas células são chamadas de lisogênicas, pois são capazes de produzir lise e seus pró-fagos podem ocasionalmente sair do estado quiescente e ingressar em um ciclo lítico.

Apesar da quantidade e diversidade dos fagos, a seleção natural favoreceu a persistência de populações naturais microbianas através da especificidade de fagos (WEINBAUER, 2004). A maioria dos fagos descritos, com poucas exceções, infecta uma gama um tanto restrita de bactérias, muitas vezes apenas uma linhagem dentro de uma espécie (KIMURA *et al.*, 2008). Em ambientes naturais diversificados, isso resulta em flutuações populacionais de bacteriófagos, que causam e respondem a flutuações nas populações de hospedeiros (KIMURA *et al.*, 2008).

#### **4.4 Terapia com bacteriófagos**

A terapia com bacteriófagos ressurgiu frente à emergência de patógenos multirresistentes a antibióticos (JAGUSZTYN-KRYNICKA; WYSZYNSKA, 2008). Envolve o uso de vírus que infectam bactérias como agentes terapêuticos, empregando a ação bacteriolítica envolvida no ciclo lítico no combate a infecção, tanto na Medicina, na Veterinária e na Agricultura (JAGUSZTYN-KRYNICKA; WYSZYNSKA, 2008).

Diversas preparações contendo fagos foram comercializadas (SUMMERS, 2005; SULAKVELIDZE; KUTTER 2005). D'Herelle o fazia através de um laboratório comercial em Paris (*Laboratoire du Bactériophage*) utilizando preparações contra diversos patógenos. Nos EUA, empresas farmacêuticas como Eli Lilly, E.R. Squibb and Sons e Swan-Myers (uma divisão dos laboratórios Abbot) também investiram em bacteriófagos nos anos 30 (SUMMERS, 2001; SULAKVELIDZE; KUTTER, 2005). No Brasil, o Instituto Oswaldo

Cruz produzia em massa o produto “Bacteriophagina”, distribuído e utilizado amplamente antes do surgimento de antibióticos (PACHECO, 1941).

Em 1991, Bercchieri Junior, Lovell e Barrow, observaram o efeito estatisticamente significativo do tratamento com fagos em frangos infectados experimentalmente com *Salmonella Typhimurium*. Observaram redução da mortalidade, bem como da carga bacteriana no sistema digestivo, reação de virulência em mutantes resistentes à infecção e ausência do surgimento de anticorpos neutralizantes por até um mês. A necessidade de altos títulos de fagos e de um timing específico para o início do tratamento também foram verificadas, levantando questionamentos sobre a interferência da etapa intracelular da patogênese dessa bactéria no tratamento com fagos. Em modelos em frangos infectados com *S. entérica* Enteritidis PT4, Fiorentin, Vieira e Barioni Júnior (2005) observaram um efeito terapêutico, mas não profilático da administração oral de uma mistura de três fagos líticos, em alta multiplicidade de infecção. Notaram redução de três e meia ordens de grandeza na titulação de bactérias presentes no ceco e uma aceleração na redução natural da contaminação por *Salmonella enteritidis* nestes animais.

Wang *et al.* (2006) utilizaram a terapia com fagos em infecções por *Pseudomonas aeruginosa* resistente a iminepen de forma bem sucedida. Summer *et al.* (2011) isolaram quatro fagos de *Rhodococcus equi* que denominaram ReqiPepy6, ReqiDocB7, ReqiPine5 e ReqiPoco6 a partir de amostras de solo. Os autores demonstraram a eficácia destes fagos na lise de *Rhodococcus equi in vitro* e sugeriram que estes são potenciais agentes profiláticos no combate à esta bactéria.

Petrovski *et al.* (2012) isolaram o fago RRH1 e demonstraram sua polivalência em lisar cinco espécies de *Rhodococcus* incluindo o *Rhodococcus equi*.

#### **4.5 Rodococose**

As infecções pulmonares constituem uma importante causa de morte em potros. O *Rhodococcus equi* é considerado o agente mais comumente relacionado a pneumonias graves em potros de 1 a 6 meses de idade, com aparecimento de sinais clínicos antes de 4 meses (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

*R. equi* está presente na maioria dos criatórios de cavalos do mundo. A prevalência de doença, no entanto, varia de região para região e de ano para ano. A incidência de rodococose apresenta status variável: enzoótica em alguns haras, esporádica em outros e, inexistente em muitos locais. Isto pode ser explicado pelas diferenças na densidade de potros, manejo da

fazenda e fatores ambientais como temperatura, poeira e pH do solo (MUSCATELLO *et al.*, 2007). Isto porque, embora qualquer animal possa ser 18ucoide18o, muitos desenvolvem anticorpos e não adoecem. A ocorrência da doença é um reflexo do ambiente (temperatura, umidade, solo, acúmulo de dejetos, pH), do manejo e da virulência do agente (KREWER *et al.*, 2008).

A rodococose é um problema mundial e, no Brasil, é uma das doenças mais severas na criação de potros (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011).

O *R. equi* é um habitante do solo e pode estar presente nas fezes dos animais. É aí que reside a maior dificuldade em se controlar a doença. Não é possível extinguir o agente do ambiente onde há cavalos. As principais formas de prevenção são através da imunização de potros em idade suscetível, detecção precoce da doença e tratamento adequado dos potros doentes. Embora o número de *R. equi* no ambiente seja semelhante em criatórios com história de doença e criatórios sem histórico de doença, os locais afetados têm uma quantidade maior da forma virulenta Vap A positivo. A virulência da bactéria está relacionada à presença de um plasmídeo que codifica um gene responsável pela expressão da proteína Vap A na superfície da bactéria. Esta se expressa em temperaturas superiores a 34° C (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

Potros infectados experimentalmente com a forma virulenta desenvolvem pneumonia severa. O cavalo adulto carrega o *R. equi* no intestino proveniente do solo contaminado de forma passiva. No intestino de potros acima de 3 meses de idade, o microorganismo se multiplica ativamente alcançando números acima de 10<sup>5</sup>/g de fezes (GIGUÈRE; PRESCOTT, 1997).

O *R. equi* tornou-se um desafio na indústria de 18ucoide. Em locais onde há prevalência de infecção, as concentrações ambientais de *Rhodococcus* são muito altas (COHEN *et al.* 2008).

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Amostra hospedeira

Para isolar o *Rhodococcus* foram coletadas amostras de fezes de animais provenientes de uma propriedade com histórico de ocorrência de rodococose em potros. A propriedade apresentava casos esporádicos de óbitos em animais de até 6 meses de idade mas somente em 2009 quando 29 dos 36 potros nascidos adoeceram sendo que destes, 6 vieram à óbito, foi que se teve a confirmação do diagnóstico por necropsia e isolamento da bactéria.

As amostras foram coletadas no período de fevereiro a abril de 2013. Os animais amostrados pertenciam ao lote de fêmeas matrizes cujos produtos haviam sido acometidos por *Rhodococcus equi* anteriormente e os potros estavam em idade suscetível (0-6 meses) naquela ocasião.

As amostras de fezes foram coletadas do reto das éguas. As amostras de fezes dos potros foram coletadas logo após evacuação. Para o isolamento do agente e descontaminação das amostras, utilizou-se como base o protocolo descrito por Finger *et al.* 1997, com modificações, como segue:

1. Coleta de fezes (aproximadamente 50 g) diretamente do reto das éguas ou do chão imediatamente após evacuação quando potros.
2. Misturar 1 g de fezes em 10 ml de água destilada estéril, permanecendo 24 horas em temperatura ambiente para sedimentar.
3. Recolher do sobrenadante e centrifugar a 1075 x g por 10 min.
4. Inocular em *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 6 µg/ml de polimixina B e incubar por 48 horas a 37° C.
5. Centrifugar o caldo a 1075 x g por 5 min e tratar o sedimento com ácido oxálico 2,5% por 60 min a 37°C.
6. Neutralizar o meio com fosfato de sódio dibásico 2,5% e centrifugar novamente.
7. Inocular o sedimento em placas de ágar sangue e em placas de ágar triptona incubados a 37° C por 48 horas.

Após este período, as colônias foram observadas e caracterizadas de acordo com a forma, pigmentação, tempo de crescimento e mucosidade. As colônias de aspecto mucóide, coloração rósea, bordos delimitados e viscosidade foram utilizadas na confecção de

esfregaços para a coloração de Gram. As colônias características foram semeadas por esgotamento para a obtenção de cultura pura.

As colônias de bactérias Gram positivas com morfologia compatível com *R. equi* foram testadas quanto ao perfil bioquímico, pesquisa do fator equi através do teste de CAMP e crescimento em meio MacConkey.

As amostras obtidas destes testes foram testadas, através do Teste de Disco Difusão ou Kirby Bauer, para a sensibilidade a antimicrobianos: amicacina, gentamicina florfenicol, eritromicina cefuroxina, amoxicilina+ ácido clavulânico, ampicilina, rifampicina, sulfazotrim.

As amostras foram submetidas a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) no laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (RS) para a determinação de presença do fator de virulência VapA (*virulence-associated protein A*).

## **5.2 Isolamento dos bacteriófagos**

### 5.2.1 Coleta de material

Para o isolamento de bacteriófagos de *Rhodococcus equi* foram coletadas amostras de solo de áreas habitadas por equinos, preferencialmente éguas com potros. Foi dada preferência para a coleta de material de superfície sombria e úmida. Coletou-se aproximadamente 10 g de terra e detritos de 3 piquetes-maternidade, priorizando a área próxima aos cochos onde os animais se aglomeram por algum tempo. Uma propriedade de cria de cavalos da raça crioula foi utilizada no estudo. Dela, foram coletadas amostras de solo e detritos das mangueiras onde os animais são concentrados para exames de rotina. Uma amostra foi obtida dos piquetes da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Nas cocheiras, coletou-se a cama usada por éguas com potros.

Para isolamento dos bacteriófagos foi utilizada a técnica descrita por Twest e Kropinski (2009) para enriquecimento a partir de amostras de água e solo.

### 5.2.2 Enriquecimento

Foram pesadas 10 g da amostra de solo/fezes em tubos tipo Falcon de 50 ml estéreis. Misturou-se 50 ml de meio nutriente caldo Tryptic Soy Broth (TSB) estéril, suplementado

com 2 mM de cloreto de magnésio. O material permaneceu em temperatura ambiente por 12 horas.

O material sólido foi removido por centrifugação a 10000 x g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtro estéril de 0,22 µm.

O caldo produzido foi misturado a 10 ml de caldo nutriente TSB estéril, duplamente concentrado, enriquecido com 2 mM de Cloreto de Magnésio.

Acrescentou-se 0,1 ml da cultura bacteriana (*Rhodococcus equi* incubados em TSB por 12 horas a 37°C). Misturou-se o material por inversão do frasco e incubou-se por 24 horas a 37°C.

Após este período, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos e repetiu-se o protocolo acima descrito 5 vezes.

Na quinta filtragem, o material foi testado para a presença de bacteriófagos, pingando 5 µl da solução em uma placa semeada com a amostra de *Rhodococcus* utilizada no enriquecimento. Se o teste for positivo para a presença de fagos, no local da gota aparecerá uma área clara, com pouco ou nenhum crescimento bacteriano, diferente do resto da placa onde há bactéria se desenvolvendo.

A cultura foi tratada com 0,1 % clorofórmio e os debris bacterianos foram clarificados por centrifugação a 10000 x g e filtrados através de um filtro de 0,22 µm.

### 5.2.3 Teste para a presença de bacteriófagos

As 6 amostras isoladas de *Rhodococcus equi* foram semeadas em placas de TSA (Tryptic Soy Agar) enriquecidas com Cloreto de Magnésio. As amostras vinham sendo mantidas em caldo TSB e sub-cultivadas a cada 48 horas. Após semeadura, as placas foram deixadas no interior da câmara de fluxo laminar até que secassem. Foram marcados os pontos onde seriam testadas as amostras de fago e identificadas com caneta permanente no verso da placa. Foram pipetados 5 µl da solução enriquecida para fagos sobre a camada de bactéria. As placas foram incubadas por 12 horas para observação de zonas de lise bacteriana.

### 5.2.4 Determinação dos hospedeiros por *spot test*

As amostras de *Rhodococcus sp.* Obtidas e cultivadas em caldo TSB com no mínimo 12 horas de cultivo, foram espalhadas sobre placas de Ágar a 10% através de swabs estéreis. Após aproximadamente 10 minutos, foi pipetada 5 µl da solução de fago sobre a camada de

ágar solidificada. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 horas. No dia seguinte foram examinadas para a observação de zonas claras na camada de bactérias. Todas as amostras de fagos obtidas foram examinadas para verificação de ação lítica em todas as amostras de *Rhodococcus* obtidas.

### 5.2.5 Purificação dos bacteriófagos

As placas de fago bem definidas e isoladas foram cortadas e colocadas em 5 ml de meio estéril. Adicionou-se 1,0 ml da solução contendo bactéria com 12 horas de cultivo. O frasco foi agitado e incubado por 24 horas para posteriormente ser centrifugado a 10000 x g e filtrado em filtro de 32 µm. A solução de fago foi diluída em tampão salina-magnésio. Uma fração foi utilizada para a produção de palhetas e congelamento em Nitrogênio líquido. O restante da amostra foi mantido em geladeira (2-8° C).

Para a manutenção dos estoques de fagos foi utilizado como diluente o tampão salina-magnésio adicionado de gelatina, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) contendo 100 mM NaCl, 8,1 mM MgSO<sub>4</sub> e 0,01% (p/v) de gelatina. A produção do tampão segue os seguintes reagentes e quantidades:

Tabela 1 – Produção do tampão: reagentes e quantidades

<b>Ingrediente</b>	<b>Quantidade</b>
NaCl	5,8 g
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	2,0 g
1M Tris- HCl (pH7,5)	50 ml
2% (p/v) gelatina	5 ml
Água destilada	1000 ml

Fonte: o próprio autor

### 5.2.6 Determinação da concentração dos fagos

Para determinação da concentração de fagos foi utilizada a técnica de dupla camada de ágar:

Camada Inferior de Agar (Ágar a 15%): o meio TSB foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado ágar numa concentração final de 15 g/l. O meio foi autoclavado. Após autoclavação, o meio foi esfriado até 55-60° C para então ser adicionado

Cloreto de Magnésio. O meio foi homogeneizado e esfriado até 48-50° C. A partir daí, despejou-se 25 ml de meio em placas de Petri. Quando frias e solidificadas, estas foram embaladas em sacos plásticos contendo 10 placas e estocadas em geladeira a 4 °C.

Camada Superior de Ágar (Ágar a 5%): o meio foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foi adicionado 2 mg de Cloreto de Magnésio e ágar na quantidade de 5 g/l de solução. O meio foi autoclavado e então foi distribuído 3,0 ml em tubos de ensaio estéreis com tampa e estocadas em geladeira por um mês.

Em tubos estéreis, foram misturados 100 µl da cultura bacteriana hospedeira com 100 µl de uma solução decimal não conhecida da suspensão de fago a qual desejamos determinar (normalmente até 10<sup>-7</sup>). Foram preparadas diluições 1/10 do caldo de cultura.

Os tubos foram pré-incubados a 37° C para permitir a adsorção dos fagos. Em seguida, adicionou-se 3,0 ml de ágar 5% fundido a 45° C.

Os tubos foram mixados cuidadosamente para não formarem bolhas de ar no ágar fundido. O conteúdo foi despejado sobre a placa de Petri, contendo 25 ml de ágar 15%. As placas foram movimentadas em círculos a fim de homogeneizar a distribuição do gel na sua superfície.

A placa foi deixada sobre a bancada da câmara de fluxo contínuo, até que o ágar 5% solidificasse (aproximadamente 10 minutos) e incubadas com a tampa para baixo em 37°C por pelo menos 12 horas.

No dia seguinte, o número de placas formadas foram contadas. A partir daí, calculou-se o título em unidades formadoras de placas/ ml (unidades formadoras de placas por mililitro que é igual ao número de placas x 10 x o inverso do fator de diluição).

### 5.2.7 Avaliação da atividade *in vitro* dos bacteriófagos

Para a avaliação da atividade lítica dos bacteriófagos, foi preparada uma cultura bacteriana de *Rhodococcus sp.* cultivada em meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) a 37 °C por 12 horas. O critério para a escolha da amostra de *Rhodococcus* e do fago foi a qualidade da lise obtida em placa durante a determinação dos hospedeiros por Spot Test. Foi medida a absorvância óptica através de um espectrofotômetro com 600 nm de comprimento de onda. Esta cultura foi dividida em 2 alíquotas de 5 ml. A uma delas foi adicionado 1,0 ml de solução de bacteriófagos e a outra foi mantida para controle. Os frascos foram incubados a 37 °C em estufa. Da amostra controle e da amostra teste foi retirada uma alíquota com 12, 24, 36 e 48 horas para a determinação da absorvância óptica. Da amostra teste, foi retirada 100 µl



para a determinação da concentração bacteriana pelo método de diluição, semeadura por espalhamento e contagem direta.

A atividade dos bacteriófagos foi determinada por comparação medida da absorbância óptica em intervalos de 12 horas.

#### 5.2.8 Microscopia eletrônica

Para a visualização dos bacteriófagos por microscopia eletrônica de transmissão as amostras foram centrifugadas duas vezes a 13.000 x g por 60 minutos em tubos tipo *ependorf* (2 ml). O pellet obtido foi misturado a uma solução de 0,1 M de Acetato de Amônia, pH (7,0). Uma gota da suspensão do fago foi depositada com Pipeta de Pasteur em uma grade de microscopia eletrônica de 300 furos/diâmetro com filme de carbono.

Uma gota do corante (acetato de uranila 2%) foi adicionada e misturada. Após 1 minuto o fluido foi removido com um filtro de papel e a grade foi colocada para secar. No dia seguinte, as grades foram examinadas a procura de fagos que aparecem como estruturas translúcidas negativas contra um fundo escuro.

A microscopia eletrônica foi realizada no Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1200 EXLL.

Aumento: 200.000 a 300.000 vezes.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Amostra hospedeira

Foram obtidas 4 exemplares de *Rhodococcus* a partir das amostras de detritos e fezes denominadas Re1, Re3, Re4 e Re6. Uma amostra foi obtida através de lavado traqueo-alveolar de um potro com sinais clínicos de rodococose. Esta amostra foi chamamada de LTB. Foram utilizadas também amostras ATCC 13701 (*American Type Culture Collection*) que foram doadas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria/RS. Duas amostras de campo, fornecidas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, identificadas como 1339/95 e 602/07.

Tabela 2 – Origem das amostras de *Rhodococcus sp.* e resultado do PCR

<b>Amostra</b>	<b>Origem</b>	<b>PCR</b>
Re 1	Fezes	Vap A negativa
Re 3	Fezes potro doente	Vap A negativa
Re 4	Detritos	Vap A positiva
Re 6	Fezes piquete contaminado	Vap A negativa
ATCC 13701	UFSM	Vap A positiva
LTB	Lavado traqueo-bronquico potro doente	Vap A positiva
1339/95	Labacvet/ UFRGS	Vap A positiva
602/07	Labacvet/ UFRGS	Vap A positiva

Fonte: o próprio autor

Figura 1 - *Rhodococcus* semeados em placa de meio TSA (Tryptic Soy Agar)



Fonte: o próprio autor

Figura 2 - Resultado de PCR para gênero *Rhodococcus* e VapA.



Fonte: o próprio autor

Os dois primeiros poços são os controles positivos, seguido de 3 amostras e por último o controle negativo.

Tabela 3 – Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Amostra	Antimicrobianos						
	Amicacina	Gentamicina	Eritromicina	Azitromicina	Ampicilina	Rifampicina	Sulfadiazina
Re 1	S	S	S	S	R	S	S
Re 3	S	S	S	S	R	S	R
Re 4	S	S	S	S	R	S	R
Re 6	R	S	S	S	I	I	I
13701	S	S	S	S	R	S	R
LTB	S	S	S	R	R	S	S
1339/95	I	S	S	S	R	S	R
602/07	S	S	R	S	S	S	R

Fonte: o próprio autor

S – sensível ( $\geq 18$  mm)

I – intermediário ( $13 \leq 17$  mm)

R – resistente ( $\leq 12$  mm)

## 6.2 Bacteriófagos

Foram isoladas 14 amostras positivas nos *spot tests* iniciais considerando a bactéria hospedeira utilizada no isolamento. As amostras foram denominadas **A, B, C, D, E, F, G, I, J, K, L, Q, AP, HJ**. Estas amostras foram obtidas a partir de raspagem do solo de locais onde há presença de equinos de acordo com a tabela a seguir

Tabela 4 – Procedência das amostras

(continua)

FAGO	PROCEDÊNCIA
A	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
B	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
C	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
D	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo

(conclusão)

<b>FAGO</b>	<b>PROCEDÊNCIA</b>
E	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
F	Cama de cocheira de haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
G	Cama de cocheira de haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
I	Cama de cocheira de haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
J	Cama de cocheira de haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
K	Cama de cocheira de haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
L	Área próxima aos cochos de piquetes de um haras de cavalos Brasileiro de Hipismo
Q	Piquetes da Faculdade de Veterinária /UFRGS
AP	Mangueira de uma cabana de cavalos crioulos
HJ	Piquete Maternidade – Haras criação cavalos Brasileiro de Hipismo

Fonte: o próprio autor

### 6.2.1 Ação lítica dos bacteriófagos

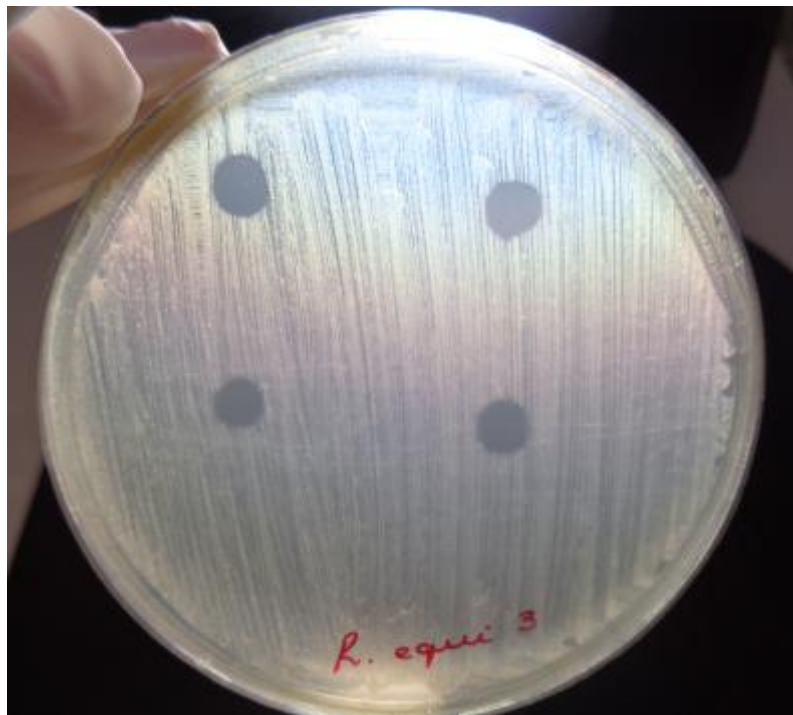
Após o isolamento e enriquecimento dos bacteriófagos encontrados, constatou-se a gama de hospedeiros sensíveis a cada um deles. Obteve-se o seguinte resultado:

Tabela 5 – Sensibilidade dos hospedeiros aos bacteriófagos

<b>FAGO</b>	<b>BACTÉRIA HOSPEDEIRA</b>						
	<b>Re 1</b>	<b>Re 3</b>	<b>Re 4</b>	<b>Re 6</b>	<b>13701</b>	<b>1339/95</b>	<b>LTB</b>
A				+			
B		+		+			
C	+						
D		+					
E		+				+	
F		+				+	
G		+					+
I	+				+		
J			+		+		+
K					+		+
L			+				
Q	+	+				+	
AP		+					+
HJ		+					+

Fonte: o próprio autor

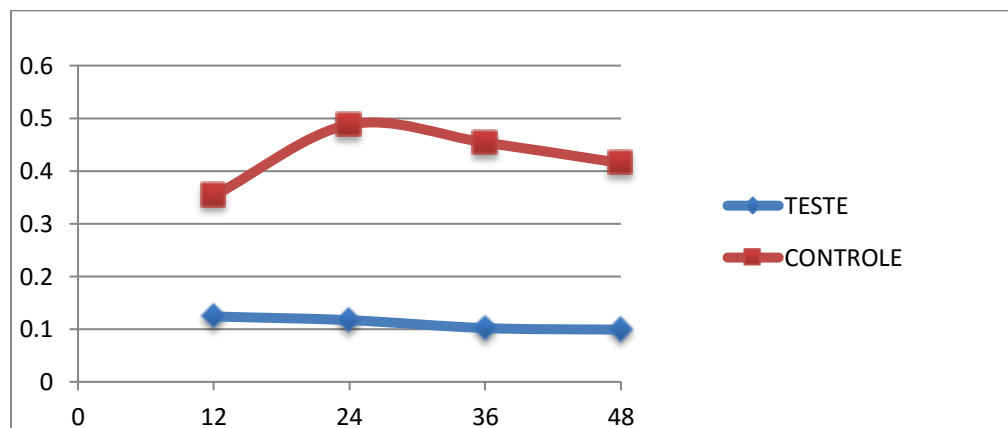
Figura 3 - Ação lítica do fago HJ sobre o cultivo de *Rhodococcus equi* 3



Fonte: o próprio autor

### 6.2.2 Curva de atuação dos bacteriófagos

Gráfico 1 - Leitura da Absorbância Óptica de solução de bacteriana Re3 com adição de bacteriófago HJ (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm



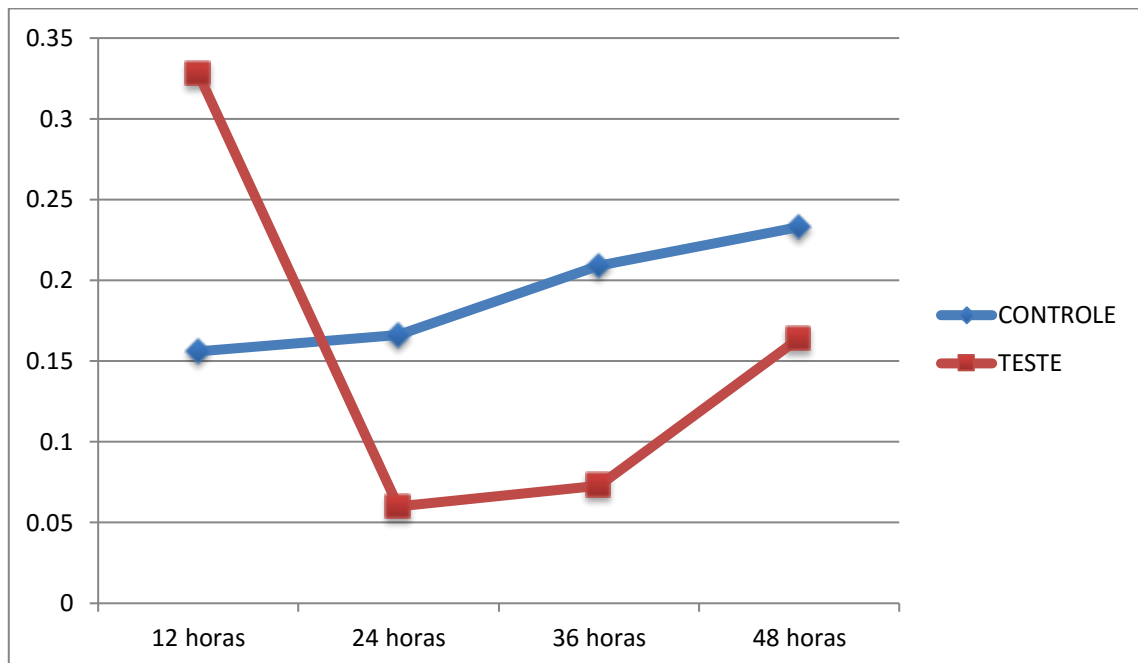
Fonte: o próprio autor

Tabela 6 – Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (Re 3)

Tempo de Cultivo	D.O	Contagem de Colônias
24 horas	0,124	62.10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,415	155.10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

Gráfico 2 - Leitura da Absorvância de soluções de amostras de *Rhodococcus equi* (Re1) com adição de bacteriófago Q (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE) em espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm



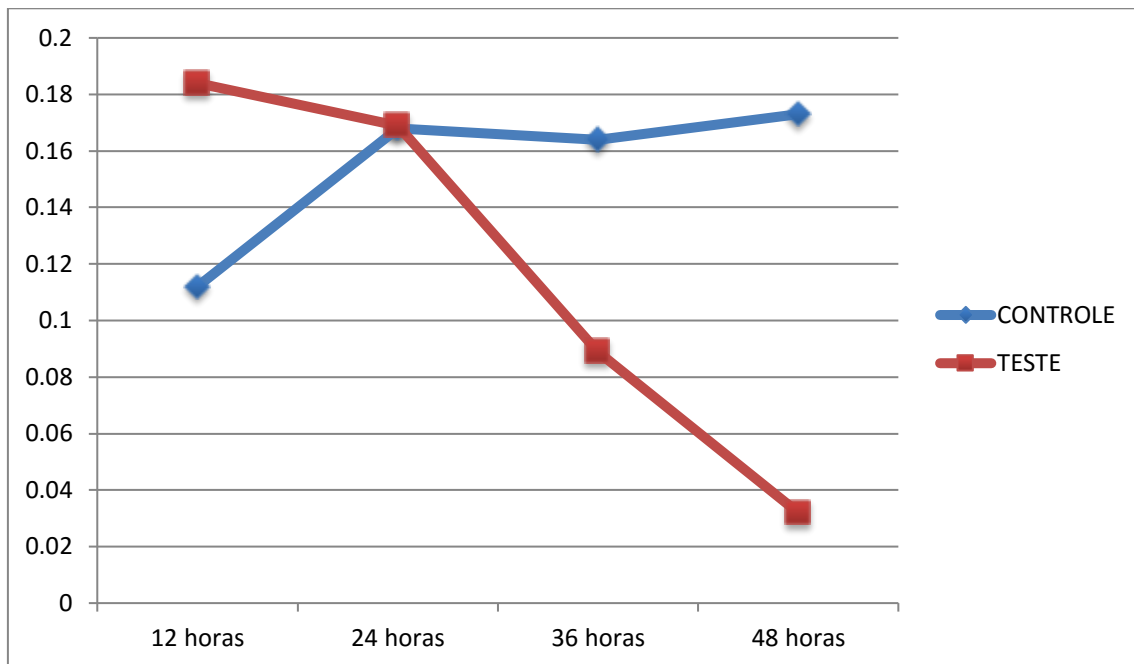
Fonte: o próprio autor

Tabela 7 – Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (Re 1)

Tempo de Cultivo	D.O	Contagem de Colônias
24 horas	0,166	68 . 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,233	167 . 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

Gráfico 3 - Leitura da Absorbância de amostras de *Rhodococcus equi* (Re 4) com adição de bacteriófago L (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE)



Fonte: o próprio autor

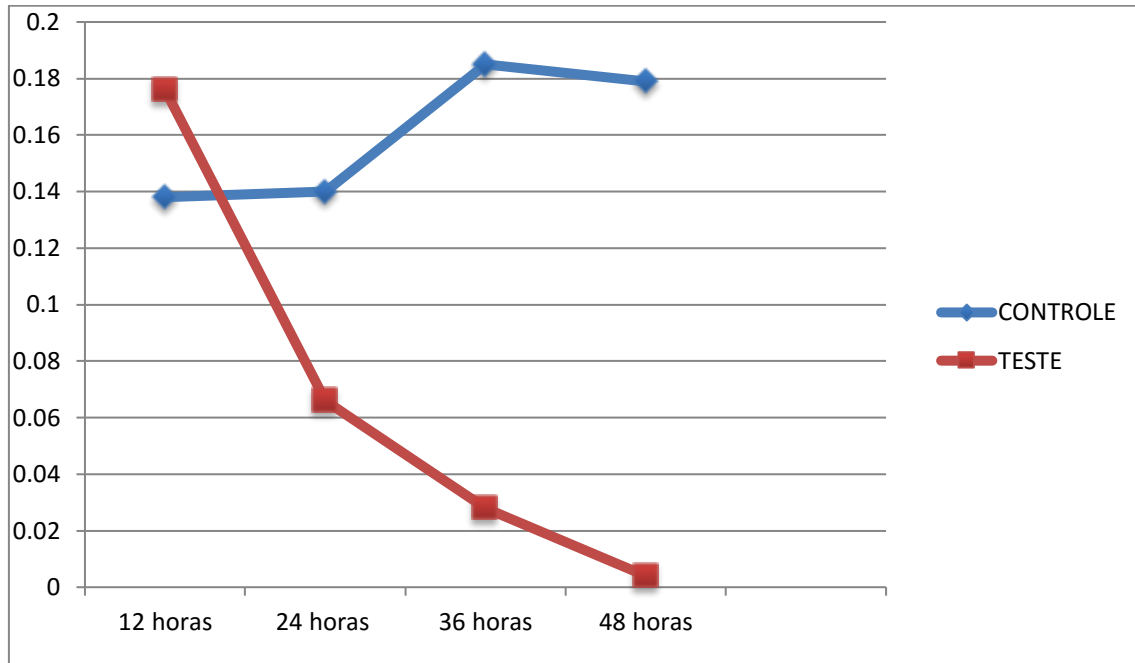
Tabela 8 – Relação entre absorvância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (Re 4)

Tempo de Cultivo	D.O	Contagem de Colônias
24 horas	0,169	26 . 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,173	215 . 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor



Gráfico 4 - Leitura da Absorbância de amostras de *Rhodococcus equi* (ATCC 13701) com adição de bacteriófago K (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE)



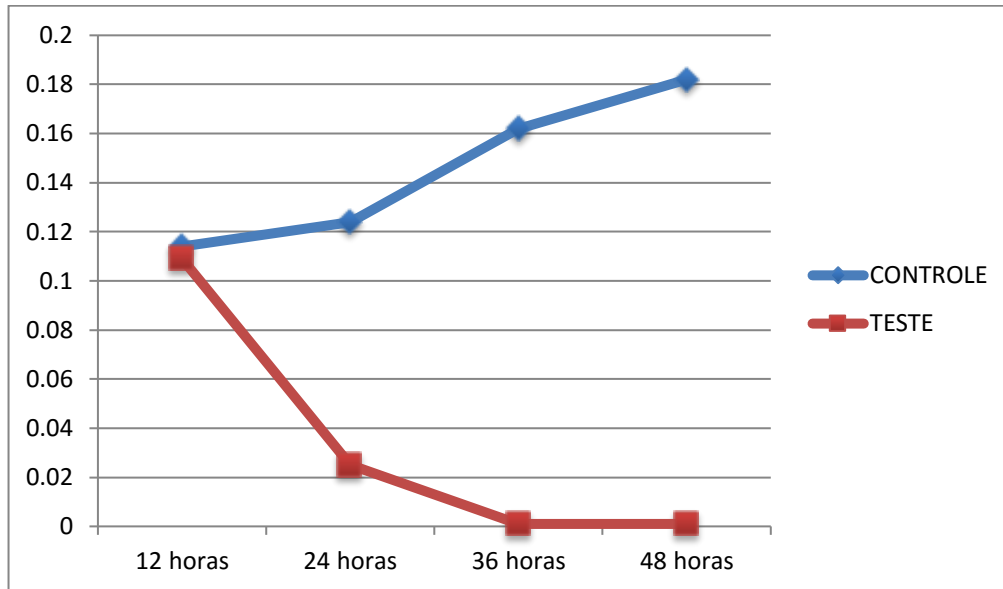
Fonte: o próprio autor

Tabela 9 – Relação entre absorbância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (ATCC 13701)

<b>Tempo de Cultivo</b>	<b>D.O</b>	<b>Contagem de Colonias</b>
24 horas	0,14	64 . 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,179	226. 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

Gráfico 5 - Leitura da Absorbância de amostras de *Rhodococcus equi* (LTB) com adição de bacteriófago AP (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE)



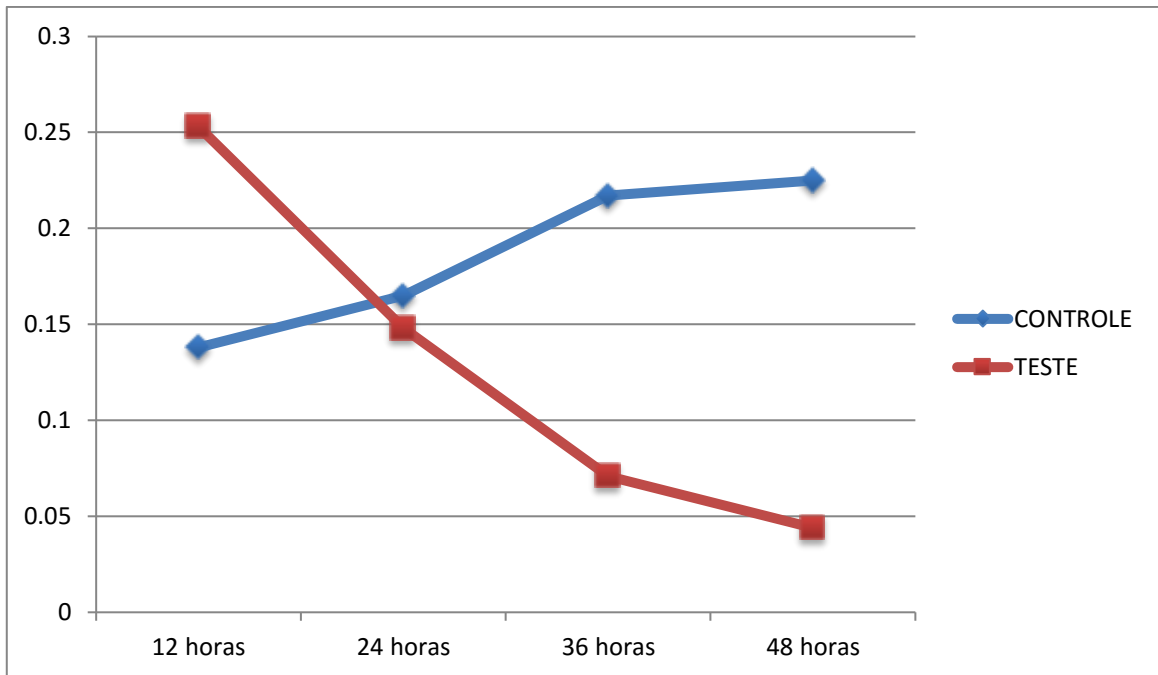
Fonte: o próprio autor

Tabela 10 – Relação entre absorbância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* LTB

Tempo de Cultivo	D.O	Contagem de Colonias
24 horas	0,114	32. 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,182	51. 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

Gráfico 6 - Leitura da Absorbância de amostras de *Rhodococcus equi* (602/07) com adição de bacteriófago F (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE)



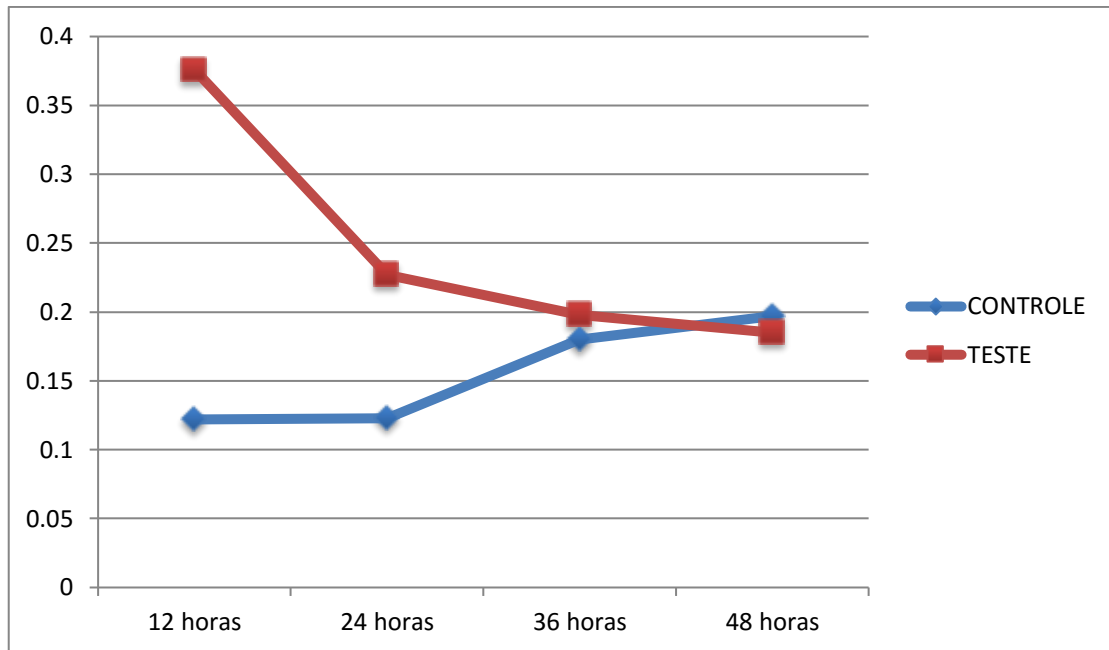
Fonte: o próprio autor

Tabela 11 – Relação entre absorbância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (602/07)

<b>Tempo de Cultivo</b>	<b>D.O</b>	<b>Contagem de Colônias</b>
24 horas	0,165	66. 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,225	83. 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

Gráfico 7 - Leitura da absorbância de amostras de *Rhodococcus equi* (1339/95) com adição de bacteriófago F (TESTE) e sem adição de bacteriófago (CONTROLE)



Fonte: o próprio autor

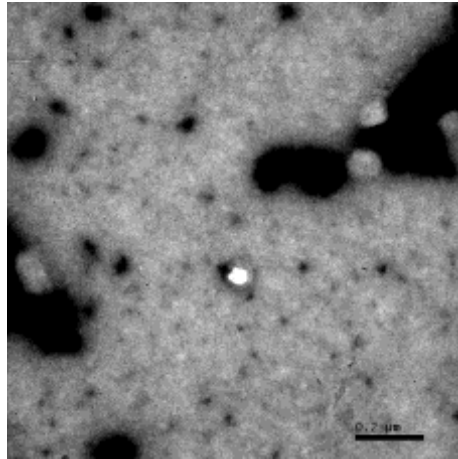
Tabela 12 – Relação entre absorbância óptica e concentração bacteriana de *Rhodococcus equi* (1339/95)

Tempo de Cultivo	D.O	Contagem de Colônias
24 horas	0,123	22. 10 <sup>5</sup> UFC
48 horas	0,197	93. 10 <sup>5</sup> UFC

Fonte: o próprio autor

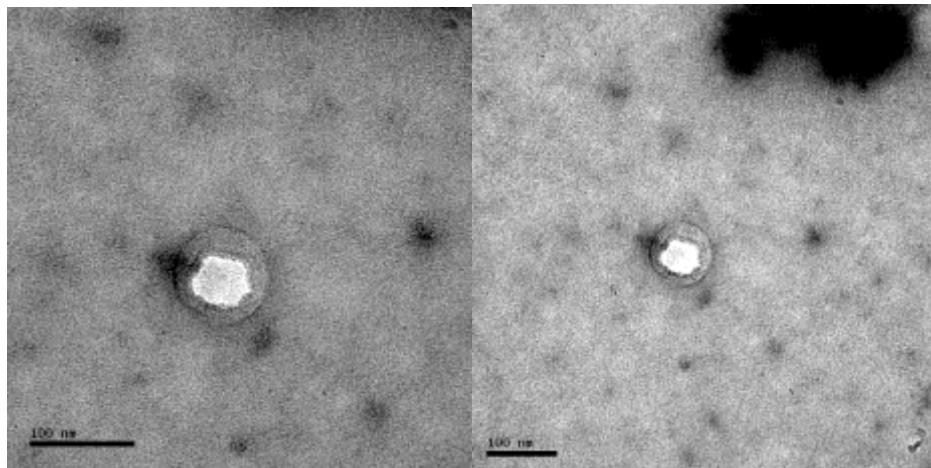
### 6.3 Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão

Imagem 1 - Fago AP



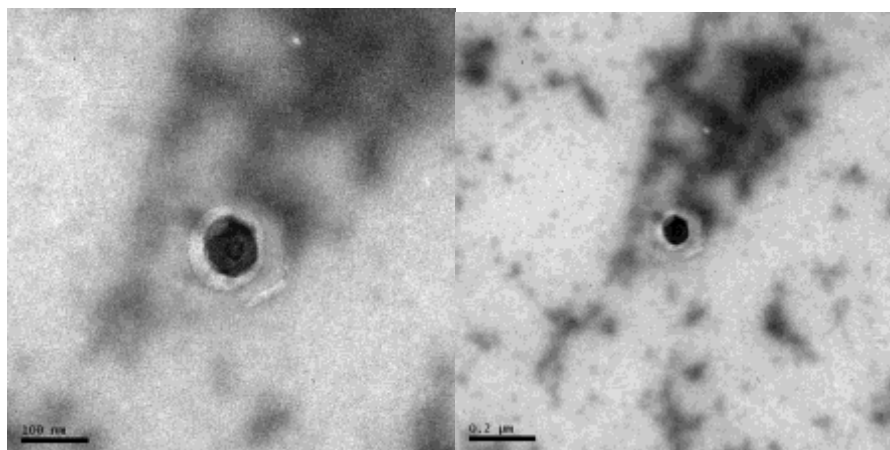
Fonte: o próprio autor

Imagem 2 - Fago AP



Fonte: o próprio autor

Imagem 3: Fago HJ



Fonte: o próprio autor

## 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Das 8 amostras *Rhodococcus* obtidas, 62,5 % (5 amostras) possuíam fator de virulência VapA. 37,5 % (3 amostras) não possuíam fator de virulência VapA.

Das 8 amostras de *Rhodococcus* utilizadas, 100% apresentou sensibilidade a gentamicina.

Das 8 amostras de *Rhodococcus* utilizadas, 87,5% (7/8) apresentaram sensibilidade a Rifampicina, Azitromicina e Eritromicina e 62,5% (5/8) apresentaram resistência a Sulfadiazina.

Dos 14 fagos isolados, 57% (8) foram eficientes em lisar a amostra Re3, 35,7% (5) lisaram a amostra LTB, 21,43% (3) lisaram amostras Re1, 13701 e 1339/95 e 14,3% (2) lisaram amostras de Re4, Re6.

Foi aplicado Teste T com significância de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ) sendo considerado significativas as variações obtidas nos grupos Re3 + HJ, 33701+ K, LTB + AP.

## 8 DISCUSSÃO

No presente trabalho, das 8 amostras de *R. equi* obtidas, 03 não possuíam fator de virulência Vap A. Estas amostras foram obtidas de amostras de solo e fezes. Segundo Muscatello *et al.* (2006), não há associação entre a concentração de *R. equi* virulentos ou a proporção de *R. equi* virulentos nas amostras de solo e a prevalência de pneumonia. Os autores mostraram que concentração de *R. equi* virulentos no ar e a proporção de bactérias virulentas no ar estão associadas a prevalência de rodococose.

Segundo Porto, Fernandes e Barreira (2011), o ensaio de PCR tem sido utilizado para identificar o DNA da bactéria, com destaque para reação direcionada à detecção do gene vapA, mostrando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 90,6% a partir do lavado traqueal, quando comparado a 57,1% e 93,8% da cultura microbiológica. Essa técnica permite identificar cepas de *R. equi* e simultaneamente avaliar a presença do gene vapA, diminuindo o tempo necessário para o diagnóstico e permitindo o acompanhamento da eficiência da terapia antimicrobiana.

No presente trabalho, as amostras de *R. equi* que apresentaram fator de virulência vapA positivo no resultado do PCR, foram aquelas obtidas de potros que apresentaram sinais clínicos compatíveis com rodococose, duas provenientes de necropsia, uma proveniente de detritos de cocheira e uma amostra ATCC. De acordo com Takai *et al.* (1996), *R. equi* virulentos tem sido isolados da grande maioria dos abscessos pulmonares de potros infectados. Muscatello, Gilkerson e Browning (2009), reportaram a presença de *R. equi* virulentos no ar expirado do pulmão de potros naturalmente infectados. Compararam a concentração de *R. equi* virulentos no ar exalado e a concentração destes organismos em amostras de ar ambiental obtidas das mangueiras e maternidades. A concentração de cepas *R. equi* contendo o gene *VapA* foi significativamente maior no ar exalado de potros do que no ar ambiental. Não encontraram diferença significativa na concentração média de *R. equi* virulentos obtidos do ar expirado de potros clinicamente saudáveis e potros doentes. Os autores sugeriram a possibilidade de transmissão via aerossóis entre potros e o impacto significativo sobre a prevalência de pneumonia por *R. equi* em haras de criação. Em 2006, Muscatello *et al.* estudaram a associação entre a ecologia do *R. equi* virulentos e a epidemiologia da pneumonia por *R. equi* através da avaliação de amostras de solo obtidas em estações de monta de haras de Puro Sangue Inglês com diferentes históricos de prevalência de rodococose. Verificaram que poucas variáveis influenciam a concentração de cepas virulentas. A acidificação do solo pode contribuir para elevar a proporção de cepas virulentas

na população de *R. equi*. Estratégias de manejo ambiental podem reduzir os níveis de exposição de potros suscetíveis a *R. equi* virulentos reduzindo o impacto da pneumonia em criações endêmicas. Estes dados nos levam a sugerir a aspersão de soluções enriquecidas com fagos de diferentes sensibilidades no ambiente de confinamento de potros em idade suscetível.

Quanto a sensibilidade das amostras de *R. equi* aos antimicrobianos, o presente trabalho mostrou que as amostras de *R. equi* isoladas, apresentaram sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da rodococose (Azitromicina, Eritromicina e Rifampicina). Apesar da grande maioria dos isolados de *R. equi* apresentar sensibilidade aos macrolídeos quando associados à rifampicina, sabe-se que é crescente o número de isolados que apresentam resistência (GIGUÈRE *et al.*, 2010). A limitação do sucesso da terapia antimicrobiana contra *R. equi*, principalmente em isolados resistentes aos antimicrobianos de eleição têm estimulado o investimento em estudos de novas alternativas de tratamento da doença (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011).

Com relação aos bacteriófagos, neste trabalho, foram isolados bacteriófagos líticos para todas as amostras de *R. equi* utilizadas no enriquecimento. Destas, 3 combinações de fagos e *Rhodococcus sp.* produziram redução significativa no crescimento bacteriano. Petrovski *et al.* (2012) isolaram quatro fagos utilizando cepas de *Rhodococcus* como hospedeiro. Destas, uma apresentou ação lítica contra *R. equi* (Requ10). A microscopia eletrônica desta amostra mostrou características morfológicas compatíveis com fagos da família *Siphoviridae*. Salifu, Campbell Casey e Foley (2013), isolaram 27 bacteriófagos do solo e detectaram que a maioria dos fagos eram do grupo *Siphoviridae*. Um fago era pertencente ao grupo *Myoviridae*. Os autores definiram uma ampla gama de hospedeiros sensíveis aos fagos isolados inclusive *R. equi* provenientes de isolados clínicos. Eles consideram que a coleção de bacteriófagos oferece potencial para o desenvolvimento de cockteis terapêuticos ou, ainda, como biocontrolador do patógeno em ambientes contaminados.

A eficácia da ação dos bacteriófagos contra *R. equi* do solo demonstrada por Summer *et al.* (2011) que sugerem que estes agentes possam ter uma potencial utilização profilática na ocorrência de rodococose. Os autores observaram um crescimento bacteriano no solo estéril, incubado com  $1,0 \times 10^5$  UFC/g para  $7,4 \times 10^7$  UFC/g após 48 horas de incubação a 30°C na ausência de fagos. Este crescimento rápido é um reflexo do conteúdo nutricional contido no solo, do estágio de crescimento da cultura inoculada e da ausência de outros microorganismos que competiriam com o *R. equi*. Devido à alta densidade bactérias no solo ( $10^8$  a  $10^9$  bactérias por grama de solo) e à diversidade genética bacteriana do solo, a competição é inevitável. O crescimento bacteriano rápido contribui para a maior eficiência lítica do bacteriófago.



Entretanto, deve ser salientado que a densidade e fisiologia das populações ambientais de *R. equi* devem variar significativamente. A mesma consideração vale para os resultados obtidos no presente trabalho.

Summer *et al.* (2011), destacaram a importância de conhecer melhor a interação entre *R. equi* e seus fagos para beneficiar as estratégias de utilização destes no controle biológico do patógeno no ambiente de criação de equinos.

Shibayama e Dabbs, (2011) consideram os fagos uma importante fonte para o desenvolvimento de drogas antibacterianas. Devido a sua abundância e diversidade, os fagos podem inibir seu hospedeiro e processar uma variedade de suas proteínas. Os autores utilizaram *R. equi* e o fago YF1 para demonstrar que um único fago pode possuir vários genes que inibem seu hospedeiro. Estes genes na maioria das vezes codificam proteínas de função desconhecida, o que confirma o potencial dos fagos em fornecer novos desafios antibacterianos.

Segundo Gill e Hyman (2010), uma vez que um ou mais fagos tenham sido isolados, eles devem ser caracterizados para que se determine se serão eficazes na aplicação. O primeiro passo é determinar se o fago é ativo contra o hospedeiro e contra outras bactérias que não fizeram parte do enriquecimento.

## 8 ARTIGO 1

### ISOLAMENTO E SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE RHODOCOCCUS EQUI ISOLADOS EM PROPRIEDADE ENDÊMICA<sup>1</sup>

### ISOLATION AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF RHODOCOCCUS EQUI ISOLATE FROM ENDEMIC FARM

**Valesca Peter dos Santos<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina de Equinos, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail:

#### RESUMO

A rodococose causa grandes prejuízos na indústria de equinos. Nas propriedades onde ocorre de forma endêmica, gera altos custos com prevenção, tratamento e, muitas vezes os potros acometidos vêm a óbito. O presente trabalho teve como objetivo isolar *Rhodococcus equi* ambientais e de casos clínicos em uma propriedade endêmica, caracterizá-los quanto ao fator de virulência vapA e testar as amostras quanto a sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de pneumonia causada por este agente.

**Palavras-chave: equinos, pneumonia, antimicrobianos, sensibilidade, Rhodococcus equi**

#### ABSTRACT

The rhodococcosis causes major losses in the equine industry. On farms where the disease is endemic, costs associated with veterinary care, long term therapy and mortality of some foals may be very high. This study aimed to isolate environmental and clinical *Rhodococcus equi* on endemic farm, characterize them for the vapA gene and test samples for sensitivity to the main antibiotics used to treat pneumonia caused by this agent.

**Key words: equine, pneumonia, antibiotics, sensitivity, Rhodococcus equi**

#### INTRODUÇÃO

*Rhodococcus equi* é uma das causas mais importantes de pneumonia em potros de 1 a 6 meses de idade (Giguère e Prescott, 1997).

*R. equi* está presente na maioria dos criatórios de cavalos do mundo. A prevalência de doença, no entanto, varia de região para região e de ano para ano. A incidência de rodococose apresenta status variável: enzoótica em alguns haras, esporádica em outros e, inexistente em

---

<sup>1</sup> Artigo submetido para publicação no periódico científico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* -- formatado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico.

muitos locais. Isto pode ser explicado pelas diferenças na densidade de potros, manejo da fazenda e fatores ambientais como temperatura, poeira e pH do solo (Muscatello *et al.*, 2007). Isto porque, embora qualquer animal possa ser infectado, muitos desenvolvem anticorpos e não adoecem. A ocorrência da doença é um reflexo do ambiente (temperatura, umidade, solo, acúmulo de dejetos, pH), do manejo e da virulência do agente (Krewer *et al.*, 2008).

A rodococose é um problema mundial e, no Brasil, é uma das doenças mais severas na criação de potros (Porto *et al.*, 2011).

O *R. equi* é um habitante do solo e pode estar presente nas fezes dos animais. É aí que reside a maior dificuldade em se controlar a doença. Não é possível extinguir o agente do ambiente onde há cavalos. As principais formas de prevenção são através da imunização de potros em idade suscetível, detecção precoce da doença e tratamento adequado dos potros doentes. Embora o número de *R. equi* no ambiente seja semelhante em criatórios com história de doença e criatórios sem histórico de doença, os locais afetados têm uma quantidade maior da forma virulenta Vap A positivo. A virulência da bactéria está relacionada à presença de um plasmídeo que codifica um gene responsável pela expressão da proteína Vap A na superfície da bactéria. Esta se expressa em temperaturas superiores a 34° C (Giguère e Prescott, 1997).

Potros infectados experimentalmente com a forma virulenta desenvolvem pneumonia severa. O cavalo adulto carrega o *R. equi* no intestino proveniente do solo contaminado de forma passiva. No intestino de potros acima de 3 meses de idade, o microorganismo se multiplica ativamente alcançando números acima de 10<sup>5</sup>/g de fezes (Giguère e Prescott, 1997).

O *R. equi* tornou-se um desafio na indústria de equinos. Em locais onde há prevalência de infecção, as concentrações ambientais de *Rhodococcus* são muito altas (Cohen *et al.*, 2008).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Para isolar o *Rhodococcus* foram coletadas amostras de fezes de animais provenientes de uma propriedade com histórico de ocorrência de rodococose em potros. A propriedade apresentava casos esporádicos de óbitos em animais de até 6 meses de idade mas somente em 2009 quando 29 dos 36 potros nascidos adoeceram sendo que destes, 6 vieram à óbito, foi que se teve a confirmação do diagnóstico por necropsia e isolamento da bactéria.

As amostras foram coletadas no período de fevereiro a abril de 2013. Os animais amostrados pertenciam ao lote de fêmeas matrizes cujos produtos haviam sido acometidos por *Rhodococcus equi* e os potros estavam em idade suscetível (0-6 meses) naquela ocasião.

As amostras de fezes foram coletadas do reto das éguas. As amostras de fezes dos potros foram coletadas logo após evacuação. Para o isolamento do agente e descontaminação das amostras, utilizou-se como base o protocolo descrito por Finger *et al.* (1997), com modificações, como segue:

8. Coleta de fezes (aproximadamente 50 g) diretamente do reto das éguas ou do chão imediatamente após evacuação quando potros.
9. Misturar 1 g de fezes em 10 ml de água destilada estéril, permanecendo 24 horas em temperatura ambiente para sedimentar.
10. Recolher do sobrenadante e centrifugar a 1075 x g por 10 min.
11. Inocular em *Brain Heart Infusion* (BHI) contendo 6 µg/ml de polimixina B e incubar por 48 horas a 37° C.
12. Centrifugar o caldo a 1075 x g por 5 min e tratar o sedimento com ácido oxálico 2,5% por 60 min a 37°C.
13. Neutralizar o meio com fosfato de sódio dibásico 2,5% e centrifugar novamente.
14. Inocular o sedimento em placas de ágar sangue e em placas de ágar triptona incubados a 37° C por 48 horas.

Após este período, as colônias foram observadas e caracterizadas de acordo com a forma, pigmentação, tempo de crescimento e mucosidade. As colônias de aspecto mucóide, coloração rósea, bordos delimitados e viscosidade foram utilizadas na confecção de esfregaços para a coloração de Gram. As colônias características foram semeadas por esgotamento para a obtenção de cultura pura.

As colônias de bactérias Gram positivas com morfologia compatível com *R. equi* foram testadas quanto ao perfil bioquímico, pesquisa do fator equi através do teste de CAMP e crescimento em meio MacConkey.

As amostras obtidas destes testes foram testadas, através do Teste de Disco Difusão ou Kirby Bauer, para a sensibilidade a antimicrobianos: amicacina, gentamicina florfenicol, eritromicina cefuroxina, amoxicilina+ ácido clavulânico, ampicilina, rifampicina, sulfazotrim.

As amostras foram submetidas a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) no laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (RS) para a determinação de presença do fator de virulência VapA (*virulence-associated protein A*).

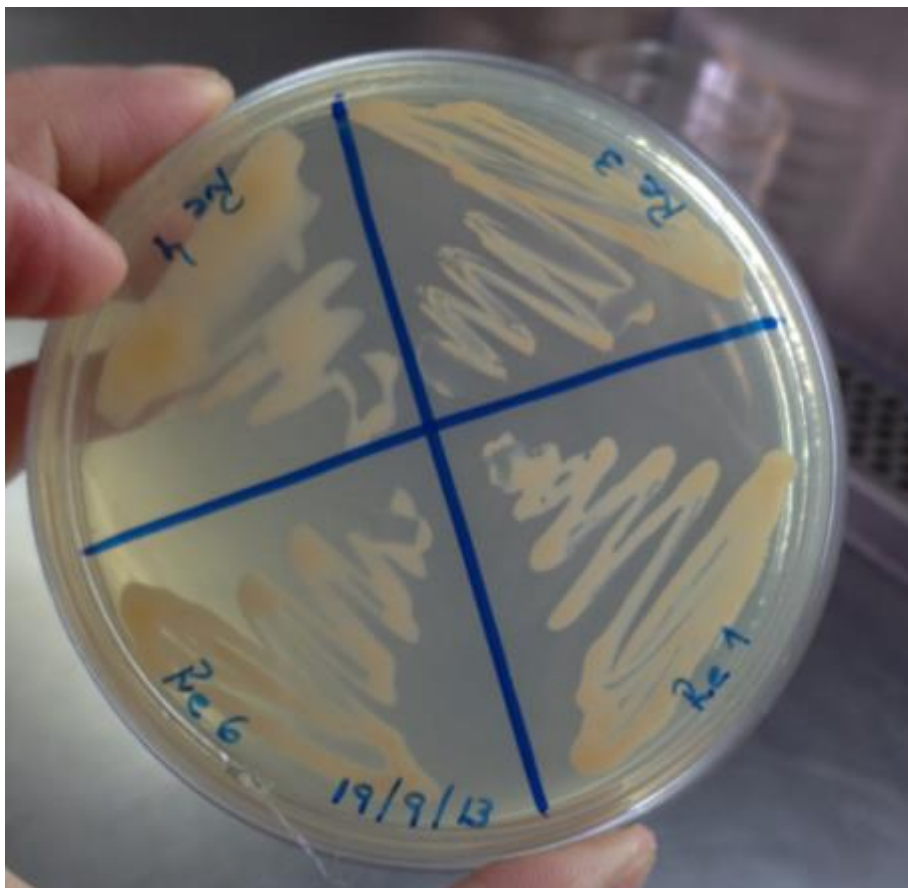
## RESULTADOS

Foram obtidas 4 exemplares de *Rhodococcus* a partir das amostras de detritos e fezes denominadas Re1, Re3, Re4 e Re6. Uma amostra foi obtida através de lavado traqueo-

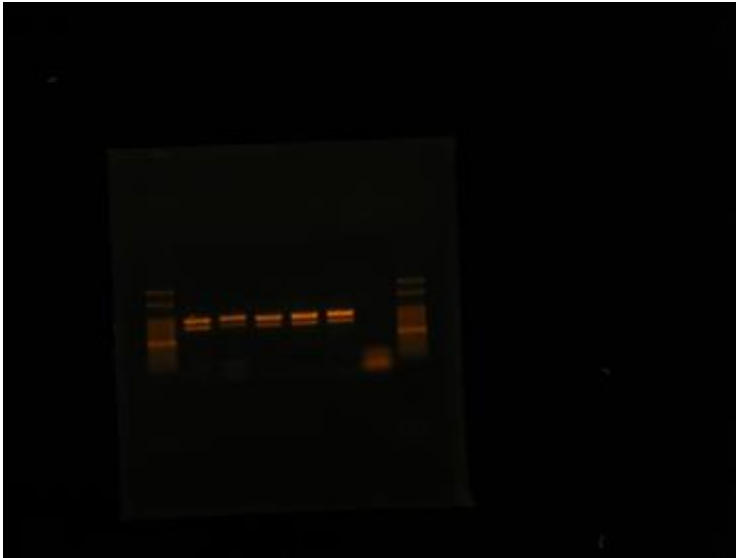
alveolar de um potro com sinais clínicos de rodococose. Esta amostra foi chamamada de LTB. Foram utilizadas também amostras ATCC 13701 (*American Type Culture Collection*) que foram doadas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria/RS. Duas amostras de campo, fornecidas pelo Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, identificadas como 1339/95 e 602/07.

**Tabela 1.** Origem das amostras de *Rhodococcus sp.* e resultado do PCR

Amostra	Origem	PCR
Re 1	Fezes	Vap A negativa
Re 3	Fezes potro doente	Vap A negativa
Re 4	Detritos	Vap A positiva
Re 6	Fezes piquete contaminado	Vap A negativa
ATCC 13701	UFSM	Vap A positiva
LTB	Lavado traqueo-brônquico potro doente	Vap A positiva
1339/95	Labacvet/ UFRGS	Vap A positiva
602/07	Labacvet/ UFRGS	Vap A positiva



**Figura 1.** *Rhodococcus equi* cultivados em meio TSA (Tryptic Soy Agar)



**Figura 2.** Resultado de PCR para gênero *Rhodococcus* e VapA.

**Tabela 2.** Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Amostra	Antimicrobianos						
	Amicacina	Gentamicina	Eritromicina	Azitromicina	Ampicilina	Rifampicina	Sulfadiazina
Re 1	S	S	S	S	R	S	S
Re 3	S	S	S	S	R	S	R
Re 4	S	S	S	S	R	S	R
Re 6	R	S	S	S	I	I	I
13701	S	S	S	S	R	S	R
LTB	S	S	S	R	R	S	S
1339/95	I	S	S	S	R	S	R
602/07	S	S	R	S	S	S	R

S – sensível ( $\geq 18$  mm)

I – intermediário ( $13 \leq 17$  mm)

R – resistente ( $\leq 12$  mm)

Das 8 amostras *Rhodococcus* obtidas, 62,5 % (5 amostras) possuíam fator de virulência VapA. 37,5 % (3 amostras) não possuíam fator de virulência VapA.

Das 8 amostras de *Rhodococcus* utilizadas, 100% apresentou sensibilidade a gentamicina.

Das 8 amostras de *Rhodococcus* utilizadas, 87,5% (7/8) apresentaram sensibilidade a Rifampicina, Azitromicina e Eritromicina e 62,5% (5/8) apresentaram resistência a Sulfadiazina.

## DISCUSSÃO

No presente trabalho, das 8 amostras de *R. equi* obtidas, 03 não possuíam fator de virulência Vap A. Estas amostras foram obtidas de amostras de solo e fezes. Segundo Muscatello *et al.* (2006), não há associação entre a concentração de *R. equi* virulentos ou a

proporção de *R. equi* virulentos nas amostras de solo e a prevalência de pneumonia. Os autores mostraram que concentração de *R. equi* virulentos no ar e a proporção de bactérias virulentas no ar estão associadas a prevalência de rodococose.

Segundo Porto *et al.* (2011), o ensaio de PCR tem sido utilizado para identificar o DNA da bactéria, com destaque para reação direcionada à detecção do gene *vapA*, mostrando uma sensibilidade de 100% e especificidade de 90,6% a partir do lavado traqueal, quando comparado a 57,1% e 93,8% da cultura microbiológica. Essa técnica permite identificar cepas de *R. equi* e simultaneamente avaliar a presença do gene *vapA*, diminuindo o tempo necessário para o diagnóstico e permitindo o acompanhamento da eficiência da terapia antimicrobiana.

No presente trabalho, as amostras de *R. equi* que apresentaram fator de virulência *vapA* positivo no resultado do PCR, foram aquelas obtidas de potros que apresentaram sinais clínicos compatíveis com rodococose, duas provenientes de necropsia, uma proveniente de detritos de cocheira e uma amostra ATCC. De acordo com Takai *et al.* (1996), *R. equi* virulentos tem sido isolados da grande maioria dos abscessos pulmonares de potros infectados. Muscatello *et al.*, 2009, reportaram a presença de *R. equi* virulentos no ar expirado do pulmão de potros naturalmente infectados. Compararam a concentração de *R. equi* virulentos no ar exalado e a concentração destes organismos em amostras de ar ambiental obtidas das mangueiras e maternidades. A concentração de cepas *R. equi* contendo o gene *VapA* foi significativamente maior no ar exalado de potros do que no ar ambiental. Não encontraram diferença significativa na concentração média de *R. equi* virulentos obtidos do ar expirado de potros clinicamente saudáveis e potros doentes. Os autores sugeriram a possibilidade de transmissão via aerossóis entre potros e o impacto significativo sobre a prevalência de pneumonia por *R. equi* em haras de criação. Em 2006, Muscatello *et al.* estudaram a associação entre a ecologia do *R. equi* virulentos e a epidemiologia da pneumonia por *R. equi* através da avaliação de amostras de solo obtidas em estações de monta de haras de Puro Sangue Inglês com diferentes históricos de prevalência de rodococose. Verificaram que poucas variáveis influenciam a concentração de cepas virulentas. A acidificação do solo pode contribuir para elevar a proporção de cepas virulentas na população de *R. equi*. Estratégias de manejo ambiental podem reduzir os níveis de exposição de potros suscetíveis a *R. equi* virulentos reduzindo o impacto da pneumonia em criações endêmicas. Estes dados nos levam a sugerir a aspersão de soluções enriquecidas com fagos de diferentes sensibilidades no ambiente de confinamento de potros em idade suscetível.

Quanto a sensibilidade das amostras de *R. equi* aos antimicrobianos, o presente trabalho mostrou que as amostras de *R. equi* isoladas, apresentaram sensibilidade aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento da rodococose (Azitromicina, Eritromicina e Rifampicina). Apesar da grande maioria dos isolados de *R. equi* apresentar sensibilidade aos macrolídeos quando associados à rifampicina, sabe-se que é crescente o número de isolados que apresentam resistência (Giguère *et al.*, 2010). A limitação do sucesso da terapia antimicrobiana contra *R. equi*, principalmente em isolados resistentes aos antimicrobianos de eleição têm estimulado o investimento em estudos de novas alternativas de tratamento da doença (Porto *et al.*, 2011).

## REFERÊNCIAS

- COHEN, N.D.; CARTER, C.N.; SCOTT, H.M. *et al.* Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *Am. J. Vet. Res.*, v.69, p.385-395, 2008.
- FINGER, G.P.; CARDOSO, M.; MATTOS, R.C.; KELLER, A. *Rhodococcus equi* em amostras de solo, fezes e pulmão de equinos provenientes da grande Porto Alegre e Região Noroeste do Rio Grande do Sul. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.25, p.61-73, 1997.
- GIGUÈRE, S.; LEE, E.; WILLIAMS, E. *et al.* 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*. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.237, p.74-81, 2010.
- GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F. Strategies for the control of *Rhodococcus equi* infections on enzootic farms. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF THE EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. *Proceedings...* Lexington: AAEP, 1997. v.43, p.65-70.
- KREWER, C.C.; SPRICIGO, D.A.; BOTTON, S.A. *et al.* Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in South of Brazil by multiplex PCR. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p. 188-193, 2008.
- MUSCATELLO, G.; ANDERSON, G.A.; GILKERSON, J.R. *et al.* Association between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.72, p.6152-6160, 2006.
- MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J.R.; BROWNING, G.F. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. *J. Clin. Microbiol.*, v.47, p.734-737, 2009.



PORTO, A.C.R.C.; FERNANDES, W.R.; BARREIRA, M.C.R. *Rhodococcus equi* parte 1: epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento. *Ciênc. Rural*, v.41, p.2143-2150, 2011.

TAKAI S. FUKUNAGA, N.; KAMISAWA, K. *et al.* Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. *Microbiol. Immunol.*, v.40, p.591-594, 1996.

## 9 ARTIGO 2

# Isolation of Lytic Bacteriophages for *Rhodococcus sp.*<sup>2</sup>

bacteriophages; isolation; foals; *Rhodococcus*; equi; horses

## Abstract

*Rhodococcus equi* is an important cause of piogranulomatous pneumonia and lymphadenitis in foals aged 1-6 months that results in high morbidity and often mortality. In endemic properties, the disease is responsible for generating high costs to treat and prevent the disease. In order to propose an alternative to the environmental control of *Rhodococcus equi*, a protocol for isolation of bacteriophages was applied. Fourteen samples of bacteriophages were isolated, which were obtained from a horse breeding environment. These showed the ability to lyse in vitro field samples of *Rhodococcus equi* with different sensitivities. The result obtained allows us to suggest that phages can be a natural alternative to reduce the bacteria in the environment.

## Introduction

*Rhodococcus equi* is a gram-positive facultative intracellular pathogen. It is a major cause of pneumonia in foals from 3 weeks to 5 months of life [1].

*R. equi* is present in most stud farms around the world. The prevalence of the disease, however, varies from region to region and from year to year. The incidence of rhodococcosis has a variable status: enzootic in some horse farms, sporadic in others, and nonexistent in many places. This can be explained by differences in the density of foals, farm management and environmental factors such as temperature, dust, and soil pH [2]. This is because, although any animal may be infected, many develop antibodies and do not get sick. The occurrence of the disease reflects the environment (temperature, humidity, soil, buildup of

---

<sup>2</sup> Artigo submetido para publicação no periódico científico *Equine Veterinary Journal* – formatado de acordo com as normas estabelecidas pelo periódico.

waste, pH), managements and agent virulence [3]. The places where *R. equi* infection is frequent contain high levels of *Rhodococcus* in the environment [4].

Rhodococcosis is a world problem and, in Brazil, it is one of the most severe diseases in foal breeding [5].

Bacteriophages, or phages, are viruses that infect and destroy bacteria. The combination of nucleic acid and capsid forms a nucleocapsid. Each has a host bacterium or group of host bacteria. Phages, like all viruses, are absolute parasites. Although they carry all the information to command reproduction in a suitable host, they lack the machinery needed to generate energy or ribosomes for the synthesis of proteins [6]. In current medicine, they are used mainly in Eastern European countries as an alternative to the use of antimicrobials. Studies of bacteriophages have recently gained prominence due to the increasing emergence of infections that are resistant to traditional antimicrobials [7]. It involves the use of viruses that infect bacteria as therapeutic agents, using the bacteriolytic action involved in their replication cycle to fight infection, both in medical environments and in veterinary medicine and agriculture [7].

Despite the quantity and diversity of phages, natural selection favored the persistence of natural microbial populations through the specificity of phages [8]. Most of the phages described, with few exceptions, infect a rather narrow range of bacteria, often only a strain within a species [9]. In diverse natural environments, this results in fluctuations in the populations of bacteriophages, which cause and respond to fluctuations in host populations [9].

The incidence of rhodococcosis in foals is directly related to the simultaneous occurrence of a higher environmental temperature, a higher concentration of virulent *R. equi* in the environment, a reduction in pastures, which favors the aerosolization of bacteria, and a higher concentration of susceptible organisms [10]. This environmental unbalance favoring bacteria

can be solved by using specific bacteriophages for *Rhodococcus equi* in order to reduce the bacterial load in specific periods and places as a strategy to prevent the occurrence of the disease.

## **Material and methods**

### **Host sample**

Eight strains of *Rhodococcus sp* were used. Of these, four were isolated from the environment in an endemic property for rhodococcosis (Re 1, Re 3, Re 4 and Re 6), an ATCC 13701 sample, and three were isolated from clinical cases (LTB, 1339/95 and 602/07).

### **Isolation of bacteriophages**

#### **Material collection**

For the isolation of bacteriophages for *Rhodococcus equi*, soil samples were collected from areas inhabited by horses, preferably mares with foals. Preference was given to the collection of dark and moist surface material. Approximately 10g of land and debris were collected from 3 maternity stalls, and the area near the troughs where animals crowd for some time was prioritized. A stud farm for Criollo horses was used in the study. On this farm, soil and debris samples were collected from corrals where animals are grouped for routine exams. A sample was taken from the paddocks at the Veterinary Medicine School, Federal University of Rio Grande do Sul.

The bed used by mares with foals was collected from the stalls.

To isolate bacteriophages, a technique described by Twest & Kropinski was used for enrichment using water and soil samples [11].

#### **Enrichment**

Ten g of the soil/stool sample was weighed in sterile 50 ml Falcon tubes. 50 ml of the sterile nutrient medium Tryptic Soy Broth (TSB) was mixed, supplemented with 2 mM magnesium chloride. The material remained at room temperature for 12 hours.

The solid material was removed by centrifugation at 10000 x g for 10 minutes. Next, the supernatant was filtered in a 0.22 µm sterile filter.

The broth produced was mixed with 10 ml of doubly concentrated, sterile TSB nutrient broth, enriched with 2 mM magnesium chloride.

0.1 ml of bacterial culture was added (*Rhodococcus equi* incubated in TSB for 12 hours at 37°C). The material was mixed by inverting the flask and incubated for 24 hours at 37°C.

After this period, the samples were centrifuged at 10,000 x g for 10 minutes and the protocol described above was repeated 5 times.

In the fifth filtering, the material was tested for the presence of bacteriophages, 5 µl of solution was dropped onto a plate seeded with the *Rhodococcus* sample used for enrichment. If the test is positive for the presence of phages, a clear area will appear at the site of the drop, with little or no bacterial growth, unlike the rest of the plate where bacteria are developing.

The culture was treated with 0.1% chloroform, and bacterial debris were cleared by centrifugation at 10,000 x g and filtered through a 0.22 µm filter.

### **Test for presence of bacteriophages**

Six samples isolated from *Rhodococcus equi* were seeded on TSA (Tryptic Soy Agar) plates enriched with magnesium chloride. The samples were kept in TSB medium and subcultured every 48 hours. After seeding, plates were left inside the laminar flow camera until drying up. The points where the phage samples would be tested were marked and identified with permanent marker on the back of the plate. 5 µL of enriched solution for phages were pipetted on the bacterial layer. The plates were incubated for 12 hours to observe bacterial lysis zones.

### **Determining hosts by spot test**

Samples of *Rhodococcus* sp. obtained and cultured in TSB broth for at least 12 hours were spread on 10% agar plates using sterile swabs. After approximately 10 minutes, 5 uL of phage solution was pipetted onto the solidified agar layer. The plates were incubated at 37°C for 12 hours. The next day, they were examined for the observation of clear zones in the bacterial layer. All phage samples were examined for lytic activity on all *Rhodococcus* samples obtained.

### **Purification of bacteriophages**

The well defined and isolated phage plaques were cut and placed in 5 ml sterile medium. 1.0 ml of solution containing bacteria cultured for 12 hours was added. The flask was shaken and incubated for 24 hours to be further centrifuged at 10,000 x g and filtered in a 32 µm filter. The phage solution was diluted in a saline-magnesium buffer. An aliquot was used for the production of pellets and for freezing in liquid nitrogen. The remaining sample was kept in a refrigerator (2-8°C).

For the maintenance of phage stocks the saline-magnesium buffer was used as a diluent with addition of gelatin, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) containing 100 mM NaCl, 8.1 mM MgSO<sub>4</sub> and 0.01% (w/v) gelatin. The buffer production uses the following reagents and quantities:

### **Determining phage concentration**

To determine the concentration of phages the double agar layer technique was used as described by Kropinski et al. [12].

Lower Agar Layer (15% Agar): the TSB medium was prepared according to the manufacturer's instructions. Agar was added to a final concentration of 15 g/l. The medium was autoclaved. After autoclaving, the medium was cooled to 55-60°C, and then magnesium chloride was added. The medium was homogenized and cooled to 48-50°C. Thereafter, 25 ml of the medium was poured into Petri dishes. Once cold and solidified, these were packed into plastic bags containing 10 dishes and stored in a refrigerator at 4 °C.

Upper Agar Layer (5% Agar): the medium was prepared according to the manufacturer's instructions. 2 mg of magnesium chloride and agar was added in the amount of 5 g/l of solution. The medium was autoclaved and then 3.0 mL was distributed into covered sterile test tubes and stored in a refrigerator for a month.

In sterile tubes, 100 µl of the host bacterial culture was mixed with 100 µl of an unknown decimal solution of the phage suspension which we want to determine (usually up to  $10^{-7}$ ). 1/10 dilutions were prepared from the culture broth.

The tubes were pre-incubated at 37° C to allow for the adsorption of phages. Next, 3.0 ml of 5% Agar melted at 45° C was added.

The tubes were mixed carefully so as not to form air bubbles in the molten agar. The content was poured into a Petri dish containing 25 ml of 15% agar. The plates were moved in circles to homogenize the distribution of the gel on its surface.

The dish was left on the benchtop of the continuous flow chamber until the 5% agar solidified (about 10 minutes) and incubated with the cover down at 37°C for at least 12 hours.

The next day, the number of plaques formed was counted. Then, the title was calculated as plaque forming units/ml (plaque forming units per milliliter which is equal to the number of plaques x 10 x the inverse of the dilution factor).

### **Assessment of in vitro activity of bacteriophages**

To assess the lytic activity of bacteriophages a bacterial culture of *Rhodococcus* sp. was prepared and cultured in Tryptic Soy Broth (TSB) at 37°C for 12 hours. The criterion for selecting the *Rhodococcus* sample and the phage was the quality of the lysis achieved on the plate during host determination by the Spot Test. Optical absorbance was measured using a spectrophotometer at 600 nm wavelength. This culture was divided into two 5 ml aliquots. 1.0 ml of phage solution was added to one of them, while the other was kept for control. The flasks were incubated at 37°C in an oven. An aliquot was taken from the control sample after

24 and 48 hours for determination of bacterial concentration. The dilution, spread-plating and direct enumeration method was used.

The activity of bacteriophages was determined by measuring optical absorbance at 12-hour intervals.

## Results

### Bacteriophages

Fourteen positive samples were isolated in the initial spot tests considering the host bacteria used in the isolation. Samples were called **A, B, C, D, E, F, G, I, J, K, L, Q, AP, HJ**. These samples were obtained by scraping the ground of places where horses are present according to the table below:

**TABLE 1: Origin of bacteriophage samples**

<b>PHAGE</b>	<b>ORIGIN</b>
A	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
B	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
C	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
D	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
E	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
F	Bedding in a stable on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
G	Bedding in a stable on a Brazilian horse stud farm for equestrianism



I	Bedding in a stable on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
J	Bedding in a stable on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
K	Bedding in a stable on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
L	Area close to the troughs in paddocks on a Brazilian horse stud farm for equestrianism
Q	Paddocks at the Veterinary Medicine School/UFRGS
AP	Corral on a criollo horse farm
HJ	Maternity Stall – Brazilian horse stud farm for equestrianism

---

### **Lytic Action of Bacteriophages**

After isolation and enrichment of the phages found, a range of hosts sensitive to each of them was observed. The following results were achieved:

**TABLE 2: Sensibility of hosts to phages**

PHAGE	HOST BACTERIA						
	Re 1	Re 3	Re 4	Re 6	13701	1339/95	LTB
A				+			
B		+		+			
C	+						
D		+					
E		+				+	
F		+				+	
G		+					+
I	+				+		
J			+		+		+

K			+		+
L				+	
Q	+	+			+
AP				+	
HJ		+			+

### Activity curve for bacteriophages

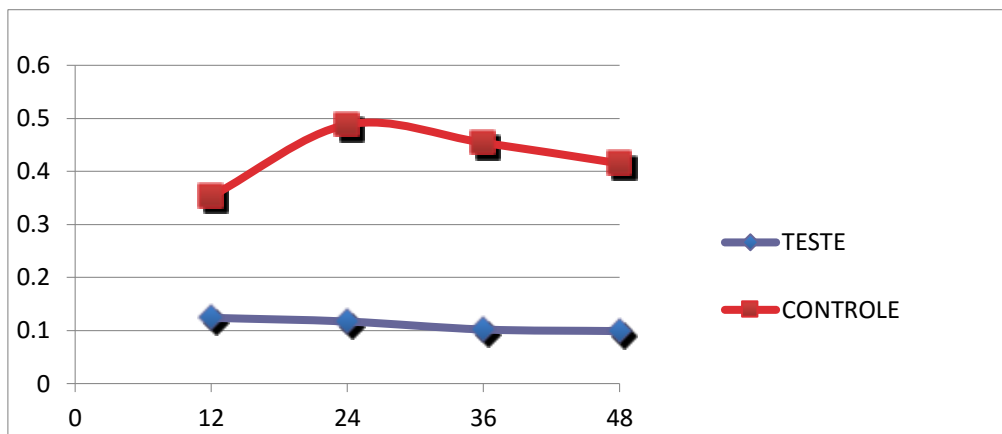


Fig. 1: Optical Absorbance reading of Re3 bacterial solution with addition of the bacteriophage HJ (test) and without addition of bacteriophage (control) on a spectrophotometer at the wavelength of 600 nm:

**TABLE 3: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (Re 3)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.124	62.10 <sup>5</sup> CFU
48 hours	0.415	155.10 <sup>5</sup> CFU

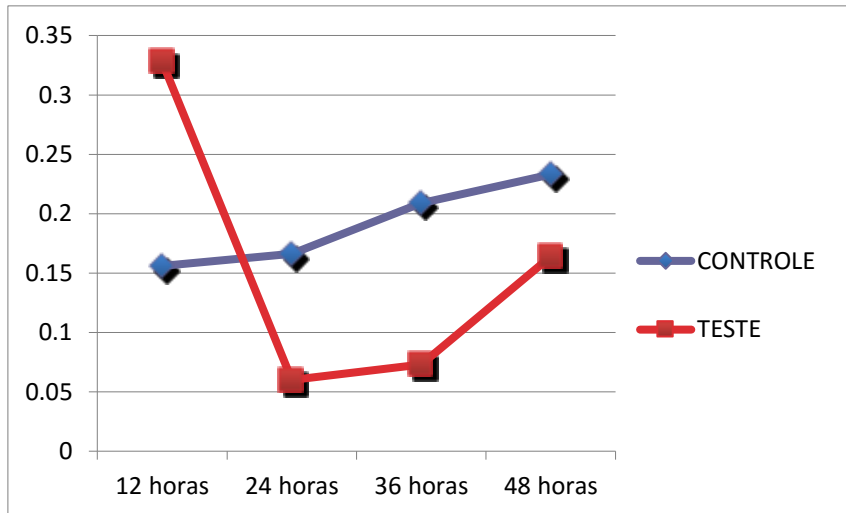


Fig. 2: Absorbance reading for solutions of *Rhodococcus equi* (Re1) samples with addition of the bacteriophage Q (test) and without addition of bacteriophage (control) on a spectrophotometer at the wavelength of 600 nm:

**TABLE 4: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (Re 1)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.166	$68.10^5$ CFU
48 hours	0.233	$167.10^5$ CFU

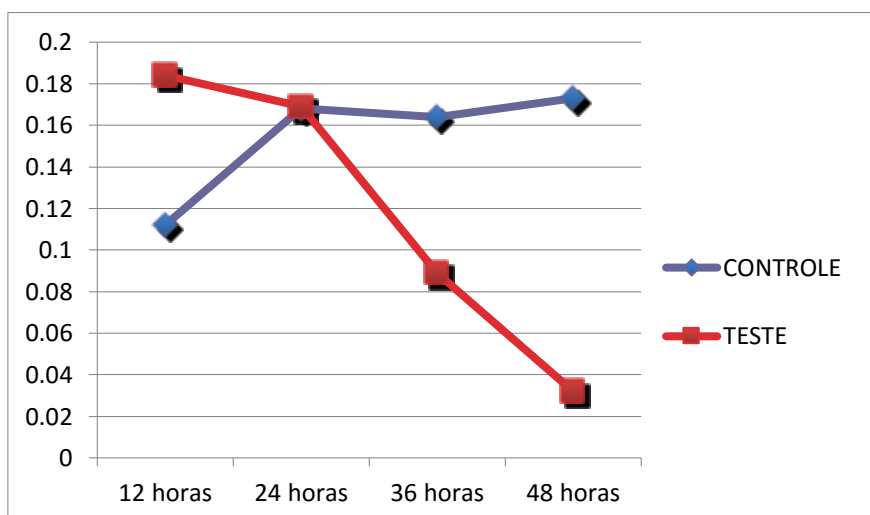


Fig. 3: Absorbance reading for *Rhodococcus equi* (Re 4) samples with addition of the bacteriophage L (test) and without addition of bacteriophage (control):

**TABLE 5: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (Re 4)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.169	26.10 <sup>5</sup> CFU
48 hours	0.173	215.10 <sup>5</sup> CFU

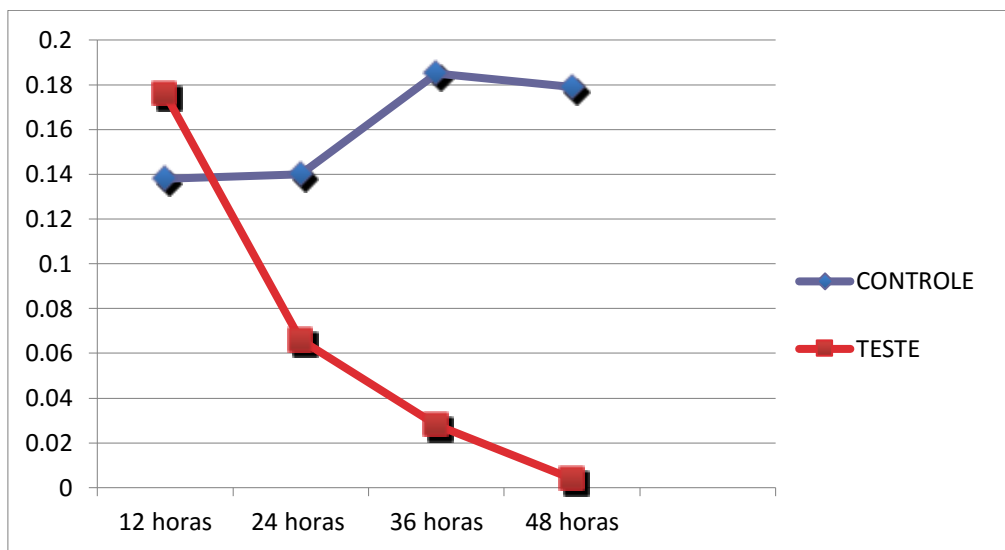


Fig. 4: Absorbance reading for *Rhodococcus equi* (ATCC 13701) samples with addition of the bacteriophage K (test) and without addition of bacteriophage (control):

**TABLE 6: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (ATCC 13701)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.14	64.10 <sup>5</sup> CFU

48 hours

0.179

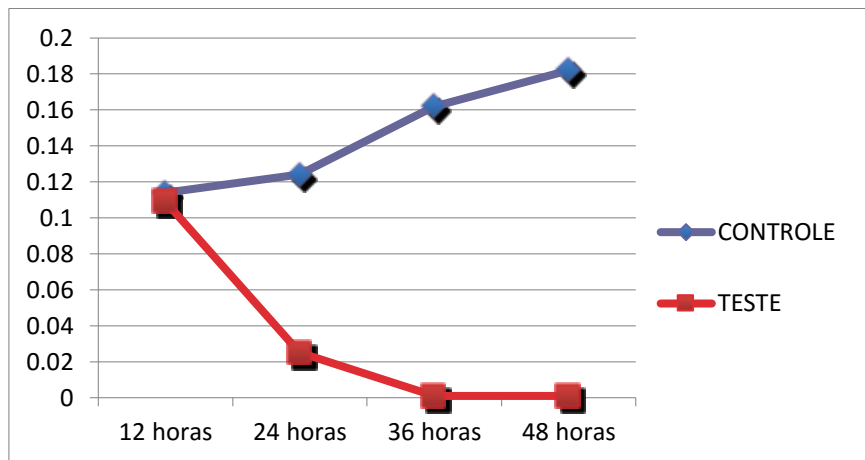
226.10<sup>5</sup> CFU

Fig. 5: Absorbance reading for *Rhodococcus equi* (LTB) samples with addition of the bacteriophage AP (test) and without addition of bacteriophage (control).

**TABLE 7: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* LTB**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.114	32.10 <sup>5</sup> CFU
48 hours	0.182	51.10 <sup>5</sup> CFU

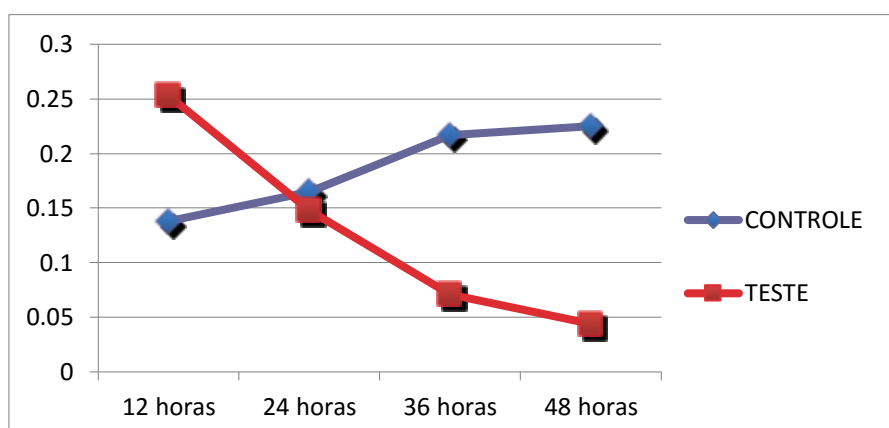


Fig. 6: Absorbance reading for *Rhodococcus equi* (602/07) samples with addition of the bacteriophage F (test) and without addition of bacteriophage (control):

**TABLE 8: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (602/07)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.165	66.10 <sup>5</sup> CFU
48 hours	0.225	83.10 <sup>5</sup> CFU

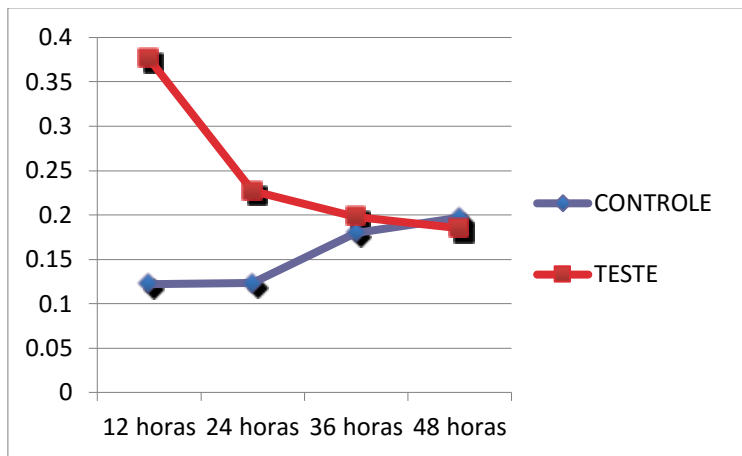


Fig. 7: Absorbance reading for *Rhodococcus equi* (1339/95) samples with addition of the bacteriophage F (test) and without addition of bacteriophage (control):

**TABLE 9: Optical absorbance and bacterial concentration ratio for *Rhodococcus equi* (1339/95)**

Culture Time	OD	Colony Counts
24 hours	0.123	22.10 <sup>5</sup> CFU
48 hours	0.197	93.10 <sup>5</sup> CFU

## Statistical analysis

Of 14 isolated phages, 57% (8) were effective in lysing the Re3 sample, 35.7% (5) lysed the LTB sample, 21.43% (3) lysed the Re1, 13701 and 1339/95 samples and 14.3 % (2) lysed the Re4 and Re6 samples.

A T test with significance level of 0.05 ( $p \leq 0,05$ ) was applied, and the variations found in the Re3 + HJ, 33701+ K, LTB + AP groups were considered significant.

## **Discussion**

Regarding bacteriophages, in this work, lytic bacteriophages were isolated for all samples of *R. equi* used for enrichment. Of these, 3 combinations of phages and *Rhodococcus sp.* produced a significant reduction in bacterial growth. Petrovsky et al isolated four phages using *Rhodococcus* strains as a host. Of these, one had lytic action against *R. equi* (Requ10). An electron microscopy examination of this sample showed morphological characteristics consistent with phages of the Siphoviridae family [13]. Salifu et al. isolated 27 bacteriophages from soil and found that most phages were from the *Siphoviridae* group [14]. A phage belonged to the *Myoviridae* group. The authors defined a wide range of hosts susceptible to isolated phages including *R. equi* from clinical isolates. They consider that the collection of bacteriophages offers potential for the development of therapeutic cocktails or even as a pathogen biocontroller in contaminated environments.

The effectiveness of the action of bacteriophages against *R. equi* from soil as demonstrated by Summer et al. suggests that these agents may potentially have a prophylactic use in the occurrence of rhodococcosis. The authors observed bacterial growth in sterile soil, incubated with  $1.0 \times 10^5$  CFU/g for  $7.4 \times 10^7$  CFU /g after 48 hours of incubation at 30°C in the absence of phages [15]. This quick growth is a reflection of the nutritional content contained in the soil, the growth stage of the inoculated culture and the absence of other microorganisms that compete with *R. equi*. Due to the high density of bacteria in the soil ( $10^8$  to  $10^9$  bacteria per gram of soil) and bacterial genetic diversity in the soil, competition is inevitable. The rapid bacterial growth contributes to a greater lytic efficiency of bacteriophages. However, it should be noted that the density and physiology of environmental populations of *R. equi* are expected to vary significantly. The same consideration applies to the results obtained in this study.

Summer et al. stressed the importance of better understanding the interaction between *R. equi* and its phages to favor the strategies of using these for the biological control of pathogens in a horse breeding environment [15].

Shibayama & Drabbs regard phages as an important source for the development of antibacterial drugs [16]. Due to its abundance and diversity, phages can inhibit its host and process a variety of its proteins. The authors used *R. equi* and the YF1 phage to demonstrate that a single phage can have several genes that inhibit its host. These genes most of the time code proteins that have an unknown function, which confirms the potential of phages to provide new antibacterial challenges.

According to Gil & Hyman, once one or more phages have been isolated, they should be characterized to determine whether they will be effective in an application [17]. The first step is to determine if a phage is active against the host and against other bacteria that were not part of enrichment.

## **Conclusion**

The stud farm has a high load of bacteriophages whose host is *Rhodococcus equi*.

Bacteriophages have in vitro lytic activity against *Rhodococcus equi* strains.

The in vitro bactericidal power of lytic bacteriophages for *Rhodococcus equi* demonstrated in this paper serves as a basis for further studies.

The use of phages is an alternative for pathogen control.

## **References**

1. Giguère, S. (2010) Clinical manifestations, pathogenesis, and diagnosis of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *AAEP Proceedings*, **56**, 121-124.
2. Muscatello, G., Leadon, D.P., Klay, M., Ocampo-Sosa, A., Lewis, D. A., Fogarty, U., Buckley, T., Gilkerson, J. R., Meijer, W. G. and Vazquez-Boland, J. A. (2007) *Rhodococcus*



- equi infection in foals: The science of “rattles”. *Equine Vet. J.* **39**, 470-478. doi: 10.2746/042516407X209217.
3. Krewer, C.C, Spricigo, D.A., Botton, S.A., Costa, M.M., Schrank, I. and Vargas, A.C. (2008) Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in South of Brazil by multiplex PCR. *Braz. J. Microbiol.* **39**, 188-193. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100036>.
  4. Cohen, N.D., Carter, C.N. Scott, H.M, Chaffin, M.K, Smith, J.L., Grimm, M.B., Kuskie, K.R., Takai, S. and Martens, R.J. (2008) Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. *Am. J. Vet. Res.* **69**, 385-395. doi: 10.2460/ajvr.69.3.385.
  5. Porto, A.C.R.C., Fernandes, W.R. and Barreira, M.C.R. (2011) *Rhodococcus equi*, Parte 1: Epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento. *Ciênc. Rural* **41**, 2143-2150. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782011001200017>.
  6. Guttman, B., Raya, R. and Kutter, E. (2005) Basic phage biology. In: *Bacteriophages Biology and Applications*, Ed: E. Kutter and A. Sulakvelidze, CRC Press, Boca Raton, pp 29-66. doi: 10.1201/9780203491751.ch3.
  7. Jagusztyn-Krynicka, E.K. and Wyszynska, A. (2008) The decline of antibiotic era: New approaches for antibacterial drug discovery. *Pol. J. Microbiol.* **57**, 91-98.
  8. Weinbauer, M.G. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 127-181. doi:10.1016/j.femsre.2003.08.001.
  9. Kimura, M., Jia, Z., Nakayama, N. and Asakawa, S. (2008) Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. *Soil Sci. Plant Nutr.* **54**, 1-32. doi: 10.1111/j.1747-0765.2007.00197.x.
  10. Muscatello, G., Anderson, G.A., Gilkerson, J.R. and Browning, G.F. (2006) Associations between the ecology of virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi*

- pneumonia on australian thoroughbred farms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 6152-6160. doi: 10.1128/AEM.00495-06.
11. Twest, R. and Kropinski, A.M. (2009). Bacteriophage enrichment from water and soil. *Methods Mol. Biol.* **501**, 15-21. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.
12. Kropinski, A.M., Mazozzo, A., Waddell, T.E., Ligoehr, E. and Johnson, P. (2009) Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. In: *Bacteriophages Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization and Interactions*. Ed: M.R.J. Clokie and A. Kropinski, Springer, Berlin. pp 69-76. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_7.
13. Petrovski, S., Dyson, Z.A., Seviour, R.J. and Tillett, D. (2012) Small but sufficient: the *Rhodococcus* phage RRH1 has the smallest known *Siphoviridae* genome at 14.2 kilobases. *J. Virol.*, **86**, 358-363. doi: 10.1128/JVI.05460-11.
14. Salifu S.P., Campbell Casey, S.A. and Foley, S. (2013) Isolation and characterization of soilborne virulent bacteriophages infecting the pathogen *Rhodococcus equi*. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 1625-1633. doi: 10.1111/jam.12194.
15. Summer, E.J., Liu, M., Gill, J.J., Grant, M., Chan-Cortes, T.N., Ferguson, L., Janes, C., Lange, K., Bertoli, M., Moore, C., Orchard, R.C., Cohen, N.D. and Young, R. (2011) Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* Phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7, *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 669-683. doi: 10.1128/AEM.01952-10.
16. Shibayama Y. and Dabbs, E.R. (2011) Phage as a source of antibacterial genes. *Bacteriophage*, **1**, 195-197. doi: 10.4161/bact.1.4.17746.
17. Gill, J.J. and Hyman, P. (2010) Phage choice, isolation and preparation for phage therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **11**, 2-14. doi: 10.2174/138920110790725311.

## 10 CONCLUSÃO

O ambiente de criação de equinos possui alta carga ambiental de *Rhodococcus* sp., principalmente em propriedades endêmicas.

O ambiente de criação de cavalos possui alta carga de bacteriófagos cujo hospedeiro é o *Rhodococcus equi*.

Os bacteriófagos possuem ação lítica *in vitro* contra cepas de *Rhodococcus equi*. O poder bactericida *in vitro* dos bacteriófagos líticos para *Rhodococcus equi* demonstrado no trabalho, serve como base para futuros trabalhos.

A utilização de fagos é uma alternativa para o controle do agente.

## REFERÊNCIAS

BERCHIERI JUNIOR, A.; LOVELL M. A.; BARROW, P. A. The activity in the chicken alimentary tract of bacteriophages lytic for *Salmonella typhimurium*. **Research in Microbiology**, Paris, v. 142, n. 15, p. 541-549, June 1991.

COHEN, N. D. *et al.* Association of soil concentrations of *Rhodococcus equi* and incidence of pneumonia attributable to *Rhodococcus equi* in foals on farms in central Kentucky. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 69, n. 3, p. 385-395, Mar. 2008.

ON AN INVISIBLE microbe antagonistic to dysentery bacilli: note by M. F. d'Herelle, presented by M. Roux. *Comptes Rendus Academie des Sciences*, 1917; 165: 373-5. **Bacteriophage**, Austin, v. 1, n. 1, p. 3-5, Jan./Feb. 2011. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/bact.1.1.14941>>. Acesso em: 11 jul. 2015.

D'HERELLE, F., SMITH, G. H. **The bacteriophage**: its rôle in immunity. Baltimore: Williams & Wilkins, 1922. 298 p.

FINGER, G. P. *et al.* *Rhodococcus equi* em amostras de solo, fezes e pulmão de equinos provenientes da grande Porto Alegre e Região Noroeste do Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, Porto Alegre, v. 25, n. 1, p. 61-73, 1997.

FIORENTIN, L.; VIEIRA, N. D.; BARIONI JUNIOR, W. Oral treatment with bacteriophages reduces the concentration of *Salmonella* Enteritidis PT4 in caecal contents of broilers. **Avian Pathology**, London, v. 34, n. 3, p.258-263, June 2005.

GIGUÈRE, S. Clinical manifestations, pathogenesis, and diagnosis of infections caused by *Rhodococcus equi* in foals. *In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS*, 56., 2010, Baltimore. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 2010. p. 121-124.

GIGUÈRE, S. *et al.* 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**, Ithaca, v. 237, n. 1, p. 74-81, July 2010.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F. Strategies for the control of *Rhodococcus equi* infections on enzootic farms. *In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF THE EQUINE PRACTITIONERS*, 43., 1997, Phoenix. **Proceedings...** Lexington: AAEP, 1997. v. 43, p. 65-70.

GILL, J. J.; HYMAN, P. Phage Choice, isolation and preparation for phage therapy. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Hilversum, v. 11, n. 1, p. 2-14, Jan. 2010.

GÓRSKI, A.; WEBER-DABROWSKA, B. The potential role of endogenous bacteriophages in controlling invading pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 62, n. 5, p. 511-519, Mar. 2005.

GUTTMAN, B.; RAYA, R.; KUTTER, E. Basic phage biology. *In*: KUTTER E.; SULAKVELIDZE, A. (Ed.). **Bacteriophages: biology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 29-66

JAGUSZTYN-KRYNICKA, E. K.; WYSZYNSKA, A. The decline of antibiotic era new approaches for antibacterial drug discovery. **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 57, n. 2, p. 91-98, 2008.

KIMURA, M. *et al.* Ecology of viruses in soils: Past, present and future perspectives. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 54, n. 1, p. 1-32, Feb. 2008.

KREWER, C. C. *et al.* Molecular characterization of *Rhodococcus equi* isolates of horse breeding farms from an endemic region in South of Brazil by multiplex PCR. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, n. 1, p. 188-193, Jan./Mar. 2008.

KROPINSKI, A. M. *et al.* Enumeration of bacteriophages by double agar overlay plaque assay. *In*: CLOKIE M. R. J.; KROPINSKI, A. (Ed.). **Bacteriophages methods and protocols: volume 1: isolation, characterization and interactions**. Berlin: Springer, 2009. p. 69-76.

LIMA-MENDEZ, G. *et al.* Reticulate representation of evolutionary and functional relationships between phage genomes. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v. 25, n. 4, p. 762-777, Apr. 2008.

MUSCATELLO, G. *et al.* Association between the Ecology of Virulent *Rhodococcus equi* and the epidemiology of *R. equi* pneumonia on Australian thoroughbred farms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 9, p. 6152-6160, Sept. 2006.

MUSCATELLO, G. *et al.* *Rhodococcus equi* infection in foals: the science of “rattles”. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 39, n. 5, p. 470-478, Sept. 2007.

MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J. R.; BROWNING, G. F. Detection of virulent *Rhodococcus equi* in exhaled air samples from naturally infected foals. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 47, n. 3, 734-737, Mar. 2009.

PACHECO, G. José da Costa Cruz: 1894-1940. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 1, p. 25-31, 1941. Disponível em: <[http://www.scielo.br/pdf/mioc/v36n1/tomo36\(f1\)\\_XXV-XXXI.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v36n1/tomo36(f1)_XXV-XXXI.pdf)>. Acesso em: 2 ago. 2015.

PETROVSKI, S. *et al.* Small but sufficient: the *Rhodococcus* phage RRH1 has the smallest known *Siphoviridae* genome at 14.2 kilobases. **Journal of Virology**, Washington, DC, v. 86, n. 1, p. 358-363, Jan. 2012.

PORTO, A. C. R. C.; FERNANDES, W. R.; BARREIRA, M. C. R. *Rhodococcus equi* parte 1: epidemiologia, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 12, p. 2143-2150, dez. 2011.

SALIFU, S. P.; CAMPBELL CASEY, S. A.; FOLEY, S. Isolation and characterization of soilborne virulent bacteriophages infecting the pathogen *Rhodococcus equi*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 114, n. 6, p. 1625-1633, June 2013.

SHIBAYAMA Y.; DABBS, E. R. Phage as a source of antibacterial genes. **Bacteriophage**, Austin, v. 1. n. 4, p. 195-197, July 2011.

STONE, R. Bacteriophage therapy. Stalin's forgotten cure. **Science**, Washington, DC, v. 298, n. 5594, p. 728-731, Oct. 2002.

SULAKVELIDZE, A.; KUTTER, E. Bacteriophage therapy in human. *In*: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, A. (Ed.). **Bacteriophage: biology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 381-436.

SUMMER, E. J. *et al.* Genomic and functional analyses of *Rhodococcus equi* phages ReqiPepy6, ReqiPoco6, ReqiPine5, and ReqiDocB7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 77, n. 2, p. 669-683, Jan. 2011. doi: 10.1128/AEM.01952-10.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage research: early history. *In*: KUTTER, E.; SULAKVELIDZE, E. (Ed.). **Bacteriophages: biology and applications**. Boca Raton: CRC Press, 2005. cap. 2, p. 5-27.

SUMMERS, W. C. Bacteriophage therapy. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 55, p. 437-451, 2001.

TAKAI, S. *et al.* Expression of virulence-associated antigens of *Rhodococcus equi* is regulated by temperature and pH. **Microbiology and Immunology**, Tokyo, v. 40, n. 8, p. 591-594, 1996.

TWEST, R.; KROPINSKI, A. M. Bacteriophage enrichment from water and soil. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 501, p. 15-21, 2009. doi: 10.1007/978-1-60327-164-6\_2.

WANG, J. *et al.* Use of bacteriophages in the treatment of experimental animal bacteremia from imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Medicine**, Athens, v. 17, n. 2, p. 309-317, Feb. 2006.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses. **FFMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 127-181, May 2004.