

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**VALORIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, NA
IDENTIFICAÇÃO DE *Rhodococcus equi* ISOLADO DO ESCARRO DE PACIENTES
SUSPEITOS DE TUBERCULOSE**

PAULO DA SILVA

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CAMPUS DE ARARAQUARA

**VALORIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO LABORATORIAL, NA
IDENTIFICAÇÃO DE *Rhodococcus equi* ISOLADO DO ESCARRO DE PACIENTES
SUSPEITOS DE TUBERCULOSE**

PAULO DA SILVA

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clarice Queico Fujimura Leite

Co-orientador: Prof. Dr. Sergio Roberto de Andrade Leite

Tese de doutorado apresentada a Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP, Campus de Araraquara, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P331v Silva, Paulo da
Valorização do diagnóstico laboratorial, na identificação de *Rhodococcus equi* isolado do escamo de pacientes suspeitos de tuberculose. / Paulo da Silva. – Araraquara, 2009.
145 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Clarice Queico Fujimura Leite
Co-orientador: Sergio R. A. Leite

1. *Rhodococcus equi* . 2. Caracterização fenotípica. 3. Gene Cho E. 4. Cholesterol Oxidase. 5. Antimicrobianos. I. Leite, Clarice Queico Fujimura , orient. II. Leite, Sergio R. A. III. Título.

CAPES: 40300005

DEDICO ESTE TRABALHO...

Aos meus pais Benedito[†] e Maria pelo exemplo de trabalho, dedicação, honestidade, muita força e grande amor.

Aos meus irmãos Dito, Taim, Dão, Nelo, Maria, Lela, Jaime, Luci e Jair, como prova de amor, perseverança e eterno aprendizado no dia a dia.

Aos meus sobrinhos e sobrinhas demonstrando a importância da formação superior para atingir os objetivos almejados.

A Jaqueline, pelo amor, amizade e suporte técnico e emocional para o desenvolvimento desta tese.

AGRADEÇO.....

A DEUS, por ser o meu guia! A JESUS por ser o meu melhor amigo!

No decorrer deste trabalho muitas foram as pessoas envolvidas e que cruzaram o meu caminho, e a todas elas sinceramente agradeço. Algumas, entretanto, se destacaram pelo apoio, incentivo e ajuda e não posso deixar de lembrar com um profundo agradecimento.

A Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite pela orientação nesta Tese de Doutorado, conhecimentos os quais compartilhou, por tantos anos de dedicação, paciência, carinho e amizade;

Ao Prof. Dr. Sergio Roberto de Andrade Leite do Instituto de Química – UNESP – Araraquara – S. P., pela co-orientação e por disponibilizar o laboratório para realização de Cromatografia de Camada Delgada, dos isolados bacterianos.

Aos professores e amigos do Curso de Pós Graduação em Análises Clínicas da UNESP – Araraquara – SP, em especial ao prof. Dr. Antônio Carlos Pizzolitto, pelo incentivo e confiança;

A Dra. Daisy Nakamura Sato do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Ribeirão Preto, S. P., pela amizade, incentivo e todo apoio científico dispensado durante todo esse tempo;

Ao Dr. Carmo Elias Andrade Melles do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Ribeirão Preto, S. P., pela amizade e incentivo;

Aos amigos do laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP – Araraquara, S. P., em especial ao Adolfo Carlos Barreto Santos, por toda ajuda neste trabalho e amizade;

Aos amigos do laboratório, Ana Carolina, José Rodrigo, Fernando Pavan, Karina, Faber, Carol, Marcelo, Natália, Sílvia, Marisa, Ednéia pelo apoio técnico;

Às Professoras: Dra. Thais Maria Baub e Dra. Ana Marisa Fusco Almeida – UNESP – Araraquara – S. P., por participarem na minha banca de qualificação com suas idéias, cujas sugestões foram muito proveitosas;

A diretora do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Ribeirão Preto, S. P., Suzel Nogueira Neme, por conceder-me autorização para realizar o Curso de Doutorado;

As minhas colegas da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Ribeirão Preto, S. P., Ana Maria Machado Carneiro e Marta Inês Czentini Medeiros, pelo companheirismo, auxílio técnico e disponibilidade sempre em ajudar;

A todos os meus amigos do Instituto Adolfo Lutz Laboratório de Ribeirão Preto, S. P., que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho;

As amigas da secretaria de pós-graduação da UNESP-Araraquara: Claudia, Sonia e Laura, por sua extrema competência, amor e dedicação, pela amizade, carinho e auxílio para realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

Creio muito na sorte. Quanto mais
trabalho, mais sorte pareço ter.

Ralph Emerson

Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é
alguém que acredite que ele possa ser realizado.

Roberto Shinyashiki

RESUMO

As bactérias Gram-positivas que contêm ácidos micólicos na parede celular estão classificadas no grupo dos actinomicetos aeróbios ou bactérias corineformes e nocardioformes. Nesse grupo encontra-se o *Rhodococcus equi*, o qual é relevante à medicina veterinária e humana tal como as micobactérias, causando doença pulmonar que pode mimetizar casos de tuberculose. *R. equi* é considerado como agente patogênico em potros e tem emergido como oportunista em humanos, especialmente, associado à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. Assim como nos animais, a rodococose humana afeta principalmente, os pulmões, com características clínicas e patológicas, similares à tuberculose pulmonar, em pacientes imunocomprometidos ou não. A identificação de *Rhodococcus equi* pode ser realizada com base numa variedade de características, fenotípicas, genotípicas e técnicas cromatográficas. Morfologia das colônias, morfologia celular e resistência parcial ao álcool ácido são características chaves para a caracterização inicial. *R. equi* não oxida ou fermenta carboidratos e nem utiliza acetato, citrato e malonato, como única fonte de carbono, produz catalase, o fator *equi* (teste de CAMP) e lipase. Não produz amilase, β -galactosidase (ONPG), casease, DNase, esculinase, gelatinase, H₂S, indol, lecitinase e oxidase. Demonstra comportamento variável para as provas de nitrato redutase, urease e redução do hipurato, decompõe a adenina, mas não hipoxantina, tirosina e xantina. O método molecular para a identificação de *R. equi* utiliza a PCR para amplificar um fragmento de 959 pares de base do gene *choE*, o qual codifica a enzima *cholesterol oxidase* (COX). Na identificação química, semelhante às espécies do gênero *Mycobacterium*, membros do gênero *Rhodococcus* contêm ácidos micólicos plausíveis de serem identificados pela cromatografia em camada delgada - CCD. O tratamento da Rodococose, é ainda bastante insipiente e no Brasil são poucos os trabalhos realizados para avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos vigentes para este agente bacteriano. O teste padrão preconizado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards” (CLSI/NCCLS) para os actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp é o de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o qual pode ser realizado pelo método de microdiluição em Caldo Mueller Hinton. Ainda não existem métodos padronizados para testes de sensibilidade de actinomicetos aeróbios, pelo método de Disco Difusão, no entanto, nos últimos anos, foram testados vários agentes antimicrobianos. Em geral, o *R. equi* apresenta resistência aos agentes beta-lactâmicos especialmente penicilinas, devido à produção de enzimas β -lactamases

(penicilinas), podendo sua detecção ser demonstrada, diretamente, com um método cromogênico que utiliza um disco de papel embebido com nitrocefina, comercialmente disponível. O objetivo deste trabalho foi identificar isolados bacterianos sugestivos de *R. equi*, proveniente de amostras de escarros de pacientes com suspeita de tuberculose, empregando métodos fenotípicos, incluindo cromatografia por camada delgada e identificação genética utilizando PCR. Foram analisadas 1636 amostras de escarro colhidas de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos em Unidades de Saúde e Hospitais da região de abrangência do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2002. Das 1636 amostras de escarros investigados, 426 foram positivas para bactérias resistentes ao álcool ácido, dos quais 114 apresentaram resistência parcial. Desse total, 78 apresentaram as características morfotintoriais de *Rhodococcus* sp e 56 foram positivos para a prova do CAMP teste. Na identificação molecular, o produto de amplificação de 959 pb, indicativa da presença do gene *choE*, foi observada em 51 isolados positivos para CAMP teste e apresentaram as características fenotípicas determinadas para *R. equi*. Na análise de ácido micólico com a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) todos apresentaram Fator de retenção (Fr) entre 0,4 e 0,5. Foram realizados testes de sensibilidade pelos métodos de Disco Difusão e Concentração Mínima Inibitória. Foram avaliados 28 agentes antimicrobianos, pertencentes a diferentes grupos, pelo método de Disco Difusão. Os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina e os glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina mostraram 100% de atividade, contra os isolados. Os macrolídeos azitromicina e claritromicina, também foram 100% ativos, exceto eritromicina (98,04%), que demonstrou atividade intermediária para um isolado. Os agentes Beta-lactâmicos não mostraram boa atividade, a menos quando combinado com inibidor de beta-lactamase, havendo um significativo aumento na atividade, como no caso de amoxicilina + ácido clavulânico (98,04% dos isolados foram sensíveis). Além desse agente antimicrobiano beta-lactâmico, imipenema e ceftriaxona foram os únicos mais ativos, sendo os isolados sensíveis em 98,04% e 80,39%, respectivamente. A sensibilidade dos isolados frente a outros agentes beta-lactâmicos variou em 49,02% a cefoxitina, 45,10% a cefepima, 23,53% a cefotaxima, 19,60% a cefalotina, 13,73% a cefazolina, 7,84% a ampicilina, 5,88% a penicilina e 1,96% a oxacilina. Mostraram baixa atividade clindamicina e sulfametoxazol + trimetoprim, sendo os isolados resistentes, respectivamente, em 90,20% e 58,84%. As quinolonas levofloxacin, ciprofloxacina e norfloxacina apresentaram atividade de 96,08%, 92,16% e 90,20%, assim como, rifampicina, cloranfenicol e tetraciclina, também foram muito ativos, apresentando respectivamente, atividade de (98,04%), (84,31%) e (78,43%). No método da Concentração Mínima Inibitória

(CIM), entre os 15 antimicrobianos avaliados, os isolados de *R. equi* mostraram 100% de sensibilidade para claritromicina, vancomicina, gentamicina e rifampicina e relativamente sensíveis à cefotaxima, ampicilina, doxiciclina e a imipenema. Para a ampicilina e o trimetoprim os isolados apresentaram resistência total. Três isolados apresentaram uma elevada resistência à ceftriaxona com CIM igual a 512 µg/mL porém 36 (83,7%) isolados apresentaram alta sensibilidade com CIM ≤ 8 µg/mL. A produção de β-lactamase foi detectada em 3 isolados, pelo método do disco de nitrocefina, indicando provável produção de penicilinase, já que, todos os isolados foram resistentes a ampicilina, oxacilina e penicilina. Este estudo alerta para a importância do isolamento, identificação e determinação do perfil de sensibilidade do *R. equi*, contribuindo para o diagnóstico diferencial das pneumonias.

Palavras-chave: *Rhodococcus equi*, caracterização fenotípica, gene *choE*, Cholesterol Oxidase, antimicrobianos, REMA, TSA, Disco Difusão, CIM.

ABSTRACT

Gram-positive bacteria, containing mycolic acids in the cellular wall are classified in aerobic actinomycetes or corineform and nocardioform bacteria group. *Rhodococcus equi* is included in this group, and it is very important to the veterinary and human medicine. *Rhodococcus equi* is a well-recognized bacterial pathogen in veterinary medicine. First isolated from foals, it causes an important chronic granulomatous pneumonia and lung abscesses. The infection also occurs in humans, often following immunosuppression of various causes. The increased number of human cases reported recently is partly the result of the spread of AIDS but may also reflect the increasing awareness by medical laboratories of this opportunistic pathogen and their improved ability to identify it rather than to dismiss it as a contaminating "micrococcus" or "diphtheroid." *R. equi* can be identified on the basis of a variety of conventional phenotypic characteristics including microscopic (Gram and acidfast staining) and macroscopic morphologies, growth requirements, metabolism of glucose, and phenotypic molecular characteristics including the presence of mycolic acid composition, which is detected by thin-layer chromatography. The colonial morphology of *R. equi* is diverse and consists of three major varieties: pale pink and slimy, coral and non-slimy, and pale yellow in color, non-slimy. Colorless colonial variants may also occur. *R. equi* is a non-motile gram-positive pleomorphic coccobacillus, varying from distinctly coccoid to bacillary depending on growth conditions. All of the rhodococci from clinical specimens are generally weakly acid fast when stained either by the modified Kinyoun method or by the Ziehl-Neelsen method. Regarding biochemical characteristics, the organism is generally biochemically unreactive. It fails to oxidize or ferment carbohydrates, neither uses sodium acetate, citrate and malonate as sole source of carbon, and it is nonproteolytic. It is catalase and lipase positive, and almost invariable for urease, nitrate reduction, and hippurate hydrolysis. It decomposes adenine, but not hypoxanthine, tyrosine and xanthine. *R. equi* does not produce amylase, β -galactosidase (ONPG), DNase, gelatinase, oxidase, H₂S, indole, or casein and, esculin hydrolysis. The molecular method for *R. equi* identification uses PCR to amplify a fragment of 959 bp of the gene *choE*, which codes the enzyme *cholesterol oxidase* (COX) or *equi factors*, which can be showed in the CAMP test. *R. equi* is a facultative intracellular pathogen, surviving inside macrophages to cause granulomatous inflammation. With the eventual destruction of macrophages, the granulomas may become purulent and progress to caseous necrosis. The lung is the most frequent organ

affected in immunosuppressed patients, where *R. equi* infections occur associated with immunosuppression following the development of AIDS, treatment for tumors, or the prevention of rejection following organ transplantation. *R. equi*, just as mycobacteria, causes lung infections that can be confused with tuberculosis cases. *R. equi* grows easily on Lowenstein-Jensen medium, and it is generally isolated from clinical specimens as sputum, bronchoalveolar lavage fluid and lung biopsy. The present study emphasizes the questions that a medical microbiologist might ask when faced with a bacterial isolate that needs confirming as *R. equi*, as well as the questions that physicians might ask when treating a patient with confirmed *R. equi* infection. The study aim was evaluate the presence of *R. equi*, analyzing 1636 sputum samples from patients with lung tuberculosis clinical suspicion, in the period of 2000 to 2002. The samples were analyzed in the “Instituto Adolfo Lutz”, Ribeirão Preto, São Paulo. From 426 positive sputum samples for fast-acid bacilli by the Ziehl Neelsen method, and through phenotypic and thin-layer chromatography methods, and PCR, were identified 51 *R. equi* isolates. Through the Disk Diffusion method, in this study were tested 28 antimicrobial agents against 51 *R. equi* isolates. Amykacin, gentamicin, mynocyline, teicoplanin, vancomycin showed 100% of activity, against the *R. equi* isolates. The macrolides azithromycin and chlarythromicin, also were 100% actives, except erythromycin (98%), that demonstrated intermediary activity for one isolate. The β -lactam agents didn't shown good activity, less when tested with β -lactamase inhibitor, there was a significant increase in the activity, as in the case of amoxicillin+clavulanate (98% of the isolates were sensitive). Beyond of this β -lactam agent, imipenem and ceftriaxone were the most actives, being the isolates sensitive in 98% and 80.4%, respectively. The isolates sensibility to other β -lactam agents varied in 49% cefoxitin, 45.1% cefepime, 23.5% cefotaxime, 19.6% cephalotin, 13.7% cefazolin, 7.8% ampicillin 5.9%, penicillin and 2% oxacillin. Those that showed low activity were clindamycin and sulfamethoxazole+trimethoprim, being the isolates resistant, respectively, in 90.2% and 58.8%. The quinolones levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin presented activity of 96%, 92.2% and 90.2%, as well as, rifampin, doxycycline, chloramphenicol and tetracycline, were very actives, presenting respectively, activity of (98%), (96%), (84.3%) and (78.4%). By the Minimum Inhibitory Concentration method in broth (MIC), modified with resazurina addition “Resazurin Microtitre Assay” (REMA) were tested 15 antimicrobial agents. This method showed that gentamicin, clarithromycin, vancomycin and rifampin were actives in 100%. Except ampicillin (0%), the β -lactams ceftriaxone (84.3%), cefotaxime (82.4%), imipenem (80.4%) and amoxicillin (60.8%), showed good activity against the most of the bacterial isolates investigated. The tetracyclines

(doxycycline and minocycline) showed activity values, respectively, in 84.3% and 52.9%. The quinolone (ciprofloxacin) was 94.1% active. A great difference was noted with sulfamethoxazole. When in the Disk Diffusion method the drug was added with trimethoprim the results were 43.1% of susceptible and 56.9% of resistant isolates. However, when in the REMA method both the drugs were, separately evaluated, no isolated showed to be sensitive, and just 7 (13.7%) isolates presented intermediary resistance to sulfamethoxazole. It was detected β -lactamase production in 3 isolates, by nitrocefin disk method, indicating probable production of penicillinase, since all of the isolates were resistant to ampicillin, oxacillin and penicillin. The obtained results in this study alert for the isolation importance, sensibility profile identification and determination of *R. equi*, contributing for the pneumonia diagnosis differential.

Key-words: *Rhodococcus equi*, phenotypic characterization, *choE* gene, Cholesterol Oxidase, antimicrobial agents, REMA, AST, Disk Diffusion, CIM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Configuração esquemática do preparo da placa para determinação da CMI utilizando Resazurina como revelador	55
Figura 2.	Cultura de <i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939 em Mueller Hinton agar, após 48 horas a 37°C. Fotografia ilustra a típica aparência (mucóide) e variação na forma das colônias	64
Figura 3.	Cultura de isolado suspeito de <i>Rhodococcus equi</i> em Mueller Hinton agar, após 48 horas a 37°C. Fotografia ilustra a típica aparência (mucóide) e variação na forma das colônias	64
Figura 4.	Visão microscópica de esfregaço da cultura de <i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939, corado pelo método de Gram modificado por Hucker. Mostra a morfologia de cocobacilos pleomórficos, Gram-positivos. Amplificação de 1000X em imersão com óleo	65
Figura 5.	Visão microscópica de esfregaço da cultura de <i>Rhodococcus equi</i> ATCC 6939, corado pelo método de Ziehl-Neelsen modificado por Kinyoun. Mostra a morfologia de cocobacilos parcialmente resistentes ao álcool ácido. Amplificação de 1000X em imersão com óleo.....	65
Figura 6.	Produtos de PCR de 959pb representantes do gene <i>choE</i> , obtidos de amostras genômicas (DNA) de <i>Rhodococcus equi</i> . Linhas 1 e 4 (isolados teste de CAMP negativo); Linhas 2, 3 e 5 (isolados teste de CAMP positivo); Linha 6 cepa ATCC 6939; M= marcador de peso molecular (100 pb).....	68
Figura 7.	Ácidos micólicos, em placa de sílica gel e eluição em diclorometano. Na placa estão representados 15 isolados suspeitos de <i>Rhodococcus equi</i>	69
Figura 8.	Fluxograma de identificação fenotípica e genotípica de <i>Rhodococcus equi</i>	70
Figura 9.	Utilização de carboidratos.....	127
Figura 10.	Produção da amilase.....	127
Figura 11.	Produção de β Galactosidase.....	128
Figura 12.	Produção de Catalase.....	128
Figura 13.	Produção de DNase.....	129

Figura 14.	Produção da gelatinase.....	129
Figura 15.	Produção de ácido sulfídrico.....	130
Figura 16.	Produção de indol.....	130
Figura 17.	Produção de lipase.....	131
Figura 18.	Produção de Nitrato redutase.....	131
Figura 19.	Produção de Oxidase.....	132
Figura 20.	Produção de urease em meio inclinado de Christensen	132
Figura 21.	Utilização do Acetato.....	133
Figura 22.	Utilização do Citrato.....	133
Figura 23.	Utilização de Malonato.....	134
Figura 24.	Hidrólise da Esculina.....	134
Figura 25.	Hidrólise do Hipurato.....	135
Figura 26.	Oxidação/Fermentação da Glicose.....	135
Figura 27.	Motilidade.....	136
Figura 28.	Produção do fator <i>equi</i> ou enzima Cholesterol Oxidase (Teste de CAMP)	136
Figura 29.	Decomposição de adenina, hipoxantina, tirosina e xantina.....	137
Figura 30.	Produção de casease.....	137
Figura 31.	Direcionamento terapêutico proposto para o tratamento de infecções por <i>Rhodococcus equi</i>	138
Figura 32.	Esquema das técnicas laboratoriais de baciloscopia e cultura de escarro.....	138
Figura 33.	Esquema do sistema automatizado.....	140
Figura 34.	Esquema da investigação de BAAR a partir do sistema automatizado.....	141
Figura 35.	Esquema da investigação de β -lactamase (Nitrocefina)	142

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Relação dos 114 isolados bacterianos caracterizados como Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido, com respectivos anos de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes..... **36**
- Quadro 2.** Relação dos isolados identificados como *Rhodococcus equi*, respectivamente, por ano de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes..... **39**
- Quadro 3.** Grupos de antimicrobianos com respectivas concentrações, testados com os 51 isolados de *Rhodococcus equi*, de acordo com o método de disco difusão **42**
- Quadro 4.** Grupos de antimicrobianos testados, com seus respectivos solventes e concentração final na microplaca contra os 51 isolados de *R. equi*, utilizando o método da microdiluição em placa com a resazurina como revelador de crescimento bacteriano **43**
- Quadro 5.** Padrões Interpretativos de Diâmetros do Halo de inibição e Pontos de Corte Equivalentes das Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) para *Staphylococcus* sp. **52**
- Quadro 6.** Pontos de corte da Microdiluição em caldo para actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp. **56**
- Quadro 7.** Caracterização dos 78 isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp. e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada em caracteres fenotípicos e bioquímicos, cromatografia de ácidos micólicos e PCR para investigar o gene *cho E*..... **58**
- Quadro 8.** Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp. e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada na utilização de fontes de carbono **61**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características fenotípicas apresentadas pelos 78 isolados suspeitos de <i>Rhodococcus</i> sp., investigados nesse estudo.....	66
Tabela 2.	Características fenotípicas para identificação de <i>Rhodococcus equi</i>	67
Tabela 3.	Sensibilidade demonstrada aos antimicrobianos testados, pelos 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i> , de acordo com o método de disco difusão.....	72
Tabela 4.	Atividade antibacteriana dos antimicrobianos contra 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i>	74
Tabela 5.	Perfil de susceptibilidade dos 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i> pelo método da microdiluição em caldo utilizando a REMA, de acordo com os pontos de corte determinados para actinomicetos aeróbios, incluindo <i>Rhodococcus</i> sp. (CLSI/NCCLS, 2003).....	75
Tabela 6.	Comparação do perfil de susceptibilidade obtido nos 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i> , utilizando o método de disco difusão e o de diluição em microplacas (REMA).....	76
Tabela 7.	Comparação dos resultados de Microdiluição em caldo e medidas dos halos referentes ao antimicrobiano cefotaxima, encontrados para os 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i>	77
Tabela 8.	Comparação dos resultados de Microdiluição em caldo e medidas dos halos referentes ao antimicrobiano ceftriaxona, encontrados para os 51 isolados de <i>Rhodococcus equi</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS

7H9 caldo	Middlebrook 7H9 Broth
AMI	Amicacina
AMC.....	Amoxicilina+ácido clavulânico
AMX.....	Amoxicilina
AMP.....	Ampicilina
ATCC.....	American Type Culture Collection
AZI	Azitromicina
BAAR.....	Bacilos Álcool-ácido resistentes
BHI agar.....	Brain Heart Infusion Ágar
BHI caldo	Brain Heart Infusion Broth
BPRAA	Bacilos Parcialmente Resistentes ao Álcool Ácido
CAMP.....	Epônimo originado pelas iniciais das palavras Christie, Atkins, Munch, Petersen
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIP	Ciprofloxacina
CLA.....	Claritromicina
CLI	Clindamicina
CLO.....	Cloranfenicol
CLSI / NCCLS..	Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards
CIM.....	Concentração Inibitória Mínima
COX.....	Cholesterol oxidase
CPM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico (ADN, em português: <i>ácido desoxirribonucleico</i> ; ou DNA, em inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DOX	Doxiciclina
ERI	Eritromicina
GEN	Gentamicina
H ₂ S.....	Ácido Sulfídrico

HI caldo	Heart Infusion Broth
<i>hsp</i>	Heat shock protein
I	Intermediário
IPM	Imipenem
LVX	Levofloxacin
Meio L. J.	Löwenstein-Jensen
MH agar	Mueller Hinton agar
MH caldo	Mueller Hinton caldo
MIN	Minociclina
NA	Nutrient Agar
Nalc/NaOH.....	N-Acetil-L- cisteína/NAOH
NOR	Norfloxacin
ONPG.....	Orthonitrophenyl-β-D-galactopyranoside
OXA	Oxacilina
Pb	Pares de base
PEN.....	Penicilina G
R	Resistente
REMA.....	Resazurin Microtiter Assay
Fr	Fator de retenção
RIF.....	Rifampicina
S.....	Sensível
SIM agar	Sulfur-Indol-Motility agar
SMT	Sulfametoxazol+Trimetoprim
TE	Tampão TRIS + EDTA
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TSB.....	Tryptic Soy Broth
Uréia agar.....	Christensen urea agar base
VAN	Vancomicina
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	23
1.1.	Identificação de <i>Rhodococcus equi</i>	26
1.1.1	Características Fenotípicas	26
1.1.2	Características genotípicas	26
1.1.3	Técnicas cromatográficas	29
1.2	Perfil de sensibilidade aos medicamentos	29
1.3	Justificativa	31
2.	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo Geral	33
2.1.1	Objetivos Específicos	33
3.	MATERIA E MÉTODOS	35
3.1	Locais de trabalho	35
3.2.	Amostras clínicas	35
3.3	Cepas de Referência utilizadas neste estudo	40
3.4.	Meios de Cultura e reagentes utilizados neste estudo	40
3.5.	Agentes antimicrobianos utilizados	41
3.5.1.	Método de Disco Difusão	41
3.5.2.	Método de determinação da CIM.....	41

3.6.	Metodologia aplicada neste estudo	44
3.6.1.	Baciloscopia e cultura de escarro	44
3.6.1.1.	Caracterização dos isolados de <i>Rhodococcus</i> sp	45
3.6.2.	Identificação dos isolados sugestivos de <i>Rhodococcus</i> sp	45
3.6.2.1.	Testes fenotípicos realizados	45
3.6.3.	Descrição dos testes fenotípicos realizados	46
3.6.3.1.	Produção do fator <i>equi</i> ou enzima Cholesterol Oxidase (teste de CAMP)	46
3.7.	Análise de ácido micólico com Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	47
3.7.1.	Obtenção da massa bacteriana	47
3.7.2.	Extração de micolatos	47
3.7.3.	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	47
3.7.3.1.	Interpretação do fator de retenção	48
3.8.	Identificação molecular de <i>R. equi</i> através de PCR	48
3.8.1.	Oligonucleotídeos iniciadores ou <i>Primers</i>	48
3.8.2.	Obtenção do DNA genômico	49
3.8.3.	Extração e Purificação de DNA: Colônias isoladas e recém cultivadas ..	49
3.8.4.	Amplificação do gene <i>choE</i>	50
3.8.5.	Detecção do gene <i>choE</i>	50
3.9.	Testes de sensibilidade a antimicrobianos	51
3.9.1.	Método de Disco Difusão	51
3.9.2.	Método para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) utilizando resazurina como revelador de crescimento bacteriano	53
3.9.2.1.	Preparo dos agentes antimicrobianos	53
3.9.2.2.	Preparo do inóculo.....	53

3.9.2.3.	Preparo das microplacas.....	54
3.9.2.4.	Incubação e leitura das microplacas	55
3.9.3.	Método de detecção de enzimas mediadoras de resistência	56
4.	RESULTADOS	57
4.1.	Caracterização fenotípica de <i>Rhodococcus equi</i>	64
4.2.	Caracterização genotípica de <i>Rhodococcus equi</i>	68
4.3.	Análise de ácido micólico com a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de <i>Rhodococcus equi</i>	69
4.4.	Testes de sensibilidade a antimicrobianos	71
4.4.1.	Método de disco difusão	71
4.4.2.	Método da Concentração Mínima Inibitória (CMI)	73
4.4.3.	Método de detecção de enzimas mediadoras de resistência	73
5.	DISCUSSÃO	78
6.	CONCLUSÕES	93
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
8.	PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	107
8.1.	Resumos apresentados em eventos científicos	107
8.2.	Artigo submetido para publicação.....	108
	ANEXO A	122
A.1.	Métodos de Coloração	122
A.1.1.	Coloração de Ziehl-Neelsen	122

A.1.2.	Gram modificado por Hucker	122
A.1.3.	Ziehl-Neelsen modificado por Kinyoun	123
A.2.	Meios de cultura formulados	123
A.2.1.	Meio de Löwenstein-Jensen	123
A.2.2.	Meio de básico de Gordon ou “Fermentation basal médium”	124
A.2.3.	Caldo de Uréia Indol	125
A.2.4.	Meio de cultura para avaliar a decomposição da caseína	125
A.3.	Reagentes formulados	125
A.3.1.	N-Acetil- cisteína/NAOH 2% (NALC-NAOH)	125
A.3.2.	Reativos “A” e “B” para nitrato redutase	126
A.3.3.	Reativo de Kovacs	126
A.3.4.	Solução reveladora de gelatinase	126
	ANEXO B	127
	ANEXO C	143
	ANEXO D.....	145

1. INTRODUÇÃO

As bactérias Gram-positivas que contêm ácidos micólicos na parede celular estão classificadas no grupo dos actinomicetos aeróbios ou bactérias corineformes e nocardioformes. Pertencem à subordem *Corynebacterineae*, sendo conhecidos os gêneros: (*Corynebacterium*; *Dietzia*; *Gordonia*; *Millisia*; *Mycobacterium*; *Nocardia*; *Rhodococcus*; *Segniliparus*; *Skermania*; *Tsukamurella* e *Williamsia*). Além das micobactérias, outras espécies desse grupo, assim como *Rhodococcus equi*, são relevantes à medicina veterinária e humana (AMAT, 2004; GÜRTLER et al., 2004; BUTLER et al., 2005, SODDELL et al., 2006; TSITKO, 2007).

Rhodococcus equi é a principal espécie do gênero *Rhodococcus*, o qual pertence à família *Nocardiaceae*, sendo descrito como actinomiceto nocardioforme. Este termo faz referência aos actinomicetos que formam um micélio fugaz que se fragmenta em elementos bacilares ou cocóides (AMAT, 2004).

No gênero *Rhodococcus*, atualmente, são reconhecidas mais de 30 espécies e somente *R. equi* é visto como causador de infecções denominadas “rodococoses” no homem e animais (GÜRTLER et al., 2004). Alguns autores sugerem que *R. equi* deveria ser reconhecido como um gênero separado (McMINN et al., 2000; GÜRTLER et al., 2004; TSITKO, 2007).

Rhodococcus equi é considerado como agente patogênico em cavalos, atinge potros com idade menor que 6 meses, resultando em severa broncopneumonia piogranulomatosa, com alta taxa de mortalidade. Atualmente, *R. equi* tem emergido como patógeno oportunista em humanos, especialmente, associado à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH). Assim como nos animais, a rodococose humana afeta principalmente, os pulmões, com características clínicas e patológicas, similares à tuberculose pulmonar, em pacientes imunocomprometidos ou não (NAVAS et al., 2001; KEDLAYA, 2008).

Em geral, os pacientes com rodococose apresentam pneumonia granulomatosa, com infiltração lobar, progredindo lentamente para cavitação, visível em radiografias de tórax. Além dos pulmões a infecção também ocorre em outros locais como sistema nervoso central, pélvis, tecido subcutâneo e sistema linfático, onde os abscessos são encontrados (BROWN et al., 1999; LINDER, 1997; SCOTT et al., 1995, KEDLAYA, 2008).

Sintomas de uma infecção pulmonar por *R. equi* incluem dispnéia, tosse produtiva ou não, dor no peito e febre, podendo ainda aparecer outros como linfadenopatia, drenagem e dor nos olhos, nível alterado de consciência e dor nas articulações. Em infecções localizadas devido a traumas, tais como endoftálmicos, artrite séptica e meningite, os sintomas podem ocorrer já nas primeiras 24 horas (KEDLAYA et al., 2001).

Nas infecções pulmonares o aparecimento dos sintomas é insidioso, podendo ocorrer em 1 semana após a exposição ao agente bacteriano. Em certos pacientes a infecção pode apresentar um curso crônico, com pneumonia recorrente que não responde a terapia empírica com antibiótico (EGAWA et al., 1990; LINARES et al., 1997; KEDLAYA et al., 2001).

Embora alguns relatos demonstrem maior incidência da infecção nos lóbulos pulmonar superiores, em indivíduos infectados por VIH, pode-se afirmar a predileção por infecção por qualquer área do pulmão (MUNTANER et al., 1997; CAPDEVILA et al., 1997).

Exames radiológicos de infecções pulmonares em pacientes imunocompetentes demonstraram o envolvimento dos lóbulos superiores em 50%, medianos em 50% e inferiores em 62%. A maioria (62%) dos pacientes apresentava cavitação, 5% demonstraram efusão pleural e 5% tinham fístula brônquio-biliar (KEDLAYA et al., 2001). Em outros relatos os casos de cavitação variaram de 54% a 69%, em pacientes não infectados pelo VIH, ao contrário dos 67% a 77% de variação em pacientes infectados pelo vírus (VERVILLE et al., 1994; MUNTANER et al., 1997; HARVEY & SUNSTRUM, 1991). As efusões ou empiemas

têm sido relatadas em 18% a 34% (VERVILLE et al., 1994) e hemoptise em 20% dos pacientes (LASKY et al., 1991),

Em casos de infecções pulmonares, o diagnóstico pode ser obtido de amostras de escarro, sangue, lavado bronquial e biópsia. O exame microscópico de lavado brônquio-alveolar resulta positividade baixa, embora HARVEY & SUNSTROM (1991), terem relatado uma positividade de 66% em pacientes infectados com o VIH. Também nesses pacientes, a malacoplaquia pulmonar é um achado histopatológico, diagnosticado por biópsia e aspiração com agulha (KWON & COLBY, 1994; LAMBERT & GANSLER, 1997). Esta situação não tem sido relatada em pacientes imunocompetentes, entretanto, se encontrada pode ser um indício de infecção pelo *R. equi* (KEDLAYA et al., 2001).

Casos de infecções causadas por outras espécies do gênero *Rhodococcus*, ou de outros gêneros, também são relatados, e os sintomas são semelhantes aos causados pelo *R. equi*. SPARK et al., (1993) reportaram um caso fatal de pneumonia e síndrome respiratória em adulto, causada por uma espécie caracterizada como não sendo do gênero *Rhodococcus*. As reações bioquímicas e padrões genéticos eram muito diferentes daquelas das espécies de *Rhodococcus* (KEDLAYA et al, 2001).

MULLER et al., 1988 reportaram um caso de ferida superficial em um garoto saudável de 13 anos. O isolado mostrou crescimento pobre a 37°C e tinha características bioquímicas diferentes de *R. equi*. Esses autores concluíram que poderia ser uma variante de *R. equi* ou uma espécie não caracterizada de *Rhodococcus*.

BROUGHTON (1981) relatou um caso de artrite e osteomielite numa criança de 29 meses de idade, causadas por um microrganismo pertencente ao gênero *Rhodococcus*.

Um caso de linfadenite axilar foi relatado numa garota de 7 anos de idade, que foi inicialmente, tratada com isoniazida e rifampicina, para infecção presuntiva por *Mycobacterium tuberculosis*. O tratamento foi interrompido após 2 meses porque, acreditou-

se pouco provável que, *M. tuberculosis* era a causa da infecção, a qual foi resolvida em poucos meses (MARTIN et al., 1991).

1.1. Identificação de *Rhodococcus equi*

Pode ser realizada com base numa variedade de características, fenotípicas, genotípicas e técnicas cromatográficas (PRESCOTT, 1991; BROWN et al., 1999; MIYAJI et al., 2002; LADRÓN et. al., 2003; AMAT, 2004).

1.1.1. Características Fenotípicas

A identificação fenotípica de *R. equi* baseia-se nos aspectos morfológicos de colônias e células, reações frente a corantes e as características fisiológicas e bioquímicas, apresentados pelo microrganismo. As colônias se desenvolvem, satisfatoriamente, nos meios de cultura não seletivos, inclusive naqueles utilizados no isolamento de micobactérias e fungos. Morfologia das colônias, morfologia celular e resistência parcial ao álcool ácido são características chaves para a caracterização inicial (BROWN et al., 1999). As colônias de *R. equi* formadas em meios de cultura sólidos são viscosas, mucóides e coalescentes, apresentando tamanho de 2 a 4 mm. Desenvolvem melhor em temperaturas que variam desde ambiente até 37°C. Em alguns casos podem ser mucóides e a formação de pigmentos é, raramente, observada em culturas com menos de quatro dias. *R. equi* é aeróbio estrito e não apresenta motilidade, é catalase positiva e oxidase negativa. Em esfregaços preparados a partir de culturas em caldo, corados pelo método de Gram, são observados cocos ou coco-bacilos Gram-positivos, pleomórficos e parcialmente álcool-ácido resistentes quando corados pelos métodos de Kinyoun modificado ou Ziehl-Neelsen (PRESCOTT, 1991; Mc NEIL & BROWN, 1994).

Quando submetido à caracterização bioquímica, *R. equi* mostra ser não reativo e não oxida ou fermenta os carboidratos (adonita; amido; arabinose; celobiose; eritritol; frutose;

galactose; glicerol; inositol; maltose; manitol; manose; melibiose; rafinose; raminose; sacarose; salicina; sorbitol; xilose) no meio básico de Gordon. Não utiliza acetato, citrato e malonato, como única fonte de carbono (PRESCOTT, 1991; McNEIL & BROWN, 1994).

R. equi produz o fator *equi* (Teste de CAMP), catalase e lipase. Não produz amilase, β -galactosidase, casease, DNase, esculinase, gelatinase, H₂S, indol, lecitinase e oxidase. Decompõe adenina, mas não hipoxantina, tirosina e xantina. Demonstra comportamento variável para as provas de nitrato redutase, urease e redução do hipurato (BIZET et al., 1997; FLORES et al., 1990; FISS & BROOKS, 1991; McNEIL & BROWN, 1994; MURRAY et al. 1995; PRESCOTT, 1991).

1.1.2. Características genotípicas

Dos poucos métodos moleculares rápidos desenvolvidos para a identificação de *R. equi*, o mais utilizado é a PCR para detectar o gene *vapA*, presente em um plasmídeo de 85 kb, associado à virulência (TAKAI et al., 1994; 1995_a; 2000). Porém, esse plasmídeo não está presente em todas as cepas de origem humana (TAKAI et al., 1995_b). Outros fragmentos alvos têm sido amplificados pela PCR. Por exemplo, um segmento cromossômico de função desconhecida (ARRIAGA et al., 2002) ou o gene 16S rDNA (BELL et al., 1996; SELTON et al., 1997), no entanto, eles foram avaliados com poucos isolados.

LADRÓN et al. (2003), propuseram a amplificação de um fragmento de 959 pares de base do gene *choE*. Esse gene codifica a *cholesterol oxidase* (COX), uma enzima considerada como um dos fatores de virulência do *R. equi*, de maior importância (NAVAS et al., (2001). A especificidade do gene *choE* foi verificada em 30 cepas representativas de actinomicetos, incluindo bactérias que expressam atividade de *cholesterol oxidase*, como *Brevibacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Nocardia asteroides*, *Rhodococcus erythropolis*, e *Streptomyces* sp. Nenhum produto de amplificação foi detectado para qualquer uma dessas

cepas (LADRÓN et al., 2003). Os autores determinaram, também, a sensibilidade da PCR para o gene *choE*, obtendo resultado positivo 0.02 ng de DNA ou 3 células de *R. equi*. Desta forma, a utilização da PCR, pode ser de grande utilidade, na identificação rápida do *R. equi* e sua diferenciação de outros actinomicetos patogênicos ou não.

Embora o sequenciamento de 16S rDNA seja aceito como um meio geral para diferenciação de espécies, alguma heterogeneidade pode existir entre diferentes isolados da mesma espécie (KIRSCHNER & BOTTGER, 1992). Um estudo realizado das seqüências de 16S rDNA de diversos isolados representativos, mostrou que *R. equi* é um táxon muito heterogêneo, com variações em 16S rDNAs acima de 4% (MCMINN et al., 2000). Por outro lado, espécies intimamente relacionadas podem ter seqüências idênticas ou quase idênticas de 16S rDNA (FOX et al., 1992; PATEL et al., 1998). Portanto, são necessários outros alvos espécie-específicos, tais como *choE*, para empreender um teste para a identificação fidedigna de uma espécie bacteriana. TAYLOR et al., (1997) desenvolveram um método de PCR-RFLP visando como alvo, um gene *hsp* (heat shock protein) de 65-kDa, o qual tinha sido anteriormente, utilizado para a identificação de micobactérias e mostrou ser útil para discriminar isolados de *R. equi*. No entanto, de acordo com LADRÓN et al., (2003), esse teste é devidamente trabalhoso, por causa da natureza conservada do tal gene. O produto de amplificação é do mesmo tamanho para todas as espécies de actinomicetos e *R. equi* pode ser discriminado por análises de restrição dos amplicons.

BELL et al. (1996), construíram para *R. equi* os iniciadores que amplificam um fragmento de 450 pb do gene 16S rRNA. O iniciador Rq1 (5'-GGT CTA ATA CCG GAT ATG AGC TCC TGT C-3') é complementar dos nucleotídeos 156 a 183 e o reverso Rq2 (5'-CGC AAG CTT GGG GTT GAG CCC CAA-3') dos nucleotídeos 582 a 605. Em 1999, BELL et al., construíram para *R. erythropolis*, os iniciadores Re1 (5'-CGT CTA ATA CCG GAT ATG ACC TCC TAT C-3') complementar aos nucleotídeos 165 a 192 e o reverso

Re2 (5'-GCA AGC TAG CAG TTG AGC TGC TGG T-3') dos nucleotídeos 609 a 633. Nesse caso o produto amplificado é um fragmento de 449 pb do gene 16S rRNA. Não foram descritos iniciadores específicos para o gênero *Rhodococcus*.

1.1.3. Técnicas cromatográficas

Na identificação química, semelhante às espécies do gênero *Mycobacterium*, membros do gênero *Rhodococcus* contêm ácidos micólicos plausíveis de serem identificados pela cromatografia em camada delgada (CCD). A chave da identificação consiste no tamanho dos ácidos micólicos que varia de 34 a 52 átomos de carbono. Outros gêneros que contêm ácidos micólicos apresentam números diferentes de átomos de carbono, sendo assim determinados: *Corynebacterium* = 22 - 36; *Dietzia* = 34 - 38; *Gordonia* = 48 - 66; *Millisia* = 44 - 52; *Mycobacterium* = 60 - 90; *Nocardia* = 44 - 60; *Tsukamurella* = 64 - 78; *Skermania* = 58 - 64; *Segniliparus* = 70 - 110 e *Williamsia* = 50 a 56 (BROWN et al., 1999; BUTLER et al., 2005; SODDELL et al., 2006; TSITKO, 2007).

A cromatografia em camada delgada (CCD) consiste em um método analítico, rápido, reprodutível e de baixo custo, que não requer equipamento específico, sendo extremamente útil na quimiotaxonomia. (LEVY-FREBAULT et al., 1987). Essa metodologia tem sido empregada rotineiramente, na identificação de micobactérias (LEITE et al., 1995, 1998, 2005).

1.2. Perfil de sensibilidade aos medicamentos

O tratamento da Rodococose é ainda bastante insipiente e no Brasil são poucos os trabalhos realizados para avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos vigentes para este agente bacteriano (SEVERO et al., 2001; VIANA, 2007). A patogenicidade de *R. equi* se baseia na sua capacidade de permanecer dentro dos macrófagos. A histopatologia revela a

presença de processos piogranulomatosos, contendo grande contingente de macrófagos, linfócitos e neutrófilos degenerados, células gigantes e grande quantidade do microrganismo no citoplasma dos fagócitos, circundado por cápsula fibrosa (RIBEIRO et al., 2007). Por essa razão, o tratamento da doença fundamenta-se na utilização de antimicrobianos aliado à terapia de suporte. Os antimicrobianos lipofílicos são recomendados por apresentarem altas concentrações no interior celular e por atuarem mesmo na presença de material purulento, que usualmente limita a ação terapêutica de antimicrobianos convencionais. Os antimicrobianos mais indicados são azitromicina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, imipenem, rifampicina, sulfametoxazol+trimetoprim, tobramicina ou vancomicina (RIBEIRO et al., 2007, KEDLAYA, 2008). Ainda que não exista um esquema terapêutico estabelecido para o tratamento da rodococose, a maioria dos investigadores concorda que devem ser utilizadas combinações de 2 a 3 antimicrobianos com boa penetração intracelular. O tratamento se estende por períodos prolongados de 6 semanas ou mais, com medicamento injetável, seguido de tratamento oral por outras semanas ou inclusive meses (DÍAZ-CORRALES, 2003; RIBEIRO et al., 2006, 2007; KEDLAYA, 2008).

O teste padrão preconizado pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards” (CLSI/NCCLS, 2003b) para os actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp é o de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o qual pode ser realizado pelo método de microdiluição em Caldo Mueller Hinton (MH caldo) suplementado com cátions. Ainda não existem métodos padronizados para testes de sensibilidade de actinomicetos aeróbios, pelo método de Disco Difusão, no entanto, nos últimos anos, foram testados vários agentes antimicrobianos como: Amicacina, amoxicilina-clavulanato, ceftriaxona, ciprofloxacina, eritromicina, imipenem, minociclina e sulfametoxazol-trimetoprim (ASOH, et al., 2003; TORRES-TORTOSA et al., 2003).

Em geral, o *R. equi* apresenta resistência aos agentes beta-lactâmicos especialmente penicilinas (KEDLAYA, 2008). Quando a resistência ocorre devido à produção de enzimas β -lactamases (penicilinases), podendo sua detecção ser demonstrada, diretamente, com a utilização da cefalosporina (nitrocefina). Nesse teste, a reação positiva indica que o isolado produz β -lactamase. Trata-se de um método cromogênico, de fácil execução, resultando em 1 a 60 minutos. O método utiliza um disco de papel embebido com nitrocefina, comercialmente disponível, sendo indicado no teste rápido de bactérias produtoras de beta-lactamase. A nitrocefina exibe uma mudança de cor, do amarelo para o vermelho, quando a bactéria produz a enzima em quantidade significativa. Embora outras penicilinas e cefalosporinas possam ser utilizadas como substrato para enzimas específicas, a nitrocefina apresenta largo espectro de sensibilidade e não se conhece sua reação com outras enzimas microbianas (SWENSON et al., 1999).

1.3. Justificativa

Rhodococcus equi é reconhecido como causador de infecções oportunistas nas pessoas imunocomprometidas, em especial, naquelas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Essa bactéria se assemelha ao *Mycobacterium tuberculosis*, pois possui ácidos micólicos na parede celular e pode estar associada com infecções pulmonares, invasivas ou sistêmicas (KEDLAYA, 2008). Devido à evolução clínica da rodococose ser semelhante com a da tuberculose, e a alta prevalência desta última em nosso meio, 58 casos por 100.000 habitantes (GOUVEIA, 2006), há certa dificuldade em se detectar as infecções causadas por *R. equi* e estabelecer um tratamento adequado para estas patologias.

Uma vez que o sucesso do tratamento depende do diagnóstico precoce e do tratamento adequado, o diagnóstico diferencial merece especial importância. Muitas vezes apesar de não se conseguir identificar o *M. tuberculosis*, nos procedimentos rotineiros dos laboratórios

clínicos, alguns médicos iniciam o tratamento empírico da tuberculose. Destaca-se, no entanto, que a susceptibilidade do *R. equi* é diferente da do *M. tuberculosis*. Uma sugestão terapêutica é a associação de vancomicina e eritromicina por dois meses pelo menos (SEVERO et al., 2001).

No laboratório de Micobactérias, do setor de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz - Laboratório de Ribeirão Preto tem sido freqüente o isolamento de bactérias nocardioformes, parcialmente resistentes ao álcool ácido. Considerando a importância clínica emergente dessas bactérias, tornou-se necessário estabelecer um esquema de identificação das mesmas, além de se investigar o seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

2.1.1. Identificar isolados bacterianos sugestivos de *R. equi*, proveniente de amostras de escarros de pacientes com suspeita de tuberculose, empregando métodos fenotípicos, genotípicos e de quimiotaxonomia, e determinar o perfil de sensibilidade de *R. equi* aos medicamentos.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Realizar provas bioquímicas para identificação do *R. equi*.

2.2.2. Padronizar e determinar o perfil de ácidos micólicos utilizando cromatografia em camada delgada dos isolados suspeitos de *Rhodococcus* sp.

2.2.3. Realizar a identificação genética dos isolados bacterianos utilizando PCR.

2.2.4. Verificar a resistência dessas bactérias pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a técnica de microdiluição em placa.

2.2.5. Verificar a resistência dessas bactérias utilizando a técnica de Disco Difusão.

2.2.6. Comparar os resultados de perfil de susceptibilidade do *R. equi* frente aos antimicrobianos obtidos pela determinação da CIM e Disco Difusão.

2.2.7. Detectar Enzimas Mediadoras de Resistência (Beta lactamase), pelo método de disco com nitrocefina.

2.2.8. Proposição de um conjunto de técnicas para a identificação fenotípica, incluindo a Cromatografia em Camada Delgada e identificação genotípica utilizando PCR, estabelecendo assim, um algoritmo para a identificação de *R. equi*.

2.2.9. Proposição do método de Disco Difusão, passível de ser aplicado em laboratórios de menor porte para determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos do *R. equi*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Locais de trabalho

Na seção de Micobactérias do setor de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Ribeirão Preto, foi realizado ensaios de fenotipagem e testes de sensibilidade às drogas.

No laboratório de Micobactérias Dr. Hugo David da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, campus de Araraquara, foram realizados a padronização e os ensaios de PCR e de Cromatografia em Camada Delgada.

3.2. Amostras clínicas

Foram analisadas 1636 amostras de escarro colhidas de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos em Unidades de Saúde e Hospitais da região de abrangência do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2002. Em 114 amostras foram isolados e caracterizados Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido (BPRAA). Desse total, 51 isolados foram identificados como *R. equi*, os quais estão relacionados nos **Quadros 1 e 2**, com respectivos anos de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes.

Quadro 1. Relação dos 114 isolados bacterianos caracterizados como Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido, com respectivos anos de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes.

ISOLADO	PROCEDÊNCIA	UNID REQ	ANO	SEXO	IDADE
005	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2000	M	29a
082	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2000	M	33a
097	SERTÃOZINHO	CSI	2000	M	36a
098	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	F	20a
099	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2000	F	44a
100	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	M	31a
101	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2000	M	30a
104	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2000	M	32a
108	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	F	25a
108	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	F	25a
110	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	M	26a
113	PRADÓPOLIS	CM	2000	M	41a
114	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2000	M	42a
115	RIBEIRÃO PRETO	CBRANCO	2000	M	33a
117	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	M	50a
118	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2000	M	30a
119	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2000	M	37a
120	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	M	35a
121	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	M	26a
122	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2000	M	37a
123	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	M	30a
124	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2000	M	30a
125	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2000	M	42a
131	SERTÃOZINHO	CSII	2000	M	26a
134	SERRANA	CSII	2000	F	50a
135	SERTÃOZINHO	CSII	2000	M	28a
136	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2000	F	29a
137	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	M	49a
139	BRODOWSKI	CSII	2000	F	65a
140	BRODOWSKI	CSII	2000	F	65a
141	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2000	M	43a
143	JARDINÓPOLIS	CSII	2000	M	73a
145	RIBEIRÃO PRETO	AADIED	2000	M	45a
146	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2000	M	40a
147	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	F	28a
148	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2000	M	25a
149	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	36a

Quadro 1. Relação dos 114 isolados bacterianos caracterizados como Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido, com respectivos anos de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes (continuação).

150	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	36a
152	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	36a
154	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	46a
155	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2001	M	77a
159	LUIZ ANTONIO	CSIII	2001	M	84a
171	RIBEIRÃO PRETO	CSIII	2001	M	35a
174	PONTAL	CSII	2001	M	33a
182	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2001	M	45a
183	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	31a
184	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	31a
190	DUMONT	UMS	2001	M	35a
191	BATATAIS	CSI	2001	M	78a
196	CATANDUVA	CSII	2001	F	30a
198	JABOTICABAL	VM	2001	M	55a
199	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2001	M	49a
204	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2001	M	40a
205	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2001	M	40a
210	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2001	F	54a
211	PONTAL	CSII	2001	M	34a
213	SERRA AZUL	CSII	2001	M	61a
214	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2001	M	40a
215	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	35a
217	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2001	M	40a
221	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	42a
226	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2001	M	34a
227	SERTÃOZINHO	CSII	2001	M	36a
229	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	33a
230	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	33a
231	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	49a
232	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	49a
235	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	36a
236	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2001	M	57a
237	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	32a
238	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2001	M	47a
240	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2001	M	44a
242	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SSAGRADO	2001	M	39a
247	LUIZ ANTONONIO	CSII	2002	M	47a
249	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	34a

Quadro 1. Relação dos 114 isolados bacterianos caracterizados como Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido, com respectivos anos de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes (continuação).

250	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	29a
252	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	56a
254	BATATAIS	CSI	2002	F	43a
255	ALTINÓPOLIS	CSII	2002	M	50a
256	SERTÃOZINHO	CSI	2002	F	34a
259	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2002	F	28a
260	RIBEIRÃO PRETO	CR	2002	M	46a
262	SANTA ROSA DO VITERBO	CSIII	2002	F	41a
263	PRADÓPOLIS	CM	2002	M	35a
270	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2002	M	32a
273	COLINA	CSIII	2002	M	38a
276	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	17a
277	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	27a
278	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	32a
279	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	32a
280	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	32a
281	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	F	34a
286	CATANDUVA	CSI	2002	F	43a
288	RIBEIRÃO PRETO	CSE	2002	F	46a
293	RIBEIRÃO PRETO	CR	2002	M	52a
296	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	31a
297	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	IPA	2002	M	19a
299	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	55a
300	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	55a
301	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	39a
302	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	33a
303	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	30a
304	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	37a
305	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	27a
306	RIBEIRÃO PRETO	UBDSC	2002	M	43a
309	PITANGUEIRAS	CSII	2002	M	69a
311	SANTA ROSA DO VITERBO	CSII	2002	F	50a
313	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	19a
314	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2002	M	58a
315	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	40a
319	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	HB	2002	M	67a
322	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	25a
345	RIBEIRÃO PRETO	ARE	2002	M	21a
346	SÃO JOSÉ DO RIO PRETO	SAE	2002	M	49a

Quadro 2. Relação dos isolados identificados como *Rhodococcus equi*, respectivamente, por ano de isolamento, procedência, sexo e idade dos pacientes.

ANO 2000				ANO 2002			
Isolado	Procedência	Sexo	Idade	Isolado	Procedência	Sexo	Idade
005	Ribeirão Preto	M	29a				
082	Ribeirão Preto	M	33a	252	São J. Rio Preto	M	56a
097	Sertãozinho	M	36a	259	Ribeirão Preto	F	28a
101	Ribeirão Preto	M	30a	260	Ribeirão Preto	M	46a
108	São J. Rio Preto	F	25a	273	Colina	M	38
113	Pradópolis	M	41a	276	São J. Rio Preto	M	17a
120	São J. Rio Preto	M	35a	277	São J. Rio Preto	F	27a
136	Ribeirão Preto	F	29a	278	São J. Rio Preto	F	32a
146	Ribeirão Preto	M	40a	279	São J. Rio Preto	F	32A
147	São J. Rio Preto	F	28a	280	São J. Rio Preto	F	32a
148	São J. Rio Preto	M	25a	286	Catanduva	F	43a
ANO 2001				288	Ribeirão Preto	F	46a
182	Ribeirão Preto	M	45a	296	São J. Rio Preto	M	31a
183	São J. Rio Preto	M	31a	297	São J. Rio Preto	M	19a
184	São J. Rio Preto	M	31a	299	São J. Rio Preto	M	55a
196	Catanduva	F	30a	300	São J. Rio Preto	M	55a
204	São J. Rio Preto	M	40a	301	São J. Rio Preto	M	39a
205	São J. Rio Preto	M	40a	303	São J. Rio Preto	M	30a
210	Ribeirão Preto	F	54a	305	São J. Rio Preto	M	27a
214	Ribeirão Preto	M	40a	306	Ribeirão Preto	M	43a
217	Ribeirão Preto	M	40a	311	Santa R. Viterbo	F	50a
221	São J. Rio Preto	M	42a	313	São J. Rio Preto	M	19a
226	São J. Rio Preto	M	34a	315	São J. Rio Preto	M	40a
227	Sertãozinho	M	36a	345	Ribeirão Preto	M	21a
235	São J. Rio Preto	M	36a	346	São J. Rio Preto	M	49
236	São J. Rio Preto	M	57a				
238	São J. Rio Preto	M	47a				
240	Ribeirão Preto	M	44a				

3.3. Cepas de Referência utilizadas neste estudo

Enterococcus faecalis ATCC 29212; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Listeria ivanovii* ATCC 19119; *Listeria monocytogenes* ATCC 19112; *Rhodococcus equi* ATCC 6939; *Rhodococcus equi* ATCC 33701; *Rhodococcus equi* ATCC 33702; *Rhodococcus equi* ATCC 33703; *Corynebacterium xerosis* IAL 0105; *Mycobacterium aurum* ATCC 23366, *Nocardia asteroides* IAL 2125;

3.4. Meios de Cultura e reagentes utilizados neste estudo

Meios de cultura em forma desidratada (Difco): Mueller Hinton Broth (MH caldo), Mueller Hinton agar (MH agar), Middlebrook 7H9 Broth (7H9 caldo), Heart Infusion (HI caldo), Brain Heart Infusion (BHI caldo), Brain Heart Infusion agar (BHI agar), Christensen Urea Agar Base (Uréia agar), Tryptic Soy Broth (Tryptic caldo), Esculin agar, Nutrient Agar (AN), Sulfur-Indol-Motility (SIM ágar), Malonate Broth (Caldo com Malonato), Simmons Citrate Agar (Citrato ágar), Acetate agar (Acetato ágar), OF basal médium (Meio OF), Urea Agar.

Meios de cultura formulados (Anexo A): Meio de básico de Gordon ou “Fermentation basal médium”, Lowenstein-Jensen (meio L. J.), Caldo de Uréia Indol.

Reagentes formulados (Anexo A): N-ACETIL-L- CISTEINA/NAOH 2% (NALC-NAOH), Reativos “A” e “B” para nitrato redutase, Reativo de Kovacs, Solução reveladora de gelatinase.

3.5. Agentes antimicrobianos utilizados

3.5.1. Método de Disco Difusão

Foram utilizados os antibióticos em disco procedentes do Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos LTDA (CECON): Amoxicilina+ácido clavulânico; Azitromicina; Cefazolina; Claritromicina; Clindamicina; Doxiciclina; Eritromicina; Imipenema; Levofloxacina; Rifampicina; Teicoplanina; antibióticos em disco procedentes de Produtos para Laboratórios Ltda (LABORCLIN): Amicacina; Ampicilina; Cefalotina; Cefepima; Ceftriaxona; Cefoxitina; Cefotaxima; Ciprofloxacina; Cloranfenicol; Gentamicina; Norfloxacina; Oxacilina; Penicilina; Sulfametoxazol+Trimetoprim; Tetraciclina; Vancomicina e o antibiótico Minociclina em disco procedente da CEFAR Diagnóstica Ltda, cujos grupos e concentrações, são demonstrados no **Quadro 3**.

3.5.2. Método de determinação da CIM

Foram utilizados 15 agentes antimicrobianos de procedência Sigma. O solvente utilizado para o preparo das soluções estoque (10.000 µg/mL) e as concentrações finais dos antimicrobianos na microplaca estão listados no **Quadro 4**.

Quadro 3. Grupos de antimicrobianos com respectivas concentrações, testados com os 51 isolados de *Rhodococcus equi*, de acordo com o método de disco difusão.

BETA-LACTÂMICOS
Penicilinas: Ampicilina (AMP 10µg); Oxacilina (OXA 5µg); Penicilina (PEN 10UI)
Penicilina + Inibidor de Beta-Lactamase: Amoxicilina+ácido clavulânico (AMC 30µg)
Cefalosporinas: 1ª geração: Cefalotina (CFL 30µg); Cefazolina (CFZ 30µg) 2ª geração: Cefoxitina (CFO 30µg) 3ª geração: Cefotaxima (CTX 30µg); Ceftriaxona (CRO 30µg) 4ª geração: Cefepima (CPM 30µg)
Carbapenema: Imipenema (IPM 10µg)
AMINOGLICOSÍDEOS
Amicacina (AMI 30µg); Gentamicina (GEN 10µg)
QUINOLONAS (2ª Geração)
Ciprofloxacina (CIP 5µg); Levofloxacina (LVX 5µg); Norfloxacina (NOR 10µg)
MACROLÍDEOS
Azitromicina (AZI 15µg); Claritromicina (CLA 15µg); Eritromicina (ERI 15µg)
TETRACICLINAS
Tetraciclina (TET 30µg); Doxiciclina (DOX 30µg); Minociclina (MIN 30µg);
LINCOSAMÍDEO
Clindamicina (CLI 2µg)
GLICOPEPTÍDEOS
Teicoplanina (TEC 30µg); Vancomicina (VAN 30µg)
SULFONAMIDA e TRIMETHOPRIM
Sulfametoxazol+Trimetoprim (SMT 25µg)
CLORANFENICOL
Cloranfenicol (CLO 30µg)
ANSAMICINA
Rifampicina (RIF 5µg)

Quadro 4. Grupos de antimicrobianos testados, com seus respectivos solventes e concentração final na microplaca contra os 51 isolados de *Rhodococcus equi*, utilizando o método da microdiluição em placa com a resazurina como revelador de crescimento bacteriano.

CLASSE ANTIMICROBIANA	ANTIMICROBIANOS	SOLVENTE	CONCENTRAÇÃO FINAL (µg/mL)
Beta-Lactâmicos	Ampicilina	Água destilada	64 a 1
	Amoxicilina	DMSO	256 a 4
	Cefotaxima	Água destilada	256 a 4
	Ceftriaxona	Água destilada	512 a 8
Aminoglicosídeos	Amicacina	Água destilada	64 a 1
	Gentamicina	Água destilada	32 a 0,5
Quinolona	Ciprofloxacina	HCl 0,1N	64 a 1
Macrolídeo	Claritromicina	DMSO	32 a 0,5
Tetraciclina	Doxiciclina	Água destilada	64 a 1
	Minociclina	Água destilada	64 a 1
Glicopeptídeo	Vancomicina	Água destilada	64 a 1
Inibidores da via metabólica do folato	Sulfametoxazol	DMSO	256 a 4
	Trimethoprim	DMSO	256 a 4
Ansamicina	Rifampicina	Metanol	2 a 0,031
Carbapenema	Imipenema	Água destilada	32 a 0,5

DMSO - dimetilsulfóxido

3.6. Metodologia aplicada neste estudo

3.6.1. Baciloscopia e cultura de escarro

As técnicas laboratoriais (baciloscopia e cultura) foram as rotineiramente utilizadas e padronizadas conforme normas e recomendações descritas no Manual de Bacteriologia da Tuberculose do Ministério da Saúde (BRASIL, 2002).

Inicialmente, foi realizada a baciloscopia pela técnica de Ziehl Neelsen, para pesquisa direta do bacilo álcool-ácido resistente. Na seqüência, as amostras foram submetidas à descontaminação pelo método de N-Acetil-L- Cisteína/NaOH 2% (NALC-NAOH), que resumidamente consistiu em colocar em contato por 15 - 20 minutos à temperatura ambiente após homogeneização vigorosa, 5 ml da amostra e o mesmo volume da solução de NALC em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 mL. A seguir, foi adicionado o mesmo volume de tampão fosfato, centrifugado a 3.000 g por 15 minutos e semeadura do sedimento onde se acrescentou tampão fosfato em caldo 7H9 e incubado no sistema automatizado MB/BacT (BioMerieux). Dos frascos incubados e sinalizados como positivos pelo sistema, foram realizados esfregaços do meio líquido para a investigação de BAAR. Se confirmado, todo o conteúdo do meio de cultura líquido foi centrifugado a 3000g por 30 minutos e o sedimento re-suspenso em 1mL de água destilada estéril. Dessa suspensão bacteriana tomou-se 100 µL, os quais foram semeados em meio Lowenstein-Jensen (LJ), seguindo a investigação de micobactérias e sua identificação pelos métodos GenProbe e fenotípicos (BRASIL, 2000).

Entre os frascos sinalizados como positivos pelo sistema, 114 deles apresentaram no esfregaço a presença de cocobacilos ou bacilos parcialmente resistentes ao álcool-ácido (BPRAA). Foram retirados destes frascos cerca de 5 mL do meio de cultura líquido, e centrifugados a 3000g por 30 minutos, sendo o sedimento semeado em meio de LJ. Assim

que desenvolvidas, as culturas foram homogeneizadas em solução fisiológica esterilizada e semeadas no ágar Müeller Hinton (MH) em placas, para certificar sua pureza. Colônias isoladas foram semeadas no ágar MH em tubos inclinados e observadas em microscopia através dos métodos de Gram modificado por Hucker e Ziehl-Neelsen modificado por Kinyoun (BALLOWS, 1991).

3.6.1.1. Caracterização dos isolados sugestivos de *Rhodococcus* sp.

Considerou-se a morfologia das colônias e de bacilos ou cocobacilos Gram-positivos, apresentando resistência parcial ao álcool-ácido. Posteriormente, as colônias foram transferidas para o meio de cultura, caldo Tryptic com 20% de glicerol e estocadas à -70° C, até o momento de serem identificadas.

3.6.2. Identificação dos isolados sugestivos de *Rhodococcus* sp

Para a identificação, as culturas mantidas em freezer foram descongeladas, estriadas em ágar MH e incubadas a $35 - 37^{\circ}$ C por tempo necessário para formação de colônias características.

3.6.2.1. Testes fenotípicos realizados

Os isolados suspeitos de *Rhodococcus* sp foram submetidos aos testes: Produção de Ácido dos carboidratos no meio de cultura base de Gordon (Adonitol, Amido, Arabinose, Celubiose, Dulcitol, Eritritol, Frutose, Galactose, Glicose, Glicerol, Inositol, Lactose, Maltose, Manitol, Manose, Melibiose, Rafinose, Raminose, Sacarose, Salicina, Sorbitol e Xilose); Produção de: (Amilase, Beta Galactosidase, Casease, Catalase, Gelatinase, H_2S , Indol, Lipase, Nitrato redutase, Oxidase, Urease); Utilização de: (Acetato, Citrato e Malonato); Hidrólise de:

(Esculina, Hipurato e ONPG); Oxidação e Fermentação da glicose; Decomposição de: (Adenina, Hipoxantina, Tirosina e Xantina); Motilidade e Teste de CAMP.

3.6.3. Descrição dos testes fenotípicos realizados

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações dos autores que propuseram as respectivas metodologias (NASH & KRENZ, 1991; FISS & BROOKS, 1991; McFADDIN, 2000; PRIEST et al., 1988; PASTEUR, 1991; KONEMAN, 1993) e a descrição dos testes fenotípicos realizados, assim como as figuras ilustrativas encontram-se no **Anexo B**. Entretanto, pela importância do Teste de CAMP na identificação do *R. equi*, apenas esse ensaio é descrito a seguir.

3.6.3.1. Produção do fator *equi* ou enzima Cholesterol Oxidase (Teste de CAMP)

A enzima Cholesterol Oxidase é codificada pelo gene *choE* e considerada como fator de virulência de *R. equi*. Interage com a enzima esfingomielinase C, produzida por certas bactérias como a *Listeria ivanovii*, formando uma área de hemólise completa, no Ágar MH com 5% de sangue desfibrinado, de carneiro, numa configuração de ponta de flecha ou pá. A prova foi realizada de acordo com o método descrito por BILLE & DOYLE (1991). A semeadura foi realizada traçando simples estrias retas da bactéria investigada (na horizontal) e a cepa padrão de *Listeria ivanovii* ATCC 19119 (na vertical). As estrias foram traçadas, perpendicularmente, distantes uma da outra cerca de 5 a 10 mm na superfície do meio de cultura. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 48 horas. A prova positiva foi caracterizada pela formação da hemólise aumentada, na área de intersecção. Utilizou como controle a cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

3.7. Análise de ácido micólico com Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

Para o estudo foi utilizada a técnica preconizada por MIYAJI et al. (2002) com algumas modificações (**Anexo C**), descritas abaixo:

3.7.1. Obtenção da massa bacteriana

Os isolados bacterianos foram semeados em MH ágar e as culturas mantidas em temperatura ambiente até que houvesse crescimento satisfatório (até ± 7 dias).

3.7.2. Extração de micolatos

Foram preparadas suspensões bacterianas densas (5 a 30 mg de bactérias) em tubos 13X100mm com tampa de rosca, contendo 1 mL de metanol/tolueno/ácido sulfúrico (30/15/1). Os tubos foram mantidos a 75°C entre 10 a 12 horas, para extração do micolato de metil éster.

Os tubos foram deixados para resfriar em temperatura ambiente, a seguir, adicionou-se 1 mL de hexano. Os tubos foram agitados (Vortex), deixando-os em repouso para a formação de duas camadas. Transferiu 0,5 mL da camada superior contendo micolato de metil éster (ácido micólico), para outros tubos, os quais foram mantidos a 45°C para evaporação do hexano.

3.7.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Os resíduos secos de micolato de metil éster foram dissolvidos em 40 μ L de hexano e aplicados com o auxílio de tubo capilar, juntamente com as cepas de referência (*Corynebacterium xerosis* IAL 0105; *Mycobacterium aurum* ATCC 23366, *Nocardia asteroides* IAL 2125; *Rhodococcus equi* ATCC 6939), sobre a placa de sílica gel (Merck®; Silicagel 60F254), para a formação de cromatogramas. Na placa de sílica gel, foram traçadas duas retas paralelas 2 cm distantes da parte distal, para determinação das partes inferior e

superior. As amostras de micolato de metil éster foram aplicadas na parte inferior da placa, com uma pipeta capilar, em linha reta com intervalos de $\pm 1,3$ cm. A placa foi colocada numa cuba de vidro (22 x 22 x 10 cm), com 100 mL de solvente. A CCD ascendente desenvolveu-se no período de $\pm 1/2$ hora na mistura hexano/éter dietílico (8/2), utilizada como solvente. Assim que o solvente ascendeu até atingir a reta superior, a placa foi retirada da cuba e deixada secar ao ar. A detecção dos cromatogramas foi realizada por meio da pulverização de solução etanólica de rodamina a 10%.

3.7.3.1. Interpretação do fator de retenção

Para a leitura foi observada a presença de manchas de ácidos micolicos e para a diferenciação dos gêneros determinado o fator de retenção (Fr). Os valores de Fr foram obtidos pela razão entre a distância percorrida pelo ácido micolico (distância em centímetros do ponto de aplicação até a mancha) e a distância percorrida pela fase móvel (solvente). *Mycobacterium* e *Tsukamurella* apresentam valores de Fr superiores a 0,6. *Gordonia*, *Nocardia* e *Rhodococcus* apresentam Fr entre 0,2 e 0,6 e *Corynebacterium* Fr menor que 0,2.

3.8. Identificação molecular de *R. equi* através de PCR

3.8.1. Oligonucleotídeos iniciadores ou *Primers*

Foram utilizados os Oligonucleotídeos iniciadores *COX-F* (5'-GTCAAC AACATCGACCAGGCG-3'), correspondendo às posições 1221 a 1241 (forward primer) e o complementar a seqüência, *COX-R* (5'-CGAGCCGTCCACGACGTACAG-3'), de acordo com a seqüência de “*choE* region” (depositado no: “EMBL data bank” sob o no. AJ242746 de acesso) que amplifica produto de 959 pb, de acordo com LADRON et al., (2003).

3.8.2. Obtenção do DNA genômico

O DNA genômico foi obtido pela termólise de suspensões bacterianas (concentradas) em 300 µL de tampão (TE) em tubos de 2,5mL. Estas foram fervidas por 10 minutos e em seguida congeladas (-70°C) por 20 minutos. Os procedimentos de fervura e congelamento foram repetidos por duas vezes. A seguir, os tubos preparados foram deixados para estabilizar em temperatura ambiente (TELENTI et al. 1993),

3.8.3. Extração e Purificação de DNA: Colônias isoladas e recém cultivadas

Os processos de extração e purificação de DNA foram realizados através dos procedimentos determinados por VAN SOOLINGEN, et al. (1991), com modificações (**Anexo D**). Nos tubos com o DNA genômico, estabilizados em temperatura ambiente, foram adicionados 600 µL da mistura: fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram agitados (vortex) e centrifugados (10.000 g) a 4°C por 20 minutos, e depois deixados em repouso para a separação das fases formadas, sendo a fase aquosa transferida para outros tubos. Na fase aquosa transferida foram adicionados 600 µL da mistura: clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). Os tubos foram agitados (vortex), centrifugados (10.000 g) em temperatura ambiente por 5 minutos, e deixados em repouso para a separação das fases formadas, sendo a fase aquosa transferida para outros tubos. Repetiu-se o procedimento, transferindo a fase aquosa para outros tubos. A seguir foram adicionados 300 µL de etanol absoluto para a precipitação do DNA e os tubos foram centrifugados (12.000 g) a 4°C por 20 minutos, desprezando o sobrenadante. O sedimento formado no fundo dos tubos foi adicionado com 500 µL de etanol a 70% (previamente mantido a -20°C pelo ao menos por 18 horas). Os tubos foram centrifugados (12.000 g) a 4°C por 20 minutos, desprezando o sobrenadante (vertendo o tubo cuidadosamente) e repetindo o procedimento. Os tubos foram mantidos invertidos (sobre papel toalha) até secagem total. Foram adicionados 50 µL de TE pH 8,

homogeneizando, com muito cuidado, esfregando a ponta da ponteira, delicadamente, na parede do fundo do tubo, para o desprendimento do DNA. Os tubos com o DNA foram mantidos a -20°C até o momento da utilização.

3.8.4. Amplificação do gene *choE*

Empregando o protocolo de LADRON et al., (2003), foram adicionados em tubo para PCR: 2,5 µL de 10 X PCR buffer; 0,75 µL de 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dntp); 0,75 µL de 50 mM MgCl₂; 0,5 µL de *Taq* DNA polymerase, 1µL (40 pmol) de cada primer; 10 µL de “DNA template”; 8,5 µL de água milli Q (volume final de 25 µL). No termociclador (PTC-100, MJ Research), as ciclagens foram: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos. Corrida através de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto. Anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Extensão final com incubação a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram mantidos a 4°C até serem analisados.

3.8.5. Revelação do produto amplificado

Após a amplificação, 25 µL do produto amplificado foram submetidos à eletroforese horizontal por 2 horas, em géis de agarose a 2% e 0,5 µg de brometo de etídio por mL, empregando tampão TAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM Na₂ EDTA; 2H₂O) e corrente elétrica de 100 V. Fragmentos de 959pb correspondentes ao produto de amplificação do gene *ChoE*, indicativos do *R. equi* foram fotodocumentados empregando AlphaImager (Alpha Innotech®).

3.9. Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Os métodos de Disco Difusão (DD) e Concentração Inibitória Mínima (CIM) foram realizados seguindo as normas do “Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards” (CLSI/NCCLS, 2003a; 2003b; 2005).

3.9.1. Método de Disco Difusão

O método de Disco Difusão foi realizado em placas de agar Mueller Hinton , a partir de crescimento dos isolados bacterianos, não mais que 48 horas. O inóculo bacteriano foi equivalente à escala 0,5 de Mac Farland, utilizando como controle as cepas-padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Depois de inoculadas, as placas foram incubadas a 35° – 37° C por 24 horas, sendo feita uma leitura dos halos inibitórios nesse período. Após a realização da primeira leitura as placas foram cuidadosamente embrulhadas com papel e deixadas por 24 horas adicionais de incubação em temperatura ambiente. Realizou-se uma segunda e definitiva leitura dos halos inibitórios. Devido à ausência de pontos de corte definidos para *R. equi*, os critérios de interpretação foram aqueles aceitos para *Staphylococcus aureus* (CLSI/NCCLS 2005), como descritos no quadro abaixo.

Quadro 5. Padrões Interpretativos de Diâmetros do Halo de inibição e Pontos de Corte Equivalentes das Concentrações Mínimas Inibitórias (CIM) para *Staphylococcus* sp*.

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	Diâmetro do Halo de Inibição (mm)		
		R	I	S
Amicacina	30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Amoxicilina+ácido clavulânico	20/10 µg	≤19	-	≥ 20
Ampicilina	10 µg	≤ 28	-	≥ 29
Azitromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Cefazolina	30 µg	≤14	15-17	≥ 18
Cefepima	30 µg	≤14	15-17	≥ 18
Cefoperazona	75 µg	≤15	16-20	≥ 21
Cefotaxima	30 µg	≤14	15-22	≥ 23
Cefoxitina	30 µg	≤ 24	-	≥ 25
Ceftazidima	30 µg	≤14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona	30 µg	≤13	14-20	≥ 21
Ciprofloxacina	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21
Claritromicina	15 µg	≤ 13	14-17	≥ 18
Clindamicina	2 µg	< 14	15-20	> 21
Cloranfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Doxiciclina	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16
Eritromicina	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Imipenem	10 µg	≤ 13	14-15	≥ 16
Levofloxacina	5 µg	≤ 15	16-18	≥ 19
Minociclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Norfloxacina	10 µg	≤ 12	13-16	≥ 17
Oxacilina	1 µg	≤ 17	-	≥ 18
Penicilina	10 UI	≤ 28	-	≥ 29
Rifampicina	5 µg	≤ 16	17-19	≥ 20
Sulfametoxazol+Trimetoprim	23,75/1,25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16
Teicoplanina	30 µg	≤ 10	11-13	≥ 14
Tetraciclina	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Vancomicina	30 µg	-	-	≥ 15

S= Sensível; I= Intermediário; R= Resistente

*Baseado no documento que apresenta tabelas atualizadas para as normas M2-A8 e M7-A6 relativas a testes de sensibilidade antimicrobiana do Clinical and Laboratory Standards Institute. Suplemento informativo, para uso global, desenvolvido mediante o processo consensual do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2005).

3.9.2. Método para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando resazurina como revelador de crescimento bacteriano (REMA – Resazurin Microtiter Assay)

O método da CIM foi realizado de acordo com o determinado para actinomicetos aeróbios que possuem ácido micólico, incluindo *Rhodococcus* sp, seguindo as normas do “Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards” (CLSI/NCCLS, 2003b) com adição da resazurina para revelar o crescimento bacteriano adaptada da técnica proposta por PALOMINO (2002), utilizada para a determinação da CIM de *M. tuberculosis* frente aos antimicrobianos.

3.9.2.1. Preparo dos agentes antimicrobianos

Para o preparo dos antibióticos foi necessário calcular o seu peso molecular de forma pura, ou seja, excluindo o peso molecular de outras substancias eventualmente presentes em alguns destes compostos. Em seguida, procedeu-se à pesagem, dissolução e diluição das drogas para obtenção da solução de trabalho, chamada de solução estoque, na concentração de 10.000 µg/mL conforme preconizado pelo CLSI/NCCLS, (2005). A diluição das drogas foi realizada primariamente em tubos a fim de obter a concentração adequada para iniciar a diluição na microplaca, de acordo com as especificações mostradas no **Quadro 4**.

3.9.2.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir de culturas recentes de *R. equi* em placas de MH ágar, incubadas a 35 – 37°C em aerobiose, por 24 horas. Preparou-se uma suspensão, de acordo com a escala 0,5 de McFarland, dos 51 isolados de *R. equi* a serem testados e da cepa padrão ATCC 6939. A partir desta suspensão, diluiu-se o inóculo na proporção 1:100 em caldo MH para inoculação na microplaca conforme a técnica preconizada pelo CSLI/NCCLS, (2003b).

3.9.2.3. Preparo das microplacas

Os orifícios de E a H da coluna 11 receberam 200 μL de meio de cultura caldo Mueller Hinton, os da coluna 12 de A a D 100 μL , os da linha A colunas 1 a 11 receberam 150 μL e as demais colunas, 1 a 11 de B a H receberam 100 μL (**Figura 1**). Os orifícios da linha A colunas 1 a 11 e os da linha B colunas 1 a 11 receberam respectivamente 50 e 100 μL das soluções de trabalho de cada uma das drogas utilizadas. Após a homogeneização, 100 μL das misturas contidas nos orifícios da linha B colunas 1 a 11 foram transferidos para a linha C colunas 1 a 11 e assim sucessivamente até que da linha H colunas 1 a 11, após homogeneização foram desprezadas 100 μL . Por último, adicionou-se em todos os orifícios, com exceção da linha A colunas 1 a 11 e da coluna 12 de E a H, 100 μL da suspensão bacteriana diluída a 1:100 preparado no item **3.8.2.2**. Dessa maneira obteve-se um volume final de 200 μL em cada orifício com as concentrações finais das drogas estudadas conforme descrito no **Quadro 4**.

Foi realizado controle de qualidade da suspensão bacteriana preparada de acordo com a escala 0,5 de McFarland. A partir do orifício 12A, controle, fez-se uma diluição do conteúdo com água destilada estéril na proporção 1:100. Semeou-se 100 μL desta diluição em MH ágar preparado em placa de Petri de 5 cm de diâmetro, a qual foi incubada a 35-37°C por 24h. O controle consistiu em conferir o número de colônias crescidas comparadas com o número de colônias que se espera obter numa suspensão bacteriana calibrada com a Escala 0,5 de McFarland, a fim de evitar falsas resistência/sensibilidade aos antibióticos devido ao grande/pequeno número de bactérias inoculadas na microplaca. Se a suspensão de bactérias estiver de acordo com a Escala 0,5 de McFarland espera-se uma contagem de cerca de 50 colônias em cada placa inoculada.

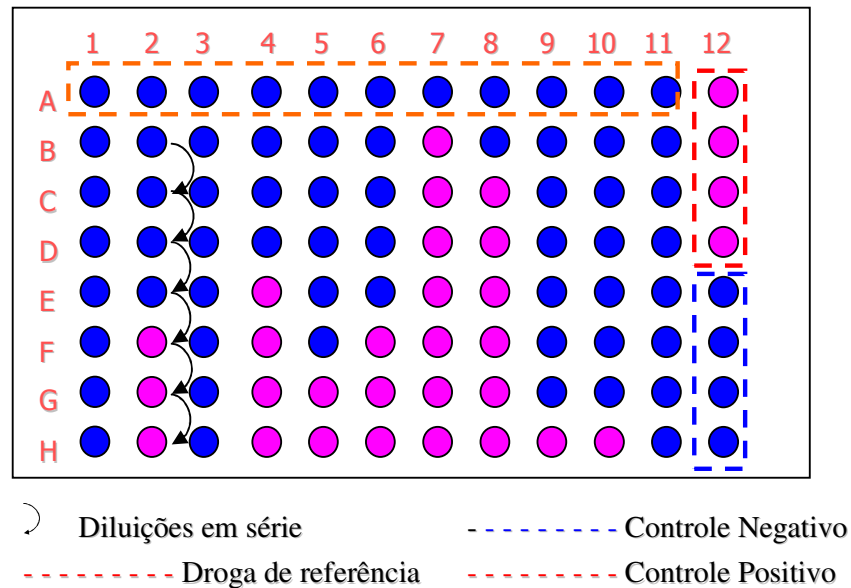


Figura 1. Configuração esquemática do preparo da placa para determinação da CMI utilizando Resazurina como revelador.

3.9.2.4. Incubação e leitura das microplacas

Cada microplaca foi selada com filme plástico e permaneceu incubada em estufa a 35 - 37° C por 3 dias. A solução reveladora de resazurina a 0,01% em água destilada estéril foi preparada no momento da revelação e foram adicionados 30 µl a todos os orifícios das microplacas. Após a adição do revelador, as microplacas foram re-incubadas em estufa a 35 - 37° C por 4 horas. A CIM foi definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da bactéria, impedindo a mudança de cor azul para rósea.

O valor da CIM para cada agente testado determinou a interpretação ("sensível", "intermediário", "resistente") dos resultados. Os pontos de corte considerados para os antimicrobianos testados foram aqueles determinados para actinomicetos aeróbios que possuem ácido micólico, incluindo *Rhodococcus* sp. (CLSI/NCCLS, 2003b). Para os antimicrobianos rifampicina, ampicilina e vancomicina foram aqueles determinados por ASOH et al (2003), como apresentado no **Quadro 6**.

Quadro 6. Pontos de corte da Microdiluição em caldo para actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp.

CIM ($\mu\text{g/mL}$) por categoria			
Agentes Antimicrobianos	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina ^a	≤ 8	-	≥ 16
Amoxicilina ^a	≤ 8	16	≥ 32
Ampicilina ^b	≤ 4	8	≥ 16
Cefotaxima ^a	≤ 8	16-32	≥ 64
Ceftriaxona ^a	≤ 8	16-32	≥ 64
Ciprofloxacina ^a	≤ 1	2	≥ 4
Claritromicina ^a	≤ 2	4	≥ 8
Doxiciclina ^a	≤ 1	2-4	≥ 8
Gentamicina ^a	≤ 4	8	≥ 16
Imipenema ^a	≤ 4	8	≥ 16
Minociclina ^a	≤ 1	2-4	≥ 8
Rifampicina ^b	≤ 1	2-4	≥ 8
Sulfametoxazol ^a	≤ 38	-	≥ 76
Trimetoprim ^a	≤ 2	-	≥ 4
Vancomicina ^b	$\leq 0,5$	-	≥ 1

^{a)} Determinados para actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp. (Number 18, 2003 NCCLS 32 *An NCCLS global consensus standard*. ©NCCLS. All rights reserved).

^{b)} Determinados por Asoh et al. J. Clin. Microbiol. 41 (6): 2337-2340, 2003.

3.9.3. Método de detecção de enzimas mediadoras de resistência

A técnica seguiu a descrita por SWENSON et al., (1999). Para cada isolado bacteriano foi utilizado um disco de papel impregnado com nitrocefina e adicionado com a bactéria investigada, disposto em placa de Petri. O disco foi umedecido com água destilada estéril e observado para a mudança de cor amarela para vermelho (reação positiva), enquanto que, numa reação negativa, o disco manteve-se inalterado (**Anexo B Figura 35**). Considerando que, para a maioria das cepas bacterianas um resultado positivo desenvolve-se em até 5 minutos, porém, para algumas isto pode levar até 1 hora. Foram utilizadas as cepas controles *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213): Positivo e *S. aureus* (ATCC 25923): Negativo.

4. RESULTADOS

Das 1636 amostras de escarros investigados, pelo sistema automatizado MB/BacT (BioMerieux[®]), 426 (26,04%) isolados foram positivo para bactérias resistentes ao álcool ácido, dos quais 114 apresentaram resistência parcial. Desse total, 78 apresentaram as características morfotintoriais de *Rhodococcus* sp e 56 foram positivos para o Teste de CAMP. Na identificação molecular, o produto de amplificação de 959 pb, indicativa da presença do gene *choE*, foi observada em 51 isolados positivos para o Teste de CAMP, e na cepa de referência *R. equi* ATCC 6939, ao passo que nos 22 isolados negativos para o Teste de CAMP, a PCR também foi negativa. Por outro lado, seis isolados positivos para o Teste de CAMP também apresentaram resultado negativo para o gene *choE*.

Caracterizados através dos ensaios fenotípicos e bioquímicos, complementada com cromatografia por camada delgada de ácidos micólicos e PCR para investigar o gene *cho E* e os resultados são apresentados no **Quadro 7** e os resultados de utilização de diferentes fontes de carbono são apresentados no **Quadro 8**.

Quadro 7. Caracterização dos 78 isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada em caracteres fenotípicos e bioquímicos, cromatografia de ácidos micólicos e PCR para investigar o gene *cho E*.

Isolados	PROVAS REALIZADAS																					C C D	P C R
	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA																						
	Nº	C A T	O X I	C M P	A M P	O N P	D N A	G E L	H 2 S	I N D	L I P	N I T	U R E	E S C	H I T	A D E	H I X	X A N	T I R	C A S	F R		
005	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	P	
082	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	P	P	P	P	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
097	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	P	
100	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	N	
101	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P	P	N	N	N	N	N	0,50	P	
108	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	P	
113	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
117	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	
120	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
125	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0,50	N	
131	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
135	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	
136	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	P	
139	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	
141	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	N	
146	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
147	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
148	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
154	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0,38	N	
159	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	
171	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
174	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0,50	N	
182	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
183	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
184	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P	
190	P	N	N	N	(-)	N	P	N	N	P	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	0,35	N	
196	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,50	P	

Quadro 7. Caracterização dos 78 isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada em caracteres fenotípicos e bioquímicos, cromatografia de ácidos micólicos e PCR para investigar o gene *choE* (continuação).

Isolados	PROVAS REALIZADAS																				C C D	P C R
	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA																					
Nº	C A T	O X I	C M P	A M I	O N P	D N A	G E L	H 2 S	I N D	L I P	N I T	U R E	E S C	H I T	A D E	H I X	X A N	T I R	C A S	F r	C h o E	
198	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
199	N	N	N	N	(-)	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
204	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
205	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
210	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
211	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	0,46	N
213	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
214	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
215	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	N	N	0,5	N
217	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
221	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
226	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
227	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
229	P	N	P	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	P	N	N	N	N	0,46	N
231	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	N
232	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	N
235	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
236	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
238	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
240	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,5	P
242	P	N	N	N	(-)	N	P	N	N	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N
247	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
249	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
250	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
252	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,42	P
255	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	0,5	N
256	P	N	N	N	(-)	N	N	N	N	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N
259	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P

Quadro 7. Caracterização dos 78 isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada em caracteres fenotípicos e bioquímicos, cromatografia de ácidos micólicos e PCR para investigar o gene *choE* (continuação).

Isolados	PROVAS REALIZADAS																			C C D	P C R	
	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA																					
Nº	C A T	O X I	C M P	A M I	O N P	D N A	G E L	H ₂ S	I N D	L I P	N I T	U R E	E S C	H I T	A D E	H I X	X A N	T I R	C A S	F r	<i>c h o E</i>	
260	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	0,46	P
263	P	N	N	N	(-)	N	P	N	N	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	0,5	N
273	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
276	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
277	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
278	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
279	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
280	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
286	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
288	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
296	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
297	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
299	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
300	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
301	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
303	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
305	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
306	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,5	P
311	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
313	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	0,46	P
315	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	0,46	P
345	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	P	P	N	N	N	N	N	0,5	P
346	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	P	N	N	P	N	N	N	N	N	0,46	P
6939*	P	N	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	N	N	N	N	0,5	P

*Cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

CAT= Catalase; OXI= Oxidase; MOT= Motilidade; CMP= Teste de CAMP; AMI= Amilase; ONP= Beta Galactosidase; DNA= DNase; GEL= Gelatinase; H₂S= Ácido sulfídrico; IND= Indol; LIP= Lipase; NIT= Nitrato redutase; URE= Urase; ESC= Esculinase; HIT= Hipurato redutase; ADE= Adenina; HIX= Hipoxantina; XAN= Xantina; TIR= Tirosina; CAS= caseinase; FR= Fator de Retenção (cromatografia por camada delgada); CHO= colesterol oxidase (presença do gene *choE*, determinado por PCR); N= Reação negativa; P= Reação positiva; (-)= Não realizado.

Quadro 8. Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos sugestivos de *Rhodococcus* sp e da cepa padrão de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, baseada na utilização de fontes de carbono (continuação).

Nº	A C	C I	M A	A D	A M	A R	C E	D U	E R	F R	G A	G L	G C	I S	L A	M L	M I	M O	M B	R N	R M	S C	S L	S O	X I	
263	N	N	N	N	P	P	N	N	N	P	N	P	P	P	N	N	N	N	N	N	P	P	N	N	N	
273	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
276	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
277	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
278	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
279	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
280	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
286	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
288	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
296	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
297	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
299	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
300	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
301	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
303	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
305	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
306	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
311	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
313	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
315	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
345	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
346	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
6939*	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	P	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

* Cepa padrão , *Rhodococcus equi*, ATCC 6939.

AC= Acetato ; CI= Citrato; MA= Malonato; AD= Adonitol; AM= Amido; AR= Arabinose; CE= Celobiose; DU= Dulcitol; ER= Eritritol; FR= Frutose; GA= Galactose; GL= Glicose; GC= Glicerol; IS= Inositol; LA= Lactose; ML= Maltose; MI= Manitol; MO= Manose; MB= Melibiose; RF= Rafinose; RM= Raminose; SC= Sacarose; SL= Salicina; SO= Sorbitol; XI= Xilose. N= Reação negativa; P= Reação positiva.

4.1. Caracterização fenotípica de *Rhodococcus equi*

Os isolados cresceram prontamente, quando incubados em condições de aerobiose a 37°C em meio não seletivo, agar Mueller Hinton. Com 24 horas de incubação, as colônias mediam cerca de 1 a 2 mm em diâmetro, não sendo distintas. Por volta de 48 horas de incubação, elas tiveram suas características aparentes desenvolvidas com bordas inteiras, irregularmente redondas, lisas, semitransparentes, brilhantes, coalescentes, mucóides, em formato de gotas de lágrimas. As colônias variaram em tamanho de 2 a 4 mm (**Figuras 2 e 3**).

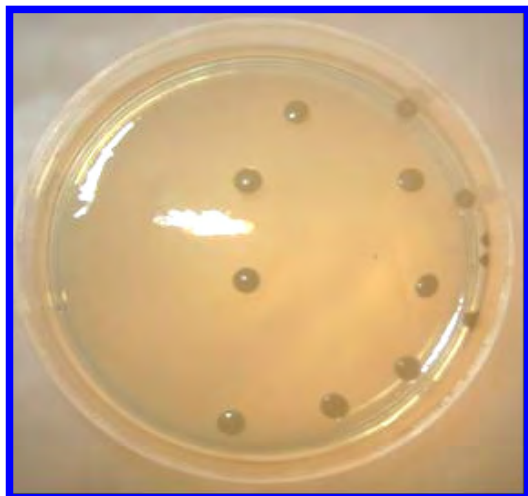


Figura 2. Cultura de *Rhodococcus equi* ATCC 6939 em agar Mueller Hinton, após 48 horas a 37°C. Fotografia ilustra a típica aparência (mucóide) e variação na forma das colônias.



Figura 3. Cultura de isolado suspeito de *Rhodococcus equi* em agar Mueller Hinton, após 48 horas a 37°C. Fotografia ilustra a típica aparência (mucóide) e variação na forma das colônias.

Todos os isolados foram submetidos ao exame microscópico, através de esfregaços confeccionados em lâminas, a partir de colônias isoladas. Com relação à morfologia microscópica e propriedades de coloração, todos se apresentaram na forma de cocobacilos Gram-positivos pleomórficos, variando de formas cocóides distintas a bacilares, dependendo das condições de crescimento (**Figura 4**).

Nos esfregaços corados pelo método de Ziehl- Neelsen (**Figura 5**), os isolados demonstraram resistência parcial ao álcool ácido, mantendo basicamente, a mesma morfologia apresentada nos esfregaços corados pelo método de Gram.

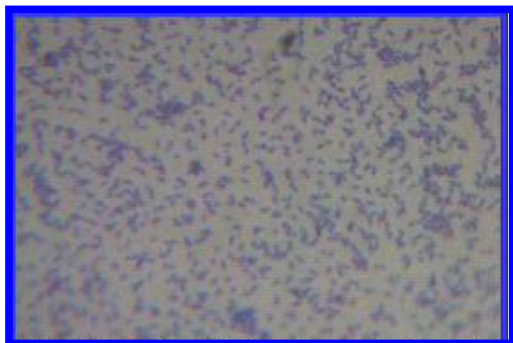


Figura 4. Visão microscópica de esfregaço da cultura de *R. equi* ATCC 6939, corado pelo método de Gram modificado por Hucker. Mostra a morfologia de cocobacilos pleomórficos, Gram-positivos. Amplificação de 1000X em imersão com óleo.

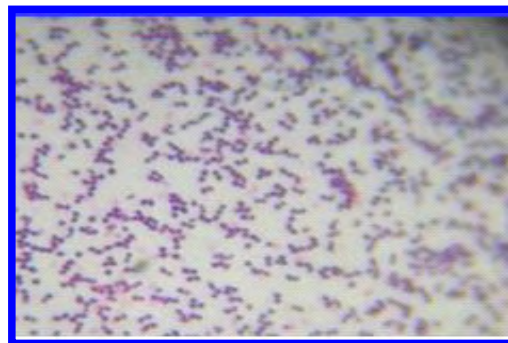


Figura 5. Visão microscópica de esfregaço da cultura de *R. equi* ATCC 6939, corado pelo método de Ziehl Neelsen modificado por Kinyoun. Mostra a morfologia de cocobacilos parcialmente resistentes ao álcool ácido. Amplificação de 1000X em imersão com óleo.

A **Tabela 1** mostra os resultados obtidos pelos 78 isolados bacterianos suspeitos de *Rhodococcus* sp frente às provas bioquímicas utilizadas na caracterização fenotípica destacando que houve 56 isolados que foram positivos no Teste de CAMP. Destes, em 51 isolados foram confirmadas a identificação através da detecção do gene *ChoE*, pela técnica da PCR.

Os 51 isolados que foram positivos para o Teste de CAMP comprovaram a presença do fragmento de 959 pb e apresentaram as características fenotípicas determinadas para *R. equi*, de acordo com a **Tabela 2**. Todos mostraram ser, bioquimicamente, pouco reativos, e falharam em utilizar carboidratos, acetato, citrato e malonato, como única fonte de carbono. Foram oxidase negativa, catalase e lipase positivas. Não apresentaram produção de amilase, β -galactosidase (ONPG), casease, DNase, gelatinase, esculinase, H_2S e indol. Um comportamento variável foi demonstrado para as provas de nitrato redutase, urease e redução

do hipurato. Todos os isolados decompueram a adenina, mas não hipoxantina, tirosina e xantina. Outras características condizentes com *R. equi* incluíram o ótimo desenvolvimento das culturas nas temperaturas entre ambiente e 37°C, aerobiose estrita e mobilidade negativa.

Todas essas características foram, também apresentadas pela cepa *R. equi* ATCC 6939.

Tabela 1. Características fenotípicas apresentadas pelos 78 isolados suspeitos de *Rhodococcus* sp, investigados nesse estudo.

TESTES REALIZADOS	Nº POSITIVOS	RESULTADOS
Catalase	78	100% (+)
Oxidase	00	100% (-)
Motilidade	00	100% (-)
Nitrato redutase	67	85,90% (+)
Fermentação da glicose	00	100% (-)
Urease	45	88% (+)
Indol	00	100% (-)
Gelatinase	03	3,85% (+)
H ₂ S	00	100% (-)
Hidrólise do hipurato	15	19,23% (+)
Hidrólise da esculina	03	3,85% (+)
Lipase	71	91,02% (+)
Amilase	00	100% (-)
Casease	00	100% (-)
DNase	01	1,28% (+)
Fator <i>equi</i> (Teste de CAMP)	51	100% (+)
Decomposição da Adenina	56	71,79% (+)
Decomposição da Hipoxantina	03	3,85% (+)
Decomposição da Tirosina	00	100% (-)
Decomposição da Xantina	00	100% (-)

Tabela 2. Características fenotípicas para identificação de *R. equi*.

Características fenotípicas de <i>R. equi</i>	Características fenotípicas dos isolados do estudo		
	Reação ^a	Nº Positivos	Resultados
Catalase	100% (+)	51	100% (+)
Amilase	100% (-)	00	100% (-)
DNase	100% (-)	00	100% (-)
Beta-galactosidase (ONPG)	100% (-)	00	100% (-)
Casease	100% (-)	00	100% (-)
Decomposição de adenina	100% (+)	51	100% (+)
Decomposição de timina	100% (-)	00	100% (-)
Decomposição de hipoxantina	100% (-)	00	100% (-)
Decomposição de xantina	100% (-)	00	100% (-)
Oxidase	1-5% (+)	00	100% (-)
Fermentação da glicose	100% (-)	00	100% (-)
Oxidação da glicose	100% (+)	51	100% (+)
Única fonte de carbono ^b	100% (-)	00	100% (-)
Gelatinase	100% (-)	00	100% (-)
Indol	100% (-)	00	100% (-)
H ₂ S	32% (+)	00	100% (-)
Urease	95% (+)	45	88% (+)
Hidrólise do hipurato	1% (+)	06	88% (-)
Hidrólise da esculina	4% (+)	00	100% (-)
Redução do nitrato	88% (+)	50	98% (+)
Lipase	100% (+)	51	100% (+)
Fator <i>equi</i> (Teste de CAMP)	100% (+)	51	100% (+)

a- Dados adaptados de Flores et al., 1990; Prescott, 1991, McNeil e Brown, 1994 e Brown et al., 1999. Símbolos: (+), reação positiva; (-) reação negativa.

b- Todas as cepas falharam na utilização de acetato, citrato, malonato e os seguintes carboidratos: adonitol, amido, arabinose, celobiose, dulcitol, eritritol, frutose, galactose, glicerol, inositol, lactose, maltose, manitol, manose, melibiose, rafinose, raminose, sacarose, salicina, sorbitol, trealose e xilose, como única fonte de carbono.

4.2. Caracterização genotípica de *Rhodococcus equi*

A presença do fragmento de 959 pb esperada do gene *choE* foi observada em 51 isolados com reação positiva no Teste de CAMP, assim como também, na cepa padrão *R. equi* ATCC 6939 (ANEXO B – **Figura 28**). Vinte e dois isolados com reação negativa no Teste de CAMP, mostraram ser negativos para o gene *choE*. Cinco isolados identificados presuntivamente, como *R. equi*, com base na reação positiva para o Teste de CAMP, mostraram ser negativos para o gene *choE*.

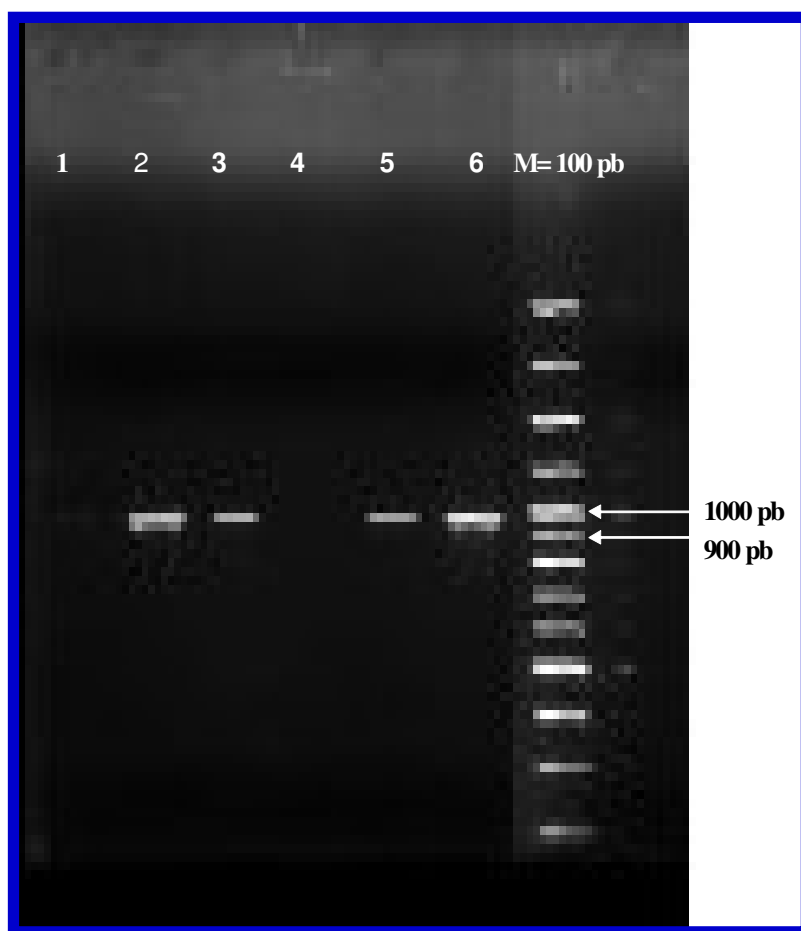


Figura 6. Produtos de PCR de 959pb representantes do gene *choE*, obtidos de amostras genômicas (DNA) de *Rhodococcus equi*. Linhas 1 e 4 (isolados Teste de CAMP negativo); Linhas 2, 3 e 5 (isolados Teste de CAMP positivo); Linha 6 cepa ATCC 6939; M= marcador de peso molecular (100 pb).

4.3. Análise de ácido micólico com a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) de *Rhodococcus equi*

A Figura 7 mostra uma placa de sílica gel com os resultados do método químico da análise de ácidos micólicos, baseado na técnica preconizada por MIYAJI et al., (2002), para detectar ácidos micólicos por Cromatografia em camada delgada (CCD). Neste estudo todos os isolados suspeitos de *Rhodococcus equi*, apresentaram Fator de retenção (FR) entre 0,4 e 0,5, comparável com o Fr da cepa padrão de *R. equi* ATCC 6939. Ácidos micólicos de cepas de referência também foram testados, simultaneamente, e os resultados apresentados foram, respectivamente para, *Gordonia*, *Nocardia* e *Rhodococcus* apresentam Fr entre 0,2 e 0,6, *Mycobacterium* e *Tsukamurella* acima de 0,6 e *Corynebacterium* abaixo de 0,2.

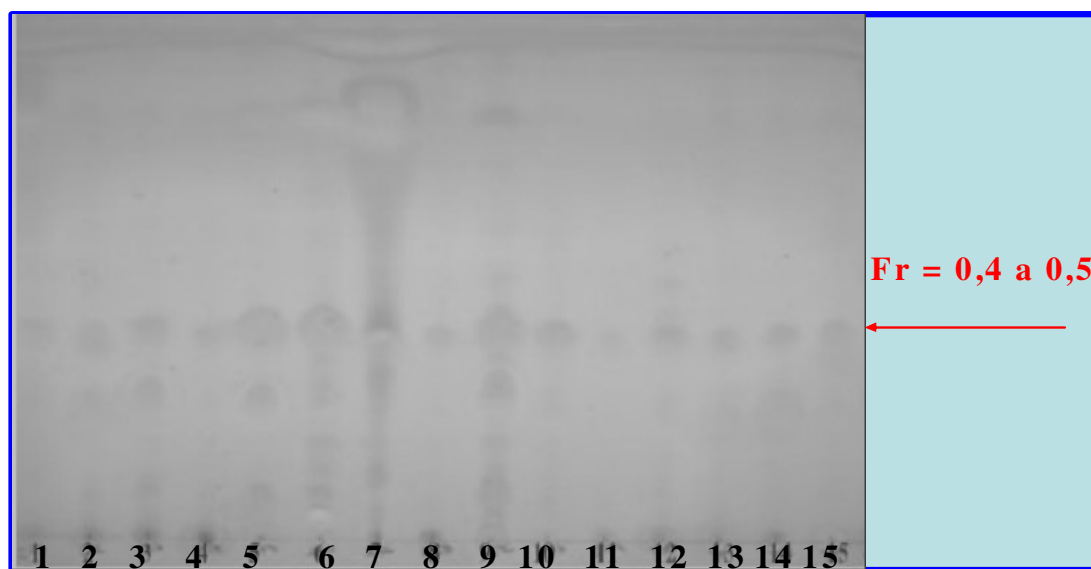


Figura 7. Ácidos micólicos, em placa de sílica gel e eluição em diclorometano. Nesta placa estão representadas 15 isolados suspeitos de *R. equi*.

Na **Figura 8** estão descritas sucintamente, todas as etapas envolvidas na identificação do *R. equi* a partir de um espécime clínico de origem pulmonar.

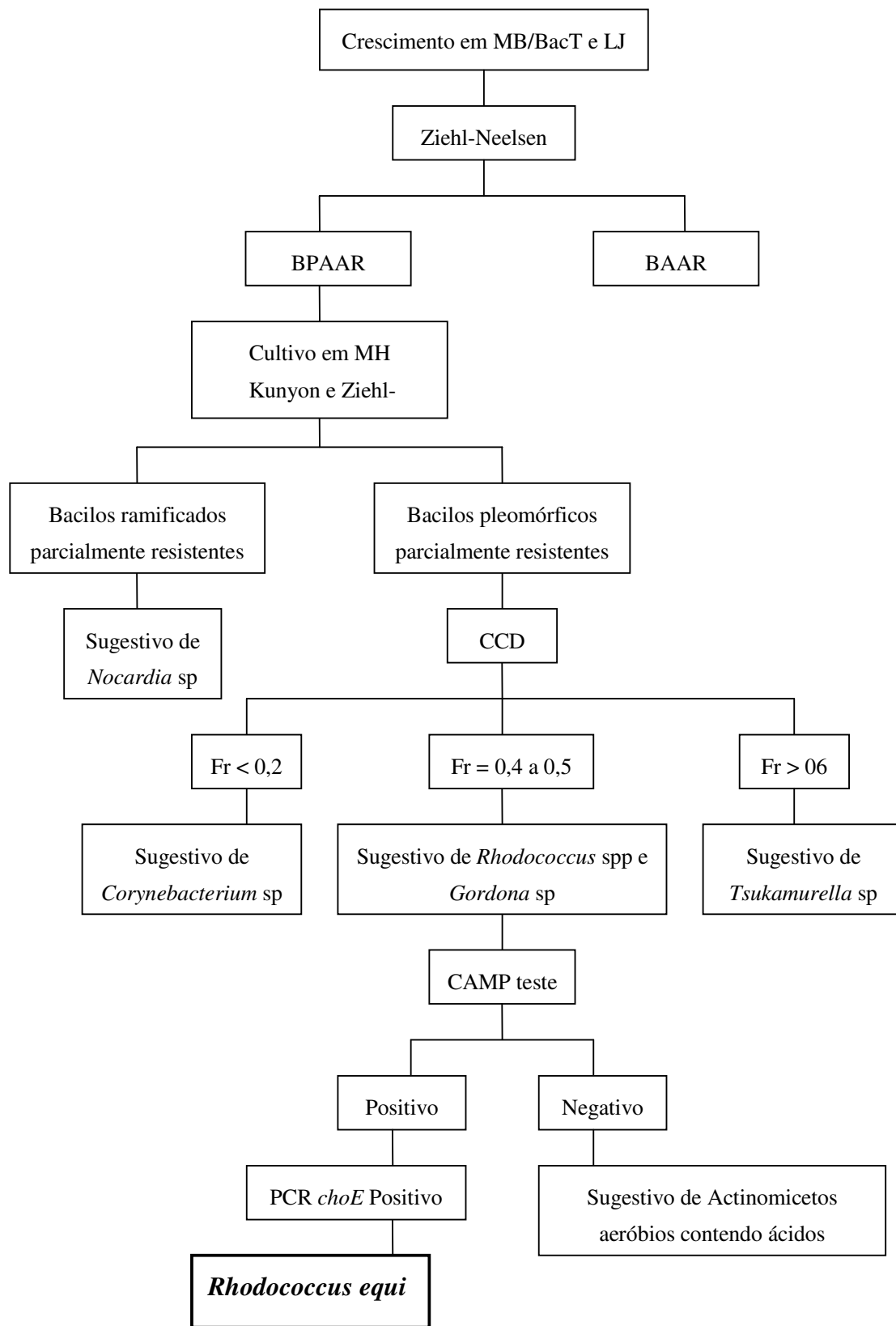


Figura 8 – Fluxograma de identificação fenotípica e genotípica de *Rhodococcus equi*.

4.4. Testes de sensibilidade a antimicrobianos

4.4.1. Método de disco difusão

Foram avaliados 28 agentes antimicrobianos, pertencentes a diferentes grupos, pelo método de Disco Difusão. Os perfis e porcentagem de resistência estão representados na **Tabela 3**.

Os aminoglicosídeos amicacina e gentamicina e os glicopeptídeos teicoplanina e vancomicina mostraram 100% de atividade, contra os isolados. Os macrolídeos azitromicina e claritromicina, também foram 100% ativos, exceto eritromicina (98,04%), que demonstrou atividade intermediária para um isolado.

Os agentes Beta-lactâmicos não mostraram boa atividade, a menos quando combinado com inibidor de beta-lactamase, havendo um significativo aumento na atividade, como no caso de amoxicilina + ácido clavulânico (98,04% dos isolados foram sensíveis). Além desse agente antimicrobiano beta-lactâmico, imipenema e ceftriaxona foram os únicos mais ativos, sendo os isolados sensíveis em 98,04% e 80,39%, respectivamente. A sensibilidade dos isolados frente a outros agentes beta-lactâmicos variou em 49,02% a cefoxitina, 45,10% a cefepima, 23,53% a cefotaxima, 19,60% a cefalotina, 13,73% a cefazolina, 7,84% a ampicilina, 5,88% a penicilina e 1,96% a oxacilina. Mostraram baixa atividade clindamicina e sulfametoxazol + trimetoprim, sendo os isolados resistentes, respectivamente, em 90,20% e 58,84%. As quinolonas levofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina apresentaram atividade de 96,08%, 92,16% e 90,20%, assim como, rifampicina, cloranfenicol e tetraciclina, também foram muito ativos, apresentando respectivamente, atividade de (98,04%), (84,31%) e (78,43%).

Tabela 3. Sensibilidade demonstrada aos antimicrobianos testados, pelos 51 isolados de *Rhodococcus equi*, de acordo com o método de Disco Difusão.

Classe Antimicrobiana	Antimicrobiano	Distribuição dos isolados de acordo com leitura de halo de inibição*		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Beta-Lactâmicos	Ampicilina	04 (7,8%)	-	47 (92,2%)
	Amoxicilina	50 (98%)	-	01 (2%)
	Cefalotina	10 (19,6%)	01 (2%)	40 (78,4%)
	Cefazolina	07 (13,7%)	01 (2%)	43 (84,3%)
	Cefepima	23 (45,1%)	06 (11,8%)	22 (43,1%)
	Ceftriaxona	41 (80,4%)	03 (5,9%)	07 (13,7%)
	Cefoxitima	25 (49%)	11 (21,6%)	15 (29,4%)
	Cefotaxima	12 (23,5%)	01 (2%)	38 (74,5%)
	Oxacilina	01 (2%)	-	50 (98%)
	Penicilina	03 (5,9%)	-	48 (94,1%)
Imipenem	50 (98%)	-	01 (2%)	
Aminoglicosídeos	Amicacina	51 (100%)	-	-
	Gentamicina	51 (100%)	-	-
Quinolonas	Ciprofloxacina	47 (92,2%)	03 (5,9%)	01 (2%)
	Levofloxacina	49 (96%)	01 (2%)	01 (2%)
	Norfloxacina	46 (90,2%)	01 (2%)	04 (7,8%)
Macrolídeo	Azitromicina	51 (100%)	-	-
	Claritromicina	51 (100%)	-	-
	Eritromicina	50 (98%)	01 (2%)	-
Lincosamídeo	Clindamicina	01 (2%)	04 (7,8%)	46 (90,2%)
Cloranfenicol	Cloranfenico	43 (84,3%)	02 (3,9%)	06 (11,7%)
Glicopeptídeo	Teicoplanina	51 (100%)	-	-
	Vancomicina	51 (100%)	-	-
Ansamícina	Rifampicina	50 (98%)	-	01 (2%)
Inibidores da via metabólica do folato	Sulfonamida+ trimetoprim	21 (41,1%)	-	30 (58,9%)
	Doxiciclina	49 (96%)	01 (2%)	01 (2%)
Tetraciclina	Tetraciclina	40 (78,4%)	08 (15,7%)	03 (5,9%)
	Minociclina	51 (100%)	-	-

*Os Padrões Interpretativos de Diâmetros do Halo de inibição, foram àqueles determinados para *Staphylococcus* sp. De acordo com Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement, document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9, 2005).

4.4.2. Método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utilizando a REMA.

Os resultados de CIM dos 15 antimicrobianos testados contra os 51 isolados de *R. equi* estão descritos nas **Tabelas 4 e 5**.

Os valores de CIM dos 15 antimicrobianos para os isolados de *R. equi* mostraram 100% de sensibilidade para claritromicina, vancomicina, gentamicina e rifampicina e relativamente sensíveis à cefotaxima, amicacina, doxiciclina e a imipenema. Para a ampicilina e o trimetoprim os isolados apresentaram resistência total. Três isolados apresentaram uma elevada resistência à ceftriaxona com CIM igual a 512 µg/mL porém 36 (83,7%) isolados apresentaram alta sensibilidade com CIM ≤ 8 µg/mL.

Na **Tabela 6** são apresentados os resultados comparativos entre Disco Difusão e REMA, em porcentagem de sensibilidade/resistência. Nas **Tabelas 7 e 8** são apresentados os resultados comparativos dos agentes antimicrobianos cefotaxima e ceftriaxona, respectivamente.

4.4.3. Método de detecção de enzimas mediadoras de resistência

A produção de β -lactamase foi detectada em 3 isolados, pelo método do disco de nitrocefina, indicando provável produção de penicilinase, já que, todos os isolados foram resistentes a ampicilina, oxacilina e penicilina.

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade dos 51 isolados de *Rhodococcus equi* pelo método da microdiluição em caldo utilizando a REMA, de acordo com os pontos de corte determinados para actinomicetos aeróbios, incluindo *Rhodococcus* sp. (NCCLS, 2003b).

Classe Antimicrobiana	Antimicrobiano	Distribuição dos isolados de acordo com resultado de CMI		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Beta-Lactâmicos	Ampicilina	-	-	51 (100%)
	Amoxicilina	31 (60,8%)	18 (35,3%)	02 (3,9%)
	Ceftriaxona	43 (84,3%)	03 (5,9%)	05 (9,8%)
	Cefotaxima	42 (82,4%)	09 (17,6%)	-
	Imipenema	41 (80,4%)	07 (13,7%)	03 (5,9%)
Aminoglicosídeos	Amicacina	47 (92,2%)	-	04 (7,8%)
	Gentamicina	51 (100%)	-	-
Quinolona	Ciprofloxacina	48 (94,1%)	03 (5,9%)	-
Macrolídeo	Claritromicina	51 (100%)	-	-
Glicopeptídeo	Vancomicina	51 (100%)	-	-
Ansamicina	Rifampicina	51 (100%)	-	-
Inibidores da via metabólica do folato	Sulfametoxazol	-	07 (13,7%)	44 (86,3%)
	Trimethoprim	-	-	51 (100%)
Tetraciclina	Doxiciclina	43 (84,3%)	08 (15,7%)	-
	Minociclina	27 (52,9%)	21 (41,2%)	03 (5,9%)

Tabela 6. Comparação do perfil de susceptibilidade obtido nos 51 isolados de *R. equi*, utilizando o método de Disco Difusão e o de diluição em microplacas (REMA).

Agentes antimicrobianos	Disco Difusão ¹			REMA ²		
	S	I	R	S	I	R
Beta-Lactâmicos						
Ampicilina	02 (3,9%)	-	49 (96,1%)	-	-	51 (100%)
Amoxicilina ^a	49 (96,1%)	-	02 (3,9%)	31 (60,8%)	18 (35,3%)	02 (3,9%)
Cefotaxima	23 (45,1%)	11 (21,6%)	17 (33,3%)	42 (82,4%)	09 (17,6%)	-
Ceftriaxona	42 (82,4%)	01 (1,9%)	08 (15,7%)	43 (84,3%)	03 (5,9%)	05 (9,8%)
Imipenema	50 (98,1%)	-	01 (1,9%)	41 (80,4%)	07 (13,7%)	03 (5,9%)
Aminoglicosídeos						
Amicacina	51 (100%)	-	-	47 (92,2%)	-	04 (7,8%)
Gentamicina	51 (100%)	-	-	51 (100%)	-	-
Quinolona						
Ciprofloxacina	47 (92,2%)	03 (5,9%)	01 (1,9%)	48 (94,1%)	03 (5,9%)	-
Macrolídeo						
Clarithromicina	51 (100%)	-	-	51 (100%)	-	-
Glicopeptídeo						
Vancomicina	51 (100%)	-	-	51 (100%)	-	-
Ansamicina						
Rifampicina	50 (98,1%)	-	01 (1,9%)	51 (100%)	-	-
Inibidores da via metabólica do folato						
Sulfametoxazol ^b	22 (43,1%)	-	29 (56,9%)	-	07 (13,7%)	44 (86,3%)
Trimethoprim ^b	-	-	-	-	-	51 (100%)
Tetraciclina						
Doxiciclina	49 (96,1%)	01 (1,9%)	01 (1,9%)	43 (84,3%)	08 (15,7%)	-
Minociclina	51 (100%)	-	-	27 (52,9%)	21 (41,2%)	03 (5,9%)

S – Sensível

I – Intermediário

R – Resistentes

^aNo método Disco Difusão foi utilizado disco Amoxicilina/Ácido Clavulânico^bNo método Disco Difusão foi utilizado disco Sulfametoxazol/Trimethoprim

¹Os Padrões Interpretativos de Diâmetros do Halo de inibição, foram àqueles determinados para *Staphylococcus* spp. De acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, document M100-S15* (ISBN 1-56238-556-9, 2005).

²Método da microdiluição em caldo utilizando a técnica de REMA (Resazurin Microtitre Assay).

Tabela 7. Comparação dos resultados de REMA e Disco Difusão referentes ao antimicrobiano cefotaxima, encontrados para os 51 isolados de *Rhodococcus equi*.

REMA	DISCO DIFUSÃO				Total
	Sensível	Intermediário	Resistente		
	Halos = 23 a 40 mm	Halos = 17 a 22 mm	Halo = 0 mm	Halo = 14 mm	
Sensível	21	12	08	01	42
Intermediário	02	05	02	-	09
Resistente	-	-	-	-	-
Total	23	17	10	01	51

Tabela 8. Comparação dos resultados de REMA e Disco Difusão referentes ao antimicrobiano ceftriaxona, encontrados para os 51 isolados de *Rhodococcus equi*.

REMA	DISCO DIFUSÃO				Total
	Sensível	Intermediário	Resistente		
	Halos = 21 a 48 mm	Halos = 16 a 20 mm	Halo = 0 mm	Halo = 10 mm	
Sensível	39	02	02	-	43
Intermediário	03	01	-	-	04
Resistente	03	-	-	01	04
Total	45	03	02	01	51

5. DISCUSSÃO

Rhodococcus equi é, reconhecidamente, patógeno oportunista para o homem e tem emergido como uma importante causa de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos, em especial naqueles infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Quanto mais consciência houver sobre as infecções por esse agente, melhor será a probabilidade de um diagnóstico adequado e rápido. São necessárias pesquisas clínicas e laboratoriais, para melhor definição das vias pelas quais o microrganismo é adquirido e por quais mecanismos de patogênese ocorrem as infecções, para a instituição de tratamento apropriado.

Neste estudo foram analisadas 1636 amostras de escarro colhidas de pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar, atendidos em Unidades de Saúde e Hospitais da região de abrangência do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório de Ribeirão Preto, no período de 2000 a 2002. Em 114 amostras foram isolados e caracterizados Bacilos Parcialmente, Resistentes ao Álcool Ácido (BPRAA). Desse total, 78 isolados apresentaram características fenotípicas de *Rhodococcus* sp., porém apenas 51 foram caracterizados por provas fenotípicas e genotípicas como sendo *R. equi*.

Assim como para qualquer bactéria, a identificação dos isolados de *Rhodococcus* sp investigados nesse estudo, foi baseada nas características fenotípicas como morfologia, cultivo, nutrição e bioquímica. Os resultados morfofisiológicos dos 51 isolados avaliados neste estudo evidenciaram características muito similares, com perfis compatíveis a *R. equi* conforme descrições de PRESCOTT (1991), MURRAY et al. (1995) e BIZET et al. (1997); FLORES et al., (1990); FISS & BROOKS, (1991).

Concordando com a descrição literária, os isolados cresceram satisfatoriamente, quando incubados em condições de aerobiose a 37°C em meio não seletivo, Mueller Hinton

agar. Com 24 horas de incubação, as colônias mediam cerca de 1 a 2 mm em diâmetro, não sendo distintas. Por volta de 48 horas de incubação, elas tiveram suas características aparentes desenvolvidas com bordas inteiras, irregularmente redondas, lisas, semitransparentes, brilhantes, coalescentes, mucóides, em formato de gotas de lágrimas. As colônias variaram em tamanho de 2 a 4 mm, embora às vezes parecessem maiores (**Figuras 1 e 2**).

De acordo com PRESCOTT (1991), a variação de colônias é vista em culturas recentes. As clássicas colônias viscosas mucóides coalescentes, são normalmente o tipo predominante, mas formas menos mucóides também podem ser vistas. Colônias pequenas de 1 mm ou menos, não mucóides também podem ser observadas. A produção de pigmento é raramente observada em culturas com menos de 4 dias e pode surpreender aquelas expectativas de todos os rodococos (cocos pigmentados em vermelho) para mostrar obviamente colônias vermelhas ou pink, imediatamente no isolamento. Após 4 a 7 dias em meio não seletivo as colônias podem desenvolver um tom delicado de rosa salmão, embora elas possam ser não pigmentadas ou aparecerem ligeiramente amarelas. Culturas mantidas em meio inclinado, por períodos prolongados, sem sub culturas, comumente tornam-se rugosas, secas e laranja-vermelha, mas reverterem para as clássicas colônias nas sub culturas. Neste estudo os isolados bacterianos investigados apresentaram as características descritas por PRESCOTT (1991).

Morfologicamente, as colônias típicas de *R. equi*, ATCC 6939 pareceram menores, mais lisas e secas (do que mucóides) e pareceram ser mais pigmentadas do que as colônias dos isolados suspeitos de *R. equi* (**Figuras 1 e 2**).

Com relação à morfologia microscópica e propriedades de coloração, todos os isolados suspeitos de *R. equi* apresentaram-se em cocobacilos Gram-positivos pleomórficos, variando de formas cocóides distintas a bacilares, dependendo das condições de crescimento (**Figura 3**). Normalmente, é cocóide, em meio sólido e material purulento de pacientes, mas

em meio líquido, particularmente em culturas jovens, ele forma bacilos longos ou filamentos curtos os quais podem mostrar ramificações rudimentares. O ocasional relato que *R. equi* seja álcool-ácido resistente na coloração de Ziehl-Neelsen (**Figura 4**) parece depender da técnica, idade das culturas e meio de cultura. A maioria dos isolados investigados demonstrou ser parcialmente álcool-ácido resistente. De acordo com (PRESCOTT, 1991), essa é uma característica inconsistente do microrganismo.

Neste estudo foram reunidas várias características que podem ser rotineiramente utilizadas para a identificação do *R. equi*, mostradas na **Tabela 1**. O microrganismo mostrou ser bioquimicamente não reativo, não utilizou carboidratos, acetato, citrato e malonato como fontes únicas de carbono e não produziu determinadas enzimas. Entre todas as provas realizadas foi negativo para a produção de amilase, β -galactosidase, casease, DNase, esculinase, gelatinase, H₂S, oxidase, indol e não decompôs hipoxantina, tirosina e xantina. Para as provas de catalase, lipase e decomposição da adenina mostrou positividade em 100%, enquanto que para as demais provas nitrato redutase, urease e hipurato redutase, apresentou comportamento variável. Todos esses isolados produziram o fator *equi*, demonstrado no Teste de CAMP (**Anexo B - Figura 28**).

Concordando com PRESCOTT (1991), este estudo reforça a importância do Teste de CAMP na identificação presuntiva de *R. equi*. Sabe-se que apesar dessa característica fenotípica não ser única para *R. equi*, ela é distintiva para esse microrganismo, devendo sempre ser empregada na identificação presuntiva, desde que nenhum isolado fator *equi* negativo tem sido descrito.

O Teste de CAMP foi descrito em 1944 por CHRISTIE, R.; ATKINS, N. E.; MUNCH-PETERSEN, E. (cujas iniciais originaram o epônimo CAMP). É a lise sinérgica dos eritrócitos de carneiro, que ocorre pela ação da enzima esfingomielinase produzida pelo *Staphylococcus aureus* e o “CAMP factor” (co-hemolisina), uma proteína secretada pelo

Streptococcus agalactiae. Essa reação ocorre com eritrócitos cujas membranas celulares contêm no mínimo 45 mol% de esfingomielina (LITWIN & JOHNSON, 2005). As reações de CAMP ocorrem em duas etapas. Na primeira reação ocorre a hidrólise da esfingomielina e fosfolípídeos da membrana celular, pela ação da esfingomielinase ou fosfolipase (DARLING 1975). Na segunda reação, o fator CAMP interage com a membrana metastável do eritrócito, levando à lise da célula (BERNHEIMER, et al., 1979). Muitas bactérias gram-positivas e gram-negativas são conhecidas por reagir positivamente no Teste de CAMP, incluindo *Listeria* sp (MCKELLAR, 1994; ROCOURT & GRIMONT, 1983), *Rhodococcus equi* (NAVAS et al., 2001), *Pasteurella* sp (FRASER, 1962), *Aeromonas* sp (FIGURA & GUGLIELMETTI, 1987), *Vibrio* sp (KOHLENER, 1988), *Streptococcus agalactiae* (SOEDERMANTO & LÄMMLER, 1996), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (FREY et al., 1994), *Bartonella henselae* (LITWIN & JOHNSON, 2005). Assim como *R. equi*, outras bactérias gram-positivas que contêm ácidos micólicos, como *Mycobacterium* sp, *R. erythropolis* e *R. rhodochrous*, apresentam atividade de colesterol oxidase (MacLACHLAN et al., 2000), indicando a possibilidade de apresentar resultado positivo para o Teste de CAMP. Sendo assim, o Teste de CAMP, a nosso ver, é um fator citolítico importante para a identificação do *R. equi*, uma vez que os 51 isolados foram positivos, entretanto não deve ser utilizado como característica fenotípica única na identificação do *R. equi* uma vez que o teste não é exclusivo desta espécie.

A quimiotaxonomia tem sido muito utilizada para caracterizar actinomicetos, sendo considerada o primeiro passo na identificação desses micro-organismos no estudo da composição da parede celular.

Os ácidos micólicos são constituintes únicos e característicos da parede celular dos microrganismos que pertencem aos gêneros *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Skermania*, *Tsukamurella*, *Williamsia*. Esses

gêneros bacterianos são denominados actinomicetos aeróbios que contêm ácidos micólicos e pertencem à subordem *Corynebacterineae*. Os ácidos micólicos possuem cadeias de tamanho variável, dependendo do número de átomos de carbono presentes e grupos funcionais determinados para cada gênero, podendo chegar a 30% do peso da parede celular (BABA et al., 1997, NISHIUCHI et al., 1999).

A detecção de ácidos micólicos pode ser realizada por cromatografia em camada delgada (MIYAJI, et al., 2002), por cromatografia líquida de alta precisão e cromatografia gasosa (AMAT, 2004). Alguns estudos demonstraram que o meio de cultura utilizado pode influenciar no perfil de ácidos micólicos em micobactérias (WICK et al., 2002) e em nocardioformes (STRATTON et al., 1993, STRATTON et al., 1997, SOKOLOVSKÁ et al., 2003).

Neste trabalho realizou-se a detecção de ácidos micólicos por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando o método preconizado por MIYAJI et al. (2002), que é o mais fácil, de baixo custo e reprodutível, para detectar ácidos micólicos. A revelação se realiza pulverizando a placa com ácido fosfomolibdico e aquecimento a 110° C. Dessa maneira as manchas são vistas azuladas sobre um fundo amarelo. Nesse estudo foram feitas pequenas modificações, onde o revelador utilizado foi rodamina em solução alcoólica a 10%, o que não interferiu na detecção de metil ésteres presentes. Em todos os 51 isolados suspeitos de *R. equi* investigados, foram detectados ácidos micólicos, com manchas de Fr entre 0,4 a 0,5 (Figura 6) concordando com os resultados de Fr obtidos por AMAT (2004) e com a cepa de referência de *R. equi* ATCC 6939.

De acordo com MIYAJI et al., (2002), a análise do ácido micólico divide a Subordem *Corynebacterineae* em três grupos: i- grupo de *Tsukamurella* e *Mycobacterium*, ii- grupo de *Nocardia*, *Gordonia* e *Rhodococcus* e iii- grupo de *Corynebacterium* (Anexo C Figura 36). Neste quesito, os nossos resultados para análise se ácidos micolicos apresentaram

valores compatíveis com o Fr de *R. equi*. Nas cepas de referência os Fr também foram compatíveis com os da literatura (*Gordonia*, *Nocardia* e *Rhodococcus* Fr entre 0,4 e 0,5, *Mycobacterium* e *Tsukamurella* acima de 0,6 e *Corynebacterium* abaixo de 0,2), indicando que a metodologia para análise de ácidos micólicos pela CCD está padronizada no nosso laboratório. Os ácidos micólicos são considerados marcadores quimiotaxonômicos muito importantes e a sua identificação pela CCD torna-se uma ferramenta útil, principalmente na triagem das bactérias que os contêm.

Quanto a identificação molecular, neste estudo empregou-se a técnica de PCR para o diagnóstico rápido do *R. equi* proposta por LADRÓN et al. (2003), que amplifica um fragmento de 959 pares de base do gene *choE*.

Os resultados deste estudo mostraram que as seqüências complementares aos primers COX estiveram presentes em 51 isolados bacterianos suspeitos de *R. equi*, sugerindo que elas são conservadas nessa espécie bacteriana. Em todos os 51 isolados, resultados da PCR foram consistentes com a produção de atividade extracelular da cholesterol oxidase derivada do gene *choE* que foi expressa fenotipicamente pela reação positiva no Teste de CAMP. Além do que, pode-se dizer que o gene *choE* não foi detectado em qualquer um dos 22 isolados bacterianos negativos para o Teste de CAMP. Por outro lado, entre os 57 isolados bacterianos que apresentaram atividade detectável no Teste de CAMP, 5 foram negativos para o gene *choE*, indicando que, provavelmente, estes pertencem a outras espécies de rodococos. Estes dados podem reforçar a validade do método molecular e dos *Primers* COX para identificar *R. equi*, principalmente, quando o Teste de CAMP é positivo. Dessa maneira, a investigação da presença do gene *Cho E* deve ser considerada como um método específico, na identificação rápida do *R. equi* pela PCR.

A análise dos resultados dos ensaios fenotípicos, dos ácidos micólicos e molecular nos 78 isolados bacterianos, nos permite propor um esquema de identificação simplificada

para *R. equi*, que consiste numa primeira etapa da pesquisa de cocobacilos parcialmente álcool-ácido resistentes e determinação do Fr de ácido micólico pela técnica de CCD, seguidos do Teste de CAMP e PCR, empregando os *Primers* COX, que amplificam o gene *choE* (Figura 7).

Para o tratamento das infecções por *R. equi* com antibióticos devem ser realizados testes de sensibilidade para todos os isolados, para evitar o uso daquelas drogas, para as quais os isolados apresentam resistência *in vitro*. Normalmente, *R. equi* é sensível a eritromicina, rifampina, flouroquinolonas, aminoglicosídeos, glicopeptídeos e imipenema. A sensibilidade ao cotrimoxazol, tetraciclina, cloranfenicol, clindamicina e cefalosporinas é variável. Tipicamente, os isolados são resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos, em especial às penicilinas, portanto, seu uso não é recomendado, mesmo para os isolados sensíveis, porque pode ocorrer uma rápida aquisição de resistência (VERVILLE et al, 1994; WEINGARTEN et al., 1988; RASMUSSEN et al, 2000; KEDLAYA et al., 2001).

Neste estudo a avaliação do perfil de susceptibilidade dos isolados de *R. equi* frente aos antimicrobianos foram realizadas comparativamente pelo método de Disco Difusão, considerando os valores dos halos determinados para *Staphylococcus aureus* e pela determinação da CIM empregando o método da diluição em microplaca com adição de resazurina (REMA) como revelador de crescimento bacteriano. Entretanto, o método recomendado para teste de sensibilidade de *Rhodococcus equi* e outros actinomicetos aeróbios é o da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), através da microdiluição em caldo (CLSI/NCCLS, 2003b). O método da microplaca é conveniente, porque os reagentes podem ser preparados no local de trabalho e uma vez preparados, podem ser estocados em freezer ou liofilizados e serem removidos do estoque quando necessário. Entretanto o método é mais trabalhoso que o de Disco Difusão, cujos discos são comercialmente disponíveis.

Neste trabalho foi realizada uma modificação no método da microdiluição, que consistiu na adição de resazurina, sendo então denominado de (Resazurin Microtitre Assay) REMA. A utilização da resazurina para a leitura da multiplicação bacteriana evitou problemas frequentemente encontrados nos testes convencionais de microdiluição em caldo, tais como a sedimentação do inóculo ou crescimento muito escasso ou transparente que ocorrem com algumas espécies de bactérias. Este método tem sido utilizado na determinação do perfil de sensibilidade de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (PALOMINO et al., 2002, MARTIN et al., 2003 e 2007) e de *Staphylococcus aureus* (COBAN et al., 2006).

Pelo método de Disco Difusão foram estudados 28 agentes antimicrobianos, (**Tabela 3**). Os antimicrobianos contidos nos grupos dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), dos glicopeptídeos (teicoplanina e vancomicina) e das tetraciclinas (minociclina) mostraram ser 100% efetivos contra os isolados bacterianos. Enquanto que, outra tetraciclina (doxiciclina) foi efetiva em 49 (96,1% %) isolados, apresentando sensibilidade intermediária e resistência, apenas para 2 isolados bacterianos. Com exceção de eritromicina, cuja atividade foi de 98,04%, devido a 1 isolado bacteriano que mostrou sensibilidade intermediária, outros agentes no grupo dos macrolídeos (azitromicina; claritromicina), foram também 100% ativos.

MCNEIL & BROWN (1992) testaram 16 agentes antimicrobianos com 98 isolados de *R. equi*, oriundos de amostras clínicas humanas, encontraram que 50% dos isolados ou mais mostraram ser resistentes a clindamicina. A resistência às quinolonas foi menos frequente (ciprofloxacina, 18% e norfloxacina, 16%) e a minoria (<5%) apresentou resistência para eritromicina, rifampicina, tetraciclina, sulfametoxazol+trimetoprim e vancomicina. Dois outros estudos de sensibilidade antimicrobiana de *R. equi* isolados de solo e de animais, realizados por BARTON & HUGHES (1984), com 66 isolados e WOOLCOCK & MUTIMER (1980), com 100 isolados, revelaram um alto grau de resistência à sulfonamidas em 58 e 50%, respectivamente. Entretanto, para DECRE et al., (1990) o sulfametoxazol foi

um dos agentes mais ativos para os 5 isolados humanos e 3 isolados de animais. Neste estudo, dos 51 isolados de *R. equi* estudados, 21 (41,2%) foram sensíveis, no método de Disco Difusão para sulfametoxazol+trimetoprima. No entanto, quando analisados separadamente, pela REMA, esses dois agentes não apresentaram atividade, pois o percentual de resistência foi de 86,3% e 100%, respectivamente. Tais diferenças entre os resultados, podem ser explicadas pelo fato de que quando os antimicrobianos são associados ocorre sinergismo, aumentando dessa forma a atividade da droga.

De maneira geral, os agentes antimicrobianos β -lactâmicos não mostraram boa atividade, principalmente aqueles do grupo das penicilinas (ampicilina, penicilina G e oxacilina), aos quais os isolados mostraram sensibilidade, respectivamente em 7,84%, 5,88% e 1,96%. No entanto, amoxicilina+ácido clavulânico, apresentou um resultado bastante elevado na atividade, sendo os isolados sensíveis em 98,04%. O que não ocorreu quando se testou isoladamente a amoxicilina pela REMA, onde apenas 31(60,7%) isolados de *R. equi*. Provavelmente explica-se também o aumento da atividade pela associação da amoxicilina com o ácido clavulânico utilizado no método de Disco Difusão. Além desse agente β -lactâmico, imipenema do grupo das carbapenemas e ceftriaxona, uma cefalosporina de 3ª geração, foram os mais ativos. Com relação a outros agentes β -lactâmicos, foram avaliadas as seguintes cefalosporinas com suas respectivas atividades frente aos isolados bacterianos: 1ª geração (cefalotina = 19,60%, cefazolina = 13,73%); 2ª geração (cefotaxima = 49,02%); 3ª geração (cefotaxima = 23,53%) e 4ª geração (cefepima = 45,10%). MCNEIL & BROWN (1992) encontraram resistência em *R. equi* isolados de humanos em mais de 50%, frente aos antimicrobianos ampicilina, cefalotina, oxacilina e penicilina. Nenhum isolado foi resistente a amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina+sulbactam e imipenema. WOOLCOCK & MUTIMER (1980) reportaram que todos os isolados estudados eram sensíveis ou moderadamente sensíveis à penicilina. Ao contrário, 95,5% dos isolados estudados por

BARTON & HUGHES (1980) eram resistentes à penicilina e 59% dos isolados estudados por MCNEIL & BROWN (1992) eram resistentes à penicilina. Em outro estudo com 13 isolados de *R. equi*, PARQUIN et al. (1990), 5 dos 6 isolados de pacientes humanos tiveram resistência adquirida a β -lactâmicos. Numerosos outros relatos incluíram somente um número limitado de isolados clínicos humanos (CLAVE et al., 1991; DECRE et al., 1990). NORDMANN et al., (1994), analisando *R. equi* isolados de infecção humana, verificaram entre os isolados fenótipos de resistência e de sensibilidade a cefalosporina. Os autores não encontraram plasmídeo com gene estrutural da β -lactamase em nenhuma das bactérias resistentes. Por outro lado verificaram presença de bacteriófagos nas cepas resistente que testados em ratos apresentaram maior virulência e maior capacidade para conduzir a infecção crônica, quando comparado às células sensíveis. Os autores concluíram que nos isolados de humanos, o fenótipo de resistência a β -lactâmicos pode ser mediado por fagos e estar relacionado com a virulência.

Os agentes antimicrobianos do grupo das quinolonas (2ª geração), levofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina apresentaram atividades respectivas de 96,08%, 92,16% e 90,20%. Outros agentes antimicrobianos, aos quais os isolados bacterianos mostraram ser bem sensíveis foram rifampicina (98,04%), cloranfenicol (84,31%) e tetraciclina (78,43%).

NORDMANN et al., (1992b) verificaram em um isolado de *R. equi* de humanos, resistência a rifampicina e quinolonas, em decorrência de monoterapia. Nesse mesmo estudo foram descritos valores de CIM em μ g para aminoglicosídeos (amicacina= 1), para macrolídeo (claritromicina= 0,25) e para glicopeptídeo (vancomicina= 0,12).

TORRES-TORTOSA et al., (2003), estudando *R. equi* isolados de 67 pacientes VIH positivos de 29 hospitais de diferentes regiões da Espanha, verificaram que os agentes antimicrobianos mais efetivos foram vancomicina (100%), amicacina (100%), rifampicina (97,9%), imipenema (97,6%), ciprofloxacina (94%) e eritromicina 91,4%. Neste estudo os

resultados obtidos foram bem próximos aos descritos pelos autores citados, tanto pelo método de Disco Difusão como pela REMA.

Num modelo infecção por *R. equi* em “nude-mouse”, os agentes mais efetivos para monoterapia foram vancomicina, imipenema e rifampina (NORDMANN et al., 1992a). Com respeito à sobrevivência intra-histocítica do *R. equi*, a importância da atividade intracelular do antibiótico não é clara. Alguns autores utilizaram combinações antimicrobianas contendo um agente com atividade intracelular. Outros dizem que a atividade bactericida é mais importante, especialmente durante a fase inicial do tratamento, quando os microrganismos extracelulares e intracelulares são numerosos (ROUQUET et al., 1991).

Comparando os resultados apresentados na tabela 6, é possível verificar que entre as cefalosporinas testadas, o método de Disco Difusão foi inferior ao de REMA (para cefotaxima, os isolados mostraram ser sensíveis em 45,1% e 82,4%, respectivamente). Por outro lado, para a ceftriaxona não foi verificada diferença significativa nas duas metodologias (sensibilidade de 82,4% e 84,3% respectivamente). Na tabela 7 estão discriminados os resultados encontrados com 42 isolados de *R. equi* sensíveis a cefotaxima pela REMA. Quando feita a comparação com os dois métodos utilizados, verifica-se que 21 isolados foram concordantes entre REMA e Disco Difusão, onde o menor halo de inibição apresentado foi de 23 mm. Doze isolados discordaram, sendo sensíveis pela REMA e intermediários pelo Disco Difusão, com halos entre 17 e 22 mm. Nove isolados foram discordantes, sendo sensíveis pela REMA e resistentes pelo Disco Difusão, apresentando nenhum halo de inibição. Entre 9 isolados intermediários pela REMA, 5 isolados foram concordantes com a Disco Difusão, apresentando halos inibitórios entre 18 e 22 mm. Quatro isolados foram discordantes, sendo 2 resistentes pela REMA, apresentando nenhum halo e 2 apresentaram halos inibitórios de 25 e 33 mm, sendo sensíveis pela Disco Difusão. A diferença mostrada para cefotaxima pode estar relacionada ao tamanho do halo considerado para *S. aureus*, já que seu valor para *R. equi*

não é padronizado. Os resultados encontrados neste estudo sugerem que devem ser considerados valores menores para os halos inibitórios da cefotaxima (entre 17 e 22 mm). Um número maior de isolados de *R. equi* deve ser investigado para confirmação desta proposição. Por outro lado, outros 9 isolados também discordantes foram sensíveis pela REMA, no entanto foram resistentes pelo Disco Difusão apresentando nenhum halo inibitório. Tais diferenças podem representar fatores relacionados com erros na metodologia como, problemas com os discos de antibiótico utilizados, diferenças nas populações de isolados testados, variabilidade nas metodologias utilizadas ou ambos.

Na tabela 8 estão discriminados os resultados encontrados com 43 isolados de *R. equi* sensíveis a ceftriaxona pela REMA. Comparando os dois métodos utilizados, verifica-se que houve concordância com 39 isolados entre REMA e Disco Difusão, onde o menor halo de inibição apresentado foi de 21mm. Quatro isolados discordaram, sendo sensíveis pela REMA, 2 intermediários com halos entre 16 e 20 mm e 2 isolados resistentes, com nenhum halo inibitório pela Disco Difusão. Quatro isolados foram discordantes com 3 intermediários pela REMA e sensíveis pelo Disco Difusão, apresentando halos de inibição entre 21 a 48 mm. Um isolado intermediário pela REMA foi concordante com o Disco Difusão, apresentando halo entre 16 a 20 mm. Quatro isolados Intermediários pela REMA foram disconcordantes com o Disco Difusão, onde 3 isolados foram sensíveis apresentando halos inibitórios entre 21 a 48 mm e 1 resistente com nenhum halo inibitório.

Para os agentes β -lactâmicos, amoxicilina (sensibilidade de 96,1% e 60,8%) e imipenema (sensibilidade de 98,1% e 80,4%) o método que apresentou melhores resultados foi Disco Difusão, lembrando que amoxicilina nesse método estava adicionada de ácido clavulânico. Neste trabalho é preciso destacar que ambos os métodos apresentaram resultados iguais com 100% de sensibilidade para gentamicina, claritromicina e vancomicina, o que sugere a proposição de que os valores estabelecidos para os halos inibitórios de *S. aureus*,

podem ser considerados determinantes da sensibilidade ou resistência do *R. equi*. Para outros agentes antimicrobianos, resultados bem próximos foram observados para ciprofloxacina (92,2% e 94,1%) e rifampicina (98,1% e 100%) e amicacina (100% e 92,2%), respectivamente para Disco Difusão e REMA. Com relação às tetraciclinas doxiciclina (sensibilidade de 96,1% e 84,3%) e minociclina (sensibilidade de 100% e 52,9%), nota-se moderada diferença para a doxiciclina, e diferença de cerca de 50% para a minociclina. Mais uma vez aqui, pode-se atribuir tal fato aos problemas com a falta de padronização de halos para *R. equi* no método de Disco Difusão. Por outro lado foi verificada grande diferença com o sulfametoxazol (43,1% de isolados sensíveis e 56,9% de resistentes no método de Disco Difusão e nenhum isolado com sensibilidade na técnica da REMA). Entretanto no método do Disco Difusão, o sulfametoxazol estava acrescido da trimetoprima e na técnica do REMA ambas as drogas foram testadas separadamente. Uma provável ação sinérgica do sulfometoxazol com trimetropina justifica o resultado diferente encontrado neste trabalho, reforçando a necessidade do uso combinado destas duas drogas no tratamento da rodococose.

A comparação de resultados do método de Disco Difusão e da técnica da REMA indicam que o primeiro pode ser utilizado para gentamicina, claritromicina, vancomicina, ciprofloxacina, rifampicina, amicacina e doxiciclina. Para os outros agentes antibacterianos encontrados neste estudo devido a ausência de pontos de corte definidos para *R. equi*, (CLSI/NCCLS, 2005), os resultados indicam a necessidade de se utilizar a técnica da microdiluição. Entretanto, o método mais prático para qualquer laboratório de microbiologia clínica é o de Disco Difusão, neste sentido a nossa sugestão é de que se adeque para os agentes antibacterianos que apresentaram diferenças nos dois métodos, um outro ponto de corte diferente da do *Staphylococcus aureus*, e que seja específico para *R. equi*, baseando nos resultados do método da REMA. Os resultados ainda indicaram que a técnica da REMA utilizada na determinação do perfil de sensibilidade/resistência do *M. tuberculosis* é

perfeitamente viável para analisar isolados de *R. equi*.

Estudos adicionais considerando definição de pontos de corte para categorias interpretativas são necessários na ordem de avançar nossos conhecimentos da atividade dos agentes antimicrobianos contra isolados de *R. equi*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sendo o *R. equi* reconhecidamente, patogênico para o homem e ter emergido como uma importante causa de morbidade e mortalidade entre pacientes imunocomprometidos, em especial naqueles infectados com o VIH, quanto mais consciência houver sobre as infecções por esse agente, melhor será a probabilidade de um diagnóstico adequado e rápido. São necessárias pesquisas clínicas e laboratoriais, para melhor definição das vias pelas quais o microrganismo é adquirido e por quais mecanismos de patogênese ocorrem as infecções, para a instituição de tratamento apropriado.

Sabe-se que *R. equi* é causa mais freqüente de infecções pulmonares cavitárias em pacientes imunocomprometidos, porém, doenças extra-pulmonares e infecções em pacientes imunocompetentes também têm ocorrido. Os sintomas clínicos podem ser insidiosos e lembrar aqueles de infecções por micobactérias, fungos e outros actinomicetos.

R. equi deve ser sempre suspeito quando culturas, principalmente, aquelas para investigação de tuberculose, apresentarem colônias com distinta pigmentação e nas observações microscópicas das mesmas sob coloração de Gram, são encontrados cocobacilos gram-positivos pleomórficos. A suspeita tem que ser reforçada com a realização da microscopia de esfregaços de cultura, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, modificado por Kinyoun e o microrganismo apresentar acidorresistência parcial.

A identificação presuntiva muitas vezes basta para o tratamento empírico, com agentes antimicrobianos, isto pode melhorar marcadamente, em especial, o curso e tratamento de pacientes infectados, assim como encurtar as estadias hospitalares dos mesmos.

A maior parte do conhecimento sobre infecções por *R. equi* provem de estudos em potros, o que pode se aplicar a infecções em humanos. A grande incidência e a prevalência da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida, os alcoólatras crônicos e o aumento do número de transplantados com necessidade de imunossupressão prolongada vêm tornando a doença cada vez mais freqüente e relevante na clínica pneumológica. Os dados existentes hoje a respeito da prevalência e incidência da doença, mostram-se, com certeza, equivocados. Acredita-se que a doença seja bastante subnotificada e confundida com outras patologias granulomatosas.

Sendo o *R. equi* um microrganismo parcialmente acidorresistente, que induz a um quadro clínico semelhante ao da tuberculose, o diagnóstico diferencial merece especial importância, principalmente em países subdesenvolvidos como o Brasil, em que a prevalência de tuberculose é alta.

Em muitas ocasiões a identificação do bacilo de Koch nos procedimentos rotineiros dos laboratórios clínicos, pode ser falha, e se o médico iniciar o tratamento empírico da tuberculose, um paciente com infecção por rodococos poderá ficar sem tratamento. Por esse lado, esse estudo estaria alertando os profissionais da área de saúde humana sobre a importância de isolar e identificar, mesmo que presuntivamente, o *Rhodococcus equi*. Esses achados seriam em especial, importantes para pacientes imunocomprometidos, apresentando lesões infecciosas cavitárias, para que se institua o tratamento específico para rodococose.

6. CONCLUSÕES

- O Teste de CAMP é a prova fenotípica principal, que deve ser considerada na identificação presuntiva do *R. equi*.
- As provas bioquímicas utilizadas neste estudo podem ser consideradas testes completos na identificação fenotípica de *R. equi*.
- A avaliação dos ácidos micólicos pela CCD é uma ferramenta promissora na classificação dos actinomicetos aeróbio que contém ácido micólico e a determinação do Fr propicia a formação de três grupos constituídos por gêneros diferentes.
- A técnica da PCR, além de ser mais rápida, oferece uma alternativa mais confiável, por sua maior especificidade, que os sistemas convencionais permitindo identificar os isolados suspeitos de *R. equi* implicados nas infecções humanas o que resulta no ganho de tempo no tratamento do paciente. A investigação da presença do gene *choE* deve ser considerada como um método específico, na identificação de *R. equi*.
- O método do REMA é perfeitamente adequado para a o ensaio da microtécnica, na determinação do perfil de sensibilidade/resistência do *R. equi* a antimicrobianos.
- Para alguns agentes antibacterianos a técnica de Disco Difusão pode ser utilizada empregando pontos de corte definidos para *Staphylococcus* sp, entretanto para outros antimicrobianos sugere-se a utilização de diferentes valores de halo de inibição específicos para *R. equi*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAT, G. C. **Detección y caracterización por métodos fenotípicos y moleculares de mycolata formadores de espumas en estaciones depuradoras de aguas residuales domésticas con sistemas de fangos activos.** 2004. f. 281. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Biotecnología. Valencia, Julio de 2004.

ARRIAGA, J. M.; COHEN, N. D.; DERR, J. N.; CHAFFIN, M. K.; MARTENS, R. J. Detection of *Rhodococcus equi* by polymerase chain reaction using species-specific nonproprietary primers. **J. Vet. Diagn. Investig.**, v. 14, p. 347-353, 2002.

ASOH, N.; WATANABE, H.; FINES-GUYON, M.; WATANABE, K.; OISHI, K.; KOSITSAKULCHAI, W.; SANCHAI, T.; KUNSUIKMENGRAL, K.; KAHINTAPONG, S.; KHANTAWA, B.; THARAVICHITKUL, P.; SIRISANTHANA, T.; NAGATAKE, T. Emergence of Rifampin-Resistant *Rhodococcus equi* with Several Types of Mutations in the *rpoB* Gene among AIDS Patients in Northern Thailand. **J. Clin. Microbiology**, v. 41. n. 6. p. 2337–2340, 2003.

BABA, T.; NISHIUCHI, Y.; YANO, I. Composition of mycolic acid molecular species as a criterion in nocardia classification. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, p. 795-801, 1997.

BALLOWS A. J.; HAUSLER, W. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology.** 5th ed. Washington, D.C.: ASM Press, 1991. 1593 p.

BARTON, M. D.; HUGHES, K. L. *Corynebacterium equi*: a review. **Vet. Bull.** (London), v. 50, p. 65-80, 1980.

BARTON, M. D., HUGHES, K. L. Ecology of *Rhodococcus equi*. **Vet. Microbiol.** y, v. 9, p. 65-76, 1984.

BELL, K. S.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; Aw. D. W. Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p.72-74, 1996.

BELL, K. S.; KUYUKINA, M. S.; HEIDBRINK, S.; PHILP, J. C.; AW, D. W. J.; IVSHINA, I. B.; CHRISTOFI, N. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR. **J. Appl. Microbiol.**, v. 87, p. 472-480, 1999.

BERNHEIMER, A. W.; LINDER, R.; AVIGAD, S. Nature and mechanism of action of the CAMP protein of group B streptococci. **Infect. Immun.**, v. 23, p. 838-844, 1979.

BILLE, J.; DOYLE, M. P. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: BALOWS, A.; HAUSLER JR, W. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 5th ed. Washington, D.C: ASM Press, 1991. p. 287-295.

BIZET, C.; BARREAU, C.; HARMANT, C.; NOWAKOWSKI, M.; PIETFROID, A. Identification of *Rhodococcus*, *Gordona* and *Dietzia* species using carbon source utilization tests ("biotype-100" strips). **Res. Microbiol.**, v.148, p.799-809, 1997.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Deteção e Identificação de Micobactérias de Importância Médica**. Brasília, D. F., 2000. p. 1-27.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual técnico para o controle da tuberculose: cadernos de atenção básica**. 6. ed. Brasília, 2002.

BROUGHTON, R. A.; WILSON, H. D.; GOODMAN, N. L.; HEDRICK, J. A. Septic arthritis and osteomyelitis caused by an organism of the genus *Rhodococcus*. **J. Clin. Microbiol.** v.13, p. 209-213, 1981.

BROWN, J. M.; McNEIL, M. M.; DESMOND, E. P. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordona*, *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other actinomycetes of medical importance. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed). **Manual of Clinical microbiology**. 7th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1999. p. 370-398.

BUTLER, W. R.; FLOYD, M. M.; BROWN, J.; TONEY, S. R.; DANESHVAR, M.; COOKSEY, R. S.; CARR, J.; STEIGERWALT, A.; CHARLES, N. Novel mycolic acid-containing bacteria in the family *Segniliparaceae* fam. nov., including the genus *Segniliparus* gen. nov., with descriptions of *Segniliparus rotundus* sp. nov. and *Segniliparus rugosus* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 55, p. 1615–1624, 2005.

CAPDEVILA, J. A.; BUJÁN, S.; GAVALDA, J.; FERRER, A.; PAHISSA, A. *Rhodococcus equi* pneumonia in patients infected with human immunodeficiency virus. Report of 2 cases and review of the literature. **Scand. J. Infect. Dis.**, v. 29, n. 6, p. 535-541, 1997.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee For Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard. 8th Edition. CLSI/NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003a.

Clinical and Laboratory Standard Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes**; Approved Standard. NCCLS document M24-A, v. 23, n. 18. (ISBN 1-56238-500-3). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003b.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee For Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S15 [ISBN 1-56238-556-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

COBAN, A. Y.; BOZDOGAN, B.; CIHAN, C. C.; CETINKAYA, E.; BILGIN, K. Two New Colorimetric Methods for Early Detection of Vancomycin and Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 580-582, 2006.

DARLING, C. L. Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. **J. Clin. Microbiol.** v.1, p. 171–174, 1975.

DECRE, D.; BURE, A.; PANGON, A.; PHILIPPON, A. ; BERGOGNE-BEREZIN, E. In vitro susceptibility of *Rhodococcus equi* to 27 antibiotics. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 28, p. 311-312, 1991.

DÍAZ-CORRALES, F. J.; SERRANO, J. A. *Rhodococcus equi* en humanos. Aspectos clínicos y terapéuticos. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, v. 23 n.2. p. 1315-2556, 2003.

EGAWA, T.; HARA, H.; KAWASE, I. MASUNO, T.; ASARI, S.; SAKURAI, M.; KISHIMOTO, S. Human pulmonary infection with *Corynebacterium equi*. **Eur. Respir. J.** v. 3, p. 240-242, 1990.

FIGURA, N.; GUGLIELMETTI, P. Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a CAMP-like factor. **J. Clin. Microbiol.** v. 25, p. 1341–1342, 1987.

FISS, E.; BROOKS, G. F. Use of a Siderophore Detection Medium, Ethylene Glycol Degradation, and 3-Galactosidase Activity in the Early Presumptive Differentiation of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, and Rapidly Growing *Mycobacterium* Species **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 7, p. 1533-1535, 1991.

FLORES, M.; FORD, E. G.; JANDA, J. M. Value of the O-Nitrophenyl-p-D-Galactopyranoside Test To Differentiate among the Aerobic Actinomycetes. **J. Clin. Microbiol.**, v. 28, n. 9, p. 2142-2144, 1990.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK, P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 42, p. 166-170, 1992.

FRASER, G. The hemolysis of animal erythrocytes by *Pasteurella haemolytica* produced in conjunction with certain staphylococcal toxins. **Res. Vet. Sci.** v. 3, p. 104–110, 1962.

FREY, J.; KUHN, R.; NICOLET, J. Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 124, p. 245–251, 1994.

GOUVEIA, A. C. C. **Avaliação da reação em cadeia da polimerase para identificação do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em cultura de escarro no meio BACTEC 12B.** 2006. f. 94. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas). Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 2006.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B. C.; SEVIOUR, R. Can whole genome analysis refine the taxonomy of the genus *Rhodococcus*? **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 28. 377-403, 2004.

HARVEY, R. L.; SUNSTRUM, J. C. *Rhodococcus equi* infection in patients with and without human immunodeficiency virus infection. **Rev. Infect. Dis.**, v. 13, p.139-145, 1991.

KEDLAYA, I.; ING, M. B.; WONG, S. S. *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 39-46, 2001.

KEDLAYA, I. *Rhodococcus equi*, 2008. Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/235466> - Updated: Sep 12, 2008. Acesso em: 12/03/2009.

KIRSCHNER, P.; BOTTGER, E. Microheterogeneity within RNA of *Mycobacterium gordonae*. **J. Clin. Microbiol.** v. 30, p. 1049–1050, 1992.

KOHLER, W. CAMP-like phenomena of vibrios. **Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. Ser.** v. 270, p. 35–40, 1988.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL JR., V. R.; SOMMERS, H. M. Introdução à microbiologia médica. In.: Diagnóstico Microbiológico: texto e Atlas colorido. 2 ed. São Paulo: **Panamericana**, 1993. p.1 - 60.

KWON, K. Y.; COLBY, T. V. *Rhodococcus equi* pneumonia and pulmonary malakoplakia in acquired immunodeficiency syndrome: pathologic features. **Arch. Pathol. Lab. Méd.**, v. 118, p. 744-748, 1994.

LADRÓN, N.; FERNÁNDEZ, M.; AGÜERO, J.; ZÖRN, B. G.; VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; NAVAS, J. Rapid identification of *Rhodococcus equi* by a PCR assay targeting the *choE* gene. **J. Clin. Microbiol.**, v. 41, n. 7, p. 3241-3245, 2003.

LAMBERT, C.; GANSLER, T. Pulmonary malakoplakia diagnosed by fine needle aspiration. **Acta Cytol.**, v. 41, p. 1833-1838, 1997.

LASKY, J. A.; PULKINGHAM, N.; POWERS, M. A.; DURACK, D. T. *Rhodococcus equi* causing human pulmonary infection: review of 29 cases. **South Med. J.**, v. 84, p.121-127, 1991.

LEITE, C. Q. F.; BARRETO, A. M. W.; LEITE, S. R. A. Thin-layer chromatography of mycobactins and mycolic acids for the identification of clinical mycobacteria. **Rev. Microbiol.**, v. 26, p. 192-199, 1995.

LEITE, C. Q. F.; DE SOUZA, C. W. O.; LEITE, S. R. A. Identification of Mycobacteria by Thin-Layer Chromatographic Analysis of Mycolic Acids and Conventional Biochemical Method: Four Years of Experience. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 6, p. 801-805, 1998.

LEITE, C. Q. F.; ROCHA, A. S.; LEITE, S. R. A.; FERREIRA, R. M. C.; SUFFYS, P. N.; FONSECA, L. S.; SAAD, M. H. F. A comparison of mycolic acids analysis by Thin-Layer Chromatography and molecular methods for nontuberculous mycobacteria identification. **Microbiol. Immunol.**, Japan, v. 49, 7, p. 571-578, 2005.

LÉVY-FRÉBAULT, V.; PANZON, B.; BURÉ A, KATLAMA C, MARCHE C. *Mycobacterium simiae* and *Mycobacterium avium-M. intracellulare* mixed infection in acquired immune deficiency syndrome. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 154-157, 1987.

LINARES, M. J.; LOPEZ-ENCUENTRA, A.; PEREA, S. Chronic pneumonia caused by *Rhodococcus equi* in a patient without impaired immunity. **Eur. Respir. J.**, v. 10, p.248-250, 1997.

LINDER R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: two “coryneform” bacteria increasingly recognized as agents of human infection. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 3, p. 145-53, 1997.

LITWIN, C. M.; JOHNSON, J. M. Identification, Cloning, and Expression of the CAMP-Like Factor Autotransporter Gene (*cfa*) of *Bartonella henselae*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 7, p. 4205–4213, 2005.

Mac LACHLAN, J.; WOTHERSPOON, A. T.; ANSELL, R. O.; BROOKS, C. J. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.72, p. 169–195, 2000.

MARTIN, T.; HOGAN, D. J.; MURPHY, F.; NATYSHAK, I.; EWAN, E. P. *Rhodococcus* infection of the skin with lymphadenitis in a non-immunocompromised girl. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 24, p. 328-332, 1991.

MARTIN, A.; CAMACHO, M.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Resazurin Microtiter Assay Plate Testing of *Mycobacterium tuberculosis* Susceptibilities to Second-Line Drugs: Rapid, Simple, and Inexpensive Method. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 47, n. 11, p. 3616-3619, 2003.

MARTIN, A.; PORTAELS, F.; PALOMINO, J. C. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 59, p. 175-183, 2007.

McFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** Baltimore: William & Wilkins, 2000.

McKELLAR, R. C. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 60, p. 4219–4225, 1994.

McMINN, E. J.; ALDERSON, G.; DODSON, H. I.; GOODFELLOW, M.; WARD, A. C. Genomic and phenomic differentiation of *Rhodococcus equi* and related strains. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, v. 78, p. 331–340, 2000.

McNEIL, M. M.; BROWN, J. M. Distribution and antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi* from clinical specimens. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 8, p. 437-443, 1992.

McNEIL, M. M.; BROWN, J. M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 7, p.357-417, 1994.

MIYAJI, M.; YAMAMOTO, K.; MORETTI-BRANCHINI, M. L.; SCHREIBER, A. Z.; AOKI, F. H.; NISHIMURA, K.; TAGUCHI, H.; YAMANAKA, A. **Fungos patogênicos – Guia prático de laboratório**. In.:-----, Capítulo 8. Actinomicetos. Análise do ácido micólico em actinomicetos. v. 1, p. 65, 2002.

MÜLLER, F.; SCHAAL, K. P.; GRAEVENITZ, A.; MOOS, L.; WOOLCOCK, J. B.; WÜST, J.; YASSIN, A. F. Characterization of *Rhodococcus equi* like bacterium isolated from a wound infection in noncompromised host. **J. Clin. Microbiol.** v. 26, p. 618-620, 1988.

MUNTANER, L.; LEYES, M.; PAYERAS, A.; HERRERA M.; GUTIERREZ A. Radiological features of *Rhodococcus equi* pneumonia in AIDS. **Eur. J. Radiol.**, v. 24, p. 66-70, 1997.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. **Manual of clinical microbiology**, 6th ed., Washington, DC.: 1995. ASM. cap. 30, p.379-399.

NASH, P.; KRENZ, M. M. CULTURE MEDIA. In.: BALOWS, A.; HAUSLER JR, W. J.; HERRMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHADOMY, H. J. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington, D. C.: A. S. M. Press, 1991. p. 1226-1288.

NAVAS, J.; GONZALEZ-ZORN, B.; LADRON, N.; GARRIDO, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. Identification and mutagenesis by allelic exchange of *choE*, encoding a cholesterol oxidase from the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **J. Bacteriol.**, v. 183, p. 4796–4805, 2001.

NISHIUCHI, Y.; BABA, T.; HOTTA, H. H.; YANO, I. Mycolic acid analysis in *Nocardia* species. The mycolic acid composition of *Nocardia asteroides*, *N. farcinica* and *N. nova*. **J. Microb. Methods**, v. 37, p. 111-122, 1999.

NORDMANN, P.; RONCO, E. *In vitro* antimicrobial susceptibility of *Rhodococcus equi*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 29, p. 383-393, 1992a.

NORDMANN, P.; KERESTEDJIAN, J. J.; RONCO, E. Therapy of *Rhodococcus equi* disseminated infections in nude mice. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 36, p.1244-1248, 1992b.

NORDMANN, P.; KELLER, M.; ESPINASSE, F.; RONCO, E. Correlation between antibiotic resistance, phage-like particle presence and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 377-383, 1994.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. agents chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PARQUIN, F.; MATHERON, S.; PETTIPRETZ, P.; PENAUD, D.; PIALOUX, G.; CAUMES, E. *Rhodococcus equi* pneumonia in AIDS: a therapeutic challenge. **Antimicrob. Agents Chemother.** abstr. 1119, p. 272, 1990.

PASTEUR **manual of microbiology and immunology**, 3^aed. Urea-indol (combined media).p. 32-33, 1991.

PATEL, R.; PIPER, K. E.; ROUSE, M. S.; STECKELBERG, J. M.; UHL, J. R.; KOHNER, P.; HOPKINS, M. K.; COCKERILL, F. R.; KLINE, B. C. Determination of 16S rRNA sequences of enterococci and application to species identification of nonmotile *Enterococcus gallinarum* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p. 3399-3407, 1998.

PRESCOTT, J. F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 4, p. 20-34, 1991.

PRIEST, F. G., GOODFELLOW, M., TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **J. Gen. Microbiol.**, v.134, p.1847-82, 1988.

RASMUSSEN, T. T.; KIRKEBY, L. P.; POULSEN, K.; REINHOLDT, J.; KILIAN, M. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. **APMIS.**, v. 108, p. 663-675, 2000.

RIBEIRO, M. G.; PAES, A.C.; LISTONI, F.J.P. Minimal inhibitory concentration of azithromycin in *Rhodococcus equi* strains isolated from foals **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 58, n.6, p.1244-1246, 2006.

RIBEIRO, M. G.; SALERNO, T.; BATISTA, G. H.; SIQUEIRA, L. A. K.; FERNANDES, M. C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicações na epidemiologia e controle da rodococose nos animais e no homem. **Vet. e Zootec.**, v.14, n.2, p. 147-163, 2007.

ROCOURT, J.; GRIMONT, P. A. D. *Listeria welshimeri* sp. nov. And *Listeria seeligeri* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 33:866–869, 1983.

ROUQUET, R. M.; CLOVE, D.; MASSIP, P.; MOATTI, N.; LEOPHONTE, P. Imipenem/vancomycin for *Rhodococcus equi* pulmonary infection in an HIV-positive patient [letter]. **Lancet**, v.337, p. 37-45, 1991.

SCOTT, M. A.; GRAHAM, B. S.; VERRALL, R.; IXON, R.; SCHAFFNER, W.; THAM, K. T. *Rhodococcus equi*: an increasingly reconized opportunistic pathogen. Report of 12 cases and review of 65 cases in the literature. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 103, p. 649-655, 1995.

SELLON, D. C.; WALKER, K.; SUYEMOTO, M.; ALTIER, C. Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids. **Am. J. Vet. Res.**, v. 58 p. 1232-1237, 1997.

SEVERO, L.C.; RITTER, P.; PETRILLO, V. F.; DIAS, C. A. G.; PORTO, N. S. Infecção pulmonar por *Rhodococcus equi*: relato dos dois primeiros casos brasileiros. **J. Pneumol.**, v. 27, n.3, p.158-162, 2001.

SODDELL, J. A.; STAINSBY, F. M.; EALES, K.L; KROPPESTEDT, R. M.; SEVIOUR, R.; J.; GOODFELLOW, M. *Millisia brevis* gen. nov., sp. nov., an actinomycete isolated from activated sludge foam. **Intern. J. System. Evolut. Microbiol.**, v. 56. p. 739–744, 2006.

SOEDERMANTO, I.; LÄMMLER, C. Comparative studies on streptococci of serological group G isolated from various origins. **Zentbl. Vetmed. Reihe B.** v. 43, p. 513–523, 1996.

SOKOLOVSKÁ, I.; ROZENBERG, R.; RIEZ, C.; ROUXHET, P. G.; AGATHOS, S. N.; WATTIAU, P. Carbon source-induced modifications in the mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis* E1. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 7019-7027, 2003.

SPARK, R. P.; MCNEIL, M. M.; BROWN, J. M.; LASKER, B. A.; MONTANO, M. A.; GARFIELD, M. D. *Rhodococcus* species fatal infection in an immunocompetent host. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 117, p. 515-520, 1993.

STRATTON, H. M.; SEVIOUR, R. J.; SODDELL, J. A. Effect of culture conditions on cell surface hydrophobicity of nocardioforms. **Actinomycetes.**, v. 4, p. 41-46, 1993.

STRATTON, H.; SEVIOUR, R.; BROOKS, P. “Activated sludge foaming: what causes hydrophobicity and can it be manipulated to control foaming?” . **Water Sci. Technol.**, v. 37, n. 4, p. 503-509, 1998.

SWENSON, J. M.; HINDLER, J. A.; PETERSON, L. R. Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (Ed). **Manual of clinical microbiology**. 7th ed. Washington, D. C.: ASM Press, 1999. p. 1563-1577.

TAKAI, S.; MORISHITA, T.; NISHIO, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HIGUCHI, T.; HAGIWARA, S.; SENBA, H.; KATO, M.; SENO, N.; ANZAI, T. KAMADA, M. Evaluation of a monoclonal antibody-based colony blot test for rapid identification of virulent *Rhodococcus equi*. **J. Vet. Med. Sci.**, n.56, p. 681-684, 1994.

TAKAI, S.; IKEDA, T.; SASAKI, Y.; WATANABE, Y.; OZAWA, T.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding for 15- to 17-kilodalton antigens. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p. 1624-1627, 1995a.

TAKAI, S. Y.; IMAI, Y.; FUKUNAGA, N.; UCHIDA, Y.; KAMISAWA, K.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with AIDS. **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 1306-1311, 1995b.

TAKAI, S.; HINES, S. A.; SEKIZAKI, T.; NICHOLSON, V. M.; ALPERIN, D. A.; OSAKI, M.; TAKAMATSU, D.; NAKAMURA, M.; SUZUKI, K.; OGINO, N.; KAKUDA, T.; DAN, H.; PRESCOTT, J. F. DNA sequence and comparison of virulence plasmids from *Rhodococcus equi* ATCC 33701 and 103. **Infect. Immun.**, v. 68, p. 6840-6847, 2000.

TAYLOR, T. B.; PATTERSON, C.; HALE, Y.; SAFRANEK, W. W. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 79–85, 1997.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.175-178, 1993.

TORRES-TORTOSA, M.; ARRIZABALAGA, J.; VILLANUEVA, J. L.; GÁLVEZ, J.; LEYES, M.; VALENCIA, M. E.; FLORES, J.; PEÑA, J. M.; PÉREZ-CECILIA, E.; QUEREDA, C. Prognosis and clinical evaluation of infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients. A multicenter study of 67 Cases. **CHEST**, v. 123, p. 1970–1976, 2003.

TSITKO, I. **Characterization of actinobacteria degrading and tolerating organic pollutants.** 2007. f. Academic Dissertation in Microbiology. Faculty of Agriculture and Forestry. University of Helsinki, Helsinki, 2007.

VAN SOOLINGEN, D.; HERMANS, P. W. M.; DE HAAS, P. E. W.; SOLL, D. D R.; VAN EMBDEN, J. D. A. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J. Clin. Microbiology.**, v. 29, n.11, p. 2578-2586,1991.

VERVILLE, T. D.; HUYCKE, M. M.; GREENFIELD, R. A.; FINE, D. P.; KUHL, T. L.; SLATER, L. N. *Rhodococcus equi* infections of humans: 12 cases and a review of the literature. **Medicine**, v. 73, p. 119-132, 1994.

VIANA, L. R. **Identificação fenotípica e molecular de *Rhodococcus equi* e *Dietzia maris* em bubalinos. 2007. F. 68.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, R. S., 2007.

WEINGARTEN, J. S.; HUANG, D. Y.; JACKMAN, J. D. *Rhodococcus equi* pneumonia: an unusual early manifestation of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Chest**, v. 94, p. 195-196. 1988.

WEINSTOCK, D. M.; BROWN, A. E.; *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. **Clin. Infect. Dis.**, v. 34, p. 1379-1385, 2002.

WICK, L. Y.; WATTIAU, P.; HARMS, H. Influence of the growth substrate on the mycolic acid profiles of mycobacteria. **Environ. Microbiol.**, v. 4, p. 612-616, 2002.

WOOLCOCK, J. B.; MUTIMER, M. D. *Corynebacterium equi* in vitro susceptibility to twenty-six antimicrobial agents. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 18, p. 976-977, 1980.

8. PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

8.1. Resumos apresentados em eventos científicos

Participação em reuniões científicas com apresentação de trabalhos relacionados com o projeto de doutorado.

SIVA, P.; SATO, D. N.; MEDEIROS, M. I. C.; SILVA, J. O.; CARNEIRO, A. M. M.; LEITE, C. Q. F. Caracterização de *Rhodococcus equi* isolado de escarro e sua resistência a antimicrobianos. *In: Anais do I Simpósio de Interação Parasito – Hospedeiro Modelos de Estudos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP (Fcfar-Unesp), 29 a 31 de maio de 2007.*

SILVA, P.; SATO, D. N.; MEDEIROS, M. I. C.; SILVA, J. O.; CARNEIRO, A. M. M.; MARTINS, M. A.; MIKAMI, Y.; LEITE, C. Q. F. Rapid presumptive identification of *rhodococcus equi* isolated from sputum of patients with suspect of pulmonary tuberculosis. *In: Anais do 6^o International Congress Pharmaceutical Sciences (CIFARP – 2007). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 02 a 05 de setembro De 2007.*

SILVA, P.; CARNEIRO, A. A. M.; PEREIRA, A. M. S.; SATO, D. N.; SILVA, J. O.; MEDEIROS, M. I. C.; MIKAMI, Y.; LEITE, C. Q. F. Método da microdiluição com resazurina na detecção de resistência dos isolados clínicos de *Rhodococcus equi* aos diferentes antibióticos. *In: Rev. Bras. C. Farm./Braz. J. Pharm. Sc., vol. 43, supl. 1, 2007 (159), pg 82 - ISSN 1516-9332. XV Congresso Paulista De Farmacêuticos / Vii Seminário International De Farmacêuticos Expofar 2007. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo – USP, 20 a 23 de outubro de 2007.*

SILVA, P.; SANTOS, A. C. B.; SATO, D. N.; SILVA, J. O.; MEDEIROS, M. I. C.; CARNEIRO, A. M. M.; LEITE, C. Q. F. Identification of *rhodococcus equi* by camp-like reaction, and pcr assay targeting the choe gene. *In: Anais do SINPOSPq 3rd International Symposium Of Post Graduation And Research. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, 30 e 31 de outubro de 2008.*

8.2. Artigo submetido para publicação (Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz).***Rhodococcus equi* ISOLATION FROM SPUTA OF PATIENTS SUSPECTED WITH TUBERCULOSIS****Paulo da Silva^{1,2}; Marcelo Miyata¹; Daisy Nakamura Sato²; Adolfo Carlos Barreto Santos¹; Natália Helena Mendes¹; Clarice Queico Fujimura Leite^{1*}**

- 1- São Paulo State University - UNESP - School of Pharmaceutical Sciences - Araraquara - SP
- 2- Adolfo Lutz Institute - Laboratory of Ribeirão Preto - SP

*Correspondent author: leitecqf@fcar.unesp.br

SUMMARY

Rhodococcus equi has emerged as an oportunic pathogen associated with pulmonary, invasive or systemic infections in immunocompromised patients. We reported the isolation of 51 *Rhodococcus equi* clinical isolates from sputum samples of 546 pulmonary tuberculosis suspects attended in Health Hospitals Units of Ribeirão Preto city and analyzed at Adolfo Lutz Institute, Laboratory of Mycobacteriology. The epidemiology of this infection as well as the phenotypical identification and drugs susceptibility profile of isolates were described in this work.

Key words: *Rhodococcus equi* – identification - tuberculosis – antimicrobial profile - epidemiology

INTRODUCTION

The genus *Rhodococcus* belongs to nocardioform Gram-positive rods containing complex mycolic acids in wall cell that includes other genera as *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Millisia*, *Segniliparus*, *Skermania*, *Tsukamurella* and *Williamsia* (Soddell *et al.*, 2006a, Soddell *et al.*, 2006b, Tsitko *et al.*, 2007). The genus *Rhodococcus* was introduced by Zopf in 1891 (Goodfellow & Alderson, 1977) and comprises 30 species of which *Rhodococcus equi* is considered the highest opportunistic pathogen for animals including humans (Meijer & Prescott *et al.*, 2004). The first human infection case was reported in 1967 in a patient presenting a pulmonary abscess. The two first cases occurred in Brazil were related by Severo *et al.* (2001). However, with the AIDS epidemic, the number of affected patients by *R. equi* infection has increased (Roda *et al.*, 2009). *R. equi* also causes infection in patients with lymphoma, chronic renal failure, alcoholism, lung cancer, leukemia, diabetes mellitus and other situations of immunodeficiency. Studies also proved that the infection can occur in immunocompetent hosts (von Bargen & Haas, 2009).

R. equi as well as *Mycobacterium tuberculosis* are considered a facultative intracellular pathogen. Both bacteria have ability to survive and to multiply inside of macrophages and the main clinical manifestation of these infections in the man is the chronic cavitary pneumonia presenting pleural effusion, accompanied of fever, cough and chest pain (Lara *et al.*, 2007). *Rhodococcus equi* causes a slowly progressive granulomatous pneumonia, with lobar infiltrates, frequently progressing to cavitary lesions, visible on a chest radiograph. Other sites of infection include the central nervous system, pelvis, subcutaneous tissue, and lymphatic system, where the abscesses are found (Tsitko *et al.*, 2007).

R. equi when incubated aerobically at 37°C, grow satisfactorily in the majority of the nonselective culture media including those used in mycobacteria isolation, presenting irregular, smooth and mucoid colonies that develop a shade of salmon pink to yellow color

after a week of growth (Prescott, 1991). As regards microscopic characteristics, in stained smears of clinical specimens, in particular, purulent material and tissue (biopsy, surgical, and autopsy), the *R. equi* coccoid form is usually seen. However, the *R. equi* bacillary form has been reported for clinical specimens, such as blood, sputum, and bronchial lavage fluid and the positive results for acid fastness are related by some authors (von Bargen & Haas, 2009). Colonies and cellular morphology plus the partial alcohol acid fastness, are characteristic keys for the initial differentiation of genera (Christopher & Bruno, 2002). In general, *R. equi* is biochemically nonreactive and nonproteolytic and fails to oxidize or ferment any carbohydrates but in Gordon's basal medium oxide glucose in 14 days. It is strictly aerobic, catalase positive and oxidase negative, mostly urease positive. *R. equi* produces soluble “*equi* factors” associated with a phospholipase and cholesterol oxidase activity and interact with phospholipase D of *Listeria ivanovii* to produce complete hemolysis of sheep erythrocytes (Prescott, 1991). *R. equi* not produces DNase, lecithinase, gelatinase or esculinase (McNeil & Brown, 1994), no hydrolyze casein, hypoxanthine, tyrosine, or xanthine but hydrolyze adenine (McNeil & Brown, 1994). *R. equi* do not produce H₂S, indol or use citrate and malonate. A variable result is demonstrated for the nitrate reductase, urease and hipurato reduction (McNeil & Brown, 1994; Prescott, 1991).

The Laboratory of Mycobacteriology at Adolfo Lutz Institute in Ribeirão Preto - SP, Brazil, has frequently isolated the partially acid-fast bacteria from patients sputa suspected with pulmonary tuberculosis. Considering the emerging clinical importance of *R. equi*, our goal was identify the 51 partially fast acid bacteria isolated from sputa, determining the antimicrobial profiles of this isolates and analyzing some epidemiological characters of patients with *R. equi* infection.

MATERIAL AND METHODS

Clinical samples

Sputum samples (duplicates/triplicates) were obtained from 546 patients of Ribeirão Preto and region suspected with pulmonary tuberculosis that were attended in Health Hospitals Units. The samples were analyzed by Laboratory of Mycobacteriology at Adolfo Lutz Institute in Ribeirão Preto.

***Rhodococcus equi* isolation and identification**

After the direct research accomplishment for acid-fast bacilli (AFB) detection, samples from 296 patients presented the AFB and from 60 the coccobacilli or bacilli partially acid-fast (AFPB) suggestive for *Rhodococcus* spp. The samples with AFB were cultivated using the automated system MB/BacT (BioMerieux) following the mycobacteria identification by phenotypic methods and Gene Probe. The 60 AFPB were submitted to the cultures on Müeller Hinton agar (MH) in plates and in the automated system MB/BacT (BioMerieux) to certify absence of *Mycobacterium* spp. Isolated colonies were transferred to MH agar slants in tubes. The identification of *R. equi* was based in microscopic observation through Gram's and Ziehl-Neelsen methods (Ballows *et al.*, 1991) and phenotypic biochemical test according to manual of systematic and clinic microbiology (Ballows, 1991; Holt, 1994; Koneman, 2000; Murray *et al.*, 1999; Mac Faddin, 2000). The culture medium Gordon's base was used for acid production of carbohydrates tests (McNeil & Brown, 1994). The CAMP test was performed according to method described by Bille & Doyle (1991) using the *Listeria ivanovii* ATCC 19119 and *R. equi* ATCC 6939 standard strains.

Susceptibility tests

The disk-diffusion method was performed according to Clinical and Laboratory Standard Institute/National Committee and Clinical Laboratory Standards guidelines. For

application of this method were used 28 antimicrobial agents (utilizing results of *Staphylococcus* sp as interpretation criteria) (CLSI/NCCLS 2004) and *Rhodococcus equi* ATCC 6939, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 reference strains.

Epidemiological investigation

The data available as gender, age and immunosuppressive condition of each patient treated in hospitals were utilized for analysis of epidemiological investigation.

RESULTS

The samples of 60 patients from 546 presented *Rhodococcus* spp isolates and from this, 51 were identified as *R. equi* according to results of phenotypic tests presented in Table 1. All of the 51 isolates were catalase positive, oxidase negative, and failed to oxidize or to ferment carbohydrates or alcohols, produced *equi* factors (CAMP test), produced lipase, but not gelatinase, esculinase, H₂S or indol, and they do not use citrate and malonate. For nitrate reductase, urease and hippurate reduction they showed variable results. Similarity of 100% was verified for all characteristics when compared with ATCC 6939 standard strain. Nine isolates could not be identified as *R. equi* because the CAMP test was negative instead the similarity of results for all other tests with standard strain.

The analysis of epidemiological data showed that from total of 51 patients infected by *R. equi*, 37 (72.5%) were male and 14 (27.4%) were female. The age most affected was between 31 and 50 years comprising 60.8% of patients. There were no cases of childhood infection. The younger patients were 17 years old and the oldest patient was 69 years old (Figure 1). All patients showed some immunosuppressive character as HIV, chronic alcoholism, drug user or submitted to a transplant surgery.

Twenty eight antimicrobial agents were tested against 51 *R. equi* isolates through the disk-diffusion method and the sensibility profile can be verified in the Table 2. The

aminoglycosides (amikacin and gentamicin), the tetracycline (minocycline), and the glycopeptides (teicoplanin and vancomycin) presented 100% of effectiveness. The macrolides (azithromycin and clarithromycin) were 100% effective too, excepting erythromycin where one isolated showed intermediary sensitivity (98.04% effective). The β -lactam agents not shown good activity (49.02% for cefoxitin, 45.10% for cefepime, 23.53% for cefotaxime, 19.60% for cephalothin, 13.73% for cefazolin, 7.84% for ampicillin, 5.88% for penicillin and 1.96% for oxacillin) but when combined with β -lactamase inhibitor, the activity was significantly increased (98.04% for amoxicillin-clavulanate). Beyond of this group, the imipenem (98.04%) and the ceftriaxone (80.39%) were the more effective antimicrobial agents. Other antimicrobial agents that showed low activity included clindamycin and sulfamethoxazole+thrimethoprim, that presented resistances of 90.20% and 58.84% respectively. The quinolones levofloxacin (96.08%), ciprofloxacin (92.16%) and norfloxacin (90.20%) were very effective as well as rifampin (98.04%), doxycycline (96.0%), chloramphenicol (84.31%) and tetracycline (78.43%).

DISCUSSION

From 546 pulmonary TB suspects analyzed, it was verified that sputa samples from 406 patients effectively presented acid-fast or acid-fast partially positive results. *M. tuberculosis* and Non tuberculous mycobacteria (NTM) were isolated from 67.5% (406/274) and 17.7% (406/72) patients respectively and *R. equi* was identified as single agent in 12.6% (406/51). Other nine isolates (2.2%) presented negative CAMP test results and were considered only *Rhodococcus* spp instead of those strains have shown similar results with standard strain in all other biochemical tests. According to Bille & Doyle (1991) and Prescott (1991) *R. equi* isolates with negative *equi* factor have been described. In spite of the general consensus that human infection with *R. equi* are rare, our results indicated that it is not so

infrequent because within pulmonary TB suspects, 12.6% were effectively of *R. equi* infection. Corti *et al.* (2009) and Martin *et al.* (2007) detached that in tuberculosis co-infected with AIDS cases, should also consider the respiratory pathogens such as *Rhodococcus equi*. Due to the similarity of the clinical state of rhodococcosis with the tuberculosis (Tsitko *et al.*, 2007) plus the high prevalence of tuberculosis in population and the *R. equi* partial acid-fastness, these factors can induce the mistake diagnosis in the laboratory and in the practices medicine.

The epidemiological data analysis showed that the *R. equi* was isolated four times more in men with predominant age (60.8%) ranging from 31 to 50 years. The male predominance of 3:1 for pulmonary rhodococcosis was also verified by Kedlaya *et al.* (2001). The HIV is one of the main factors predisposing to *R. equi* infection (Roda *et al.* 2009) and normally the incidence of HIV is higher among the male, justifying the incidence. In our study it was verified that 100% of a men with *R. equi* infection, it has also co-infected with HIV. Torres-Tortosa *et al.* (2003) evaluated the *R. equi* infection in 67 patient co-infected with HIV. Fifty five patients were male with age varying between 25 to 37 years. These authors also verified that most (52.2%) of bacterial isolates was from sputum.

With regard to treatment, *R. equi* infection must be treated based in the microbial susceptibility test because there is no standardized treatment for human (Roda *et al.* 2009) and the emergence of some resistant strains to different antibiotics has been reported within the last 10 years (Buckley *et al.* 2007). *R. equi* isolates showed resistance to β -lactam agents with colonies growing to the disc edges, corroborating the results described by Roda *et al.* (2009). However, when the β -lactam agents were combined with beta-lactamase inhibitor, the activity was significantly increased (98.04% for amoxicillin-clavulanate) indicating the correlation of β -lactamase enzyme production and resistance. However, working with human clinical isolates, Normann *et al.* (1994), verified that neither β -lactamase nor plasmid DNA was detected in β -lactam-resistant or -susceptible strains but they verified by electron microscopy

presence of phage particles on β -lactam-resistant strains. Testing for virulence in Swiss mice revealed lower 50% lethal doses for phage-producing strains than the non-phage- strains. The authors suggest that, among *R. equi* human isolates, the antibiotic resistance phenotype is associated with virulence and may be phage mediated.

For Buckley *et al.* (2007) due to *R. equi* intracellular nature, the infection may treat with macrolides such as erythromycin and rifampicin, which are concentrated in granulocytes and macrophages (Heidmann *et al.* 2006). The macrolides azithromycin and clarithromycin tested were 100% and the erythromycin 98% effective to isolates. The quinolones were very effective against *R. equi* analyzed and this sensitivity is similar to *M. tuberculosis* clinical isolates (Ginsburg *et al.*, 2003). The rifampin, a first line drug for tuberculosis control also was active in 98.04% of isolates. Torres-Tortosa *et al.* (2003) verified that in 55 infected patients with *R. equi* the most effective antibiotics were vancomycin, amikacin, rifampin, imipenem, ciprofloxacin and erythromycin. The effectiveness of those antibiotics was also verified in our 51 isolates.

Concluding, the great incidence of AIDS and other immunosuppressive factors come turning more frequent the *R. equi* infections in human. The disease is sub-notified and misdiagnosed with tuberculosis or others granulomatous pathologies. Our intention is alert to the professionals of the human health area, about the importance of *Rhodococcus equi* infection suspecting, especially in the immunocompromised patients with cavitory lesions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks FAPESP for the financial support and CNPq for the scholarship.

Table 1. Phenotypic identification of *R. equi*^a

Phenotypic characteristics of <i>R. equi</i>	Phenotypic characteristics of 51		
	Reaction ^a	Nº Positive	Result
Catalase	100% (+)	51	100% (+)
Oxidase	1-5% (+)	0	100% (-)
Motility	100% (-)	0	100% (-)
Obligate aerobe	100% (+)	51	100% (+)
Glucose Fermentation	100% (-)	0	100% (-)
Glucose Oxidation	100% (+)	51	100% (+)
Sole carbon source ^b	100% (-)	0	100% (-)
<i>equi</i> factor (CAMP test)	100% (+)	51	100% (+)
Gelatinase	100% (-)	0	100% (-)
Indol	100% (-)	0	100% (-)
H ₂ S	32% (+)	0	100% (-)
Urease	95% (+)	45	88% (+)
Nitrate reduction	88% (+)	50	98% (+)
Lipase	100% (+)	51	100% (+)
DNase	100% (-)	0	100% (-)
Lecithinase	100% (-)	0	100% (-)
Hippurate hydrolysis	1% (+)	06	88% (-)
Esculin hydrolysis	4% (+)	0	100% (-)
Adenine hydrolysis	100% (+)	51	100% (+)
Casein hydrolysis	100% (-)	0	100% (-)
Hypoxanthine hydrolysis	100% (-)	0	100% (-)
Tyrosine hydrolysis	100% (-)	0	100% (-)
Xanthine hydrolysis	100% (-)	0	100% (-)

a- Adapted from Prescott, 1991, McNeil & Brown, 1994 and Christopher & Bruno, 2002
 Symbols: (+) positive reaction and (-) negative reaction.

b- All isolates failed to use acetate, citrate and malonate as sole carbon source, and acid production from adonitol, arabinose, cellobiose, erythritol, fructose, galactose, glycerol, inositol, maltose, mannitol, mannose, melibiose, raffinose, rhaminose, sucrose, salicin, sorbitol, starch, and xylose.

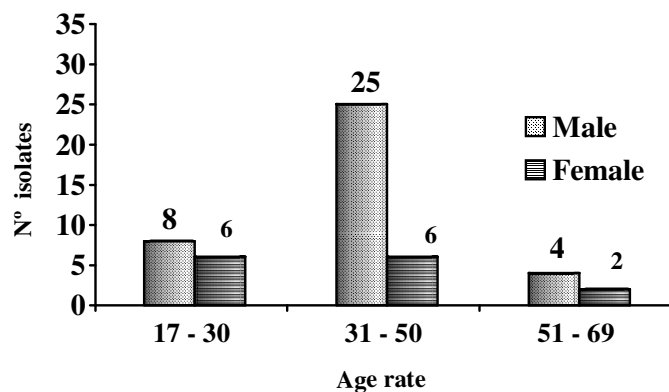


Figure 1. Age and sex distribution of the 51 phenotypically characterized *Rhodococcus equi*, isolates from sputum.

Table 2. Susceptibility test results by disk-diffusion method using 28 antimicrobial agents against 51 *Rhodococcus equi* isolates*

Antimicrobial agents (concentration)	N°. isolates (S, I, R) / N°. tested isolates (%)		
	Interpretation Categories		
	S = sensitive	I = intermediate	R = resistant
Aminoglicosides			
AMI (30µg)	51 (100%)	-	-
GEN (10µg)	51 (100%)	-	-
β-lactams			
AMC (30µg)	50 (98%)	-	01 (20%)
AMP (10µg)	04 (7.8%)	-	47 (92.2%)
CFL (30µg)	10 (19.6%)	01 (2%)	40 (78.4%)
CFZ (30µg)	07 (13.7%)	01 (2%)	43 (84.3%)
CRO (30µg)	41 (80.4%)	03 (5.9%)	07 (13.7%)
CFO (30µg)	25 (49%)	11 (21.6%)	15 (29.4%)
CTX (30µg)	12 (23.5%)	01 (2%)	38 (74.5%)
CPM (30µg)	23 (45.1%)	06 (11.8%)	22 (43.1%)
IPM (10µg)	50 (98%)	-	01 (2%)
OXA (5µg)	01 (2%)	-	50 (98%)
PEN (10UI)	03 (5.9%)	-	48 (94.1%)
Chloramphenicol			
CLO (30µg)	43 (84.3%)	02 (4%)	06 (11.7%)
Glycopeptides			
TEC (30µg)	51 (100%)	-	-
VAN (30µg)	51 (100%)	-	-
Lincosamide			
CLI (2µg)	01 (2%)	04 (7.8%)	46 (90.2%)
Macrolides			
AZI (15µg)	51 (100%)	-	-
CLA (15µg)	51 (100%)	-	-
ERI (15µg)	50 (98%)	01 (2%)	-
Quinolones			
CIP (5µg)	47 (92.1%)	03 (5.9%)	01 (20%)
LVX (5µg)	49 (96%)	01 (2%)	01 (2%)
NOR (10µg)	46 (90.2%)	01 (2%)	04 (7.8%)
Rifampin			
RIF (5µg)	50 (98%)	-	01 (2%)
Sulfa+trimethoprim			
SMT (25µg)	21 (41.2%)	-	30 (58.8%)
Tetracyclines			
TET (30µg)	40 (78.4%)	08 (15.7%)	03 (5.9%)
DOX (30µg)	49 (96%)	01 (2%)	01 (2%)
MIN (30µg)	51 (100%)	-	-

AMI= Amikcin. AMC= Amoxicillin+clavulanate. AMP= Ampicillin. AZI= Azithromycin. CFL= Cephalothin. CFZ= Cefazolin. CPM= Cefepime. CRO= Ceftriaxone. CFO= Cefoxitin. CTX= Cefotaxime. CIP= Ciprofloxacin. CLA= Clarithromycin. CLI= Clindamycin. CLO= Chloramphenicol. DOX= Doxycycline. ERI= Erythromycin. GEN= Gentamicin. IPM= Imipenem. LVX= Levofloxacin. MIN= Minocycline. NOR= Norfloxacin. OXA= Oxacillin. PEN= Penicillin G. RIF= Rifampin. SMT= Sulfamethoxazole+Trimethoprim. TEC= Teicoplanin. TET= Tetracycline and VAN= Vancomycin.

* The Interpretative Patterns of Halo inhibition Diameters were those determined for *Staphylococcus* sp. In agreement with Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9. 2005.

REFERENCES

Balows A, Hausler Jr WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ 1991. Manual of clinical microbiology 5thed. ASM Press, Washington DC, 1364 pp.

von Bargen K, Haas A 2009. Molecular and infection biology of the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *FEMS Microbiol Rev* 33: 870–891.

Bille J & Doyle M P 1991. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: Balows A. Hausler Jr. WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology 5thed. ASM Press, Washington DC, p. 287–295.

Buckley T, McManamon E, Stanbridge S 2007. Resistance studies of erythromycin and rifampin for *Rhodococcus equi* over a 10-year period. *Ir Vet J* 60(12): 728-731.

Christopher K, Bruno E 2002. Tested Studies for Laboratory Teaching. Association for Biology Laboratory Education (ABLE). Louisiana State University, 24(8): 103-130.

Clinical and Laboratory Standard Institute/ National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement. Approved standard M 100-S14. NCCLS. Wayne. Pa.

Corti M, Palmero D, Eiguchi K 2009. Respiratory infections in immunocompromised patients. *Curr Opin Pulm Med* 15(3): 209-17.

Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *Lancet Infect Dis* 3: 432–42.

Goodfellow M, Alderson G 1977. The Actinomycete-genus *Rhodococcus*: A Home for the 'rhodochrous' Complex. *J Gen Microbiol* 100: 99-122.

Heidmann P, Madigan JE, Watson JL 2006. *Rhodococcus equi* Pneumonia: Clinical Findings. Diagnosis. Treatment and Prevention. *Clin Tech Equine Pract* 5(3): 203-210.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST 1994. Group 22. nocardioform actinomycetes. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9thed. Williams & Wilkins. Baltimore MD, p. 625-50.

Kedlaya I, Ing MB, Wong S 2001. *Rhodococcus equi* infections in Immunocompetent Hosts: Case Report and Review. *Clin Infect Dis* 32: 39–47.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC 2000. Bacilos Gram-positivos. In: Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5nded. S. Paulo: Panamericana, p. 133-97.

Lara GHB, Ribeiro MG, Guazzelli A, Fernandes MC 2009. Linfadenite infecciosa em suínos: etiologia, epidemiologia e aspectos em saúde pública. *Arq Inst Biol São Paulo* 76(2): 317-325.

Martin A, Uwizeye C, Fissette K, De Rijk P, Palomino JC, Leão S, Portaels F 2007. Application of the *hsp65* PRA method for the rapid identification of mycobacteria isolated from clinical samples in Belgium. *J Microbiol Methods* 71: 39–43.

Mc Faddin JF 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria 3thed. Williams & Wilkins. Baltimore MD, 901 pp.

McNeil MM, Brown JM 1994. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* 7: 357-417.

Meijer WG, Prescott JF 2004. *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 35: 383–396.

Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover HR 1999. Manual of Clinical Microbiology 7thed. ASM Press, Washington DC, p. 1526-43.

Nordmann P, Keller M, Espinasse F, Ronco E 1994. Correlation between antibiotic resistance, phage-like particle presence, and virulence in *Rhodococcus equi* human isolates. *J Clin Microbiol* 32: 377-383.

Prescott JF 1991. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 4: 20-34.

Roda RH, Young M, Timpone J, Rosen J 2009. *Rhodococcus equi* pulmonary-central nervous system syndrome: brain abscess in a patient on high-dose steroids - a case report and review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis* 63: 96–99.

Severo LC, Ritter P, Petrillo VF, Dias CAG, Porto NS 2001. Infecção pulmonar por “*Rhodococcus equi*”: relato dos dois primeiros casos brasileiros. *J Pneumol* 27(3): 158-162.

Soddell JA, Stainsby FM, Eales KL, Kroppenstedt RM, Seviour RJ, Goodfellow M 2006. *Millisia brevis* gen. nov. sp. nov. an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 739–744.

Soddell JA, Stainsby FM, Eales KL, Seviour RJ, Goodfellow M 2006. *Gordonia defluvii* sp. nov. an actinomycete isolated from activated sludge foam. *Int J Syst Evol Microbiol* 56: 2265–2269.

Torres-Tortosa M, Arrizabalaga J, Villanueva JL, Gálvez J, Leyes M, Valencia ME, Flores J, Peña JM, Pérez-Cecilia E, Quereda C 2003. Prognosis and clinical evaluation of infection caused by *Rhodococcus equi* in HIV-infected patients: a multicenter study of 67 cases. *Chest* 123: 1970–76.

Tsitko I, Rahkila R, Priha O, Ali-Vehmas T, Terefework Z, Soini H, Salkinoja-Salonen MS 2007. Isolation and automated ribotyping of *Mycobacterium lentiflavum* from drinking water distribution system and clinical specimens. *FEMS Microbiol Lett* 256: 236–243.

8.3. Artigos em fase de redação

8.3.1. “Caracterização de bactérias da subordem *Corynebacterineae* Isoladas de escarro pela análise de ácidos micólicos e técnicas moleculares”.

8.3.2. “Comparação dos métodos microdiluição em caldo com resazurina e disco difusão, para teste de sensibilidade de isolados clínicos de *Rhodococcus equi*”.

8.3.3. “Caracterização de *Rhodococcus equi* isolado de escarro e sua sensibilidade a antimicrobianos”.

ANEXO A

A.1. Métodos de Coloração

A.1.1. Coloração de Ziehl-Neelsen

Preparo da Fucsina: 3 g de fucsina básica dissolvidos em 10 ml de etanol 95%, mais adição de 90 mL de uma solução aquosa de fenol a 5%.

Preparo do Álcool-ácido: 3 mL de HCl concentrado adicionados em 97 mL de etanol 95%.

Preparo do Azul de Metileno: 0,3 g de cloreto de azul de metileno dissolvidos em 100 ml de água destilada.

Técnica

Fixar o esfregaço na lâmina, na chama do bico de bunsen. Cobrir o esfregaço com a fucsina. Aquecer, sem deixar ferver, 3 a 4 vezes em um período de 5 min. Lavar com água. Descorar com o álcool-ácido até remover todo o corante - 2 min. Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min. Lavar com água. Deixar a lâmina secar ao ar (se for usado papel de filtro para secar a lâmina, desprezar em lixo apropriado e usar um papel para cada lâmina). Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.

Positivo: bacilos coram em vermelho, outras bactérias e células coram em azul.

A.1.2. Gram modificado por Hucker

Preparo do Cristal-violeta - solução estoque

Solução A - 20 g de Cristal-violeta em 200 mL de Álcool etílico a 95%.

Solução B - 8 g de Oxalato de amônio em 800mL de Água destilada.

-As duas soluções, são preparadas separadamente, misturando-as depois de prontas. Deixar em repouso por 24 horas. Filtrar em papel de filtro e manter em frasco escuro.

Preparo da Solução de Lugol (mordente): 2 g de Iodo metalóide ou ressublimado e 4 g de Iodeto de potássio em 300mL de Água destilada. Misturar triturando o iodo e o iodeto de potássio em um gral, até que estejam bem homogeneizados. Acrescentar a água aos poucos, misturando vigorosamente, para dissolução completa. Manter em frasco escuro.

Preparo do Descorante: Álcool etílico a 95% e Acetona (v/v).

Preparo do Contra-corante

Solução de reserva: 25 g de Fucsina (ou 5g de Safranina) em 1litro de álcool etílico a 95%.

Solução de trabalho: 10 mL de solução de reserva em 90 mL de água. Misturar suavemente até a dissolução. Deixar repousar por 24 horas e filtrar. Manter em frasco escuro.

Técnica

Cobrir o esfregaço com a solução de cristal-violeta por um minuto. Decantar o cristal-violeta e enxaguar suavemente com água da torneira. Cobrir o esfregaço com a solução de lugol durante um minuto, enxaguar. Descorar a lâmina com a mistura álcool-acetona (1:1), até que o solvente escorra incolor. Alternar com água corrente (suavemente). O tempo usualmente utilizado nesta etapa é de cerca de 10 segundos. Cobrir o esfregaço com a solução de safranina ou Fucsina, cerca de 30 segundos e enxaguar. Deixar secar ao ar, em temperatura branda.

Gram positivo: bactérias coram em azul escuro (forte).

A.1.3. Ziehl-Neelsen modificado por Kinyoun

Preparo da Fucsina: 4 g de fucsina básica dissolvidos em 20 ml de etanol 95%, mais adição de 100 mL de uma solução aquosa de fenol a 5%.

Preparo do Álcool-ácido: 3 mL de HCl concentrado adicionados em 97 mL de etanol 95%.

Preparo do Azul de Metileno: 0,3 g de cloreto de azul de metileno dissolvidos em 100 ml de água destilada.

Técnica: Fixar o esfregaço na lâmina. Cobrir o esfregaço com a fucsina - 5 min. Lavar com água. Descorar com álcool-ácido até remover todo o corante. Cobrir o esfregaço com azul de metileno - 2 min. Lavar com água. Deixar a lâmina secar no ar. Ler em microscópio óptico comum em objetiva de imersão de 100x.

Positivo: são observados bacilos corados, parcialmente em vermelho e em azul.

A.2. Meios de cultura formulados

A.2.1. Meio de Löwenstein-Jensen

Composição

Fosfato monopotássico anidro (KH_2PO_4) 2,4g; Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0,5g; Ácido cítrico 0,5g; L-asparagina 3,6g; Fécula de batata 30g; Glicerol 9,6mL; Água destilada 600mL; Ovos integrais homogeneizados 1000mL; Solução aquosa de verde malaquita 2% 20mL.

Preparo

Os sais e a asparagina foram dissolvidos em um Erlenmeyer, em seguida adicionou-se a fécula de batata e a mistura foi levada ao fogo até dissolução. O glicerol foi adicionado e o meio autoclavado a 121° C por 30 minutos, após esfriar em temperatura ambiente, o meio foi mantido em estufa de 37°C para teste de esterilidade. Os ovos que devem ser frescos e de preferência de granjas que não utilizam antibióticos na ração, foram limpos utilizando-se solução de sabão 5%, água e escova e em seguida, foram submersos em álcool 70% por 6 horas. Utilizando-se luvas, os ovos foram quebrados, cuidadosamente, separando a clara. As gemas foram colocadas em um Béquer estéril e misturadas com um bastão de vidro estéril. Em seguida transferiu-se a mistura para um balão de fundo chato estéril, com pérolas de vidro. Através de agitação (forte e constante) obteve-se um homogeneizado, que foi então filtrado em 4 camadas de gaze estéril, em funil estéril, para uma proveta estéril onde foi medido o volume necessário, adicionando à mistura de sais e fécula de batata, o verde malaquita foi adicionado e a mistura foi agitada até completa dissolução.

Distribuição do meio nos tubos com tampa de rosca

Foram utilizados tubos com tampa de rosca 16 X 125 mm, sendo o meio distribuído num volume de 5 a 7 mL de meio por tubo.

Coagulação do meio de cultura

O meio contido nos tubos foi coagulado em estufa com temperatura de 80°C, por 60 minutos, os tubos foram inclinados e permaneceram com as tampas semi abertas para evaporar a água. Após a coagulação, os tubos foram incubados em estufa de 37°C por 48 horas para teste de esterilidade, com as tampas ligeiramente frouxas, para eliminar a água de condensação e controle do teste de esterilidade. Os tubos com o meio estéril foram mantidos em geladeira com as tampas completamente rosqueadas por no máximo quatro meses.

A.2.2. Meio de básico de Gordon ou “Fermentation basal médium”

Formulação

fosfato diamônio, 1,0g; cloreto de potássio, 0,02g; sulfato de magnésio, 0,2g; ágar, 15g para 1000mL de água destilada.

Preparo

Os sais foram dissolvidos em \pm 800 mL de água, em um Erlenmeyer, sob aquecimento. O volume foi completado com água, para 1000 mL. Foram adicionados 15mL de uma solução alcoólica de púrpura de bromocresol a 0,04% e o pH reajustado para 7,0. Foram distribuídos 200 mL adicionados de 3g de ágar, em balões. O meio foi autoclavado a 121° C por 20

minutos, após esfriar foi mantido em temperatura ambiente. No momento de uso, o meio foi aquecido em forno de micro-ondas e completado com a adição do carboidrato desejado na concentração final de 1%. Os carboidratos utilizados foram esterilizados através do processo de tindalização e adicionados asépticamente, ao meio básico ainda em estado líquido. Em seguida foram distribuídos, asépticamente, 3mL em tubos 12 X 120 mm esterilizados e deixados na posição inclinada para a solidificação do ágar.

A.2.3. Caldo de Uréia Indol

Formulação: L-triptofano, 3g; fosfato monopotássico, 1g; fosfato bipotássico, 1g; cloreto de sódio, 5g; uréia, 20g; álcool 95° 10ml; vermelho de fenol, 25mg e água destilada 1000ml.

Preparo: Com exceção da uréia e do álcool, os sais foram dissolvidos em \pm 180 mL de água, em um Erlenmeyer, sob aquecimento. O volume foi completado com água, para 200 mL. Foram adicionados 5mg de vermelho de fenol o pH reajustado para 7,0. O meio foi autoclavado a 121° C por 20 minutos, após esfriar foi mantido em temperatura ambiente. No momento de uso, adicionou-se ao meio 10 mL de solução de uréia a 40% (esterilizada por filtração) e 2 mL de álcool 95°. Em seguida foram distribuídos, asépticamente, 2 mL em tubos 12 X 120 mm esterilizados, os quais foram mantidos em geladeira para conservação.

A.2.4. Meio de cultura para avaliar a decomposição da caseína

Foram adicionadas 10g de leite desnatado em pó em 100 mL de água destilada e 2g de ágar em 100 mL de água destilada. As duas partes foram esterilizadas separadas, por autoclavação a 121° C por 20 minutos e depois foram asépticamente misturadas e distribuídas em placas de Petri.

A.3. Reagentes formulados

A.3.1. N-Acetil- cisteína/NAOH 2% (NALC-NAOH)

Reagentes

Formulação de volume correspondente a 100 mL: N-acetil-L-cisteína 500mg adicionados em 50 mL de Solução de NaOH + 50 mL de Solução de Citrato de Sódio: (autoclavado e estocado em frascos com tampa de rosca).

-NaOH 4% (40 g pastilhas de NaOH em 1000mL de água destilada).

-Citrato de Sódio 0,1M (26 g de citrato de sódio anidro em 1000 ml de água destilada).

Procedimentos

Preparar a quantidade necessária da solução de NALC de acordo com a quantidade de amostras. Colocar 5 ml da amostra em um tubo cônico estéril com tampa de rosca de 50 ml e homogeneizar vigorosamente. Deixar 15 - 20 minutos à temperatura ambiente. Adicionar o mesmo volume de tampão fosfato ou água destilada. Centrifugar a 3.000 xg por 15 minutos e desprezar o sobrenadante em recipiente com solução de hipoclorito a 1%, evitando ao máximo respingo do material. Suspender o sedimento com tampão fosfato; ou soro fisiológico, com um volume suficiente para inocular os meios que serão utilizados. Preparar lâminas para coloração. Desprezar todo o material utilizado em lixo apropriado ou em frascos próprios contendo solução de hipoclorito a 1%.

A.3.2. Reativos “A” e “B” para nitrato redutase:

“A” (α -naftilamina, 5g; ácido acético 5N a 30% 1000 mL)

“B” (ácido sulfanílico, 8g; ácido acético 5N a 30% 1000 mL)

A.3.3. Reativo de Kovacs:

-álcool isoamílico, 150 mL; p-dimetilaminobenzaldeido, 10g e ácido clorídrico concentrado 50 mL.

A.3.4. Solução reveladora de gelatinase:

-bicloreto de mercúrio 15g, ácido clorídrico concentrado 20 mL, água destilada 100 mL.

ANEXO B (descrição dos testes fenotípicos realizados)

B.1. Utilização de carboidratos: o teste determinou a capacidade do micro-organismo utilizar um carboidrato específico incorporado ao meio básico de Gordon (Anexo A), produzindo ácido. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por NASH & KRENZ (1991). A inoculação foi realizada com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico no meio de cultura, inclinado em tubos, sendo esses incubados a 35-37⁰ C por até 5 dias e conseqüentemente, em temperatura ambiente por mais 4 semanas. O desenvolvimento de cor amarela indicou reação positiva.



Figura 9. Meio de cultura adicionado de glicose (1%). Tubo à esquerda – sem inóculo (pH inalterado). Tubo à direita – inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939. (pH alterado devido à produção de ácido, com a utilização do carboidrato pelo microrganismo).

B.2. Produção de amilase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir enzimas proteolíticas, que hidrolisam o amido. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por Nash & Krenz (1991). O meio de cultura utilizado foi agar nutriente (AN) adicionado de 1% de amido, em placa de Petri. O inóculo da bactéria foi realizado com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante da placa do meio de cultura. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 1 semana. A prova foi realizada recobrimdo o crescimento bacteriano com solução de lugol usado na coloração de Gram. A formação de um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano indicou reação positiva.

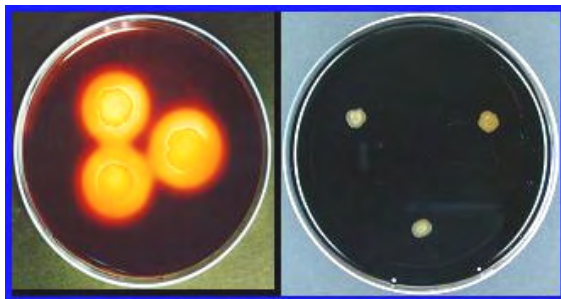


Figura 10. Placa à esquerda (teste positivo), inoculado com *Bacillus cereus*. Placa à direita (teste negativo), inoculado com *Bacillus sphaericus*.

Fonte: (© Dept. of Vet. Microbiology, KVL, Denmark, 2000).

B.3. Produção de β Galactosidase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo hidrolisar O-nitrophenyl-p-D-galactopyranoside (ONPG) e liberar O-nitrophenol, um composto cromogênico de cor amarela. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por Fiss & Brooks, (1991). A partir do crescimento bacteriano de 72 horas em MH agar, preparou-se uma suspensão em 0.4 mL de água destilada estéril, com densidade padrão 0.5 da escala de McFarland em tubos 12X75mm. Um disco de ONPG (Oxoid) foi adicionado aos tubos inoculados e a incubação foi a 35°C. O desenvolvimento de cor amarela após 4 a 24 horas indicou teste positivo.

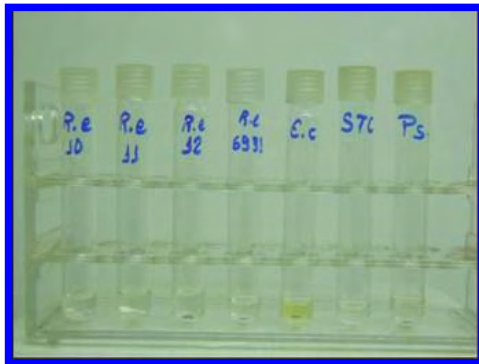


Figura 11. Tubo teste positivo (E.C) inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922; tubos testes negativos (STC, PS) inoculados com *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; tubos (R.e) inoculados com *Rhodococcus equi* ATCC (6939; 33701; 33702 e 33703).

B.4. Produção de Catalase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir a enzima catalase, que se encontra na maioria das bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas, que possuem citocromo. O teste foi realizado de acordo com McFADDIN (2000), pelo método da lâmina de vidro, onde com o auxílio de uma alça de inoculação foram colocadas colônias puras de culturas, gotejando água oxigenada 30% (10 volumes). A formação imediata de bolhas indicou a reação positiva.



Figura 12. O teste detectou a presença da enzima catalase, a qual hidrolisou H_2O_2 para produzir H_2O e O_2 (formação de bolhas). Reação à direita (teste positivo), inoculado com *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, reação à esquerda (teste negativo), inoculado com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

B.5. Produção de DNase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir a enzima desoxirribonuclease (DNase) e foi realizado de acordo com o método descrito por Nash & Krenz (1991). O meio de cultura utilizado foi “DNase test agar” (Difco) em placa de Petri. O inóculo da bactéria foi realizado com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante da placa do meio de cultura. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 1 semana e a seguir recobriu-se o crescimento bacteriano com solução reveladora de HCL 1N. A formação de um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano indicou reação positiva.



Figura 13. Testes positivos: 1^a e 2^a estrias = inóculos de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e ATCC 6538).
Teste negativo: 3^a estria = inóculo de *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228).
Fonte: (www.austin.cc.tx.us/microbugz/images/MSA.jpg).

B.6. Produção da gelatinase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir enzimas proteolíticas, que hidrolisam a gelatina e foi realizado de acordo com o método de Frazier/Smith (PRIEST et al., 1988). O meio de cultura utilizado foi “Nutrient agar” (Difco) adicionado de 0,4% de gelatina nutritiva (Difco) em placa de Petri. O inóculo da bactéria foi realizado com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante da placa do meio de cultura. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 1 semana e a seguir recobriu-se o crescimento bacteriano com solução reveladora de bicloreto de mercúrio. A formação de um halo transparente ao redor do crescimento bacteriano indicou reação positiva.

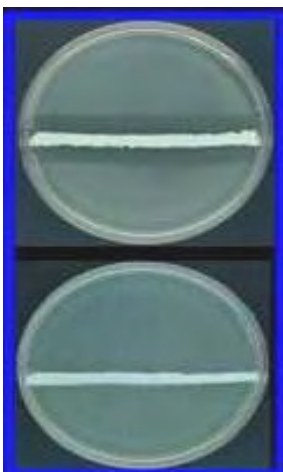


Figura 14. Placa acima (teste positivo), inóculo de *Serratia marcescens*.
Placa abaixo (teste negativo), inóculo de *Salmonella typhimurium*.
Fonte: (www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/images/s/).

B.7. Produção de ácido sulfídrico (H₂S): o teste determinou a capacidade do micro-organismo reduzir enxofre em sulfeto de hidrogênio, o qual combina com íons de ferro contidos no meio para formar sulfeto férrico, um precipitado visível de cor negra. O teste foi realizado de acordo com McFADDIN (2000). O meio de cultura utilizado foi “SIM” agar semi-sólido. A inoculação da bactéria foi realizada inserindo uma agulha com o microorganismo no meio de cultura, incubando os tubos a 35 - 37⁰ C por até 5 dias. O desenvolvimento de cor negra indicou reação positiva.

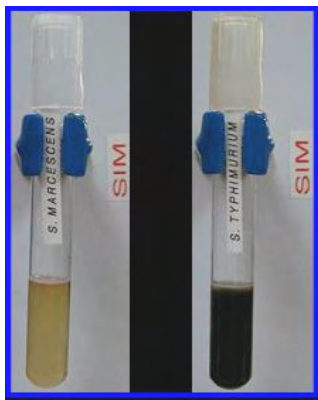


Figura 15. Tubo à esquerda (teste negativo), inoculado com *Serratia marcescens*, tubo à direita (teste positivo), inoculado com *Salmonella typhimurium*.

Fonte: (www.austin.cc.tx.us/microbugz/images/MSA.jpg).

B.8. Produção de indol: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir indol a partir do triptofano. A técnica seguiu o prescrito no manual de PASTEUR (1991), empregando o Caldo de Uréia Indol (**Anexo A – 2.3**). Foram inoculadas colônias puras em 0,5ml do meio e incubadas a 35 – 37⁰ C por até 3 dias. A produção de indol foi revelada pela adição do reativo de Kovacs (**Anexo A – 3.3**). O desenvolvimento de um anel vermelho superior indicou reação positiva de indol.

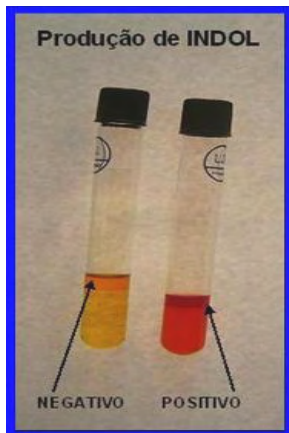


Figura 16. Tubo à esquerda (teste negativo), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Tubo à direita (teste positivo), inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922.

B.9. Produção de lipase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir enzimas lipolíticas e foi realizado de acordo com o método descrito por NASH & KRENZ (1991). O meio de cultura utilizado foi AN adicionado de 1% de tween 80, em placa de Petri. A inoculação da bactéria foi realizada com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante da placa do meio de cultura. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 1 semana. A formação de um halo opaco ao redor do crescimento bacteriano indicou reação positiva.

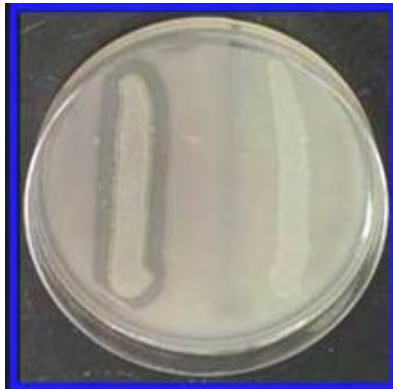


Figura 17. Reação à esquerda (teste positivo), inoculado com *pseudomonas aeruginosa*, reação à direita (teste negativo), inoculado com *Salmonella typhimurium*.

Fonte: (www.austin.cc.tx.us/microbugz/images/MSA.jpg).

B.10. Produção de Nitrato redutase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo reduzir o nitrato em nitritos ou em nitrogênio livre e foi realizado de acordo com McFADDIN (2000). O meio de cultura utilizado foi o Heart Infusion (HI caldo) com 0,2% de nitrato de potássio. A inoculação da bactéria foi realizada em tubo contendo 3 mL do meio de cultura e a incubação a 35 – 37⁰ C por até 5 dias. Adicionou-se ao cultivo bacteriano, 0,5 mL dos respectivos reativos: “A” e “B” (**Anexo A 3.2**). O desenvolvimento de cor vermelha indicou reação positiva. Na seqüência foi adicionado o zinco em pó (aproximadamente 20mg), nos tubos inalterados, o desenvolvimento de cor vermelha, indicou reação negativa e a permanência do tubo inalterado indicou reação positiva.

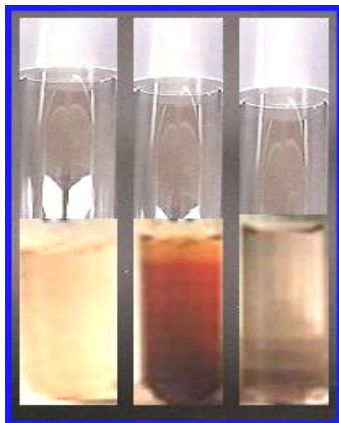


Figura 18. Reação positiva (tubo central), inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922. Nos tubos inalterados com a adição dos reativos adicionou-se sulfato de zinco: (tubo da esquerda), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939, o desenvolvimento de cor vermelha indicou reação negativa; (tubo da direita), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 permaneceu inalterado indicou reação positiva

B.11. Produção de Oxidase: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir enzimas oxidases e foi realizado de acordo com McFADDIN (2000), pelo método indireto de Kovacs. Sobre papel de filtro impregnado com solução aquosa a 1% de oxalato de p-aminodimetilanilina (Difco) e com o auxílio de material não oxidável (alça de plástico) promoveu-se o atrito de colônias com o reativo. O desenvolvimento de cor vermelha indicou reação positiva.

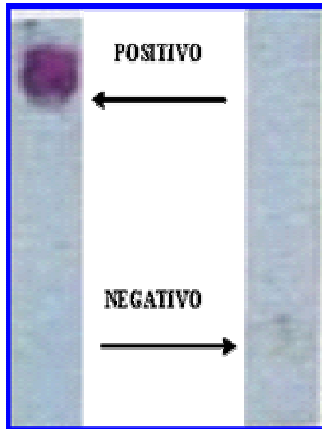


Figura 19. Reação à esquerda (teste positivo), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, reação à direita (teste negativo), inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922.

B.12. Produção de urease em meio inclinado de Christensen: o teste determinou a capacidade de um micro-organismo produzir uréase e foi realizado de acordo com Nash & Krenz (1991). O meio de cultura utilizado foi “Urea agar base, Christensen” (Difco) com 20% de solução de uréia esterilizada por filtração. O inóculo da bactéria foi realizado em tubos contendo 3 mL do meio de cultura inclinado e a incubação feita a 35 – 37⁰ C por até 14 dias. O desenvolvimento de cor vermelho indicou produção de urease.

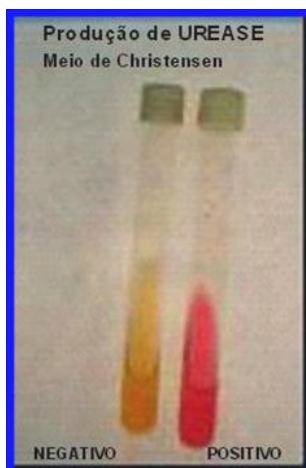


Figura 20. Tubo à esquerda (teste negativo), inoculado com *Escherichia coli* ATCC 25922, tubo à direita (teste positivo), inoculado com um isolado suspeito de *Rhodococcus* sp. O microrganismo em degradar a uréia pela ação da enzima uréase, formando duas moléculas de amônia, resultando na alcalinidade do meio.

B.13. Utilização do Acetato: o teste determinou a capacidade do micro-organismo utilizar o acetato de sódio como única fonte carbono para o metabolismo, provocando alcalinidade e foi realizado de acordo com McFADDIN (2000). O meio de cultura utilizado foi “Acetate agar” (Difco). O inóculo foi realizado com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico na superfície do meio de cultura. A incubação foi a 35 - 37⁰ C por até 5 dias. O desenvolvimento de cor azul intensa indicou reação positiva.



Figura 21. Tubo à esquerda (teste negativo), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939, tubo à direita (teste positivo), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B.14. Utilização do Citrato: o teste determinou a capacidade do micro-organismo utilizar citrato de sódio como única fonte carbono para o metabolismo, provocando alcalinidade e foi realizado de acordo com McFADDIN (2000). O meio de cultura utilizado foi “Simmons citrate agar” (Difco). O inóculo foi realizado com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico na superfície do meio de cultura. A incubação foi a 35 - 37⁰ C por até 5 dias. O desenvolvimento de cor azul intensa indicou reação positiva.

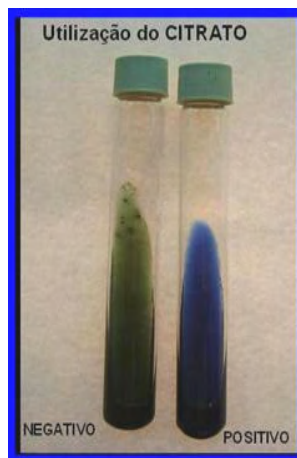


Figura 22. Tubo à esquerda (teste negativo), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939. Tubo à direita (teste positivo), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B.15. Utilização de Malonato: o teste determinou a capacidade do micro-organismo utilizar malonato de sódio como única fonte de carbono para o metabolismo, provocando alcalinidade e foi realizado de acordo com McFADDIN (2000). O meio de cultura utilizado foi caldo de malonato (Difco). O inóculo foi realizado com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico na superfície do meio de cultura. A incubação foi a 35 - 37⁰ C por até 5 dias. O desenvolvimento de cor azul intensa indicou reação positiva.



Figura 23. Tubo à esquerda (negativo), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939. Tubo à direita (positivo), inoculado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

B.16. Hidrólise da Esculina: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir esculinase, hidrolisando o glicosídeo esculina para esculetina e glicose e foi realizado de acordo com o método descrito por Nash & Krenz (1991). O meio de cultura utilizado foi “Esculin agar” (Difco) em tubo (12 X 120mm) inclinado. O inóculo foi realizado com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico na superfície do meio de cultura. A incubação foi a 35 - 37⁰ C por até 4 semanas. O desenvolvimento de cor negra indicou reação positiva.

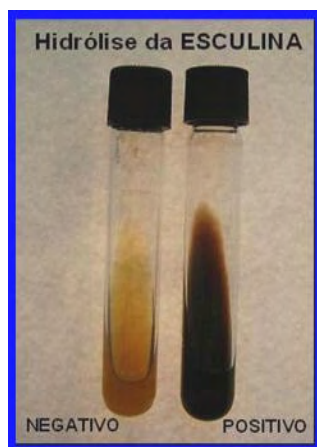


Figura 24. Tubo à esquerda (negativo), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939. Tubo à direita (positivo), inoculado com *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

B.17. Hidrólise do Hipurato: o teste determinou a capacidade do micro-organismo produzir enzimas que hidrolisam o hipurato de sódio, tendo glicina como um dos produtos finais, o que é detectado pela adição de ninhidrina, formando coloração azul. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por NASH & KRENZ (1991). O meio de cultura utilizado foi o HI adicionado de 1% de hipurato de sódio, em tubos (12 X 120mm) com 0,5 mL. A inoculação da bactéria foi realizada com uma gota de suspensão bacteriana em soro fisiológico no meio de cultura. A incubação foi a 35 - 37⁰ C por até 4 dias. Nos tubos testes apresentando turvação dentro do tempo de incubação estabelecido, foram adicionados 0,2 mL de solução alcoólica de Ninhidrina a 1%. Os tubos foram mantidos em banho Maria a 37°C por 1 hora. Aqueles que apresentaram coloração azul foram considerados positivos.

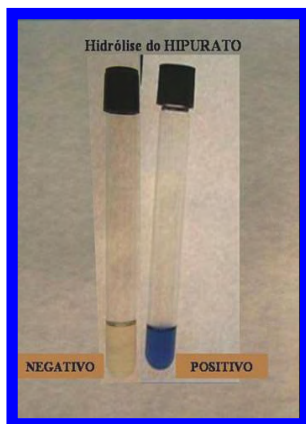


Figura 25. Tubo à esquerda (negativo), inoculado com *Rhodococcus equi* ATCC 6939. Tubo à direita (positivo), inoculado com isolado suspeito de *Rhodococcus* sp.

B.18. Oxidação/Fermentação da Glicose: o teste determinou a capacidade do micro-organismo utilizar um hidrato de carbono, oxidando ou fermentando, especialmente a glicose, indicando se este é aeróbio estrito ou anaeróbio facultativo. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por Nash & Krenz (1991). O meio de cultura utilizado foi “OF basal medium” (Difco) adicionado com 1 % de glicose. O inóculo foi realizado em dois tubos (12 X 120 mm) contendo 5ml do meio de cultura. Um dos tubos foi selado com óleo mineral estéril e a incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 15 dias. O desenvolvimento de cor amarela indicou reação positiva, considerando fermentação no tubo selado e oxidação no tubo normal.

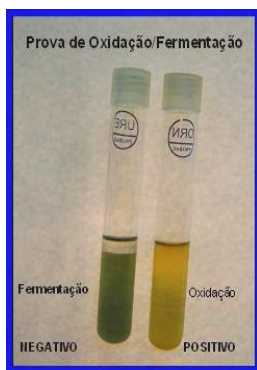


Figura 26. Tubo à esquerda (negativo), tubo à direita (positivo), ambos inoculados com *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

B.19. Motilidade: Esse teste determina se o microrganismo apresenta motilidade em meio semi-sólido devido à presença de flagelos. A bactéria móvel migra da picada e se difunde no meio causando turbidez e a bactéria não móvel mostra crescimento confinado à linha da picada. O teste foi realizado de acordo com o método descrito por Koneman et al., (1993) utilizando o meio de cultura “Motility basal medium” (Difco). O inóculo da bactéria foi realizado com agulha bacteriológica em tubo (12 X 120 mm) contendo 5ml do meio de cultura, espetando até à metade. A incubação foi a 35 – 37⁰ C por até 5 dias. O desenvolvimento de turbidez no tubo indicou motilidade positiva.

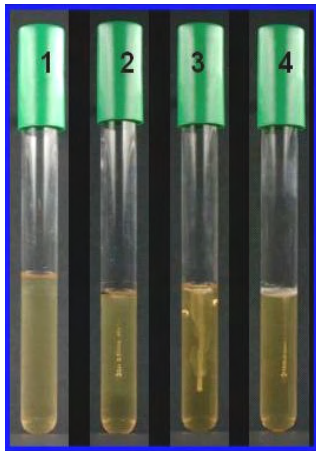


Figura 27. Tubo 1: meio não inoculado; tubo 2: inoculado com *Shewanella* sp (positivo); tubo 3: inoculado com *Acinetobacter* sp (negativo); tubo 4: inoculado com *Klebsiella* sp (negativo).
Fonte: © Dept. of Vet. Microbiology, KVL, Denmark, 2000.

B.20. Produção do fator *equi* ou enzima Cholesterol Oxidase (Teste de CAMP)

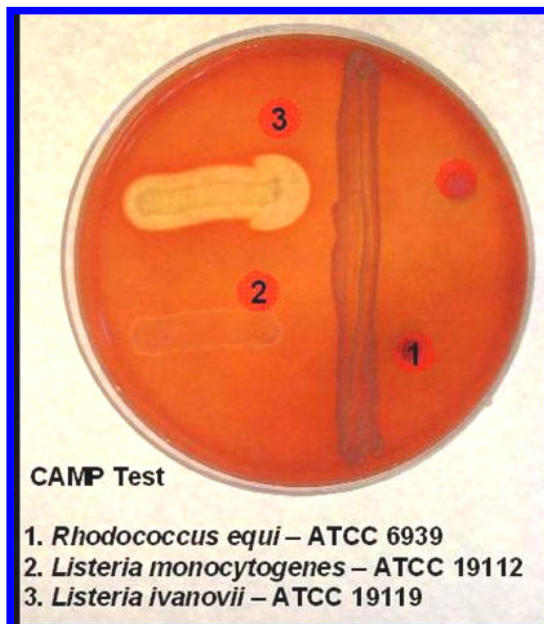


Figura 28. O teste determinou os isolados bacterianos produtores da enzima *Cholesterol Oxidase*, a qual em *Rhodococcus equi* é codificada pelo gene *choE*, interagindo com a enzima esfingomielinase C, produzida pela *Listeria ivanovii*, formando uma área de hemólise completa, no Ágar MH com 5% de sangue desfibrinado, de carneiro, numa configuração de ponta de flecha ou pá.

B.21. Decomposição de adenina, hipoxantina, tirosina e xantina: A habilidade dos actinomicetos aeróbios para decompor ou não estes substratos, continua sendo um dos maiores e mais aceitos critérios para a tentativa de identificação de espécies. Os testes foram realizados de acordo com os métodos descritos por Brown et al., (1999). O meio de cultura utilizado foi “Nutrient agar” (Difco) adicionado de 0,4g % dos respectivos substratos em placa de Petri. O inóculo da bactéria foi realizado com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante das placas dos meios de cultura. A incubação foi a 35⁰ C (ou em temperatura ambiente se não houvesse crescimento satisfatório a 35⁰ C), por até 4 semanas. O aparecimento de área clara ao redor do crescimento bacteriano indicou teste positivo.

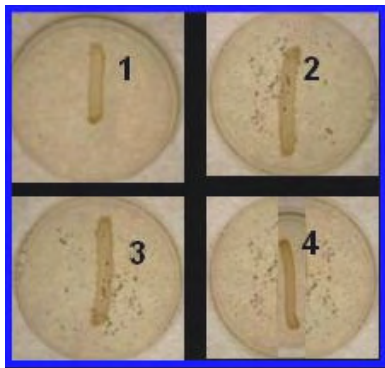


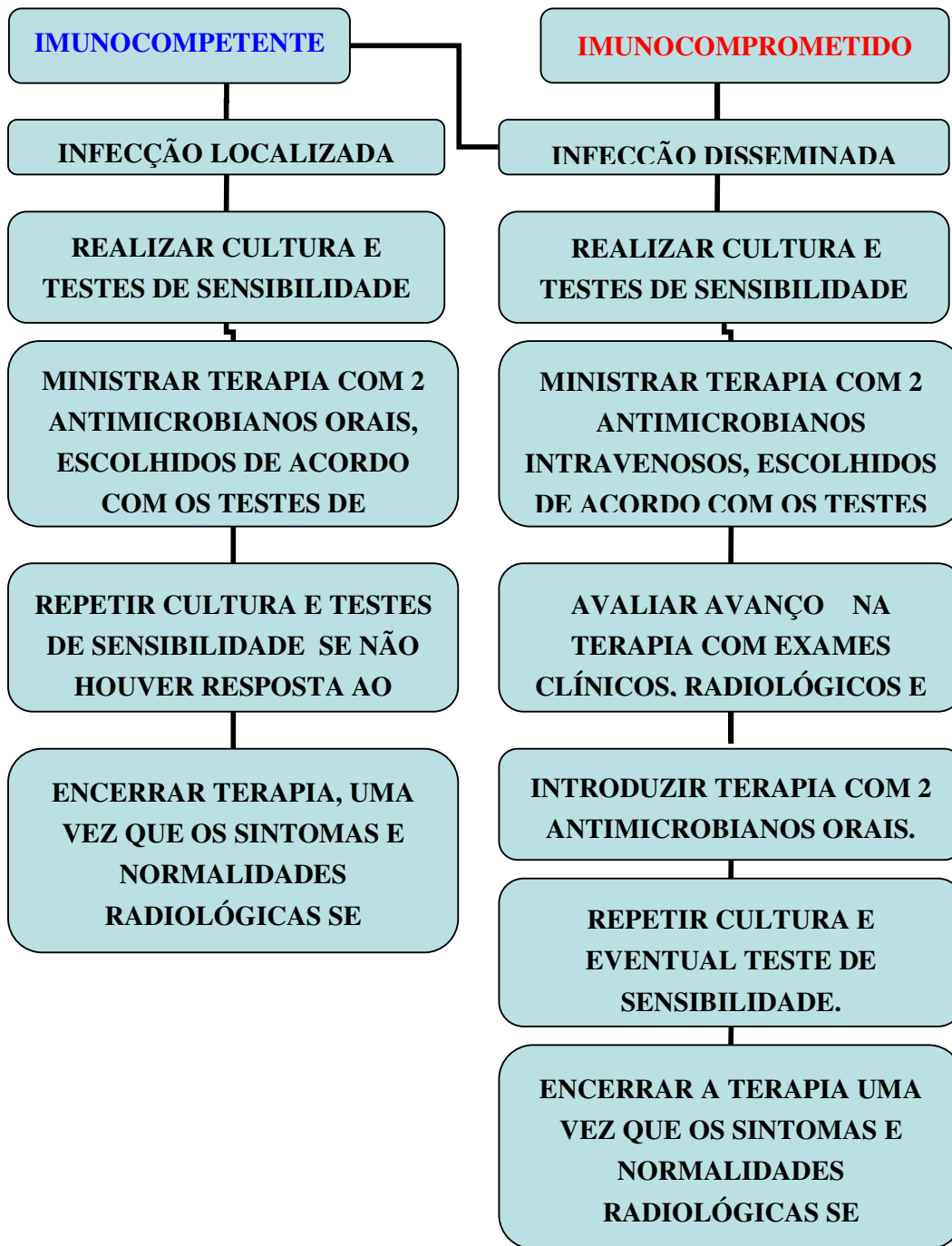
Figura 29. Placa 1 (adenina) teste positivo= Ausência de precipitado no ágar; placa 2 (hipoxantina); placa 3 (tirosina); placa 4 (xantina) testes negativos= Presença de precipitado no ágar. Inoculo com *Rhodococcus equi* ATCC 6939.

B.22. Produção de casease: o teste determinou a capacidade do micro-organismo decompor a caseína e foi realizado de acordo com o método descrito por Brown et al., (1999). O meio de cultura utilizado seguiu formulação (ANEXO A – 2.4). O inóculo da bactéria foi realizado com alça bacteriológica, traçando uma estria reta em um quadrante da placa do meio de cultura. A incubação foi a 35⁰ C (ou em temperatura ambiente se não houvesse crescimento satisfatório a 35⁰ C), por até 4 semanas. O aparecimento de área clara ao redor do crescimento bacteriano indicou teste positivo.



Figura 30. Teste positivo, presença de halo ao redor do crescimento bacteriano.

Fonte: (www.austin.cc.tx.us/microbugz/images/MSA.jpg)



B.23. Figura 31*. Direcionamento terapêutico proposto para o tratamento de infecções por *Rhodococcus equi*. A antibioticoterapia intravenosa é, geralmente, indicada para tratamento inicial, exceto nos casos de infecções localizadas em hospedeiros imunocompetentes. Os agentes antimicrobianos são taxados como “preferidos” ou “alternativos” com base nas suas atividades *in vitro*, resultados de estudos em animais, experiências clínicas e relatos de caso publicados.

*Adaptado de WEINSTOCK & BROWN. *Rhodococcus equi*: An Emerging Pathogen. Clinical Infectious Diseases 2002; 34:1379–85.



B.24. Figura 32. Esquema das técnicas laboratoriais de baciloscopia e cultura de escarro.

SISTEMA MB-Bact



Frascos com meio de cultura para o desenvolvimento do mtb.



- O desenvolvimento bacteriano consome O_2 e gera CO_2 .
- Um jato de luz se reflete sobre uma membrana fixa no fundo do frasco de cultivo que muda de cor, de acordo com o teor de CO_2 no frasco.



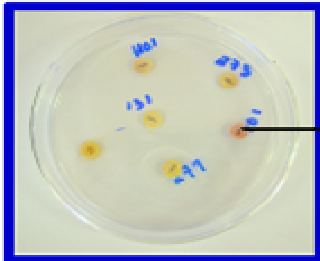
B.25. Figura 33. Esquema do sistema automatizado.



B.26. Figura 34. Esquema da investigação de BAAR a partir do sistema automatizado.

Método cromogênico: utilizado na detecção de enzimas mediadoras de resistência.

Teste da β -lactamase (Nitrocefina)



Beta-lactamase positiva: teste direto no disco impregnado com nitrocefina. Nota-se a mudança de cor do disco, de amarela para vermelha.

B.27. Figura 35. Esquema da investigação de Beta-lactamase (nitrocefina).

ANEXO C

C.1. PROTOCOLO: Análise do Ácido Micólico em Actinomicetos

1. Obtenção da massa bacteriana

-Semear o isolado bacteriano em MH ágar e manter as culturas em temperatura ambiente até que haja crescimento satisfatório (até ± 7 dias).

2. Extração de micolatos

-Preparar suspensões bacterianas densas (5 a 30 mg de bactérias) em tubos 13X100mm com tampa de rosca, contendo 1 mL de metanol/tolueno/ácido sulfúrico (30/15/1).

-Manter os tubos a 75°C entre 10 a 12 horas, para extração do micolato de metil éster.

-Deixar os tubos para resfriar em temperatura ambiente, a seguir, adiciona 1 mL de hexano.

-Agitar os tubos (vortex), deixando-os em repouso para a formação de duas camadas.

-Transferir 0,5 mL da camada superior contendo ácido micólico, para outros tubos, os quais devem ser mantidos a 45°C para evaporação do hexano.

3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

-Preparar a placa de (Merck; Silicagel 60F254), traçando duas retas paralelas 2 cm distantes da parte distal, para determinação das partes inferior e superior.

-Dissolver o resíduo em 40 μ L de hexano e aplicar na parte inferior da placa, com uma pipeta capilar, em linha reta com intervalos de $\pm 1,3$ cm, para a formação de cromatograma.

-A placa é colocada numa cuba de vidro (22 x 22 x 10 cm), com 100 mL de hexano/éter dietílico (8/2) utilizado como solvente.

-A CCD ascendente desenvolve-se no período de $\pm 1/2$ hora no solvente

-Assim que o solvente ascender até atingir a reta superior, a placa é retirada da cuba e deixada a secar ao ar.

-A detecção dos cromatogramas é realizada por meio da pulverização da placa com solução etanólica de rodamina a 10% e aquecimento a 120°C, durante 5 minutos.

-Devem ser utilizadas cepas de referência representantes dos grupos (*Corynebacterium*; *Mycobacterium*; *Nocardia*; *Rhodococcus*; *Tsukamurella*; *Gordonia*).

O resultado da análise de detecção do ácido micólico é mostrado na **Figura 36**.

-O ácido micólico de *Mycobacterium* e *Tsukamurella* apresenta valores de Rf mais elevados do que de outras espécies.

-O ácido micólico de *Gordonia*, *Nocardia* e *Rhodococcus* apresenta valores de Rf inferiores ao de *Mycobacterium* e os valores Rf dessas três espécies anteriores são iguais.

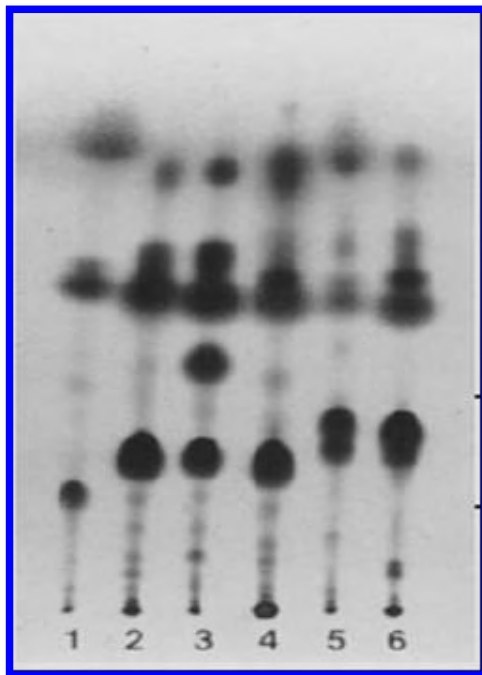
-O ácido micólico de *Corynebacterium* apresenta o valor de Rf mais baixo de todas.

-A análise do ácido micótico divide essas bactérias em três grupos:

Grupo 1: *Tsukamurella* e *Mycobacterium*

Grupo 2: *Nocardia*, *Gordonia* e *Rhodococcus*

Grupo 3: *Corynebacterium*.



1- *Corynebacterium*, 2- *Gordonia*
3- *Rhodococcus*, 4- *Nocardia*,
5- *Tsukamurella*, 6- *Mycobacterium*.

Figura 36. Adaptado de: MIYAJI et al., (2002). Fungos patogênicos. Guia prático de laboratório. Capítulo 8. Actinomicetos. Pg 65.

ANEXO D**D.1. PROTOCOLO: PCR PARA *Rhodococcus equi***

Primers: específicos para *Rhodococcus equi*.

COX-F (5'-GTCAACAACATCGACCAGGCG), correspondendo às posições 1221 a 1241 (forward primer) e COX-R (5'-CGAGCCGTCCACGACGTACAG), complementar a seqüência, estendendo as posições 2160 a 2180 (reverse primer), (coordenadas de acordo com a seqüência de “*choE* region” depositado no “EMBL data bank” sob o no. AJ242746 de acesso). Produto amplificado de 959 bp.

1. Obtenção do DNA genômico: procedimento da termólise, segundo TELENTI et al. (1997), com modificações. A partir de colônias isoladas e recém cultivadas.

- Fazer suspensão bacteriana (forte) em 300 µL de tampão (TE) em tubo de 2,5mL.
- Ferver a suspensão bacteriana por 10 minutos.
- Congelar (-20°C ou -70°C) por 20 minutos.
- Repetir os procedimentos de fervura e congelamento.
- Deixar estabilizar em temperatura ambiente

2. Extração e Purificação de DNA: procedimentos determinados por Van SOOLINGEN, et al. (1991), com modificações.

- Nos tubos com o DNA genômico, estabilizados em temperatura ambiente, adicionar 600 µL da mistura: fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1).
- Agitar os tubos (vortex) e centrifugar (10.000 g) a 4°C por 30 minutos.
- Deixar os tubos em repouso para a separação das fases formadas, e transferir a fase aquosa para outros tubos e adicionar 600 µL da mistura: clorofórmio/álcool isoamílico (24:1).
- Agitar os tubos, centrifugar (10.000 g) em temperatura ambiente por 5 minutos, deixar em repouso para a separação das fases formadas, transferir a fase aquosa para outros tubos.
- Repetir o procedimento, transferindo a fase aquosa para outros tubos.
- Adicionar 300 µL de etanol absoluto para a precipitação do DNA e centrifugar os tubos (12.000 g) a 4°C por 20 minutos, desprezando o sobrenadante.
- Lavar o sedimento com 500 µL de etanol a 70% (diluído em TE previamente mantido a -20°C pelo ao menos por 18 horas). Centrifugar (12.000 RPM) a 4°C por 20 minutos e desprezar o sobrenadante (vertendo o tubo cuidadosamente) e repetir o procedimento.
- Centrifugar os tubos (12.000 RPM) a 4°C por 20 minutos e desprezar o sobrenadante (vertendo o tubo cuidadosamente) e repetir o procedimento.

- Manter os tubos invertidos (sobre papel toalha) até secagem total.
- Adicionar 50 μL de TE pH 8, homogeneizar, com muito cuidado esfregando a ponta da ponteira, delicadamente, na parede do fundo do tubo, para o desprendimento do DNA.

Manter os tubos a -20°C até o momento da utilização (10 μL da amostra para PCR).

3. Amplificação do gene *choE*

- Adicionar em um tubo para PCR: 2,5 μL de 10 X PCR buffer; 0,75 μL de 10 mM deoxynucleoside triphosphate (dntp); 0,75 μL de 50 mM MgCl_2 ; 0,5 μL de “*Taq* DNA polymerase”, 1 μL (40 pmol) de cada primer; 10 μL de “DNA template”; 8,5 μL de água milli Q (volume final de 25 μL).

-No termociclador (PTC-100, MJ Research), as ciclagens devem ser: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos. Corrida através de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto. Anelamento a 55°C for 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Extensão final com incubação a 72°C por 10 minutos.

-Manter as misturas a 4°C até serem analisadas.

4. Detecção do gene *choE*

-Após a amplificação, 25 μL do produto amplificado são submetidos a eletroforese horizontal por 2 horas, em géis de agarose a 2% e 0,5 mg de brometo de etídio por mL, empregando tampão TAE (40 mM Tris-acetate, 2 mM Na₂ EDTA; 2H₂O) e corrente elétrica de 100 V.

-Fragmentos de 959pb correspondentes ao produto de amplificação do gene *ChoE*, indicativos do *R. equi* devem ser fotodocumentados.

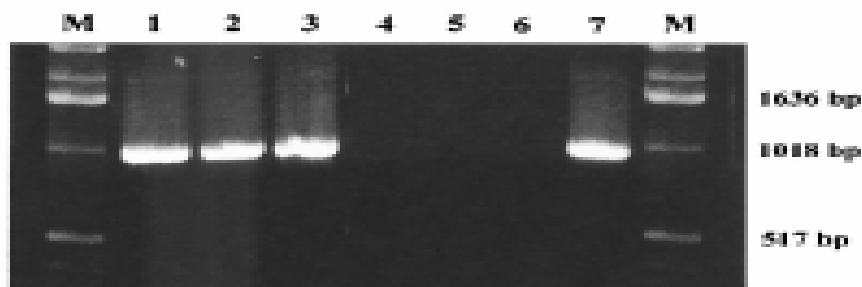


Figura 37. representa os produtos de amplificação do gene *choE* (PCR) – obtido de amostras de DNA genômico de *R. equi*. Linhas: 1, isolado 103; 2, ATCC 6939; 3, isolado 70; 4, isolado 11; 5, isolado 20; 6, isolado 21; 7, *Brevibacterium sterolicum* ATCC 21387 (*Rhodococcus equi*); M, marcador de DNA.

Fonte: LADRON et al., J. Clin. Microb. 2003, 41: 3241–3245 - Rapid Identification of *Rhodococcus equi* by a PCR Assay Targeting the *choE* Gene.