

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE *Rhodococcus equi* ISOLADAS
DE LINFONODOS DE SUÍNOS E JAVALIS (*Sus scrofa*) DE
ABATEDOUROS**

ALESSANDRO GUAZZELLI

**Botucatu – SP
junho/ 2009**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**VIRULÊNCIA DE LINHAGENS DE *Rhodococcus equi* ISOLADAS
DE LINFONODOS DE SUÍNOS E JAVALIS (*Sus scrofa*) DE
ABATEDOUROS**

ALESSANDRO GUAZZELLI

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre, junto a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro

Botucatu – SP

junho/ 2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Guazzelli, Alessandro.

Virulência de linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos de suínos e Javalis (*Sus scrofa*) de abatedouros / Alessandro Guazzelli. --
Botucatu : [s.n.], 2009

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009.

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Assunto CAPES: 50502034

1. Suíno - Doenças 2. *Rhodococcus equi* 3. Virulência

CDD 636.40896

Palavras-chave: Fatores de virulência; Javalis; Linfadenite; *Rhodococcus equi*; Suíno

Nome do autor: Alessandro Guazzelli

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro
FMVZ - UNESP, Botucatu-SP
(Orientador)

Prof. Ass. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
FMVZ - UNESP, Botucatu-SP

Prof. Ass. Dr. Rogério Giuffrida
Universidade do Oeste Paulista - UNOESTE,
Presidente Prudente-SP

Data da defesa: 25/06/2009

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais,

minha esposa Sandra

e meus filhos Vinícius e Pedro,

que são,

e sempre serão,

minha fonte maior de inspiração para seguir em frente e vencer desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que guia nosso destino, coloca pessoas especiais e abençoadas em nosso caminho e nos faz tomar as decisões certas;

Agradeço especialmente ao meu orientador, Prof. Dr. Márcio Garcia Ribeiro, que acreditou e me incentivou de maneira grandiosa e me fez ir além das minhas próprias expectativas;

Ao Pós-graduando Gustavo Henrique Batista Lara, pela sua inestimável colaboração no processamento laboratorial das amostras e pela generosidade ao dividir seus conhecimentos;

Ao professor Dr. Shinji Takai da Universidade de Kitasato no Japão, pela disposição em caracterizar o perfil plasmidial das linhagens;

A Profa. Dra. Maria de Lores R. Souza da Cunha, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP e ao Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo por ceder as cepas padrão para realização deste trabalho;

Ao Prof. Ass. Dr. Aristeu Vieira da Silva da Universidade Paranaense-UNIPAR, Umuarama, PR, pelo auxílio no tratamento estatístico dos resultados;

Ao técnico Fernando José Paganini Listoni e a todos os Pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública pela amizade e colaboração nos trabalhos do laboratório;

A todos os professores do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública que, de alguma forma, foram importantes na minha formação acadêmica fornecendo a base humana, científica e ética, que possibilitou trilhar o mestrado de maneira segura e natural.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de 378 linfonodos de suínos e javalis, com e sem linfadenite, colhidos em abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.....26

Tabela 2- Distribuição de linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos submandibulares e mesentéricos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009..... 27

Tabela 3- Multiplicação em meio com restrição de ferro em 23 isolados de *Rhodococcus equi*, identificados em linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009..... 28

Tabela 4- Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em 23 linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009..... 29

Tabela 5- Perfil de virulência plasmidial em 23 isolados de *Rhodococcus equi*, identificados em linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS*

%= porcentagem
 - = negativo
 ®= marca registrada
 µg= micrograma
 µm= micrômetro
 µM= microMolar
 µl= microlitro
 mm= milímetro
 mM= miliMolar
 <= menor
 ≤= menor ou igual
 ≥= maior ou igual
 A= adenina
 ABIECS= Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína
 Aids= Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
 ATCC= American Type Culture Collection
 BHI= ágar infusão cérebro e coração
 C= citosina
 CAMP= Christie, Atkins, Munch e Petersen
 CIM= Concentração Inibitória Mínima
 CLSI= Clinical and Laboratory Standards Institute
 DNA= ácido desoxirribonucléico
 et al.= colaboradores
 EUA= Estados Unidos da América
 G= guanina
 HIV= Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
 IBAMA= Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
 IC= Intervalo de confiança
 kb= kilobases
 kDa= kiloDaltons
 kg= quilograma
 MAA= *Mycobacterium avium* subsp. *avium*
 MAC= Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*
 mCAZ-NB= ágar ceftazidima-novobiocina
 MAPA= Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
 MgCl= cloreto de magnésio
 NANAT= ácido nalidíxico, novobiocina, actidione e telurito de potássio
 °C= grau centígrado
 OPS= Organização Panamericana da Saúde
 P= significância estatística
 PCR= Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia pela Polimerase)
 pH= potencial hidrogeniônico
R. equi= *Rhodococcus equi*
 RIISPOA= Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal
S. aureus= *Staphylococcus aureus*
 sp= espécie
 T= timina
 Vap= Virulence-associated protein
 WHO= World Health Organization (Organização Mundial da Saúde- OMS)

* Em virtude do uso consagrado na literatura, determinadas abreviaturas utilizadas seguem as iniciais da sua grafia no idioma inglês.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 . <i>Rhodococcus equi</i> : Propriedades gerais e fatores de virulência.....	5
2.2. Rodococose nos animais.....	8
2.2.1. Rodococose em suínos.....	11
2.2.2. Rodococose em javalis.....	13
2.3. Rodococose nos humanos.....	14
3. OBJETIVOS.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1. Origem e colheita das amostras.....	20
4.2. Processamento das amostras e caracterização microbiológica de <i>R. equi</i>	20
4.3. Detecção dos fatores de virulência.....	21
4.3.1. Caracterização da presença de hemólise sinérgica (“Fator equi”).....	21
4.3.2. Teste de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos.....	21
4.3.3. Concentração inibitória mínima.....	22
4.3.4. Capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro.....	22

4.3.5. Caracterização de virulência das linhagens utilizando técnicas imunoenzimáticas e moleculares.....	23
4.3.5.1. Técnica Imunoenzimática (Imunobloting)..	23
4.3.5.2. Extração de DNA plasmidial.....	24
4.3.5.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)	24
4.4. Análise estatística.....	25
5. RESULTADOS.....	26
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	39
8. REFERÊNCIAS.....	41
9. ANEXO.....	55
Anexo 1. Cepas de referência de <i>Rhodococcus equi</i> utilizadas como controle-positivas na reação em cadeia pela polimerase, para avaliação do perfil de virulência de linhagens isoladas de suínos e javalis Botucatu, SP, 2009.....	55
10. TRABALHO CIENTÍFICO	

RESUMO

GUZZELLI, A. **Virulência de linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos de suínos e javalis (*Sus scrofa*) de abatedouros**. Botucatu, 2009. 55f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, SP.

A rodococose suína compreende doença infecciosa caracterizada por linfadenites piogranulomatosas. Diferentes fatores de virulência são reconhecidos na patogenicidade de *Rhodococcus equi*. A estrutura da parede celular bacteriana, a viabilidade no interior de fagócitos e na ausência de ferro, a produção de citotoxinas, a resistência aos antimicrobianos convencionais e, recentemente, a presença de proteínas associadas à virulência (Vap) reguladas por plasmídios, são considerados os principais mecanismos de virulência do microrganismo. Diferentes fatores de virulência foram avaliados em 23 (6,1%) linhagens de *R. equi* isoladas de 378 linfonodos submandibulares e mesentéricos de suínos e javalis (*Sus scrofa*). Foram realizados exames microbiológicos em 129 linfonodos apresentando lesões (linfadenite) e 129 sem lesões (controle) de suínos, e 60 linfonodos com lesões e 60 sem lesões de javalis. Dentre as 23 linhagens de *R. equi*, 19 (7,4%) foram isoladas de suínos, das quais 17 obtidas de linfonodos com lesões e duas sem lesões. Das 19 linhagens de suínos, 18 (94,7%) foram obtidos de linfonodos submandibulares e um (5,3%) de mesentérico. As quatro (3,3%) linhagens de *R. equi* isoladas de javalis foram obtidas exclusivamente de linfonodos com lesões. Destes, três foram obtidos de linfonodos submandibulares e um de mesentérico. Dentre nove antimicrobianos testados, azitromicina (100,0%), gentamicina (100,0%), levofloxacina (100,0%), vancomicina (100,0%), amoxicilina/ácido clavulânico (94,7%), eritromicina (94,7%) e rifampicina (94,7%) foram os fármacos mais efetivos. Baixa ocorrência de resistência aos antimicrobianos nos isolados de suínos foi observada contra os fármacos testados. A concentração inibitória mínima (MIC₉₀) da azitromicina, eritromicina e rifampicina foi observada,

respectivamente, em $\leq 2 \mu\text{g/mL}$, $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$ and $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. Todas as linhagens foram positivas para o “Fator equi” ou hemólise sinérgica (Camp-test) com cepa padrão hemolítica de *Staphylococcus aureus*. A multiplicação de *R. equi* em meio com restrição de ferro foi observada em sete (30,4%) linhagens. Destas, seis (31,6%) foram isoladas de suínos e uma (25,0%) de javalis. O perfil de virulência plasmidial das 19 linhagens isoladas de suínos permitiu observar a presença de 12 VapB e sete linhagens avirulentas. Das 12 linhagens VapB obtidas de suínos, oito (66,7%) foram identificadas como tipo 8, duas (16,7%) tipo 10, uma (8,3%) tipo 1 e outra (8,3%) tipo 29. A caracterização de virulência dos plasmídios de javalis revelou quatro linhagens VapB do tipo 8. Os resultados reforçam a alta frequência de linhagens de virulência intermediária identificadas em suínos e javalis, particularmente do tipo 8, semelhante ao perfil de virulência identificado em humanos com rodococose. Os achados alertam para os riscos de transmissão de linhagens VapB isoladas de suínos e javalis para humanos.

Palavras-chave: fatores de virulência; javalis; linfadenite; *Rhodococcus equi*; suíno.

ABSTRACT

GUAZZELLI, A. Virulence of *Rhodococcus equi* strains isolated from lymph nodes of swine and wild boars (*Sus scrofa*) from slaughterhouses. Botucatu, 2009. 55f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP.

The rhodococcosis in swine comprise an infectious disease characterized by pyogranulomatous lymphadenitis. Different virulence factors are recognized in pathogenicity of the *Rhodococcus equi*. The structure of bacterial cell wall, the viability inside of phagocytes and in absence of iron, the production of cytotoxins, the resistance to conventional antimicrobials and recently, the presence of proteins associated to virulence (Vap) regulated by plasmids, are considered the most important virulence mechanisms of microorganism. Different virulence factors were evaluated in 23 (6.1%) *R. equi* strains isolated from 378 submandibular and mesenteric lymph nodes of swine and wild boars (*Sus scrofa*). Microbiological exams were performed in 129 lymph nodes presenting lesions (lymphadenitis) and 129 without lesions (controls) from swine, and 60 lymph nodes with lesions and 60 without lesions from wild boars. Among 23 *R. equi* strains, 19 (7.4%) were isolated from swine and, from these, 17 were obtained from lymph nodes with lesions and two without lesions. From 19 strains isolated from swine, 18 (94.7%) were obtained of submandibular lymph nodes and one (5.3%) from mesenteric. The four (3.3%) *R. equi* strains isolated from wild boars were obtained exclusively of lymph nodes presenting lesions. From these, three were obtained from submandibular lymph nodes and one of mesenteric. Among nine antimicrobials tested, azithromycin (100.0%), gentamicin (100.0%), levofloxacin (100.0%), vancomycin (100.0%), amoxicillin/clavulanic acid (94.7%), erythromycin (94.7%) and rifampin (94.7%) were the most-effective drugs. Low rates of resistance to antimicrobials in swine isolates were observed against drugs tested. The inhibitory minimal concentration of 90% of isolates (MIC₉₀) with use of

azithromycin, erythromycin and rifampin were observed respectively in ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$, ≤ 0.5 $\mu\text{g/mL}$ and ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$. All the strains were positive for “Equi factor” or synergic hemolysis (Camp–test) using hemolytic reference *Staphylococcus aureus* strain. *R. equi* grown under iron restriction conditions was observed in seven (30.4%) out of strains. From these, six (31.6%) were isolated from swine and one (25.0%) of wild boars. The virulence plasmids profile of 19 strains isolated from swine revealed the presence of 12 VapB and seven avirulent strains. From 12 VapB strains obtained of swine, eight (66.7%) were identified as type 8, two (16.7%) type 10, one (8.3%) type 1 and another (8.3%) type 29. The virulence characterization of plasmids identified in wild boars revealed four strains VapB type 8. The results reinforce the high frequency of intermediately virulence strains identified in swine and wild boars, particularly the type 8, similar to virulence profile identified in humans with rhodococcosis. The findings alerts for the risks of transmission of VapB strains isolated from swine and wild boars to humans.

Keywords: virulence factors; wild boars; lymphadenitis; *Rhodococcus equi*; swine.

1. INTRODUÇÃO

A carne suína é o produto de origem animal mais consumido em todo mundo, representando cerca de 50% do consumo global. Em 2007, estimou-se que a produção mundial ultrapassaria os 100 milhões de toneladas (SILVEIRA et al., 2007).

O Brasil possui rebanho suíno destinado ao abate da ordem de 35,5 milhões de cabeças, compreendendo o quarto maior produtor mundial, superado apenas pela China, União Européia e EUA. Em 2007, do efetivo do rebanho nacional, 24,3 milhões de animais foram abatidos sob fiscalização da Inspeção Federal. Estima-se também, que cerca de cinco milhões de suínos são criados de maneira semi-extensiva para subsistência (ABIEPCS, 2009). O grande consumo em todo mundo de produtos de origem animal exige um sistema de vigilância atuante para evitar que doenças que afetam os animais se estabeleçam nas diversas fases da cadeia produtiva, representando riscos ao consumidor. Desta forma, a fiscalização sanitária durante o abate é fundamental na preservação da saúde da população (ROPPE, 2008).

Por questões sócio-econômicas e culturais, o consumo de carne suína “per capita” no Brasil é considerado baixo, em torno de 13,4 kg/ano, notadamente distante do consumo nacional de carne bovina, ao redor de 37 kg/ano, ou de carne de frango, estimado em 38,7 kg/ano. No entanto, entre 2000 e 2008, houve evolução positiva, com crescimento de 34% no consumo de carne suína e derivados (SUINOCULTURA INDUSTRIAL, 2009).

O setor suinícola é importante gerador de divisas ao Brasil. Em 2008 contabilizou a produção de mais de três milhões de toneladas de carne e exportou mais de 500 mil toneladas, atingindo cifra recorde de 1,48 bilhões de dólares em exportações (ABIEPCS, 2009).

A linfadenite infecciosa figura dentre os principais entraves que acometem a suinocultura industrial. A doença provoca graves perdas econômicas aos produtores, decorrente das condenações de carcaças (STRAW, 1999), e oferece riscos à saúde pública, em virtude do potencial zoonótico dos agentes causais, principalmente para pessoas com algum grau de imunossupressão (ACHA & SZYFRES, 2003).

Dentre os vários microrganismos envolvidos na gênese da linfadenite infecciosa em suínos, destacam-se os de origem bacteriana, particularmente *Mycobacterium* sp e *Rhodococcus equi* (*R. equi*) [CORRÊA & CORRÊA, 1992]. Secundariamente, outros microrganismos como *Nocardia asteroides* (QUINN et al., 1994), *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli* e os gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Proteus* e *Klebsiella*, também têm sido identificados, isoladamente ou em associações, na linfadenite suína (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1981; FERREIRA-NETO et al., 1989; PRESCOTT, 1991; ACHA & SZYFRES, 2003; LARA, 2009). Vários autores reforçaram a impossibilidade de se distinguir macroscopicamente na inspeção *post-mortem* ao abate, as lesões granulomatosas ou piogranulomatosas determinadas por estes microrganismos, também denominadas “tuberculóides” (OLIVEIRA et al., 1995; BALIAN, 1997; STRAW et al., 1999).

As micobactérias e os gêneros *Nocardia* e *Rhodococcus* pertencem ao grupo dos actinomicetos. Possuem em comum a presença de lipídios e ácido micólico na composição da parede celular, que induz a formação de lesões crônicas (pio)granulomatosas, de difícil resolução tecidual (CORRÊA & CORRÊA, 1992; RADOSTITS et al., 2007).

R. equi causa severa afecção pulmonar e entérica em potros (RIBEIRO et al., 2005). Magnusson em 1923, na Suécia, isolou pela primeira vez o patógeno em caso de broncopneumonia abscedante em potro. O microrganismo é considerado a causa mais preocupante de morbimortalidade em potros entre 1 a 6 meses de idade (GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997). A alta infecciosidade e patogenicidade da bactéria é creditada à elevada sobrevivência e multiplicação no meio ambiente, e pela presença de diferentes propriedades de virulência, incluindo a produção de exoenzimas (fosfolipase C, colesterol oxidase), resistência aos antimicrobianos convencionais e constituição lipídica da parede bacteriana (PRESCOTT, 1991).

R. equi possui distribuição cosmopolita, e manifesta-se predominantemente em condições debilitantes do hospedeiro, considerado, portanto, microrganismo de comportamento oportunista (PRESCOTT, 1991; GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997).

O reconhecimento de antígenos e plasmídios de virulência (VAPs) redirecionou os estudos com o microrganismo. A classificação das linhagens em virulentas (VapA), de virulência intermediária (VapB) e avirulentas permitiu avanços no entendimento da epidemiologia, patogenia e controle da doença em animais e humanos (TAKAI, et al., 1991; TAKAI, 1997). As linhagens virulentas (VapA) são encontradas primordialmente em potros com pneumonia e secundariamente em humanos, enquanto as linhagens de virulência intermediária (VapB) são frequentemente isoladas de suínos e humanos. Estirpes avirulentas são encontradas no solo e nas fezes dos animais domésticos e, eventualmente, na rodococose em humanos (HINES, et al., 1997; TAKAI, 1997).

A notificação da rodococose em humanos é crescente em vários países, particularmente em indivíduos co-infectados com o vírus da Aids (RIBEIRO et al., 2001).

Curiosamente, as linhagens de *R. equi* isoladas de suínos são similares às encontradas em pacientes portadores do vírus da Aids. Entretanto, não está completamente esclarecido o papel epidemiológico dos suínos como fontes de infecção ou na via de transmissão da rodococose para humanos e outros animais. Prescott (1991) considera os suínos como reservatórios do microrganismo. Ademais, as lesões em linfonodos de suínos provocadas por estirpes de *R. equi* são indistinguíveis macroscopicamente na linha de abate das lesões determinadas pelo gênero *Mycobacterium* (TAKAI, 1997).

No Brasil, foram introduzidas criações comerciais de javali (*Sus scrofa*) nas últimas décadas, cuja autorização e monitoramento dos criatórios estão sob a responsabilidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA (IBAMA, 2008). Os animais são criados em sistema semi-extensivo, cuja alimentação assemelha-se à encontrada em animais de vida livre, a base de folhagens e tubérculos. No entanto, são escassas as informações no país sobre a susceptibilidade do javali às doenças infecciosas, incluindo a rodococose.

O aumento do registro de casos de rodococose em humanos levou ao reconhecimento da doença como emergente (MOSSER & HONDALUS, 1996; LINDER, 1997; MAKRAI et al., 2000). As infecções por *R. equi* em humanos são descritas em indivíduos severamente comprometidos, incluindo

transplantados, acometidos por neoplasias, doenças debilitantes e, especialmente, pacientes infectados pelo vírus da Aids (ACHA & SZYFRES, 2003). O Programa das Nações Unidas sobre HIV/Aids, estimou que 33,2 milhões de pessoas no mundo são portadoras do vírus, dos quais 1,6 milhões habitam na América Latina (World Health Organization-WHO, 2007). No Brasil foram confirmados 474.273 casos de Aids entre 1980 e 2007. Destes, 289.074 pertencem à região sudeste do país (BRASIL, 2007).

Os mecanismos de transmissão de *R. equi* para os humanos permanecem controversos. Possivelmente a veiculação do microrganismo para os humanos decorre do contato direto com animais ou ambiente dos criatórios, pela inalação de aerossóis, ou secundária às lesões transcutâneas (PRESCOTT, 1991; ADAL et al., 1995; STRAW et al., 1999). Tem-se constatado que número considerável de pacientes com rodococose – acometidos ou não pelo vírus da Aids –, possui histórico de contato com animais domésticos, aventando-se que esse estreitamento possa favorecer a transmissão de linhagens virulentas de *R. equi* dos animais e/ou do ambiente para os humanos (DOIG et al., 1991; PRESCOTT, 1991; MOSSER & HONDALUS, 1996; LINDER, 1997; MAKRAI et al., 2000; TAKAI et al., 2002).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Rhodococcus equi*: Propriedades gerais e fatores de virulência

O microrganismo denominado até 1977 como *Corynebacterium equi* foi re-classificado taxonomicamente e, atualmente, é conhecido como *Rhodococcus equi* (KRIEG & HOLT, 1984).

O gênero *Rhodococcus* pertence à ordem *Actinomycetales*, família *Nocardiaceae* (EUZÉBY, 2005). O microrganismo apresenta-se como coco-bacilo ou pleomórfico, Gram-positivo, imóvel, com 1 a 5 µm (BERTONE, 2000). No primo-isolamento no meio de ágar-sangue, a 37°C, em condições de aerobiose, as colônias mostram-se pequenas, lisas e brilhantes. A partir de 72 horas, apresentam 1mm de diâmetro, são coalescentes, mucóides e assumem coloração rosa-salmão (QUINN, 1994; RIBEIRO et al., 2002). *R. equi* possui considerável resistência a determinados produtos químicos, mantendo-se viável na presença do ácido oxálico a 2,5%, ácido sulfúrico a 5% e hidróxido de sódio a 0,5%, por períodos de 15 a 60 minutos (STRAW et al., 1999; HIRSH & ZEE, 2003).

As linhagens de *R. equi* são catalase-positivas e pouco exigentes bioquimicamente, reduzindo nitrato e uréia. Caracteristicamente mostram fenômeno de sinergismo de efeito hemolítico (teste de Camp positivo), também denominado “fator equi”, decorrente da interação de exoenzimas (colesterol oxidase e fosfolipase C) e hemolisinas de bactérias como *Staphylococcus aureus*. O efeito da hemólise sinérgica mostra “in vitro” a formação de “ponta de seta” no meio de ágar-sangue. A produção de hemólise é reconhecida como fator de virulência - mediante a captação do íon ferro que é elemento essencial no metabolismo bacteriano - e também é utilizada na confirmação diagnóstica de linhagens de *R. equi* isoladas dos animais e de humanos (PRESCOTT, 1991; QUINN et al., 1994; KOWALSKI, 2000; RIBEIRO et al., 2002).

O reconhecimento recente de antígenos e plasmídios virulentos permitiu grandes avanços no estudo do microrganismo. Takai (1997) descreveu que os plasmídios associados à virulência (Vaps) podem ser divididos em três níveis: virulentos (VapA), intermediários (VapB) e avirulentos. As estirpes virulentas

contém plasmídios de 80-90kb e possuem genes responsáveis pela expressão de antígenos

de 15 a 17kDa, chamados VapA (virulence-associated proteins). As linhagens VapA são isoladas predominantemente de potros com pneumonia e menos frequentemente de humanos (HINES et al., 1997; TAKAI, 1997).

São descritos 11 tipos de plasmídios virulentos encontrados principalmente em equinos: 85kb tipos I–IV, 87kb tipo I-II e 90kb tipos I-V. No entanto, diferentes autores têm registrado novas variantes ou tipos em linhagens isoladas de animais (TAKAI et al., 1997; RIBEIRO et al., 2005). Os 11 tipos de plasmídios virulentos (VapA) possuem distribuição distinta nos diferentes países e continentes. Na América do Sul, Austrália e Europa predominam os tipos 85kb tipo I e 87kb tipo I. O plasmídio de 85kb tipo II é encontrado exclusivamente na França e 85kb tipo III e IV nos EUA, especificamente no estado do Texas. Os plasmídios 87kb tipo II e 90kb tipos I a IV foram detectados somente no Japão (TKACHUK–SAAD & PRESCOTT, 1991; TAKAI et al., 1999; BECU et al., 2000; TAKAI et al., 2001a; TAKAI et al., 2001b; MAKRAI et al., 2002; YUYAMA et al., 2002).

Estirpes de virulência intermediária contém plasmídios de 79-100kb que detêm genes que expressam antígenos de 20kDa denominados VapB. Linhagens produtoras de VapB são encontradas com maior frequência em linfonodos de suínos e em pacientes humanos infectados pelo vírus da Aids (TAKAI, 1997).

Há pelo menos 24 tipos de plasmídios de virulência intermediária (VapB) encontrados em linhagens de origem suína e em humanos (TAKAI, et al., 1996a; TAKAI et al., 2001a, TAKAI et al., 2001b; MAKRAI et al., 2005; MAKRAI et al., 2008). Recentemente sugere-se a inclusão de três novos tipos denominados 25, 26 e 27 encontrados em linfonodos submandibulares de javalis (MAKRAI et al., 2008).

Na Hungria tem-se demonstrado o predomínio de linhagens VapB do tipo 5 em isolados de linfonodos submandibulares de suínos (MAKRAI et al., 2002; MAKRAI et al., 2005; MAKRAI et al., 2008).

As estirpes avirulentas são desprovidas de plasmídios e antígenos virulentos. São comumente encontradas no solo de criatórios e nas fezes de

animais domésticos (TAKAI, 1997). Ademais, são isoladas de pacientes humanos com rodococose, com ou sem imunossupressão (LINDER, 1997).

R. equi possui diferentes mecanismos de evasão do sistema imune, que permitem a sua localização intracelular e multiplicação no interior de fagócitos (neutrófilos e macrófagos). Dentre as estruturas bacterianas responsáveis pela patogenicidade do microrganismo merecem destaque a cápsula polissacarídica, o ácido micólico da parede celular, e as enzimas colesterol oxidase e fosfolipase C, que dificultam o mecanismo convencional de resposta imune contra infecções por *R. equi* (ZINK et al., 1986; QUINN et al., 1994; HIRSH & ZEE, 2003).

Nos animais e humanos, a partir da infecção oral, aerógena, genital, mamária e/ou transcutânea o microrganismo é ativamente fagocitado por neutrófilos e macrófagos (PRESCOTT, 1991). A bactéria geralmente é opsonizada, e sofre ação dos componentes do sistema complemento (HIRSH & ZEE, 2003). A manutenção intracelular de *R. equi* em macrófagos é considerada um dos principais mecanismos de patogenicidade do organismo. A supressão da formação do fagolisossomo e da inativação do microrganismo determinam a manutenção do processo infeccioso e o estabelecimento de reações piogranulomatosas, com a formação de múltiplos abscessos nos órgãos e tecidos, comumente tendendo à cronicidade. À microscopia, predominam nesses locais grandes contingentes de macrófagos modulados em células epitelióides e, secundariamente, neutrófilos, plasmócitos e células gigantes (HIRSH & ZEE, 2003), com centro contendo áreas caseosas e o agente circundado por cápsula fibrosa, cuja estrutura é similar as reações granulomatosas encontradas nas infecções pelo gênero *Mycobacterium* (BERTONE, 2000). Em virtude da localização intracelular do microrganismo, a resposta mediada por células é considerada mais efetiva do que a humoral na imunidade contra o microrganismo (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

Assumia-se nas últimas décadas que a ação conjunta das propriedades anti-fagocíticas capsulares, da presença do ácido micólico e da produção de citolisinas (fosfolipase C e colesterol oxidase), seriam suficientes para determinar a virulência e a severidade das infecções pelo microrganismo. Entretanto, a identificação recente dos plasmídios associados à virulência de *R. equi*, direcionaram os estudos para estes marcadores de virulência em

linhagens isoladas de humanos e animais. Postula-se que estirpes dotadas de antígenos de virulência codificados por plasmídios – especialmente de 15–17kDa – possuem maior habilidade em manterem-se viáveis no interior de macrófagos, resistindo à fagocitose (LAZZARI et al., 1997).

Na rodococose em suínos a infecção fica geralmente restrita aos linfonodos. No entanto, permanece controversa a patogenicidade de *R. equi* nesta espécie, em face da reduzida progressividade do agente (MAKRAI et al., 2002). Comumente são acometidos os linfonodos submandibulares e, secundariamente, mediastínicos e mesentéricos, embora o agente também seja isolado de linfonodos sem lesões aparentes (PRESCOTT, 1991). A investigação da virulência de estirpes de *R. equi* isoladas de linfonodos de suínos têm identificado principalmente plasmídios de virulência intermediária (VapB), similar ao perfil de estirpes isoladas de pacientes humanos com rodococose (TAKAI, 1997).

As estirpes que carregam VapA e VapB possuem predileção na infecção, respectivamente, por potros e suínos. Contudo, já foram isolados *R. equi* avirulentos de outras espécies animais e de pacientes humanos, sugerindo que a patogênese das infecções por *R. equi* nesses hospedeiros é distinta da que ocorre nos potros e suínos (MEIJER & PRESCOTT, 2004).

2.2. Rodococose nos animais

R. equi caracteriza-se como microrganismo amplamente distribuído na natureza e, apesar de não ser considerado pertencente à microbiota intestinal de animais (STRAW et al., 1999), frequentemente é isolado das fezes de eqüinos, bovinos, ovinos, caprinos, suínos e animais silvestres (KOWALSKI, 2000; TAKAI, 2004). Não tem sido isolado das fezes de gatos domésticos e raramente é identificado nas fezes de humanos e de cães (PRESCOTT, 1991).

O microrganismo possui grande capacidade de sobrevivência no meio ambiente, proliferando no solo em condições favoráveis de temperatura e umidade (QUINN, 1994; TAKAI, 1997). Em material fecal de eqüinos foi comprovada a viabilidade da bactéria por até 12 meses (WILSON, 1992). Também já foi isolado em ambientes de entretenimento de humanos como parques, praças e jardins (TAKAI et al., 1996b), bem como em material fecal e

solo de reservas de proteção de animais selvagens (TAKAI et al., 2004). O isolamento de *R. equi* do ambiente é favorecido com o uso de meios seletivos específicos como o NANAT (KOWALSKI, 2000) e, mais recentemente, o mCAZ-NB (MUSCATELLO et al., 2007).

A doença se manifesta nos criatórios de eqüinos de maneira enzoótica em determinadas propriedades e esporádica em outras. Deste modo, acredita-se que a ocorrência da rodococose, principalmente em potros, está intimamente relacionada à contaminação do meio ambiente dos criatórios, ao perfil de virulência das estirpes (GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997), influenciados por determinados fatores predisponentes como extremos de temperatura, clima seco, tipo de solo e condições de manejo dos criatórios, que favoreçam a aerossolização (WILSON, 1992; GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997; BERTONE, 2000)

Os potros e herbívoros domésticos infectados eliminam o agente em grande quantidade principalmente pelas fezes, além de secreções respiratórias. Esses animais são considerados a principal fonte de infecção para outros animais e a mais importante forma de contaminação e manutenção ambiental do agente (TAKAI, 1997). Eqüinos adultos também eliminam o agente pelas fezes para o meio ambiente. No entanto, a eliminação é intensa nos potros com aumento exponencial de microrganismos até a 10^a semana de idade, declinando em seguida, para atingir níveis semelhantes aos adultos (TAKAI, 1997). Assim, o microrganismo permanece viável no trato intestinal de animais jovens e adultos, contribuindo para disseminação ambiental em criatórios (BARTON & HUGHES, 1980).

Os equinos representam a espécie mais acometida clinicamente pela rodococose. Nos potros até os seis meses de idade, a doença tem curso insidioso, se manifestando por sinais de inapetência, letargia, febre (41°C), tosse (produtiva ou não), perda de peso, secreção nasal uni ou bi-lateral (serosa a muco-purulenta), taquicardia e taquipnéia. Os animais que apresentam progressão do quadro tendem a apresentar anorexia, decúbito, sinais severos de insuficiência respiratória e cianose (RADOSTITS et al., 2007). Secundariamente, são observadas manifestações entéricas como

diarréia, desidratação, cólica, perda de peso e retardo no crescimento, decorrentes de grave colite e linfadenite mesentérica (RIBEIRO et al., 2002).

As artropatias por *R. equi* também são importantes entidades nosológicas em potros, possuindo origem séptica ou asséptica (reumatóides), esta última caracterizada por deposição de imunocomplexos (TIZARD, 2002; RIBEIRO et al., 2002).

A caracterização dos diferentes perfis de virulência de *R. equi* em linhagens virulentas, de virulência intermediária e avirulentas (TAKAI et al., 1991; TAKAI, 1996b; TAKAI, 1997), impulsionaram os estudos atuais com o agente, utilizando essas propriedades como marcadores de virulência nas investigações epidemiológicas.

Takai (1997) afirmou que estirpes isoladas de potros com pneumonia e/ou lesões entéricas são predominantemente virulentas. Em estudo realizado no Japão por Takai et al. (1994), em 54 potros submetidos à necropsia, foram identificadas 44 linhagens virulentas de *R. equi* contendo plasmídios de 85kb e dez detentores de plasmídios virulentos de 90kb. A virulência de 146 isolados de *R. equi* em 15 criatórios de eqüinos foi investigada na Hungria. Do total de linhagens, 129 foram positivas para VapA, das quais 123 continham plasmídio virulento de 85kb (tipo I) e nas seis remanescentes foi detectado plasmídio 87kb (tipo I) [MAKRAI et al., 2002].

Nas demais espécies de animais de produção (bovinos, búfalos, ovinos e caprinos) a rodococose é considerada afecção clínica rara. Além das manifestações respiratórias e entéricas, foram descritas nessas espécies piometra, mastite, abortamentos, linfadenite, abscessos hepáticos, esplênicos (PRESCOTT, 1991) e ósseos (DAVIS et al., 1999). No Brasil foi descrito o isolamento do microrganismo em amostras de leite de vacas com mastite clínica e subclínica (LANGONI et al., 1998).

A rodococose é incomum em animais de companhia, embora seja mais frequente em gatos do que em cães. Em ambas as espécies, se observa lesões cutâneas, pneumonia, linfadenite, piotórax, hepatomegalia e abscessos em órgãos. As infecções por *R. equi* em gatos estão relacionadas à co-infecção com doenças imunossupressivas, incluindo o vírus da imunossupressão e leucemia felina (GREENE, 2006). As disputas territoriais por fêmeas no cio

parecem favorecer a veiculação transcutânea da bactéria presente na pele ou na região ungueal dos felinos (FARIAS et al., 2007).

Afecção incomum em animais selvagens e silvestres, a rodococose apresenta-se sob a forma de quadros respiratórios, linfadenites, abscessos em órgãos e septicemia. Nestes animais a doença tem sido descrita geralmente sob a forma de relatos de caso em crocodilos, jacarés, koalas, cervos, focas, cobaias e saguis (PRESCOTT, 1991; BERTONE, 2000).

2.2.1. Rodococose em Suínos

A linfadenite infecciosa figura dentre as doenças mais preocupantes que acometem os suínos, em virtude dos prejuízos aos produtores com a condenação de carcaças e pelo potencial zoonótico dos microrganismos. Em 2001, na região sul do Brasil, estimou-se que o impacto econômico da linfadenite granulomatosa em suínos seria ao redor de 8,0 milhões de reais (MARTINS, 2001).

A linfadenite em suínos geralmente é assintomática, diagnosticada, comumente na linha de abate. Segundo os critérios de destinos de carcaças recomendada pela legislação brasileira, regida pelo Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA), as lesões infecciosas por *R. equi* ou outros microrganismos recebem julgamento equivalente ao indicado para a tuberculose “clássica” (BRASIL, 2007). Desta forma, a linfadenite gera severos prejuízos ao produtor e à indústria, notadamente pela condenação de carcaças (SILVA et al., 2000; MARTINS, 2001). O rigor no destino de carcaças com linfadenite justifica-se, em parte, pela impossibilidade de distinção macroscópica dos agentes infecciosos. Ademais, vários destes patógenos possuem potencial zoonótico, particularmente *Mycobacterium* sp (FERREIRA-NETO et al., 1989) e *R. equi* (ACHA & SZYFRES, 2003).

A via oral é reconhecida como a principal forma de infecção nos suínos no estabelecimento da linfadenite infecciosa, provavelmente pelo contato dos animais com o microrganismo proveniente do meio ambiente, fato que justificaria o maior acometimento dos linfonodos da cadeia submandibular e mesentérica (ACHA & SZYFRES, 2003). A criação de suínos domésticos ou

selvagens (javalis) em ambientes sujos, com excesso de dejetos, fezes, sobre camas ou palhadas, tende a aumentar o risco de infecções por microrganismos ambientais, incluindo *R. equi* (RADOSTITS et al., 2007).

Os linfonodos acometidos podem exibir graus variados de hipertrofia, apresentando-se lobulados, mostrando ao corte lesões necróticas-purulentas, focais ou generalizadas, de tonalidade branco-amarelada (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Diferentes microrganismos têm sido isolados de linfonodos de suínos ao abate, com destaque para *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*, complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*, *R. equi*, *Nocardia asteroides* (QUINN et al., 1994), *Arcanobacterium pyogenes*, enterobactérias e os gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* (LANGENEGGER & LANGENEGGER, 1981; FERREIRA-NETO et al., 1989; PRESCOTT, 1991; SLUTSKY et al., 1994; LEÃO et al., 1999; ACHA & SZYFRES, 2003; LARA, 2009). As lesões por *R. equi* em linfonodos de suínos predominam na cadeia submandibular, enquanto pelo gênero *Mycobacterium* nos linfonodos mesentéricos (RADOSTITS et al., 2007).

Em diferentes países tem-se investigado, nas últimas décadas, o perfil de virulência das linhagens de *R. equi* isoladas de suínos. Takai et al. (1996a) relataram que de 1832 linfonodos submandibulares de suínos aparentemente saudáveis criados no Japão, foi isolado *R. equi* em 56 (3,1%), nos quais predominaram os antígenos de virulência intermediária (VapB). Makrai et al. (2002) na Hungria, isolaram três linhagens de *R. equi* obtidos de linfonodos submandibulares de suínos, dos quais uma estirpe VapA (85kb tipo I) e duas VapB (95kb tipo 5).

Na Eslovênia, Pate et al. (2004) realizaram exames microbiológicos e moleculares em 260 linfonodos de suínos e encontraram *Mycobacterium avium* (*M. avium*) em 47,3% da amostragem, da qual 3,9% em infecções mistas com *R. equi*. No mesmo estudo, em 27,3% da amostragem foi identificado somente *R. equi*, enquanto em 1,5%, infecções mistas por *R. equi* e micobactérias, outras que não *M. avium*. Dos isolados de *R. equi*, cerca de 60% apresentaram virulência intermediária (VapB) e as demais avirulentas.

Makrai et al. (2005) na Hungria, investigaram 1173 linfonodos submandibulares de suínos sem lesão aparente, dos quais em 164 (14%) foi

isolado *R. equi*, com predomínio de estirpes avirulentas (73,2%). Dentre as linhagens de virulência intermediária (VapB) isoladas, ocorreu maior prevalência de plasmídios de 95kb (tipo 5). Os animais provinham de pequenas propriedades, mantidos em ambiente natural com livre acesso ao solo.

Komijn et al. (2007) investigaram a etiologia bacteriana de linfadenite em suínos na Holanda, com especial interesse em *Mycobacterium avium* subsp *avium* (MAA) e *R. equi*. Dentre 1276 linfonodos amostrados, 98 (7,7%) mostraram lesões submandibulares por *R. equi* e apenas um (0,1%) em linfonodo mesentérico, ressaltando para o predomínio de isolamentos de *R. equi* em detrimento do gênero *Mycobacterium*.

A despeito da preocupação na investigação da linfadenite suína em outros países, são escassos os estudos no Brasil enfocando a etiologia das linfadenites infecciosas na espécie, tampouco da virulência dos isolados de *R. equi* obtidos de linfonodos de suínos no país. Amaral et al. (2004) avaliaram a ocorrência da linfadenite em suínos da região Sul do Brasil em unidades de terminação que criavam animais em granjas, com lotação de 22 a 960 suínos. Nas 60 unidades de terminação com histórico de condenações por linfadenite foi aplicado inquérito contendo 156 variáveis, relativas aos fatores de risco para a ocorrência de linfadenite em granjas de piso compacto. Os resultados permitiram demonstrar predomínio de fatores de risco relacionados às deficiências na limpeza e desinfecção de instalações e equipamentos, além da baixa qualidade higiênico-sanitária dos alimentos oferecidos aos animais.

Morés et al. (2007) analisaram 394 carcaças de suínos abatidos na região Sul e encontraram predomínio de lesões do complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* em linfonodos mesentéricos e/ou cefálicos.

Lara (2009) investigou a presença de microrganismos em linfonodos de suínos com e sem lesões, e observou o predomínio de *Mycobacterium avium* e *Rhodococcus* sp

2.2.2. Rodococose em javalis

No Brasil, os criatórios de javalis (*Sus scrofa*) foram impulsionados nas últimas décadas, estimulados pelo baixo percentual de calorias, gordura e colesterol da carne da espécie comparativamente ao suíno doméstico, embora

com teores equivalentes de proteína (DE CICCIO, 2008). Os javalis são considerados animais exóticos à fauna brasileira. Desta forma, os criadouros nacionais são controlados e monitorados pelo IBAMA. Recomenda-se que as criações assemelhem-se ao habitat natural. Assim, os animais são mantidos em regime semi-extensivo, alimentando-se de vegetais, tubérculos e restos de culturas agrícolas (IBAMA, 2008).

São escassos os estudos da ocorrência e da natureza etiológica de processos infecciosos em javalis, particularmente enfocando a casuística da linfadenite infecciosa. Em virtude do tipo de alimento fornecido, da criação destes animais próximo ao ambiente de espécies domésticas e da possibilidade de contato com *R. equi* oriundo do solo, acredita-se que o javali possa estar exposto à riscos semelhantes de infecção encontrados na espécie suína. Makrai et al. (2008) na Hungria, avaliaram a virulência de 82 estirpes de *R. equi* obtidas de linfonodos submandibulares de javalis, nos quais 61 (74,4%) foram caracterizados como avirulentos e 21 (25,6%) de virulência intermediária (VapB). Os autores evidenciaram o predomínio do plasmídeo tipo 5 dentre os de virulência intermediária (VapB), e ausência de estirpes virulentas (VapA).

Lara (2009) investigando a etiologia bacteriana da linfadenite infecciosa em javalis de abatedouros no Brasil, identificou o predomínio dos gêneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Mycobacterium spp* e *R. equi* em linfonodos com lesões aparentes.

2.3 Rodococose nos humanos

Em 1967, foi relatada a primeira descrição da rodococose em humanos em paciente apresentando abscesso pulmonar, mantido sob tratamento utilizando corticóides devido à quadro de hepatite crônica (GOLUB et al., 1967). Nas décadas subsequentes, as infecções por *R. equi* em humanos foram caracterizadas como raras (SEVERO & LONDERO, 1996). Entretanto, tem-se notado número crescente de registros da rodococose em humanos, fato que tem gerado preocupação na área médica, e reconhecimento da doença como emergente (LINDER, 1997).

A rodococose em humanos está estreitamente relacionada a determinados grupos de risco ou de vulnerabilidade, que incluem pacientes

com diferentes graus de imunossupressão como hepatopatas, transplantados, alcoólatras, acometidos por neoplasias (leucemia, linfoma), usuários de drogas injetáveis e, principalmente, infectados pelo vírus da Aids (DOIG et al., 1991). Raramente a doença é diagnosticada em indivíduos imunocompetentes (MACGOWAN & MANGANO, 1991).

O relatório anual do Programa das Nações Unidas sobre HIV/Aids reportou, em 2007, cerca de 33,2 milhões de pessoas portadoras do vírus da imunodeficiência adquirida em todo mundo. Destes, 2,1 milhões evoluíram para óbito em decorrência da doença e de infecções oportunistas. O mesmo documento assinalou, de forma preocupante, o aumento de mais de 150% no número de infectados na Europa Oriental e Ásia Central, que passaram de 630 mil em 2001 para 1,6 milhões em 2007. A África subsaariana figura dentre as regiões mais atingidas em todo o mundo, concentrando quase 70% de infectados pelo vírus, o que representa 22,5 milhões de indivíduos. Na América Latina, estima-se que ao redor de 1,6 milhões de pessoas são portadoras do vírus da Aids (World Health Organization - WHO, 2007).

No Brasil, entre 1980 e 2007 foram notificados 474.273 casos de Aids, dos quais 289.074 somente na região sudeste do país (BRASIL, 2007). O avanço no número de pessoas infectadas encontra reflexo direto no aumento de doenças consideradas emergentes e re-emergentes, causadas predominantemente por agentes oportunistas. Neste contexto, classicamente merece destaque a tuberculose e, recentemente, a rodococose (ACHA & SZYFRES, 2003).

Aventa-se que a principal forma de transmissão da rodococose para os humanos seria representada pela via respiratória, decorrente da inalação de aerossóis emanados do ambiente das criações de animais (BROWN, 1995; SEVERO & LONDERO, 1996). Secundariamente, os humanos podem ser infectados pela via digestória, mediante a deglutição de esputo em pacientes com infecção respiratória (OPS, 2001). O real impacto do histórico do contato estreito ou recente com animais em pacientes com rodococose é assunto controverso na literatura (SEVERO & LONDERO, 1996; HIRSH & ZEE, 2003). No entanto, levantamento detalhado de 18 casos de rodococose apontou que oito (44,4%) pacientes apresentavam histórico de contato recente com

ambiente rural (limpeza de estábulos, baias e/ou piquetes) e/ou com animais de fazenda, especialmente equinos (DOIG et al., 1991).

Prescott (1991) relatou que de 32 pacientes com rodococose co-infectados com o vírus HIV, 12 possuíam histórico de contato com animais ou ambientes rurais, postulando o risco ocupacional na transmissão da doença para os *humanos*. Verville et al. (1994) investigaram minuciosamente a epidemiologia de 12 casos de rodococose humana (seis acometidos por Aids), revelando que dois pacientes possuíam histórico de contato estreito com equinos, um com cão e outro com ambiente rural. Watanabe et al. (2008) relataram maior ocorrência de rodococose em pacientes HIV-positivos em indivíduos que residiam próximos a propriedades rurais ou eram agricultores, fato que facilitaria o contágio por *R. equi* mediante contato com animais e seu meio ambiente.

Clinicamente, os casos de rodococose em pacientes humanos caracterizam-se por manifestações respiratórias como tosse e dispnéia, decorrentes de lesões pulmonares abscedantes e cavitárias (MOSSER & HONDALUS, 1996). As infecções pulmonares são graves complicações clínicas em portadores do vírus da Aids e, seguramente, reduzem a qualidade de vida e a longevidade dos pacientes (WATANABE et al., 2008). Linder (1997) relatou que na rodococose em indivíduos co-infectados com o vírus da Aids, a mortalidade pode alcançar índices acima de 50% e as recidivas são comuns, independente da instituição do tratamento. A ocorrência da rodococose em indivíduos com Aids na Tailândia mostrou que a maioria dos pacientes apresentou manifestações pulmonares. Os autores concluíram que a idade avançada e co-infecções por *R. equi* com doenças imunossupressivas representaram os mais importantes fatores de risco para pacientes que evoluíram para óbito (WATANABE et al., 2008).

R. equi pode causar também manifestações extra-pulmonares em humanos representadas por diarreia sanguinolenta, caquexia, pleurisia, hepatopatias, abscessos renais, peritonite, artrite séptica, osteomielite, linfadenite e meningite (PRESCOTT, 1991; BROWN, 1995; SEVERO & LONDERO, 1996). O aumento da casuística da rodococose nos humanos deve-se, seguramente, ao estado de imunossupressão e debilidade orgânica

determinado pelo vírus em pacientes acometidos pelo vírus da Aids (LINDER, 1997; ACHA & SZYFRES, 2003).

O diagnóstico da rodococose nos humanos é baseado no isolamento do microrganismo a partir de diferentes humores orgânicos e órgãos (OPS, 2001), principalmente utilizando lavados traqueo-brônquicos, hemocultura ou material de biópsia de órgãos (PRESCOTT, 1991). Exames de diagnóstico por imagem (raios-x, tomografia e ressonância magnética), auxiliam na avaliação da extensão do comprometimento de órgãos, no estabelecimento de prognóstico ou mesmo na tomada de decisão para remoção cirúrgica de áreas lesionadas (ACHA & SZYFRES, 2003).

Na instituição da terapia contra rodococose são recomendados antimicrobianos que atinjam altas concentrações no interior celular, incluindo o grupo dos macrolídeos (eritromicina, azitromicina), rifampicina e vancomicina, bem como outros fármacos como sulfas/trimetoprim, aminoglicosídeos e fluorquinolonas (VERVILLE et al., 1994; BROWN, 1995; OPS, 2001; TAVARES, 2002). Os pacientes são tratados por várias semanas até a remissão completa dos sintomas e após culturas microbiológicas negativas (BROWN, 1995), embora recidivas e complicações clínicas sejam frequentes em pacientes humanos (SEVERO & LONDERO, 1996). A avaliação retrospectiva de 12 casos de rodococose em humanos com Aids, constatou que a doença foi fatal em quatro pacientes e tendeu a evolução crônica em dois (VERVILLE et al., 1994).

Estudos recentes têm procurado enfatizar a caracterização de virulência das estirpes de *R. equi* isoladas de pacientes humanos – em especial os acometidos de Aids – utilizando os plasmídios como marcadores da patogenicidade. O perfil de virulência de seis isolados de *R. equi* oriundos de pacientes com Aids na Tailândia revelou a presença de plasmídios de virulência intermediária–VapB (TAKAI et al., 2002). Estudo similar na Hungria descreveu que cinco dentre sete estirpes de *R. equi* isoladas de pacientes aidéticos, possuíam antígenos de virulência intermediária (VapB), contendo plasmídio de 95kb (tipo 5), semelhante ao padrão plasmidial de virulência de estirpes encontradas em linfonodos de suínos (MAKRAI et al., 2002).

Na Tailândia, Takai et al. (2003) identificaram o mesmo perfil de virulência (VapB) em *R. equi* isolados de linfonodos submandibulares de suínos aparentemente saudáveis e de pacientes humanos com rodococose.

No Brasil, a rodococose é considerada doença incomum em humanos. Santos-Fortuna et al. (1999) compararam o perfil de virulência de quatro linhagens de *R. equi* isoladas no país frente à nove estirpes oriundas de casos na Itália. Os autores verificaram que em uma das linhagens no Brasil e em duas da Itália foram detectados antígenos de 15 a 17kDa (virulentos), enquanto em três estirpes do Brasil e em uma da Itália foram caracterizados antígenos de 20kDa (virulência intermediária).

Araújo et al. (2000) registraram caso de rodococose no Brasil em paciente humano com pneumonia, co-infectado com o vírus da Aids. A caracterização dos antígenos de virulência da linhagem de *R. equi* deste paciente acusou a presença de VapB (20kDa). No Rio Grande do Sul, Severo et al. (2001) relataram dois casos de rodococose, dos quais um em paciente HIV-positivo que evoluiu para óbito mesmo diante da instituição de terapia. Em que pese o incremento das notificações da rodococose em pacientes humanos em todo mundo, os registros no Brasil são restritos aos relatos de caso, e não têm se preocupado em investigar o perfil de virulência dos isolados de *R. equi*.

Apesar da similaridade do perfil de virulência (VapB) de estirpes isoladas de pacientes com Aids, de suínos e de javalis, não está esclarecido o impacto destas espécies de animais como fontes de infecção para os humanos (TAKAI et al., 1996a). Ademais, são insipientes os estudos no Brasil visando a detecção da virulência de estirpes de *R. equi* isoladas de suínos, tampouco de javalis. Considerando a escassez de estudos voltados a caracterização da virulência de *R. equi* isolados de suínos no Brasil, o presente estudo investigou os principais fatores de virulência em linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo.

3. OBJETIVOS

Gerais:

- Avaliar a ocorrência de *R. equi* em linfonodos de suínos e javalis, com e sem linfadenite, colhidos em abatedouros.
- Avaliar os principais fatores de virulência em linhagens de *R. equi* isoladas de linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo.

Específicos:

- Verificar a ocorrência de hemólise sinérgica “in vitro” (“Fator equi”) nos isolados;
- Determinar o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” e a ocorrência de multirresistência dos isolados frente aos principais antimicrobianos recomendados na terapia da rodococose nos animais e humanos;
- Quantificar a concentração inibitória mínima “in vitro” da azitromicina, eritromicina e rifampicina frente aos isolados;
- Pesquisar a ocorrência de linhagens com capacidade de multiplicação “in vitro” em meio com restrição de ferro;
- Determinar o perfil de virulência (VapA, VapB ou avirulentas) e os tipos de plasmídios presentes nas linhagens isoladas de suínos e javalis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Origem e colheita das amostras

Foram utilizados no estudo 129 linfonodos de suínos com linfadenite e 129 linfonodos sem lesões aparentes (controles), além de 60 linfonodos de javalis com linfadenite e 60 linfonodos sem alterações. Os linfonodos eram provenientes da cadeia submandibular e mesentérica, e foram colhidos aleatoriamente na linha de abate dos frigoríficos Cowpig, Santo Expedito e Rabicó, localizados no interior do estado de São Paulo, dos quais o primeiro sob Inspeção Estadual (SISP) e os dois últimos sob Inspeção Federal (SIF). As amostras foram colhidas entre 2006 e 2008, e totalizaram 258 linfonodos de suínos e 120 linfonodos de javalis com idade ao abate variando entre 150 e 180 dias.

Os linfonodos foram acondicionados e encaminhados em temperatura de refrigeração (4-8°C) para o laboratório de Doenças Infecciosas dos animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. As amostras foram armazenadas a -20°C até o processamento microbiológico e para detecção dos diferentes fatores de virulência.

4.2. Processamento das amostras e caracterização microbiológica de *R. equi*

Inicialmente os linfonodos foram descongelados e após flambagem da superfície, foi colhido assepticamente fragmento que foi semeado nos meios de ágar sangue bovino (5%) desfibrinado, ágar MacConkey (QUINN et al., 1994) e meio seletivo de NANAT (ácido nalidíxico, novobiocina, actidione e telurito de potássio) [TAKAI et al., 1996a], mantidos em condições de aerobiose, a 37°C, por 72-96 horas.

A caracterização de *R. equi* foi baseada nas características morfo-tintoriais (coloração de Gram), de cultivo e bioquímicas, incluindo a realização das reações de catalase, oxidase, redução de nitrato, urease e utilização de glicose, maltose e sacarose (QUINN et al., 1994).

Todas as linhagens de *R. equi* isoladas foram estocadas em tubos vedados contendo meio de Lignières, mantidas em temperatura ambiente (25°C) até o processamento pelas técnicas de identificação dos diferentes fatores de virulência.

4.3. Detecção dos fatores de virulência

4.3.1. Caracterização da presença de hemólise sinérgica (“Fator equi”)

Todas as linhagens de *R. equi* isoladas foram submetidas ao teste de CAMP (QUINN et al., 1994) no laboratório de Doenças infecciosas dos Animais da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Foi utilizado o meio de ágar sangue ovino (5%) desfibrinado e cepa padrão hemolítica de *Staphylococcus aureus* (ATCC 33.591), cedida pela Profa. Dra. Maria de Lorde R. Souza da Cunha, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP.

Após incubação do meio de ágar sangue em aerobiose, a 37°C por 48 horas, foram consideradas positivas as linhagens que apresentaram hemólise sinérgica, caracterizada pela formação em “ponta de seta” na intersecção com a estria de *S. aureus*.

4.3.2. Teste de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos

A totalidade das linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis foram submetidas ao teste de sensibilidade microbiana pelo método clássico “in vitro” de difusão com discos (BAUER et al., 1966), no laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ- UNESP/Botucatu, SP. Os resultados foram interpretados segundo as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005, 2006).

Foram utilizados discos impregnados com os principais antimicrobianos recomendados na terapia da rodococose em humanos e animais de produção, a saber: amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg), azitromicina (15µg), ceftriaxona (30µg), eritromicina (15µg), gentamicina (10µg), levofloxacin (5µg),

rifampicina (5µg), sulfametoxazole/trimetoprim (25µg) e vancomicina (30µg). As linhagens que apresentaram resistência simultânea a três ou mais antimicrobianos foram consideradas multirresistentes.

4.3.3. Concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada nas 23 linhagens de *R. equi*, no laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ- UNESP/Botucatu, SP, utilizando o kit comercial E-test®, frente a azitromicina (0,016- 256 µg/ml), eritromicina (0,016- 256 µg/ml) e rifampicina (0,016- 256 µg/ml). A interpretação dos resultados foi baseada nas normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005, 2006). Como controle foi utilizada cepa padrão de *R. equi* (ATCC 33.701+), cedida pelo Prof. Dr. Shinji Takai, da Universidade de Kitasato no Japão.

Foram considerados sensíveis, parcialmente sensíveis e resistentes à azitromicina os isolados com, respectivamente, CIM ≤2, 4 e ≥8 µg/ml. Para eritromicina foram considerados sensíveis, parcialmente sensíveis e resistentes os isolados com, respectivamente, CIM ≤0.5, 1-4 e ≥8 µg/ml, enquanto para rifampicina, os isolados sensíveis, parcialmente sensíveis e resistentes foram considerados aqueles que acusaram, respectivamente, CIM ≤1, 2 e ≥4 µg/ml.

4.3.4. Capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro

A capacidade de multiplicação “in vitro” em meio com restrição de ferro foi avaliada no laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ- UNESP/Botucatu, SP, nas 23 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e de javalis.

As linhagens armazenadas no meio de Lignières foram reisoladas em ágar sangue bovino e mantidas por 48 horas, em condições de aerobiose a 37°C. Em seguida, os isolados foram subcultivados em ágar nutriente contendo 200µM de dipiridila, um quelante do íon ferro, e mantidos em aerobiose a 37°C, por 24 horas.

Cada isolado foi submetido a três passagens no meio contendo dipiridila. As linhagens que apresentaram crescimento ao final da terceira passagem foram consideradas com capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro. A técnica descrita por Ferreira & Bottino (1998), originalmente utilizada para *Escherichia coli*, foi modificada pela realização de novo subcultivo dos isolados de *R. equi* ao final da terceira passagem no ágar nutriente, para o meio de ágar sangue bovino a 5% (incubado a 37°C em aerobiose, por 72 horas). Esse procedimento foi necessário em virtude da dificuldade na visualização das colônias de *R. equi* no ágar nutriente contendo dipiridila.

Como controle positivo foi utilizada cepa-padrão de *Escherichia coli* K12, cedida pelo Prof. Dr. Antônio José Piantino Ferreira, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

4.3.5. Caracterização de virulência das linhagens utilizando técnicas imunoenzimáticas e moleculares.

As 19 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e quatro de javalis foram enviadas para o Japão para a caracterização de virulência pelo perfil plasmidial. As linhagens foram enviadas no meio de Lignières, em tubos de plástico esterilizados com tampas de rosca, com autorização de exportação do Serviço de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Brasil, e permissão de importação do Ministério da Agricultura, Reflorestamento e Pesca do Japão. A detecção do perfil plasmidial foi realizada pelo Prof. Dr. Shinji Takai do Departamento de Higiene Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Kitasato, Japão.

4.3.5.1. Técnica Imunoenzimática (Imunoblotting)

As colônias de *R. equi* foram inoculadas em ágar infusão cérebro-coração (BHI), incubadas em aerobiose, a 37°C, por 24 horas. Após, foram dispostas em contato com filtro de nitrocelulose (0,45 µm), por 5 a 10 minutos. A membrana foi removida, seca ao ar e autoclavada por 105°C, por 60 segundos. O material impregnado na membrana foi submetido à técnica

imunoenzimática utilizando anticorpos monoclonais, com intuito de determinar linhagens VapA, VapB e avirulentas (TAKAI et al., 1991; TAKAI, 1996b; TAKAI, 1997).

4.3.5.2. Extração de DNA plasmidial

A obtenção de DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina. O material genético extraído foi analisado pela digestão com enzimas de restrição: *HindIII*, *BamHI*, *EcoRI* e *EcoT22I* visando a determinação dos plasmídios de 85 a 90kb para linhagens virulentas (VapA) e 79 a 100kb para linhagens de virulência intermediária (VapB) [TAKAI et al., 1993].

4.3.5.3. Reação em cadeia pela polimerase (PCR)

A amplificação do material genético foi realizado em 10µl de DNA preparado em 50µl de volume contendo 10mM de Tris-HCl (pH 8,3, a 25°C), 50 mM de KCl, 0,2 mM de desoxinucleotídios trifosfatos, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5U de *Taq* DNA-polimerase e 1mM de cada *primer*. As amostras foram submetidas a 30 ciclos de amplificação, segundo as seguintes condições: desnaturação por 90s a 94°C; anelamento por 1 minuto a 55°C, e extensão por 2 minutos a 72°C. A detecção das seqüências de genes de antígenos virulentos (15–17kDa) foi realizada utilizando o *primer* 1 (5'–GACTCTTCACAAGACGGT–3') e *primer* 2 (5'–TAGGCGTTGTGCCAGCTA–3'), visando a amplificação de seqüências entre 569 e 552 pares de base. Para linhagens de virulência intermediária (20kDa) foram utilizados o *primer* 3 (5'–AACGTAGTCGCGGTGAGAA–3') e *primer* 4 (5'–ACCGAGACTTGAGCGACTA–3'), para amplificação gênica entre 240 e 258 pares de base (TAKAI et al., 1995a). As linhagens sem o perfil plasmidial para VapA ou VapB foram consideradas avirulentas. Os controles-positivos dos diferentes tipos de linhagens VapA e VapB são apresentados no Anexo 1.

4.4. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada mediante a associação entre a presença dos diferentes fatores de virulência avaliados (multirresistência aos antimicrobianos, a multiplicação em meio com restrição de ferro e o perfil de virulência plasmidial), nas 23 linhagens de *R. equi* isoladas de linfonodos mesentéricos e submandibulares de suínos e javalis. Foram empregados os testes de Qui-quadrado e Exato de Fisher, e os valores calculados pelo programa EPI-INFO (versão 6.04), considerando associação significativa para valores de $P < 0,05$ (TRIOLA, 2005)

5. RESULTADOS

Foram isoladas 23 (6,1%) linhagens de *R. equi* dentre 378 linfonodos de suínos e javalis colhidos nos abatedouros. Dos 258 linfonodos de suínos, foram isoladas 19 (7,4%) linhagens de *R. equi*, das quais 17 de linfonodos com lesões e dois sem lesões aparentes (controle). Das 19 linhagens isoladas de suínos, 18 (94,7%) foram obtidas de linfonodos submandibulares e uma (5,3%) de mesentérico. Dos 120 linfonodos colhidos de javalis foram isoladas quatro (3,3%) linhagens de *R. equi*, todas provenientes de linfonodos com lesões. Das quatro linhagens isoladas de javalis, três (75,0%) foram obtidas de linfonodos submandibulares e uma (25,0%) de mesentérico.

A Tabela 1 sumaria os resultados dos isolamentos de *R. equi* em linfonodos com e sem linfadenite. A Tabela 2 apresenta a distribuição dos linfonodos submandibulares e mesentéricos de suínos e javalis colhidos nos abatedouros.

TABELA 1. Linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de 378 linfonodos de suínos e javalis, com e sem linfadenite, colhidos em abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.

espécie	nº isolados / total com linfadenite (%)	nº isolados / total sem linfadenite (%)	total isolados / total de linfonodos (%)
suína	17/129 (13,2)	2/129 (1,5)	19/258 (7,4)
javali	4/60 (6,6)	0/60 (--)	4/120 (3,3)
total	21/189 (11,1)	2/189 (1,1)	23/ 378 (6,1)

nº= número

%= porcentagem

TABELA 2. Distribuição de linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos submandibulares e mesentéricos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.

espécie	nº de linhagens	nº de isolados de linfonodos submandibulares (%)	nº de isolados de linfonodos mesentéricos (%)
Suína	19	18 (94,7)	1 (5,3)
Javali	4	3 (75,0)	1 (25,0)
Total	23	21(91,3)	2 (8,7)

nº= número

%= porcentagem

Nas 23 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis foi evidenciada hemólise sinérgica (“Camp” positivo) representada pela formação de “ponta de seta” no meio de ágar sangue ovino.

Da totalidade de linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis, sete (30,4%) apresentaram capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro, das quais seis de origem suína e uma de javali. A multiplicação em meio com restrição de ferro em linhagens de *R. equi* de suínos e javalis é apresentada na Tabela 3.

O perfil de sensibilidade microbiana no teste de difusão com discos das linhagens de *R. equi* isoladas de suínos evidenciou maior efetividade da azitromicina (100,0%), gentamicina (100,0%), levofloxacina (100,0%) e vancomicina (100,0%), seguida da amoxicilina/ácido clavulânico (94,7%), eritromicina (94,7%) e rifampicina (94,7%).

TABELA 3. Multiplicação em meio com restrição de ferro em 23 isolados de *Rhodococcus equi*, identificados em linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.

espécie	nº linhagens	multiplicação em meio com restrição de ferro	
		nº positivos (%)	nº negativos (%)
suína	19	6 (31,6)	13 (68,4)
javali	4	1 (25,0)	3 (75,0)
Total	23	7 (30,4)	16 (69,6)

nº= número

%= porcentagem

Nas quatro linhagens de javalis, a amoxicilina/ácido clavulânico, a azitromicina, a gentamicina e a levofloxacina mostraram 100,0% de efetividade na prova de difusão com discos. A eritromicina, a rifampicina, a sulfametoxazole/trimetoprim e a vancomicina revelaram somente 50,0% de efetividade frente aos isolados. Das quatro linhagens obtidas de javalis, apenas uma (25,0%) mostrou-se sensível a ceftriaxona.

Dentre as 23 linhagens testadas, uma (4,3%) originária de suíno revelou multirresistência aos antimicrobianos na prova de difusão com discos. Esta linhagem apresentou resistência simultânea a amoxicilina/ácido clavulânico, ceftriaxona, eritromicina, rifampicina e sulfametoxazole/trimetoprim.

A Tabela 4 sumaria o perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” dos 23 isolados de suínos e javalis no teste de difusão com discos.

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P>0,05$) para multirresistência aos antimicrobianos na prova de difusão com discos e para capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro entre os isolados.

TABELA 4. Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em 23 linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.

espécie	suínos			javalis		
	nº de Sensíveis (%)	nº de Parcialmente Sensíveis (%)	nº de Resistentes (%)	nº de Sensíveis (%)	nº de Parcialmente Sensíveis (%)	nº de Resistentes (%)
antimicrobianos						
amoxicilina/ác						
clavulânico (20/10 µg)	18 (94,7)	---	1 (5,3)	4 (100,0)	---	---
azitromicina (15 µg)	19 (100,0)	---	---	4 (100,0)	---	---
Ceftriaxona (30 µg)	11 (57,9)	7 (36,8)	1 (5,3)	1 (25,0)	3 (75,0)	---
Eritromicina (15 µg)	18 (94,7)	---	1 (5,3)	2 (50,0)	---	2 (50,0)
gentamicina (10 µg)	19 (100,0)	---	---	4 (100,0)	---	---
levofloxacina (5 µg)	19 (100,0)	---	---	4 (100,0)	---	---
rifampicina (5 µg)	18 (94,7)	---	1 (5,3)	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)
sulfametoxazole/ trimetoprim (25 µg)	14 (73,7)	2 (10,5)	3 (15,8)	2 (50,0)	---	2 (50,0)
Vancomicina (30 µg)	19 (100,0)	---	---	2 (50,0)	2 (50,0)	---

ác= ácido

µg= micrograma

nº= número

%= porcentagem

A CIM na qual 90% (MIC₉₀) ou mais das 23 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis foram sensíveis a azitromicina, eritromicina e rifampicina foi, respectivamente, ≤ 2 µg/mL, $\leq 0,5$ µg/mL e ≤ 1 µg /mL. Com exceção de um isolado de javali que mostrou-se parcialmente sensível a eritromicina, todos os demais foram sensíveis aos antimicrobianos testados.

O perfil de virulência plasmidial das linhagens revelou que dos 19 isolados de suínos, 12 (63,2%) [IC95%: 40,78 – 80,88] apresentaram virulência intermediária (VapB) e sete foram consideradas avirulentas. Dos 12 isolados VapB, oito (66,7%) [IC95%: 38,57 – 86,14] foram identificadas como do tipo 8, dois (16,7%) tipo 10, um (8,3%) tipo 1 e outro (8,3%) tipo 29, revelando predomínio do tipo oito dentre as linhagens de virulência intermediária isoladas de suínos. Das quatro linhagens de javalis, todas acusaram plasmídios VapB tipo 8. Nenhum isolado de suíno ou javali foi caracterizado como VapA. A Tabela 5 sumaria a distribuição do perfil de virulência plasmidial das 23 linhagens de *R. equi* isolados de linfonodos de suínos e javalis.

TABELA 5. Perfil de virulência plasmidial em 23 isolados de *Rhodococcus equi*, identificados em linfonodos de suínos e javalis de abatedouros do interior do estado de São Paulo. Botucatu, SP, 2009.

espécie	nº de linhagens	perfil e tipo plasmidial (%)				avirulentos
		VapB				
		tipo 1	tipo 8	tipo 10	tipo 29	
Suína	19	1 (5,3)	8 (42,1)	2 (10,5)	1 (5,3)	7 (36,8)
Javali	4	0 (--)	4 (100,0)	0 (--)	0 (--)	0 (--)
Total	23	1 (4,3)	12 (52,2)	2 (8,7)	1 (4,3)	7 (30,4)

nº= número

%= porcentagem

Não houve diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) para os diferentes tipos de virulência plasmidial entre os isolados.

6. DISCUSSÃO

A rodococose em suínos é uma doença praticamente restrita à cadeia linfática (RADOSTITS et al., 2007). Tal fato pode ser creditado a idade precoce de abate dos animais criados com finalidade comercial (150 -180 dias de vida), que limita a distribuição do microrganismo nos órgãos e tecidos animais (OLIVEIRA, 2007). Apesar da baixa progressividade ou disseminação da bactéria na espécie, a rodococose inclui-se entre as principais causas de condenação de carcaças juntamente com outros microrganismos de potencial zoonótico, como o gênero *Mycobacterium* (OLIVEIRA et al., 1995; BALIAN, 1997; STRAW et al., 1999), determinando prejuízos significativos aos produtores e a indústria.

No presente estudo houve predominância do isolamento de linhagens de *R. equi* de linfonodos submandibulares de suínos e javalis em detrimento dos mesentéricos, resultado que corrobora os achados obtidos por Komijn et al. (2007) e Makrai et al. (2008), respectivamente, na Holanda e Hungria, que também verificaram maior ocorrência do microrganismo em linfonodos submandibulares. A alta frequência de isolamento de *R. equi* em linfonodos que drenam a região cefálica pode ser justificada pelo predomínio da infecção nestas espécies pela via digestória, em virtude da presença da bactéria contaminando água, alimentos e ambiente dos criatórios (PRESCOTT, 1991; ACHA & SZYFRES, 2003; RADOSTITS et al., 2007).

Amaral et al. (2004) na região Sul do Brasil realizaram inquérito visando determinar os fatores predisponentes ligados a ocorrência de linfadenite em granjas suínas. Os autores verificaram que os principais fatores de risco da linfadenite estavam relacionados às deficiências na higienização de instalações, equipamentos e na baixa qualidade higiênico-sanitária dos alimentos fornecidos aos animais. Como os criatórios de javalis são semelhantes aos dos suínos de criação extensiva e, muitas vezes, são oferecidos aos javalis os mesmos tipos de alimentos, postula-se que os javalis estariam expostos à riscos de contágio por patógenos equivalentes aos suínos, em virtude da similaridade de alimento e contato com o ambiente. Porém, nas condições do presente estudo, foi encontrada menor frequência de linhagens de *R. equi* em javalis (3,3%) comparativamente aos suínos (7,4%). Tal fato

poderia indicar que a contaminação dos alimentos pode ser considerado fator de risco mais relevante do que o contato entre animais, ou mesmo o tipo de ambiente de criação na rodococose em suínos e javalis.

Das 19 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos, 17 (13,2%) foram encontradas nos linfonodos com lesão e somente duas (1,5%) em linfonodos sem lesão aparente. Takai et al. (1996a) no Japão, Makrai et al. (2005) na Hungria e Komijn et al. (2007) na Holanda, também isolaram o microrganismo em linfonodos sem lesão aparente. Igualmente, estudos no Brasil descreveram o gênero *Mycobacterium* em linfonodos sem lesão ao abate (FERREIRA NETO et al., 1989; BALIAN et al., 1997). O conjunto destes achados sinaliza para a preocupação quanto aos riscos de veiculação de microrganismos com potencial zoonótico aos humanos, pelo consumo de carne suína. Ademais, reforça a importância das ações do médico veterinário em abatedouros, bem como a necessidade de investigações microbiológicas periódicas em linfonodos de suínos e javalis encaminhados ao abate, com e sem lesões, como medida fundamental na vigilância epidemiológica de doenças (RIBEIRO, 2009; LARA, 2009).

Nos javalis as linhagens de *R. equi* foram isoladas exclusivamente de linfonodos com lesão aparente. No entanto, a similaridade das lesões macroscópicas de *R. equi* com outros agentes causais de linfadenite reinter a necessidade do cultivo microbiano de linfonodos com lesões na linha de abate, que possibilitem o diagnóstico dos patógenos e a vigilância de doenças em abatedouros.

A realização do teste de “CAMP” revelou que as 23 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis detém o “fator equi” (colesterol oxidase e fosfolipase C). Estas enzimas de ação citolítica tem sido utilizadas na caracterização das estirpes (QUINN et al., 1994), mas também são apontadas como importante mecanismo de virulência do agente. A ação lítica destas enzimas determina a captação de ferro exógeno das hemácias e a lise de fagócitos (PRESCOTT et al., 1991), contribuindo na patogenicidade de *R. equi* e no estabelecimento da linfadenite em suínos e javalis.

Os microrganismos necessitam do íon ferro para síntese de proteínas, transporte de elétrons e na catalização de reações enzimáticas. Linhagens com a capacidade de captação de ferro exógeno, que se mantém viáveis em baixas

concentrações ou mesmo na ausência deste íon, são capazes de sobreviver e se multiplicar em diferentes tecidos, órgãos e humores orgânicos, detendo mecanismo adicional de virulência (SUSSMAN, 1997; MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2008). Dentre as 19 linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e quatro de javalis foi possível verificar a multiplicação em meio com restrição de ferro em seis (31,6%) e uma (25,0%), respectivamente. Ribeiro (2009) reportou, recentemente, a capacidade de multiplicação em meio com restrição de ferro em estirpes de *R. equi* obtidas de potros e humanos no Brasil. Miranda-Casoluengo et al. (2008) na Irlanda descreveram em estirpes de *R. equi*, a presença de gene que seria responsável pela expressão de receptor capaz de realizar a captação do íon ferro. A captação de ferro como mecanismo de patogenicidade em estirpes de *R. equi* ainda não foi completamente esclarecida (MIRANDA-CASOLUENGO et al., 2008). No entanto, estirpes detentoras de VapA apresentariam maior capacidade de multiplicar-se em meios contendo quantidades restritas de ferro, em detrimento de estirpes avirulentas (JORDAN et al., 2003). Ademais, Meijer & Prescott (2004) relataram que a disponibilidade de ferro no ambiente dos animais influenciaria na complexa expressão dos genes Vap's dentro de ilhas de patogenicidade de *R. equi*, fato que poderia explicar variações geográficas e até regionais na ocorrência da doença em animais.

No tratamento da rodococose em animais e humanos são recomendados antimicrobianos que atinjam concentrações terapêuticas no interior celular, com ação predominante em microrganismos Gram-positivos (TAVARES, 2002; ACHA & SZYFRES, 2003; RADOSTITS et al., 2007).

O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” na prova de difusão com discos nas 23 linhagens de *R. equi* de suínos e javalis, mostrou alta efetividade da amoxicilina/ácido clavulânico, azitromicina, gentamicina e levofloxacina frente aos isolados. Em contraste, foi verificada baixa efetividade da ceftriaxona, eritromicina, rifampicina, sulfametoxazole/trimetoprim e vancomicina nas linhagens de javalis. A multirresistência aos antimicrobianos foi encontrada em somente uma linhagem de suíno. A baixa efetividade de antimicrobianos em animais domésticos geralmente é creditada ao uso inadequado dos fármacos, que exerce pressão seletiva para linhagens multirresistentes (ACHA & SZYFRES, 2003; RADOSTITS et al., 2007).

Interessantemente, a grande maioria dos antimicrobianos não efetivos no presente estudo não contempla fármacos de uso nestas criações. Ademais, a rodococose em suínos e javalis geralmente não é tratada em vista do microrganismo restringir-se à cadeia linfática e pelo abate precoce dos animais explorados com intuito comercial (STRAW et al., 1999; OLIVEIRA, 2007).

A resistência aos antimicrobianos mostrou-se evidente nas quatro linhagens de javalis, notadamente para eritromicina e rifampicina que, curiosamente, constituem a associação de escolha no tratamento da rodococose em potros (GIGUÈRE & PRESCOTT, 1997), bem como para a vancomicina, indicada na terapia em humanos (VERVILLE et al., 1994; BROWN, 1995; OPS, 2001; TAVARES, 2002). A baixa efetividade destes fármacos frente às linhagens de javalis pode ser considerada incomum, e poderia ser justificada pela aquisição de fator de resistência aos antimicrobianos (fator R) – via plasmidial – de linhagens oriundas de outras espécies animais (RIBEIRO, 2009).

Os valores encontrados da CIM mostraram alta efetividade (MIC₉₀) da azitromicina, eritromicina e rifampicina frente as 19 linhagens de *R. equi* de origem suína. Houve também boa relação entre os resultados obtidos nas provas de CIM e de difusão com discos. Em contraste, nos javalis, duas linhagens foram resistentes a eritromicina e uma a rifampicina na prova de difusão com discos, enquanto na CIM, com exceção de uma linhagem parcialmente sensível a eritromicina, as demais foram sensíveis. A pequena discrepância observada entre estas provas, pode ser creditada a certa subjetividade na interpretação do halo de inibição do método de difusão com discos, ou na maior sensibilidade da CIM quando comparada a prova clássica de difusão com discos (TRABULSI et al., 1999).

Dentre a literatura consultada, não foi possível encontrar estudos conduzidos na investigação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e CIM de estirpes de *R. equi* originárias de suínos e javalis, provalmente em decorrência da não indicação do tratamento da rodococose nestas espécies.

A identificação de marcadores de virulência em linhagens de *R. equi* isoladas de suínos tem demonstrado predomínio dos plasmídios de virulência intermediária (TAKAI et al., 1996a; PATE et al., 2004) e avirulentos (MAKRAI et al., 2005), semelhante ao padrão encontrado em humanos. Raramente são

descritos plasmídios virulentos em suínos (MAKRAI et al., 2002). Em javalis, são insipientes os estudos sobre a virulência plasmidial das linhagens de *R. equi*. Entretanto, Makrai et al. (2008) descreveram pioneiramente o predomínio de linhagens de virulência intermediária e avirulentas isoladas de linfonodos de javalis na Hungria.

Nas 19 linhagens de *R. equi* isoladas de linfonodos de suínos, com e sem linfadenite, provenientes de abatedouros do interior do estado de São Paulo, foi observada alta frequência de plasmídios de virulência intermediária (VapB) em 12 linhagens, notadamente dos tipos 1, 8, 10 e 29, com predomínio do tipo 8, enquanto as demais linhagens foram classificadas como avirulentas. Madarame et al. (1998) no Japão, Makrai et al. (2002) na Hungria e Pate et al. (2004) na Eslovênia também encontraram linhagens predominantemente de virulência intermediária (VapB), apesar da diversidade de tipos plasmidiais. De maneira similar, Makrai et al. (2002) na Hungria, descreveram o predomínio de linhagens de *R. equi* de virulência intermediária do tipo 5 em suínos com linfadenite e em pacientes humanos com rodococose. Takai et al. (2003) na Tailândia, encontraram isolados VapB dos tipos 1 e 7 em suínos e em humanos, nos quais, em ambos, houve predomínio do tipo 1. Na Hungria, Makrai et al. (2005) verificaram predomínio do tipo 5 dentre os isolados VapB de linfonodos suínos com e sem lesões e, secundariamente, os tipos 1, 4, 6, 7, além de nova variante denominada 17.

As quatro linhagens de *R. equi* oriundas de javalis com linfadenite obtidas de animais de abatedouro no interior do estado de São Paulo, revelaram a presença de plasmídios de virulência intermediária (VapB), todos do tipo 8. Diferentemente, Makrai et al. (2008) na Hungria relataram predomínio de linhagens VapB do tipo 5 e, secundariamente, dos tipos 1 e 21, além de três novas variantes denominadas tipos 25, 26 e 27, em linfonodos de javalis de abatedouro.

No presente estudo foi evidenciado o predomínio de plasmídios de virulência intermediária do tipo 8 tanto em suínos como em javalis. Coincidentemente, Ribeiro (2009) verificou que dentre 20 humanos infectados com *R. equi* no Brasil, em cinco foram identificadas linhagens de virulência intermediária (VapB) do tipo 8. Esses achados indicam estreita relação entre linhagens VapB tipo 8 isoladas de suínos e javalis no interior do estado de São

Paulo, e estirpes do mesmo tipo identificadas em infecções humanas por *R. equi* em diferentes estudos do Brasil. No entanto, a diversidade de tipos de VapB a que os animais e os humanos estão expostos sugerem a presença de fatores específicos que determinam a ocorrência dos diferentes tipos plasmidiais em determinadas regiões ou países, no estabelecimento da rodococose em humanos, suínos e outras espécies animais.

Takai et al. (1996a) já havia atentado para a estreita relação entre a ocorrência de linhagens de *R. equi* de virulência intermediária isoladas de suínos e de humanos, particularmente acometidos pelo vírus da Aids. O perfil de virulência de linhagens de *R. equi* isolados de humanos de oito países, em grande parte HIV-positivos, revelou 14 estirpes de virulência intermediária (Austrália, Itália, França, Suíça, EUA) [TAKAI et al., 2003].

No Brasil, Araújo et al. (2000) também revelaram linhagens de virulência intermediária em pacientes com Aids. De maneira similar, Ribeiro (2009) identificou cinco dentre 20 linhagens de *R. equi* isoladas de humanos no Brasil, apresentando virulência intermediária (tipo 8), todas oriundas de pacientes HIV-positivos. O predomínio de linhagens de virulência intermediária encontradas nos suínos e javalis no presente estudo sinaliza indícios destas espécies como potenciais fontes de infecção de estirpes VapB para humanos, especialmente afetados por doenças imunossupressivas e/ou debilitantes.

Curiosamente, a despeito da similaridade de virulência das estirpes que acometem humanos e suínos, os estudos em vários países (VERVILLE et al., 1994; TAKAI et al., 1996a; MAKRAI et al., 2002) e também no Brasil (SEVERO et al., 2001; RIBEIRO, 2009), não estabeleceram relação direta entre o histórico de contato de humanos infectados por *R. equi* com suínos, tampouco com o ambiente dos criatórios. Takai et al. (2003) verificaram o predomínio de linhagens VapB em pacientes com rodococose na Tailândia, nos quais não havia menção do histórico de contato com suínos e/ou com o ambiente de criação. Neste estudo, foi postulado que a transmissão do microrganismo poderia ter ocorrido pelo consumo de produtos e derivados de origem suína, visto que, na Tailândia, a ingestão de carne suína é maior que a bovina, além do hábito local do consumo de carne crua ou mal cozida.

R. equi pode ser isolado das fezes e linfonodos de suínos em idade de abate (BARTON & HUGUES, 1980). O abate clandestino de suínos sem o rigor

da fiscalização sanitária poderia possibilitar o contato de conteúdo de linfonodos com a carne, ou mesmo a contaminação cruzada das fezes com a carne. A utilização desta matéria prima na produção de produtos cárneos e derivados poderia favorecer a infecção de humanos por *R. equi*, pelo consumo de carne contaminada de origem suína (RIBEIRO, 2009).

Das 19 linhagens de origem suína, sete (36,8%) foram identificadas como avirulentas. Pate et al. (2004) na Eslovênia e Makrai et al. (2005) na Hungria também encontraram linhagens avirulentas em linfonodos de suínos. As linhagens avirulentas de *R. equi* são encontradas abundantemente no ambiente de criatórios de animais de produção, incluindo de suínos (TAKAI, 1997; MEIJER & PRESCOTT, 2004), de animais selvagens (TAKAI et al., 2004), assim como no solo, terra, areia de jardins e praças públicas (TAKAI et al., 1996b).

Takai et al. (1995b) no Japão, Takai et al. (2003) na Tailândia, Napoleão et al. (2005) e Ribeiro (2009) no Brasil relataram a rodococose em humanos com e sem Aids, causada por estirpes avirulentas. O conjunto destes resultados alerta para o risco de o contato de indivíduos imunossuprimidos – particularmente acometidos pelo vírus da Aids – com ambientes de criação de suínos na transmissão da rodococose para humanos. Nos pacientes humanos imunossuprimidos, infectados por linhagens avirulentas de *R. equi*, a presença de outros mecanismos de virulência tais como a presença de cápsula, os constituintes da parede bacteriana (ácido micólico), a produção de enzimas (fosfolipase C, colesterol oxidase) e a resistência aos antimicrobianos convencionais seriam suficientes para determinar a virulência do microrganismo (PRESCOTT, 1991).

Várias doenças emergentes e re-emergentes descritas em humanos são causadas por microrganismos veiculados por produtos e subprodutos de origem animal (TREVEJO et al., 2005), entre as quais se inclui a rodococose (ACHA & SZYFRES, 2003). No entanto, não existem métodos específicos de controle e profilaxia da rodococose em humanos. Assim, torna-se mais racional evitar o contato de pacientes debilitados ou imunossuprimidos com animais ou com ambiente dos criatórios (VERVILLE et al., 1994; DONISI et al., 1996; ACHA & SZYFRES, 2003).

O reconhecimento recente dos plasmídios associados à virulência de *R. equi* redirecionaram certos conceitos da doença. A utilização do perfil plasmidial como marcadores de patogenicidade, tornou necessária a comparação da virulência de linhagens isoladas de animais, do ambiente dos criatórios e de humanos, no intuito de esclarecer os mecanismos de transmissão e os reflexos em saúde pública da rodococose, visando fornecer subsídios às ações de controle e profilaxia da doença.

7. CONCLUSÕES

- O perfil de sensibilidade microbiana na prova de difusão com discos mostrou que a azitromicina, gentamicina e levofloxacina foram os antimicrobianos mais efetivos “in vitro” frente as linhagens de *R. equi* isoladas de suínos e javalis, podendo ser indicados como opções de fármacos quando da opção por terapia da doença nestas espécies;
- A CIM da azitromicina, eritromicina e rifampicina revelou efetividade destes antimicrobianos nos isolados de suínos e javalis, reiterando a eficácia “in vitro” destes fármacos em linhagens de *R. equi* obtidas de animais;
- Houve baixa ocorrência de resistência múltipla dos isolados aos antimicrobianos utilizados, decorrente, provavelmente, da baixa frequência de uso destes fármacos no tratamento de suínos e javalis;
- Todos os isolados mostraram efeito “in vitro” de hemólise sinérgica no teste de CAMP, confirmando que a produção das enzimas difusíveis (“Fator equi”) é considerada característica inerente do microrganismo, indicando sua ação como mecanismo de virulência do agente, mediante a captação do íon ferro;
- Foi constatada a capacidade de multiplicação “in vitro” em meio com restrição de ferro em isolados de *R. equi* de suínos e javalis, evidenciando que estas linhagens que mantêm-se viáveis na ausência do íon ferro, provavelmente detém mecanismo adicional de virulência no estabelecimento da rodococose nestas espécies;
- A presença de linhagens de *R. equi* em linfonodos de suínos sem lesões, alerta para a preocupação em saúde pública mediante os riscos de transmissão de patógenos com potencial zoonótico para humanos, mediante o consumo de produtos e subprodutos de origem suína;

- A alta frequência de estirpes VapB em suínos e javalis com linfadenite submandibular, reitera o predomínio de linhagens de virulência intermediária na rodococose nestas espécies;
- A presença de estirpes VapB do tipo 8 e avirulentas em suínos e javalis, similar ao perfil de virulência encontrado em humanos com rodococose, sinaliza para os riscos em saúde pública, representados pela transmissão de linhagens com este padrão de virulência destas espécies animais para humanos.

8. REFERÊNCIAS*

ACHA, P.N.; SZYFRES, B. **Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3.ed. Washington: Organizacion Panamericana de la Salud, 2003. v.1, p.266–283.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA DA CARNE SUÍNA - ABIPECS. **Carne suína brasileira**. 2009. Disponível em: <[http:// www.abipecs.org.br/home.html](http://www.abipecs.org.br/home.html)> Acesso em: 20 abr. 2009.

ADAL, K.A.; SHINER, P.T.; FRANCIS, J.B. Primary subcutaneous abscess caused by *Rhodococcus equi*. **Annals of Internal Medicine**, v. 122, p. 317, 1995.

AMARAL, A.L.; MORÉS, N.; BARIONI JÚNIOR, W.; VENTURA, L.; SILVA, R.A.M.; SILVA, V.S. Fatores de risco associados à ocorrência de linfadenite em suínos na fase de crescimento-terminação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.3, p.120-122, 2004.

ARAÚJO, A.C.; SANTOS-FORTUNA, E.D.; ZANDONÁ-MELEIRO, M.C.; CALORE, E.E.; PEREZ-CALORE, N.M. Detection of the 20-kDa virulence-associated antigen of *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion in pleural tissue obtained from an AIDS patient. **Pathology Research Practice**, v.196, n.5, p.321–327, 2000.

BALIAN, S.C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S.A.; PINHEIRO, S.R.; FERREIRA NETO, J.S.; GUERRA, J.L.; XAVIER, J.G.; MORAIS, Z.M.; TELLES, M.A.S. Linfadenites tuberculóides em suínos abatidos no Estado de São Paulo, Brasil: aspectos macroscópicos histopatológicos e pesquisa de micobactérias. **Revista de Saúde Pública**, v.31, n.4, p.391–397, 1997.

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 6023: Informação, documentação, referências e elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

BARTON, M.D.; HUGHES, K.L. *Corynebacterium equi*: a review. **Veterinary Bulletin**, v. 50, p. 65–80, 1980.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-496, 1966.

BECU, T.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Prevalence of virulence plasmids in soil isolates of *Rhodococcus equi* from 5 horse–breeding farms in Argentina. **Journal of Equine Science**, v.11, n. 2, p. 23–27, 2000.

BERTONE, J.J. Pneumonia e outros distúrbios associados ao *Rhodococcus equi*. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. **Medicina interna eqüina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.830–839.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal e outras legislações de interesse do DIPOA/SDA**. Brasília, 2007. 381p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/Aids. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico DST/Aids**. Brasília, 2007. 48p.

BROWN, A.E. Other *Corynebacteria* and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 4.ed. New York: Livingstone, 1995. p.1872–1877.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI-NCCLS**, approved standard M100-S15. Wayne, PA, USA, 2005.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. Approved standard. 8. ed CLSI-NCCLS (document M2-A9). Wayne: USA, 2006.

CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1992. p.317–335.

DAVIS, W. P.; STEFICEK, B.A.; WATSON, G.L.; YAMINI, B.; MADARAME, H.; TAKAI, S.; RENDER, J.A. Disseminated *Rhodococcus equi* infection in two goats. **Veterinary Pathology**, v. 36, n. 4, p. 336–339, 1999.

DE CICCIO, L.H.S. Javali. Saúde Animal. 2008. Disponível em: <www.saudeanimal.com.br/javali.htm>. Acesso em: 30 set. 2008.

DOIG, C.; GILL, M.J.; CHURCH, D.L. *Rhodococcus equi*—an easily missed opportunistic pathogen. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 23, p. 1–6, 1991.

DONISI, A.; SUARDI, M.G.; CASARI, S.; LONGO, M.; CADEO, G.P.; CAROSI, G. *Rhodococcus equi* infection in HIV–infected patients. **Aids**, v.10, n.4, p.359–362, 1996.

EUZÉBY, J. P. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/rr/Rhodococcus.html>>. Acesso em: 27 jan. 2005.

FARIAS, M.R.; TAKAI, S.; RIBEIRO, M.G.; FABRIS, V.E.; FRANCO, S.R.V.S. Cutaneous pyogranuloma in a cat caused by virulent *Rhodococcus equi* containing an 87kb type I plasmid. **Australian Veterinary Journal**, v.85, n.1-2, p.29-31, 2007.

FERREIRA, A.J.P.; BOTTINO, J.A. **Patogenia da colibacilose aviária**. São Paulo: Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 1998. 31p. (apostila).

FERREIRA NETO, J.C.; CORTES, J.A.; SINHORINI, I.L.; VASCONCELLOS, S.A.; ITO, F.H.; SILVA, E.A.M. Lesão tuberculóide macroscópica como critério diagnóstico da infecção microbiana em suínos abatidos em matadouro. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.266, p.21–23, 1989.

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

GOLUB, B.; FALK, G.; SPINK, W.W. Lung abscess due to *Corynebacterium equi* – Report of first human infection. **Annales of Internal Medicine**, v.66, p.1174–1176, 1967.

GREENE, C.E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3.ed. Philadelphia: Saunders- Elsevier, 2006. 1387p.

HINES, S.A.; KANALY, S.T.; BYRNE, B.A.; PALMER, G.H. Immunity to *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.56, p.177–185, 1997.

HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.119–126.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Portaria nº 102/98, de 15 de julho de 1998**. Implantação de criadouros de animais da fauna silvestre com fins econômicos e industriais. Criadouros de Javali. 2008. Disponível em: <www.jcprada.com.br/home/vendas/ibama.htm> Acesso em: 30 set. 2008.

JORDAN, M.C.; HARRINGTON J.R.; COHEN, N.D.; TSOLIS, R.M.; DANGOTT, L.J.; WEINBERG, E.D.; MARTENS, R.J. Effects of iron modulation on growth and viability of *Rhodococcus equi* and expression of virulence- associated protein A. **American Journal of Veterinary Research**, v.64, n.11, p.1337-1346, 2003.

KOMIJN, R.E.; WISSELINK H.J.; RIJSMAN, V.M.C.; ZURWIEDEN, N.S.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F.G.; EGER, T.; WAGENAAR, J. A.; PUTIRULAN, F.F.; URLINGS, B.A.P. Granulomatous lesions in lymph nodes of slaughter pigs bacteriologically negative for *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and positive for *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.120, p.352-357, 2007.

KOWALSKI, J. J. Mecanismos da doença infecciosa. In: REED, S.M.; BAYLY, W. M. **Medicina interna equina**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 53-106.

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. (Eds.). **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1984. v. 2, p. 1458-1506.

LANGENEGGER, C.H.; LANGENEGGER, J. Prevalência e distribuição dos sorotipos de micobactérias do complexo MAIS isoladas de suínos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.1, p.75–80, 1981.

LANGONI, H.; SILVA, A.V.; CABRAL, K.G.; DOMINGUES, P.F. Aspectos etiológicos na mastite bovina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.20, p.204-209, 1998.

LARA, G.H.B. **Ocorrência de *Mycobacterium* spp e outros microrganismos em linfonodos de suínos e javalis de abatedouro, com e sem linfadenite**. 2009. 71f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LAZZARI, A.; VARGAS, A.C.; DUTRA, V.; ARAÚJO, L.A.; CASTAGNA, L.; COSTA, M.M. Patogenicidade de isolados clínicos e ambientais do *Rhodococcus equi* em camundongos. **Veterinária Técnica**, p.24–30, 1997.

LEÃO, S.C.; BRIONES, M.R.S.; SIRCILI, M.P.; BALIAN, S.C.; MORES, N.; FERREIRA-NETO, J.S. Identification of two novel *Mycobacterium avium* allelic variants in pig and human isolates from Brazil by PCR–restriction enzyme analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.8, p.2592–2597, 1999.

LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *Arcanobacterium haemolyticum*: Two “Coryneform” bacteria increasingly recognized as agents of human infection. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, p.1–10, 1997.

MACGOWAN, K.L.; MANGANO, M.F. Infections on *Rhodococcus equi* in children. **Diagnostic Microbiologic and Infectious Diseases**, v. 14, p. 347-352, 1991.

MADARAME, H.; YAEGASHI, R.; FUKUNAGA, N.; MATSUKUMA, M.; MUTOH, K.; MORISAWA, N.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HASEGAWA, Y.; TAKAI, S. Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15 to 17 kDa antigens: experimental and natural cases in pigs. **Journal of Comparative Pathology**, v.119, n.4, p. 397- 405, 1998.

MARTINS, L.S. **Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do Brasil**: estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade. 2001. 51f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAKRAI, L.; FODOR, L.; CSIVINCSIK, A.; VARGA, J.; SENONER, Z.; SZABÓ, B. Characterization of *R. equi* strains isolated from foals and from immunocompromised human patients. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.48, n.3, p. 253–259, 2000.

MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; SEKIMOTO, R.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; VARGA, J.; FODOR, L.; SOLYMOSI, N.; MAJOR, A. Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. **Veterinary Microbiology**, v.88, n.4, p.377–384, 2002.

MAKRAI, L.; TAKAYAMA, S.; DÉNES, B.; HAJTÓS, I.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; MAJOR, A.; FODOR, L.; VARGA, J.; TAKAI, S. Characterization of virulence plasmids and serotyping of *Rhodococcus equi* isolates from submaxillary lymph nodes of pigs in Hungary. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1246–1250, 2005.

MAKRAI, L.; KOBAYASHI, A.; MATSUOKA, M.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; DÉNES, B.; HAJTÓS, I.; RÉVÉSZ, I.; JÁNOSI, K.; FODOR, L.; VARGA, J.; TAKAI, S. Isolation and characterisation of *Rhodococcus equi* from submaxillary lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*). **Veterinary Microbiology**, v. 131, p. 318-323, 2008.

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

MIRANDA-CASOLUENGO, R.; PRESCOTT, J.F.; VÁSQUEZ-BOLAND, J.A.; MEIJER, W.G. The intracellular pathogen *Rhodococcus equi* produces a catecholate siderophore required for saprophytic growth. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.5, p.1631-1637, 2008.

MORÉS, N.; VENTURA, L.; DUTRA, V.; SILVA, V.S.; BARIONI JÚNIOR, W.; OLIVEIRA, S.R.; KRAMER, B.; FERREIRA NETO, J.S. Linfadenite granulomatosa em suínos: linfonodos afetados e diagnóstico patológico da infecção causada por agentes do Complexo *Mycobacterium avium*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p. 13-17, 2007.

MOSSER, D.M.; HONDALUS, M.K. *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic pathogen. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 29–33, 1996.

MUSCATELLO, G.; GILKERSON, J.R.; BROWNING, G.F. Comparison of two selective media for the recovery, isolation, enumeration and differentiation of *Rhodococcus equi*. **Veterinary Microbiology**, v.119, p.324-329, 2007.

NAPOLEÃO, F.; DAMASCO, P.V.; CAMELLO, T.C.F.; VALE, M.D.; ANDRADE, A.F.B.; HIRATA JÚNIOR, R.; MATTOS-GUARALDI, A.L. Pyogenic liver abscess due to *Rhodococcus equi* in an immunocompetent host. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.2, p.1002–1004, 2005.

OLIVEIRA, S.J.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.E.S.N.; RAMOS, E.T. Etiologia de lesões tuberculóides em suínos no Rio Grande do Sul. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.23, p.112–116, 1995.

OLIVEIRA, S.J. Linfadenite cervical por *Rhodococcus equi*. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D.E.S.N. **Doença dos suínos**. Goiânia: Cânone, 2007. p. 147.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – OPS. Rodococosis. In: _____. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis**. 3.ed. Washington: OPS, 2001. p.236-239 (Publicación Científica y Técnica, 580).

PATE, M.; ZDOVC, I.; PIRS, T.; KRT, B.; OCEPEK, M. Isolation and characterisation of *Mycobacterium avium* and *Rhodococcus equi* from granulomatous lesions of swine lymph nodes in Slovenia. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.52, n.2, p.143-150, 2004.

PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, p. 20–34, 1991.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.; CARTER, G.R. *Corynebacterium* species and *Rhodococcus equi*. In: _____. **Clinical veterinary microbiology**. London: Wolfe, 1994. p. 137–143.

RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. **Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats**. 9. ed. Philadelphia: Saunders–Elsevier, 2007. p.800–804.

RIBEIRO, M.G.; CARVALHO FILHO, A.S.; LISTONI, F.J.P. Dimetil-sulfóxido-DMSO no teste de sensibilidade microbiana in vitro em cepas de *Rhodococcus equi* isoladas de afecções pulmonares em potros. **Ciência Rural**, v.31, n.5, p. 889-892, 2001.

RIBEIRO, M.G.; NARDI JUNIOR, G.; DIAS JUNIOR, J.G.; PAES, A.C.; MEGID, J.; GONÇALVES, R.C.; SILVA JUNIOR, F.F. Polissinovite auto-imune por *Rhodococcus equi* em potro, secundária à enterocolite. **Revista de Educação Continuada do CRMV-SP**, v.5, n.2, p.206–214, 2002.

RIBEIRO, M.G.; SEKI, I.; YASUOKA, K.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of virulent *Rhodococcus equi* from foals in Brazil: virulence plasmids of 85–kb type I, 87–kb type I, and a new variant, 87–kb type III. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.28, n.1, p.53–61, 2005.

RIBEIRO, M.G. **Fatores de virulência em linhagens de *Rhodococcus equi* isoladas de equinos, suínos e humanos**. 2009. 66f. Livre docência – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ROPPIA, L. Brasil: o consumo de carnes passado a limpo. **Revista Porkworld**, n.43, p.17 – 20, 2008.

SANTOS-FORTUNA, E.D.; ZANDONÁ-MELEIRO, M.C.; MASTROIANNI, C.M.; LICHTNER, M.; MENGONI, F.; VULLO, V.V.; ARAÚJO, A.C. Search for virulence- associated antigens of *Rhodococcus equi* in strains isolated from patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.3, n.5, p.184-188, 1999.

SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Rodococoses. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.1032–1033.

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. **Jornal de Pneumologia**, v.27, n.3, p.158–162, 2001.

SILVA, V.S.; MORÉS, N.; DUTRA, V.D.; FERREIRA–NETO, J.S.; SAAD, M.H.F. Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium–intracellulare* em suínos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n.6, p.562–566, 2000.

SILVEIRA, P.R.S.; TALAMINI, D.J.D. Suinocultura: um agronegócio lucrativo. **Revista CFMV**, n. 42, p.11-20, 2007.

SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D.; BARBER, T.W.; RICH, J.; VON REYN, C.F.; PIECIAK, W.; BARLOW, M.A.; MASLOW, J.N. Polyclonal infections due to *Mycobacterium avium* complex in patients with aids detected by pulsed–field electrophoresis of sequential clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.7, p.1773–1778, 1994.

STRAW, B.E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W.L.; TAYLOR, D.J. (Eds.). **Diseases of swine**. 8.ed. Ames: Iowa State University Press; Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 638-639.

SUINOCULTURA INDUSTRIAL. Brasileiro consome cada vez mais carne suína e de frango. Disponível em: http://www.suinoculturaindustrial.com.br/portal_gessulli>. Acesso em: 13 abr. 2009.

SUSSMAN, M. **Escherichia coli: Mechanisms of virulence**. United Kingdom: Cambridge University Press, 1997. 639p.

TAKAI, S.; SEKIZAKI, T.; OZAWA, T.; SUGAWARA, T.; WATANABE, Y.; TSUBAKI, S. Association between a large plasmid and 15 to 17–kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. **Infection and Immunity**, v.59, n.11, p.4056–4060, 1991.

TAKAI, S.; WATANABE, Y.; IKEDA, T.; OZAWA, T.; MATSUKURA, S.; TAMADA, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Virulence-associated plasmids in *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.31, p.1726–1729, 1993.

TAKAI, S.; ANZAI, T.; YAMAGUCHI, K.; KAKIZAKI, S.; TAKAHAGI, J.; SATO, Y.; TAKEHARA, F.; TAMADA, Y.; MATSUKURA, S.; TANI, A.; KATO, M.; SENO, N.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; KAMADA, M. Prevalence of virulence plasmids in environmental isolates of *R. equi* from horse-breeding farms in Hokkaido. **Journal of Equine Science**, v.5, p.21–25, 1994.

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

TAKAI, S.; 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. **Journal of Infectious Diseases**, v.172, p.1306–1311, 1995b.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCHIAI, S.; IMAI, Y.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; SEKIZAKI, T. Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.1034–1037, 1996a.

TAKAI, S.; FUKUNAGA, N.; OCHIAI, S.; SAKAI, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Isolation of virulent and intermediately virulent *Rhodococcus equi* from soil and sand on parks and yards in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.58, n.7, p.669–672, 1996b.

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

TAKAI, S.; SHODA, M.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; FORTIER, G.; PRONOST, S.; RAHAL, K.; BECU, T.; BEGG, A.; BROWNING, G.; NICHOLSON, V. M.; PRESCOTT, J. F. Restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in *Rhodococcus equi*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3417–3420, 1999.

TAKAI, S.; MURATA, N.; KUDO, R.; NAREMATSU, N.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S. Two new variants of the *Rhodococcus equi* virulence plasmid, 90 kb type III and type IV, recovered from a foal in Japan. **Veterinary Microbiology**, v.82, n.4, p. 373–381, 2001a.

TAKAI, S.; CHAFFIN, M.K.; COHEN, N.D.; HARA, M.; NAKAMURA, M.; KAKUDA, T.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; MARTENS, R.J. Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in soil from five *R. equi*-endemic horse-breeding farms and restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in isolates from soil and infected foals in Texas. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, p.489–494, 2001b.

TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; SASAKI, C.; ONISHI, Y.; YAMANO, S.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TRINARONG, C.; ROJANASTHIEN, S.; SIRIMALAISUWAN, A.; TESAPRATEEP, T.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. **Amerinan Journal Tropical Medicine Hygiene**, v.66, n.1, p.52–55, 2002.

TAKAI, S.; THARAVICHITKUL, P.; TAKARN, P.; KHANTAWA, B.; TAMURA, M.; TSUKAMOTO, A.; TAKAYAMA, S.; YAMATODA, N.; KIMURA, A.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; MANEEKARN, N.; SIRISANTHANA, T.; KIRIKAE, T. Molecular epidemiology of *Rhodococcus equi* of intermediate virulence isolated from patients with and without acquired immune deficiency syndrome in Chiang Mai, Thailand. **The Journal of Infectious Diseases**, v.188, p.1717- 1723, 2003.

TAKAI, S.; SYAKALIMA, M.; YASUDA, J.; SASAKI, Y.; TSUTSUMI, H.; MIYAGAWA, E.; WADA, K.; KAKUDA T.; TSUBAKI, S.; SUGIMOTO, C. Isolation of *Rhodococcus equi* from the feces of indigenous animals and soil from the Lower Zambezi National Park and Lochinvar National Park, Zambia. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 6, p. 743-746, 2004.

TKACHUK–SAAD, O.; PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi* plasmids: isolation and partial characterization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p. 2696–2700, 1991.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2002. 1216p.

TIZARD, I.R. Resistência às bactérias e aos organismos relacionados. In:_____. **Imunologia veterinária**: uma introdução. 6.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.282-297.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

TREVEJO, R.T.; BARR, M.C.; ROBINSON, R.A. Important emerging infectious bacterial zoonotic infections affecting the immunocompromised. **Veterinary Research**, v.36, p.493–506, 2005.

TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 9.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 682p.

VERVILLE, T.D.; HUYNCKE, M.M.; GREENFIELD, R.A.; FINE, D.P.; KUHLS, T.L.; SLATER, L.N. *Rhodococcus equi* infections in humans. **Medicine**, v.73, p.119–132, 1994.

WATANABE, H.; ASOH, N.; KOBAYASHI, S.; WATANABE, K.; OISHI, K.; KOSITSAKULCHAI, W.; SANCHAI, T.; KHANTAWA, B.; THARAVICHITKUL, P. SIRISANTHANA, T.; NAGATAKE, T. Clinical and microbiological characteristics of community- acquired pneumonia among human immunodeficiency vírus-infected patients in northern Thailand. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.14, p.105-109, 2008.

WILSON, W.D. Foal pneumonia. In: ROBINSON, N.E.; MILLS, L. (Eds.). **Current therapy in equine medicine**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p. 466 – 473.

WORLD HEALTH ORGANIZATION–WHO. Global HIV prevalence has levelled off improvements in surveillance increase understanding of the epidemic, resulting in substantial revisions to estimates. 2007. Disponível em: <www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr61/en/print.html>. Acesso em: 03 set. 2008.

YUYAMA, T.; YUSA, S.; YOSHIZUMI, K.; YAMANO, S.; MURATA, S.; HIROSE, T.; OSANAI, R.; ONISHI, Y.; OSATO, S.; SASAKI, C.; SASAKI, Y.; KAKUDA, T.; TSUBAKI, S.; TAKAI, S. Molecular epidemiology of VapA- positive *Rhodococcus equi* in thoroughbred horses in Kagoshima, Japan. **Journal of Veterinary medical Science**, v.64, n.8, p. 715–718, 2002.

ZINK, M.C.; YAGER, J.A.; SMART, N.L. *Corynebacterium equi* infections in horses, 1958–1984: a review of 131 cases. **Canadian Veterinary Journal**, v.27, p. 213–217, 1986.

ANEXO 1

Anexo 1. Cepas de referência de *Rhodococcus equi* utilizadas como controle- positivas na reação em cadeia pela polimerase, para avaliação do perfil de virulência de linhagens isoladas de suínos e javalis. Botucatu, SP, 2009.

Identificação da cepa-padrão	Proteína associada à virulência (Vap)	Característica de virulência (tipo)
ATCC 33701	VapA	85-kb tipo I
96E	VapA	85-kb tipo II
T47- 2	VapA	85-kb tipo III
T43	VapA	85-kb tipo IV
222	VapA	87-kb tipo I
96B6	VapA	87-kb tipo II
L1	VapA	90-kb tipo I
S11-8	VapA	90-kb tipo II
<i>Kuma 83-3</i>	VapA	90-kb tipo III
<i>Kuma 83-10</i>	VapA	90-kb tipo IV
J21-2	VapA	90-kb tipo V
A2	VapB	tipo 1
S2	VapB	tipo 2
S3	VapB	tipo 3
S4	VapB	tipo 4
A5	VapB	tipo 5
S6	VapB	tipo 6
S7	VapB	tipo 7
S8	VapB	tipo 8
S9	VapB	tipo 9
A11	VapB	tipo 10
A43	VapB	tipo 11
70	VapB	tipo 12
H3	VapB	tipo 13
H25	VapB	tipo 14
H43	VapB	tipo 15
H66	VapB	tipo 16
316	VapB	tipo 17
KVDL 13	VapB	tipo 18
78/00	VapB	tipo 19
51/01	VapB	tipo 20
55/01	VapB	tipo 21
KVDL 9	VapB	tipo 22
KVDL 22	VapB	tipo 23
32/00	VapB	tipo 24

* Cepas cedidas pelo Prof. Dr. Shinji Takai, da Universidade de Kitasato, Japão.

TRABALHO CIENTÍFICO

Trabalho aceito pela Revista Arquivos do Instituto Biológico

Linfadenite infecciosa em suínos: etiologia, epidemiologia e aspectos em saúde pública

Gustavo Henrique Batista Lara¹, Marcio Garcia Ribeiro², Alessandro Guazzelli¹, Marta Catarina Fernandes¹.

¹ Mestrando do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública; Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Distrito de Rubião Jr. s/n, cep:18.618-000 – Botucatu – SP.

² Prof. Ass. Dr. da Disciplina de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos; do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública; Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Campus de Botucatu, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública. Distrito de Rubião Jr. s/n, cep:18.618-000 – Botucatu – SP.

Resumo

A linfadenite infecciosa em suínos gera altos prejuízos com a condenação de carcaças, pela similaridade das lesões causadas pelos agentes causais e de certos microrganismos, reforçando a necessidade da vigilância sanitária continuada nas afecções de linfonodos em suínos. O crescente isolamento de *Mycobacterium* sp e de *Rhodococcus equi* em pacientes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids) redobrou a preocupação na vigilância da linfadenite na linha de abate,

em virtude destes microrganismos figurarem dentre as principais causas da linfadenite em suínos. O presente artigo revisou os principais aspectos da linfadenite infecciosa em suínos, com ênfase a epidemiologia e reflexos em saúde pública, e a ocorrência de *Mycobacterium* sp e *Rhodococcus equi* como agentes causais da linfadenite.

Palavra chave: Suínos, *Mycobacterium*, *R. equi*

Infectious lymphadenitis in swine: etiology, epidemiology and public health aspects

Abstract

The infectious lymphadenitis in swines lead to high damages with the lasses of carcasses, due to similarity ot lesions caused by causal agents and zoonotic risks of certain microorganisms, reinforcing the important of periodic sanitary vigilance in affections of lymf nodes in swines. The increasing of *Mycobacterium* sp and *Rhodococcus equi* in patients affected by acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) had highlighted the importance of monitoring of the infectious lymphadenitis in slaughterhouses, in virtue of these microorganisms to represent the most-common causes of swine lymphadenitis. The present article revised the mainly aspects of lymphadenitis in swine, with emphasis to epidemiology and public health impact, and *Mycobacterium* and *Rhodococcus equi* as causal agents.

Keywords: Swines, *Mycobacterium*, *R. equi*

1. INTRODUÇÃO

A carne suína figura dentre as principais fontes de proteína de origem animal para os humanos. Representa cerca de 44,0% do consumo de carne de origem animal

50 em todo o mundo, seguida pela carne bovina (29,0%) e de aves (23,0%). Em contraste,
51 no Brasil, em virtude de diferenças quanto ao poder aquisitivo, hábitos e costumes da
52 população, a carne mais consumida é a de frango (43,0%), seguida pela bovina (42,2%)
53 e suína (14,8%). Em todo o mundo, o alto consumo da carne de origem animal exige do
54 sistema de vigilância sanitária padrões rígidos de controle de doenças nas diferentes
55 fases da cadeia produtiva, quais sejam: criação, abate, industrialização e
56 comercialização dos produtos. Neste contexto, a fiscalização sanitária dos animais no
57 momento do abate desempenha papel fundamental na vigilância de doenças (ROPPE,
58 2008).

59 A Associação Brasileira da Indústria Produtora e Exportadora de Carne Suína–
60 ABIPECS, referiu que o Brasil é o terceiro produtor mundial de suínos, superado
61 somente pelos EUA e China. O rebanho suíno brasileiro em 2008 foi da ordem de 32
62 milhões de cabeças destinadas à suinocultura industrial e cinco milhões de animais
63 criados sob a forma de subsistência. Em 2007, do efetivo do rebanho do país, estima-se
64 que 24,3 milhões de animais foram abatidos sob fiscalização da inspeção federal. O
65 Brasil produziu três milhões de toneladas e exportou 600 mil toneladas de carne suína
66 em 2007, superando um bilhão de dólares em receita com a atividade. A cadeia
67 produtiva suína envolve ao redor de um milhão de pessoas no Brasil, e é considerada
68 uma das mais importantes divisas do agronegócio brasileiro (ABIPECS, 2008).

69 As recentes mudanças sócio-econômicas e sanitárias impõem aos suinocultores o
70 incremento na qualidade de seus produtos e redução de custos, visando atender às
71 exigências do mercado (LEITE *et al.*, 2001).

72 A linfadenite em suínos é uma das principais afecções que assolam a
73 suinocultura no Brasil e em todo o mundo, particularmente pelo alto prejuízo
74 econômico com a condenação de carcaças (ACHA; SZYFRES, 2003). Estudo realizado

na região sul do Brasil no ano de 1999, demonstrou impacto negativo para a suinocultura decorrente da linfadenite granulomatosa, da ordem de 6,9 a 8,0 milhões de reais (MARTINS *et al.*, 2001).

Os quadros de linfadenite infecciosa em suínos, comumente são diagnosticados na linha de abate (SILVA *et al.*, 2000).

A prática de condenação das carcaças é justificada pelo potencial zoonótico de vários microrganismos envolvidos na gênese da linfadenite em suínos, em especial *Mycobacterium* sp e *Rhodococcus equi* (*R. equi*) (ACHA; SZYFRES, 2003), e também pela impossibilidade de se distinguir, macroscopicamente na linha do abate, as lesões determinadas por outros agentes como *Staphylococcus* sp, *Nocardia* sp, *Streptococcus* sp e *Arcanobacterium pyogenes* (LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1981).

Os prejuízos gerados com a condenação de carcaças, a complexidade etiológica e o potencial zoonótico dos agentes causais levam a preocupação contínua do sistema de vigilância sanitária no controle da linfadenite infecciosa da doença em suínos. Ademais, o crescente isolamento de espécies de *Mycobacterium* sp e *R. equi* em pacientes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (Aids), redobram a preocupação dos profissionais de saúde com a linfadenite infecciosa suína (ACHA; SZYFRES, 2003). Postula-se que a transmissão de *Mycobacterium* sp e *R. equi* para o homem possa ocorrer pelo criatórios, bem como pelo consumo de produtos e derivados de origem suínos (KIEHN *et al.*, 1985; HOFFNER *et al.*, 1990; JOONES, 1996).

O presente artigo procura revisar os principais aspectos da etiologia, epidemiologia e reflexo em saúde pública da linfadenite suína, com ênfase a ocorrência de *Mycobacterium* sp e *Rhodococcus equi*.

2. Considerações gerais sobre a etiologia da linfadenite infecciosa em suínos

100

101 A linfadenite em suínos é caracterizada pela pluralidade de agentes infecciosos,
102 predominantemente de origem bacteriana, muitos dos quais com potencial zoonótico
103 (SILVA *et al.*, 2000). As lesões são causadas principalmente pelo gênero
104 *Mycobacterium* e, em menor frequência, por *Rhodococcus equi* (*R.equi*).
105 Ocasionalmente é determinada por outras bactérias que incluem *Arcanobacterium*
106 *pyogenes*, enterobactérias, os gêneros *Streptococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Nocardia*.
107 As lesões de origem granulomatosa ou piogranulomatosa causadas por estes agentes,
108 são indistinguíveis macroscopicamente na linha de abate, necessitando de suporte
109 laboratorial para confirmação diagnóstica.

110 No Brasil são escassos os estudos conduzidos na investigação etiológica dos
111 microrganismos envolvidos na casuística de linfadenite em suínos. OLIVEIRA *et al.*
112 (1995) avaliaram a etiologia bacteriana de 25 linfonodos apresentando lesões
113 macroscópicas de linfadenite no estado do Rio Grande do Sul. Foram isoladas quatro
114 linhagens de *Mycobacterium bovis*, 15 estirpes do grupo MAIS (*M. avium*, *M.*
115 *intracellulare* e *M. scrofulaceum*) e seis linhagens de *R. equi*. Os autores reforçaram
116 para a similaridade das lesões linfonodais entre os gêneros *Mycobacterium* e
117 *Rhodococcus*, e a necessidade de diagnóstico diferencial entre esses microrganismos, na
118 gênese das lesões “tuberculóides” em linfonodos de suínos.

119 Estudos de lesões “tuberculóides” em 60 carcaças destinadas ao abate no Estado
120 de São Paulo constatou a predominância do complexo MAI (*Mycobacterium avium*–
121 *intracellulare*), notadamente em linfonodos mesentéricos (BALIAN *et al.*, 1997). A
122 ocorrência do gênero *Mycobacterium* sp em 64 criatórios de suínos no sul do país
123 apresentando linfadenite caseosa no momento do abate foi investigada utilizando

124 diagnóstico molecular. Neste estudo, foram identificadas 107 estirpes de *M. avium*
125 (LEÃO *et al.*, 1999).

126 As infecções por *R. equi* em suínos são restritas ao sistema linfático e
127 manifestam-se sob a forma de linfadenite, desenvolvendo lesões similares à tuberculose
128 e micobacterioses (TAKAI, 1997). Os suínos são considerados reservatório do
129 microrganismo. A linfadenite suína assume comportamento não progressivo ou não
130 disseminado, levando freqüentemente ao descarte de carcaças com linfonodos
131 acometidos (PRESCOTT, 1991). Entretanto, não está completamente esclarecido o
132 papel epidemiológico dos suínos como fontes de infecção de *R. equi* para o homem e
133 outros animais.

134 Em que pese a importância de *R. equi* na etiologia da linfadenite suína, são
135 escassos os estudos no Brasil visando a determinação da prevalência do microrganismo
136 ou mesmo a detecção da virulência de estirpes de *R. equi* isoladas de suínos (RIBEIRO
137 *et al.*, 2007).

138

139 **2.1 Linfadenite suína pelo gênero *Mycobacterium***

140

141 Os agentes pertencentes ao gênero *Mycobacterium* são bacilos álcool-ácido
142 resistentes, não formadores de esporos (ACHA; SZYFRES, 2003), em forma de bastão,
143 aeróbicos e imóveis (QUINN *et al.*, 2005), caracterizados por processos infecto-
144 contagiosos crônicos, com o desenvolvimento de reações granulomatosas típicas
145 denominadas “tubérculos” (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

146 As micobactérias possuem alto teor de lipídios em sua parede celular, tornando-
147 as resistentes a muitos desinfetantes e ao meio ambiente. Não se coram adequadamente
148 pela coloração clássica de Gram. São identificadas pela coloração de Ziehl-Neelsen, na

149 qual a fucsina carbólica se liga fortemente aos lipídios da parede celular e não é
150 removida pelo descorante álcool – ácido, mostrando microrganismos de tonalidade
151 avermelhada denominados bacilos álcool – ácido resistentes (BAAR) (ACHA;
152 SZYFRES, 2003; QUINN *et al.*, 2005). O microrganismo multiplica-se em meios
153 específicos compostos de gema de ovo e amido, enriquecidos por asparagina, contendo
154 verde malaquita como descontaminante. Os meios mais utilizados para o isolamento são
155 o Löewestein-Jensen e o Stonebrink-Lesslie (CORRÊA; CORRÊA, 1992).

156 A espécie suína é suscetível à infecção pelo *M. bovis*, *M. tuberculosis* e as
157 micobacterias não-tuberculosas, das quais se destacam às pertencentes ao Complexo
158 *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI) (CORRÊA; CORRÊA, 1992). As espécies
159 *M. bovis* e *M. tuberculosis* são consideradas as mais patogênicas, frequentemente
160 diagnosticadas nos bovinos e em humanos, respectivamente (ROXO, 1996; JOONES,
161 1996; ACHA; SZYFRES, 2003).

162 As micobactérias pertencentes ao complexo MAI são oportunistas e
163 reconhecidas como atípicas (JOONES, 1996), representadas pelo complexo *M. avium-*
164 *intracellulare* que possui 28 sorotipos (RADOSTITS *et al.*, 2007).

165 As infecções por micobactérias em suínos são assintomáticas, detectadas
166 geralmente nos abatedouros, visto que os animais são abatidos relativamente jovens
167 (SILVA *et al.*, 2000), ao redor de 120 dias, não havendo tempo hábil para o
168 desenvolvimento de grandes áreas lesionais.

169 As lesões ou granulomas geralmente estão restritos aos linfonodos mesentéricos
170 e submandibulares (SILVA *et al.*, 2000) e, secundariamente, mediastínicos. Os
171 linfonodos apresentam-se aumentados de volume em diferentes graus. Ao corte
172 mostram lesões necropurulentas focais, de diâmetro variável e tonalidade branco-
173 amarelada, levando à condenação parcial ou total da carcaça (MARTINS *et al.*, 2001).

174 A principal via de transmissão das micobactérias para os suínos é a oral. Após a
175 ingestão, invadem a mucosa do trato digestório e são drenadas para os linfonodos
176 regionais (ACHA; SZYFRES, 2003).

177 A criação dos suínos em solo sujo ou sobre cama de palha, em vez de concreto
178 liso ou chão ripado, tende a aumentar a disseminação da doença no plantel, visto que
179 cama de palha, serragem ou maravalha são facilmente contaminadas por fezes de
180 animais doentes (RADOSTITS *et al.*, 2007).

181 A excreção ativa das micobactérias pelas fezes e urina dos suínos infectados
182 constitui-se em importante via de eliminação do microrganismo e perpetuação da
183 doença nos platéis (SILVA *et al.*, 2000). PAVLAS, em 1987, inoculou
184 experimentalmente micobactérias em suínos, demonstrando que o período de excreção
185 ativa máxima nas fezes foi entre 35 - 42 dias pós-infecção, e que a quantidade de
186 bacilos eliminados e o período de excreção dependem da virulência e da dose infectante
187 da micobactéria. SMITH *et al.* (1993) alertaram que as fezes de animais de produção
188 contendo o gênero *Mycobacterium* podem permanecer entre 6 a 8 semanas
189 contaminadas no ambiente, enquanto o microrganismo pode manter-se viável até 18
190 dias em água estagnada.

191 Ocasionalmente, o leite de porcas infectadas pode servir como via de
192 transmissão da micobacteriose para os leitões (SMITH *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*,
193 1995).

194 CARDOSO *et al.* (2000) assinalaram que a ingestão de maravalha utilizada
195 como cama favorece a infecção das micobactérias. Outras vias de transmissão como a
196 ingestão de água (JONES, 1996), leite ou produtos lácteos contaminados, restos de
197 comida de cozinhas, ou mesmo o contato com abatedouros de aves (QUINN *et al.*,

2005) são aventadas na transmissão de bactérias do gênero *Mycobacterium* para os suínos (PAVLAS, 1987; ACHA; SZYFRES, 2003).

O controle e a profilaxia das infecções em suínos pelas diferentes espécies do gênero *Mycobacterium* envolvem diferentes práticas de manejo nas criações de exploração industrial e de subsistência. O controle do complexo MAC pode ser alcançado pela não utilização da cama de frango na alimentação dos animais e evitar a criação de suínos próximos às granjas de aves. O controle e a profilaxia de *M. bovis* pode ser obtido evitando a coabitação de bovinos com suínos, particularmente em áreas endêmicas para a tuberculose bovina. Embora menos freqüente na etiologia da linfadenite suína, o controle de *M. tuberculosis* pressupõe cuidados com a saúde dos tratadores e outros profissionais que mantêm contato estreito com os animais. Medidas gerais de controle e profilaxia das infecções pelo gênero *Mycobacterium* incluem também retirar diariamente os dejetos das instalações, realizar a desinfecção periódica das instalações e acompanhamento do abate dos animais, com vistas a identificar lesões sugestivas em linfonodos e encaminhar para o diagnóstico microbiológico.

213

2.2 Linfadenite suína por *Rhodococcus equi*

215

R. equi anteriormente denominado *Corynebacterium equi* é reconhecido como bactéria intracelular facultativa, de comportamento oportunista. Apresenta-se sob a forma de cocos ou pequenos bacilos Gram-positivos, com 1 a 5 µm, parcialmente ácido-resistentes. O microrganismo é isolado a partir de 48–72 horas, em condições de aerobiose, a 37°C, no meio de ágar-sangue ovino ou bovino (5%) desfibrinado. As colônias são tipicamente mucóides, não hemolíticas, inicialmente de coloração branco-

222 acinzentada que, posteriormente, assumem tonalidade salmão (QUINN *et al.*, 1994;
223 QUINN *et al.*, 2005).

224 Diferentes fatores de virulência conferem patogenicidade ao *R. equi*, que
225 incluem a presença de cápsula polissacarídica e (PRESCOTT, 1991), do ácido micólico
226 na parede bacteriana, produção das exoenzimas fosfolipase C e colesterol oxidase, e a
227 resistência aos antimicrobianos convencionais. A cápsula e o ácido micólico dificultam
228 a fagocitose, impedindo a formação do fagolisossomo. Microrganismos contendo ácido
229 micólico na parede celular tendem a desenvolver reações do tipo piogranulomatosa, de
230 difícil resolução tecidual (HIRSH; ZEE, 2003). As Enzimas fosfolipase C e colesterol
231 oxidase atuam nos fosfolipídios da parede de hemácias, liberando o íon ferro, elemento
232 fundamental no metabolismo bacteriano. A produção destas exoenzimas é considerado
233 importante mecanismo de virulência bacteriano mediante a captação de ferro exógeno, e
234 recebe a denominação de “Fator equi”. A presença deste fator hemolítico pode ser
235 visualizado no teste clássico de CAMP, em 48 horas, no meio de ágar sangue ovino,
236 semeando *R. equi* perpendicularmente a cepa hemolítica de *Staphylococcus aureus*. Na
237 intersecção dos microrganismos ocorre a formação de “ponta de seta” ou fenômeno
238 denominado de hemólise sinérgica, também utilizado na classificação fenotípica de *R.*
239 *equi* (PRESCOTT, 1991).

240 Nas últimas décadas foram reformulados os conceitos sobre a virulência de *R.*
241 *equi*. Assume-se, atualmente, que o mecanismo de virulência das linhagens de *R. equi*
242 está intimamente ligado a presença de grande plasmídeo (85 a 90kb), que contém genes
243 responsáveis pela expressão de proteínas (antígenos) entre 15 a 17 kDa, denominada
244 VapA. As linhagens dotadas destes genes são isoladas predominantemente de casos de
245 pneumonia em potros e menos frequente de humanos, particularmente em pacientes
246 acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida – Aids (TAKAI, 1997).

247 Linhagens de *R. equi* detentoras de plasmídios entre 79 a 100kb são identificadas
248 principalmente em pacientes com Aids e em linfonodos submandibulares de suínos –
249 com e sem sinais de linfadenite –, classificadas como de virulência intermediária
250 (VapB) (TAKAI, 1997).

251 As linhagens de *R. equi* isoladas do meio ambiente dos animais, são
252 classificadas como avirulentas, visto que não possuem plasmídios que expressam a
253 produção de proteínas de 15 a 17kDa (VapA) ou de 20kDa (VapB), embora também
254 sejam isoladas de humanos com rodococose, com e sem doenças imunossupressivas
255 (TAKAI, 1997). Entretanto, ocasionalmente são identificadas estirpes virulentas de *R.*
256 *equi* provenientes do ambiente (TAKAI, 1997), suportando a evidência de que
257 linhagens ambientais também determinam infecções em animais e no homem. Nestes
258 casos, presume-se que estas linhagens sejam transmitidas por contaminação de
259 alimentos, água, ferimentos e/ou por aerossolização.

260 A identificação das proteínas associadas à virulência (Vap's) culminam com a
261 classificação das linhagens de *R. equi* em virulentas, de virulência intermediária e
262 avirulentas (TAKAI, 1997). No entanto, permanece não completamente esclarecida a
263 função das proteínas associadas à virulência na patogenicidade do agente (HIRSH;
264 ZEE, 2003), a despeito que evidências apontem que as estirpes dotadas de plasmídeos
265 virulentos, possuam maior habilidade em manterem-se viáveis no interior de
266 macrófagos, resistindo à fagocitose (LAZZARI *et al.*, 1997).

267 A linfadenite é a principal manifestação clínica da rodococose em suínos.
268 Entretanto, permanece controversa a patogenicidade do *R. equi* na espécie, em face da
269 reduzida progressão ou disseminação do microrganismo nos suínos (MAKRAI *et al.*,
270 2002).

271 Comumente são acometidos os linfonodos submandibulares e, secundariamente,
272 mesentérico e mediastínicos nos suínos. Porém, frequentemente o microrganismo
273 também é isolado de linfonodos sem lesões aparentes (PRESCOTT, 1991). A virulência
274 de isolados de *R. equi* recuperadas de linfonodos de suínos têm detectado
275 predominantemente plasmídios de virulência intermediária (VapB), similar ao perfil de
276 linhagens isoladas de pacientes com Aids (TAKAI, 1997). Em 56 linhagens de *R. equi*
277 isoladas de 1832 linfonodos de suínos em abatedouros sem lesões na linha de abate, 54
278 estirpes foram identificadas produtoras de VapB e duas de VapA.

279 MADARAME *et al.* (1998) identificaram 5,5% de estirpes de *R. equi* virulentas
280 e de virulência intermediária em 1615 linfonodos de suínos. Na Hungria, em 164
281 estirpes de *R. equi* recuperadas de linfonodos de suínos, foi detectada a produção de
282 VapB em 44 (26,8%) linhagens (MAKRAI *et al.*, 2005).

283 A despeito da similaridade entre a virulência de linhagens isoladas de pacientes
284 com Aids e de suínos, não está completamente esclarecido o papel dos suínos como
285 fonte de infecção para o homem, e outros animais, ou mesmo na contaminação
286 ambiental com linhagens virulentas (TAKAI *et al.*, 1996).

287 Macroscopicamente não é impossível diferenciar o aspecto das lesões nos
288 linfonodos por *Mycobacterium* sp e *R. equi* no momento do abate, bem como outros
289 causas bacterianas de linfadenite. Assim, permanece a recomendação do diagnóstico
290 microbiológico na diferenciação destes microrganismos, em virtude do potencial
291 zoonótico, bem como para nortear ações de controle nos plantéis.

292

293 3. SAÚDE PÚBLICA

294

295 Diferentes microrganismos são isolados de linfonodos de suínos ao abate, com
296 destaque para *Mycobacterium* sp, *R. equi*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus*
297 sp, *Staphylococcus* sp, entre outros (LANGENEGGER; LANGENEGGER, 1981;
298 FERREIRA–NETO *et al.*, 1989; PRESCOTT *et al.*, 1991; ACHA; SZYFRES, 2003).
299 Contudo, o gênero *Mycobacterium* é reconhecido como o principal agente causal da
300 linfadenite em suínos com potencial zoonótico. O impacto da tuberculose e
301 micobacterioses enquanto zoonoses e a similaridade lesional entre os agentes reforçam a
302 preocupação vigilância sanitária com a linfadenite em suínos, que culminam com o
303 descarte das carcaças com lesões ao abate (FERREIRA NETO *et al.*, 1989; ACHA;
304 SZYFRES, 2003).

305 Nos últimos anos tem ocorrido incremento das doenças consideradas emergentes
306 e reemergentes no homem, particularmente a tuberculose. Neste contexto, assume
307 importância recente também a rodococose (ACHA; SZYFRES, 2003). A ocorrência
308 dessas doenças está relacionada a certos grupos de risco ou de vulnerabilidade que
309 incluem pessoas imunossuprimidas, especialmente, hepatopatas, transplantados,
310 alcoólatras, acometidos de neoplasias (leucemia, linfoma), usuários de drogas injetáveis
311 e, principalmente, infectados pelo vírus da Aids (DOIG *et al.*, 1991).

312 Dados recentes estimam que, em média, 39,4 milhões de pessoas estejam
313 infectadas pelo vírus da Aids em todo o mundo. Somente na América Latina, refere-se
314 que 1,7 milhões de indivíduos estejam infectados, que representa expectativa de
315 240.000 novos casos/ano (World Health Organization–WHO, 2005). Somente no
316 estado de São Paulo, em 2004, foram descritos 4.786 novos casos (BRASIL, 2005a,
317 2005b). O notário avanço da em todo o mundo, incluindo o Brasil, e o aumento da co–
318 infecção desses pacientes com microrganismos oportunistas, tem redobrado a
319 preocupação dos órgãos de vigilância epidemiológica com as doenças emergentes e

reemergentes, das quais, nesse cenário, inserem-se a tuberculose, micobacterioses e rodococose.

A tecnificação da suinocultura tem refletido na diminuição da ocorrência de *M. bovis* e *M. tuberculosis* como causa de linfadenite (OLIVEIRA *et al.*, 2002; QUINN *et al.*, 2005). Em contrapartida é crescente o isolamento do Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI) em suínos em humanos, notadamente em indivíduos imunocomprometidos, em especial portadores do vírus da Aids (HOFFNER *et al.*, 1990; INDERLIED *et al.*, 1993; SLUTSKY *et al.*, 1994; ROXO, 1996; KOMIJN *et al.*, 1999). GRANGE *et al.* (2002) referem, de forma preocupante, que 30% dos pacientes acometidas de Aids em todo mundo estão co-infectados com o Complexo MAI.

Em 40% dos humanos infectados pelo vírus da Aids em estado avançado da doença, tem-se isolado microrganismos pertencentes ao Complexo MAI. Destes, em 90 a 95 % o agente causal é *M. avium*, geralmente determinando graves problemas respiratórios (SLUTSKY *et al.*, 1994; LEÃO *et al.*, 1999).

KIEHN *et al.* (1985) diagnosticaram no período de 1981 a 1984, no Centro Memorial do Câncer em Nova York, 30 pacientes com Aids, dos quais três com leucemia e dois com imunodeficiência congênita severa, co-infectados com o Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (MAI).

No Brasil, entre janeiro de 1989 a fevereiro de 1991, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo isolou micobactérias do complexo MAI em 103 dentre 2.304 pacientes com Aids. Destes, em 29 indivíduos a doença era disseminada. No entanto, em indivíduos saudáveis a infecção por *M. avium* é rara, ocorrendo sob a forma de infecções pulmonares em adultos ou linfadenopatias em crianças (COSIVI *et al.*, 1995).

Nos últimas décadas, o principal agente causal na gênese da tuberculose em humanos acometidos pelo vírus da imunodeficiência humana são as micobactérias

345 pertencentes ao Complexo *Mycobacterium avium-intracellulare* (INDERLIED *et al.*
346 1993).

347 A transmissão do Complexo MAC para humanos HIV-positivos pode decorrer
348 do consumo de produtos e derivados de origem animal, pelo contato com os animais de
349 produção ou o ambiente dos criatórios (FERREIRA NETO *et al.*, 1989; RADOSTITS *et*
350 *al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2000) caracterizando, inclusive, o caráter ocupacional na
351 transmissão da doença.

352 CASTRO *et al.* (1978) investigaram 500 amostras de linfonodos de suínos
353 aparentemente normais. Destes, em 95 linfonodos foram isolados microrganismos do
354 gênero *Mycobacterium*, dos quais 74 eram pertencentes ao Complexo MAIS (*M. avium*,
355 *M. intracellulare* e *M. scrofulaceum*).

356 No Brasil, RAMOS *et al.* (2000) afirmaram que a associação entre infecções
357 causadas pelo complexo *M. avium* e Aids é muito mais comum do que tem sido
358 registrada. Aventa-se que a co-infecção de *M. avium* e Aids em humanos é quase tão
359 freqüente quanto à associação do vírus com *M. tuberculosis*.

360 Em 1967, foi relatada pela primeira vez a rodococose em humano apresentando
361 abscesso pulmonar (GOLUB *et al.*, 1967). Nas décadas subseqüentes, a rodococose em
362 humanos foi caracterizada como rara (SEVERO; LONDERO, 1996). O crescente
363 registro de casos de rodococose em humanos imunossuprimidos motivou os órgãos de
364 saúde mundiais a considerar a rodococose como doença emergente (LINDER, 1997;
365 ACHA e SZYFRES, 2003).

366 A via respiratória é reconhecida como principal forma de transmissão, mediante
367 a inalação de aerossóis emanados do ambiente das criações de animais (BROWN, 1995;
368 VERONESI, 2005). Secundariamente, a infecção de humanos pode ocorrer pelo contato

369 direto com animais ou pela via digestória, após a deglutição de esputo em pacientes com
370 infecção respiratória (OPS, 2001).

371 A pneumonia cavitária crônica com derrame pleural é a manifestação clínica
372 mais grave e freqüente da rodococose em humanos. Manifestações extra-pulmonares
373 incluem diarreia sanguinolenta, abscessos renais, pleurisia, caquexia, hepatopatias,
374 peritonite, artrite, osteomielite, meningite e linfadenite (BROWN, 1995; SEVERO;
375 LONDERO, 1996; PRESCOTT, 1991). Assume-se que, seguramente, o aumento da
376 prevalência da rodococose no homem tem relação direta ao estado de imunossupressão
377 induzido nos pacientes pelo vírus da Aids (ACHA E SZYFRES, 2003).

378 DOIG *et al.* (1991) investigaram minuciosamente 18 casos de rodococose no
379 homem. Foi destacado que oito (44,4%) pacientes apresentavam histórico de contato
380 freqüente com ambiente rural (limpeza de estábulos, baias e/ou piquetes) e/ou animais
381 de fazenda, especialmente eqüinos. De maneira similar, PRESCOTT (1991) descreveu
382 12 dentre 32 pacientes diagnosticados com rodococose possuíam histórico de contato
383 estreito com animais e/ou ambientes dos criatórios.

384 VERVILLE *et al.* (1994) realizaram estudo epidemiológico de 12 casos de
385 rodococose em humanos, dos quais seis HIV - positivos. Foi constatado que dois
386 pacientes mantiveram contato estreito com eqüinos, um com cão e outro com ambiente
387 rural, reiterando a preocupação da rodococose como doença ocupacional.

388 As linhagens isoladas de pacientes humanos com rodococose possuem
389 plasmídios predominantemente de virulência intermediária (VapB). Perfil de virulência
390 similar é encontrado em linhagens isoladas de linfonodos de suínos, com e sem lesões
391 de linfadenite. Menos freqüentemente, esses pacientes têm sido infectados por *R. equi*
392 contendo plasmídios virulentos (VapA), semelhantes aos identificados em potros com
393 pneumonia (TAKAI, 1997).

394 Na Tailândia, TAKAI *et al.* (2002) identificaram estirpes de virulência
395 intermediária (VapB) em seis isolados de *R. equi* oriundos de pacientes com Aids.
396 Resultado similar foi encontrado na Hungria no qual cinco entre sete estirpes de *R. equi*
397 isoladas de pacientes HIV - positivos, continham proteínas VapB, (MAKRAI *et al.*,
398 2002).

399 No Brasil, DE LOS SANTOS FORTUNA *et al.* (1999) compararam o perfil de
400 virulência de quatro linhagens de *R. equi* isoladas de casos de rodococose em humanos
401 no país frente à nove estirpes isoladas de pacientes com rodococose na Itália. Foi
402 observado que um dos isolados do Brasil e dois da Itália eram detentores de antígenos
403 de 15 a 17kD (virulentos). Nos demais pacientes, em três estirpes do Brasil e em uma da
404 Itália foram caracterizados antígenos de 20kDa (VapB). Esses resultados re-afirmam a,
405 similaridade de ocorrência de linhagens de virulência intermediária em linfonodos de
406 suínos e em humanos com Aids.

407 O primeiro caso de rodococose em humanos no Brasil foi diagnosticado em
408 paciente com sintomatologia pulmonar, co-infectado com o vírus da aids (CATERINO–
409 DE-ARAÚJO, 2000). O perfil de virulência desta linhagem de *R. equi* acusou a
410 produção de VapB. No Rio Grande do Sul, SEVERO *et al.* (2001) relataram
411 subseqüentemente, dois casos de rodococose em humanos, dos quais um paciente era,
412 que evoluiu para óbito mesmo diante da instituição de terapia.

413 A rodococose em humanos é considerada doença rara no Brasil. Entretanto, é
414 motivo de preocupação crescente em pacientes imunossuprimidos, especialmente HIV -
415 positivos (MOSSER; HONDALUS, 1996; LINDER, 1997; OPS, 2001). A semelhança
416 da evolução clínica da rodococose com a tuberculose requer a necessidade de
417 diagnóstico diferencial entre essas doenças. Adicionalmente, a ácido-resistência parcial
418 de *R. equi* pode resultar em diagnósticos preliminares equivocados com os gêneros

419 *Mycobacterium* ou outros actinomicetos, ou mesmo o sub-diagnóstico da doença no
420 homem (VERONESI, 2005).

421

422 **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

423

424 A linfadenite em suínos possui etiologia múltipla, com predominância de
425 *Mycobacterium* sp e outros actinomicetos como *R. equi*.

426 Em virtude dos prejuízos da linfadenite nos suínos, do potencial zoonótico dos
427 microrganismos envolvidos na enfermidade e da similaridade dos agentes quanto ao
428 aspecto lesional dos linfonodos ao abate, recomenda-se a ênfase no diagnóstico
429 microbiológico da linfadenite em suínos, com vistas a nortear ações de profilaxia e
430 controle nos criatórios.

431 A transmissão de *Mycobacterium* sp e *R. equi* para o homem pode ocorrer pelo
432 contato direto com animais, consumo de produtos e sub-produtos de origem suína ou
433 contato com ambientes dos criatórios. Nos últimos anos, é notório o aumento do número
434 de casos de doença no homem por espécies do gênero *Mycobacterium* e também por *R.*
435 *equi*, notadamente em pacientes acometidos de Aids. É crescente a preocupação dos
436 profissionais da área de saúde, com o abate clandestino de suínos no Brasil, e o
437 conseqüente consumo de carne e derivados oriundos de criatórios de baixa tecnificação
438 e/ou de exploração familiar. Esta prática, sem o rigor da inspeção sanitária de produtos
439 de origem animal, expõe a população aos riscos do consumo de carne e derivados
440 suínos contendo microrganismos reconhecidamente patogênicos para o homem, em
441 especial *Mycobacterium* sp e *R. equi*, em indivíduos acometidos por doenças de base
442 imunossupressivas.

443

444 **5. REFERÊNCIAS**

445

446 ACHA, P.N.; SZYFRES, B. *Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al*
447 *hombre y los animales*. 3.ed. Volumen I. Bacteriosis y Micosis. Washington.
448 Organizacion Panamericana de la Salud. P.266–283, 2003.

449 ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA PRODUTORA E EXPORTADORA
450 DA

451 CARNE SUÍNA – ABIPECS. *Carne Suína Brasileira*. 2008. Disponível em:

452 <www.abipecs.org.br>. Acesso em: 25 nov. 2008.

453 BALIAN, S.C.; RIBEIRO, P.; VASCONCELLOS, S.A. et al. Tuberculosis
454 lymphadenitis in slaughtered swine from the State of São Paulo, Brazil: microscopic
455 histopathology and demonstration of mycobacteria. *Revista de Saúde Pública*, v.31, n.4,
456 p.391–397, 1997.

457 BRASIL. Ministério da Saúde. *Programa Nacional* Boletim Epidemiológico:*
458 *DST/Aids* Secretaria de Vigilância em Saúde, p. 1-47, 2005a.

459 BRASIL. Ministério da Saúde. *Dados e Pesquisas em Doenças Sexualmente*
460 *Transmissíveis e aids*. Net. out. 2005. Disponível em:
461 <www.aids.gov.br/cgi/tabcgi.exe?tabnet/sp.def> Acesso em: 03 out. 2005b.

462 BROWN, A.E. Other *Corynebacteria* and *Rhodococcus*. In: MANDELL, G.L;
463 BENNETT, J.E.; DOLIN, R. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4.ed. New
464 York: Livingstone, p.1872–1877, 1995.

465 CARDOSO, M.; BORTOLOZZO, F.P.; FERNANDES, R.E.; BENNEMANN, P.E.;
466 BOROWSKI, S.; MIGGLIAVACCA, F. Lesões em linfonodos de suínos causadas por
467 *Mycobacterium* grupo III(Runyon). *Brazilian Jornal Veterinary Research Animal*
468 *Science*. vol.37 nº4, São Paulo 2000.

- 469 CASTRO, A. F. P.; CAMPEDELLI FILHO, O.; WAISBICH, E. Opportunist
470 mycobacteria isolated from the mesenteric lymphnodes of apparently healthy pigs in
471 São Paulo, Brazil. *Revista de Microbiologia*, 9:74-83, 1978.
- 472 CATERINO-DE-ARAÚJO, A.; DE LOS SANTOS-FORTUNA, E.; ZANDONA-
473 MELEIRO, M.C. et al. Detection of the 20-kDa virulence-associated antigen of
474 *Rhodococcus equi* in malakoplakia lesion in pleural tissue obtained from an AIDS
475 patient. *Pathology Research Practice*, v.196, n.5, p.321-327, 2000.
- 476 CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M.; *Enfermidades infecciosas dos animais*
477 *domésticos*. 2.ed. Edt. Médica e Científica Ltda, Rio de Janeiro, p. 317- 335, 1992.
- 478 COSIVI, O; MESLIN, F.X.; DABORN, C.J.; GRANGE, J.M. Epidemiology of
479 Mycobacterium bovis infection in animals and humans, with particular reference to
480 Africa. *Revue Scientifique et Technique*. v. 14(3), p. 733-746, 1995.
- 481 DE LOS SANTOS-FORTUNA, E.; MASTROIANNI, C.M.; LICHTNER, M. et al.
482 *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v.3, n.5, p.184-188, 1999.
- 483 DOIG, C.; GILL, M.J.; CHURCH, D.L. *Rhodococcus equi*—an easily missed
484 opportunistic pathogen. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 23, p. 1-6,
485 1991.
- 486 FERREIRA NETO, J. S.; CORTES, J. A.; SINHORINI, I. L.; VASCONCELLOS, S.
487 A.; ITO, F. H.; SILVA, E. A. M. A lesão tuberculóide macroscópica como critério
488 diagnóstico da infecção microbiana em suínos abatidos em matadouro. *Revista da*
489 *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, v.
490 266, p.21-23, 1989.
- 491 GOLUB, B.; FALK, G.; SPINK, W.W. lung abscess due to *Corynebacterium equi* –
492 Report of first human infection. *Annales of Internal Medicine*, v.66, p.1174-1176,
493 1967.

- 494 GRANGE, J.M.; ZUMLA, A. The global emergency of tuberculosis: what is the
495 cause?. *Journal of the Royal Society for the promotion of Health*. v. 122(2), p. 78-81,
496 2002.
- 497 HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. *Microbiologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara
498 Koogan, p.119–126, 2003.
- 499 HOFFNER, S.E.; KÄLLENIS, G.; PETRINI, B.; BRENNAN, P.J.; TSANG, A.Y.
500 Serovars of Mycobacterium avium complex isolated from patients in Sweden.
501 *Journal of Clinical Microbiology*. v.28(6), p. 1105-1107,1990.
- 502 INDERLIED, C.B.; KEMPER, C.A.; BERMUDEZ, L.E. The Mycobacterium avium
503 complex. *Clinical Microbiology Review*. v. 6(3), p. 266-310, 1993.
- 504 JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Veterinary Pathology*. 6 ed. Lippincott
505 Williams & Wilkins, USA, p. 489-497, 1996.
- 506 KIEHN, T.E.; EDWARDS, F.F.; BRANNON, P.; TSANG, A.Y.; MAIO, M.; GOLD,
507 J.W.; WHIMBEY, E.; WONG, B.; MCCLATCHY, J.K.; ARMSTRONG, D. Infections
508 caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients:
509 diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility
510 tests, and morphological and seroagglutination characteristics. **J. Clin.**
511 **Microbiol.**, v. 21, n.2, p. 168-173, 1985.
- 512 KOMIJN, R.E.; DE HAAS, P.E.; SCHNEIDER, M.M.; EGER, T.; NIEUWENHUIJS,
513 J.H.; VAN DEN HOEK, R.J.; BAKKER, D.; VAN ZIJDERVELD, F.G.; VAN
514 SOOLINGEN, D. Prevalence of Mycobacterium avium in Slaughter Pigs in The
515 Netherlands and Comparison of IS1245 Restriction Fragment Length
516 Polymorphism Patterns of Porcine and Human Isolates. *Journal of Clinical*
517 *Microbiology*. v.37(5),p. 1254-1259,1999.

- 518 LANGENEGGER, C.H.; LANGENEGGER, J. Prevalência e distribuição de dos
519 sorotipos de micobactérias do co,plexo MAIS isoladas de suínos no Brasil. **Pesquisa**
520 **Veterinária Brasileira**, v.1, p.75–80, 1981.
- 521 LAZZARI, A.; VARGAS, A.C.; DUTRA, V. et al. Patogenicidade de isolados clínicos
522 e ambientais do *Rhodococcus equi* em camundongos. **Veterinária Técnica**, p.24–30,
523 1997.
- 524 LEÃO, S.C.; BRIONES, M.; SIRCILLI, M.P.; BALIAN, S.C.; MORÉS, N.;
525 FERREIRA NETO, J.S. Identification of two novel *Mycobacterium avium* alleic
526 variants by PCR-restriction enzyme analysis (PRA) in pig and human isolates from
527 Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.2592-7, 1999.
- 528 LEITE, D.M.G.; COSTA, O. A. D.; VARGAS, G.A.; MILLEO, R.D.S.; DA SILVA, A.
529 Análise econômica do sistema intensivo de suínos criados ao ar livre. **Revista brasileira**
530 **de zootecnia**, 30(2):482-486, 2001
- 531 LINDER, R. *Rhodococcus equi* and *C. haemolyticum*: Two “Coryneform” bacteria
532 increasingly recognized as agents of human infection. **Emerging Infectious Diseases**,
533 v.3, p.1–10, 1997.
- 534 MADARAME, H.; YAEHASHI, R.; FUKUNGA, N.; MATSUKUMA, M.; MUTOH,
535 K.; MORISAWA, N.; SASAKI, Y.; TSUBAKI, S.; HASEGAWA, Y.; TAKAI, S.
536 Pathogenicity of *Rhodococcus equi* strains possessing virulence-associated 15 to 17 kDa
537 antigens: experimental and natural cases in pigs. **Journal of Comparative Pathology**,
538 v.119, n.4, p.397-405, 1998.
- 539 MARTINS, L.S. Epidemiologia e controle das micobacterioses em suínos no sul do
540 Brasil: estimativa do impacto econômico e estudo da sazonalidade. 2001. 51 p.
541 **Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,**
542 **Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.**

- 543 MAKRAI, L.; TAKAI, S.; TAMURA, M. et al. Characterization of virulence plasmids
544 in *R. equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. ***Veterinary***
545 ***Microbiology***, v.88, n.4, p.377–384, 2002.
- 546 MAKRAI, L.; TAKAIMA, S.; DÉNES, B.; HAJTÓS, I.; KAKUDA, Y.; TSUBAKI, S.;
547 MAJOR, A.; FODOR, L.; VARGA, J. ***Journal of Clinical Microbiology***, v.43, n.3,
548 p.1246–1250, 2005.
- 549 MOSSER, D.M.; HONDALUS, M.K. *Rhodococcus equi*: an emerging opportunistic
550 pathogen. ***Trends in Microbiology***, v. 4, p. 29–33, 1996.
- 551 OLIVEIRA, S.J.; BOROWSKI, S.M.; BARCELLOS, D.S.N. et al. Etiologia de lesões
552 tuberculoídes em suínos no Rio Grande do Sul. ***Arquivos da Faculdade de Veterinária***
553 ***da UFRGS***, v.23, p.112–116, 1995.
- 554 OLIVEIRA, E.M.D.; MORAIS, Z. M.; TABATA, R. et al. Avaliação da virulencia em
555 hamsters (*Mesocricetus auratus*) de estirpes de *Mycobacterium avium* presente na
556 população de suínos do sul do Brasil. ***Brazilian Jornal Veterinary Research Animal***
557 ***Science***. v.39 n.4, 2002.
- 558 ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD – OPS. Rodococosis. In:
559 *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales:*
560 *bacteriosis y micosis*. 3.ed. Washington: OPS (Publicación Científica y Técnica no.
561 580), 3v., p.236–239, 2001.
- 562 PAVLAS, M. Dynamics of excretion of *M. avium* and *M. intracellulare* in faeces of
563 experimentally infected pigs. ***Acta Veterinaria Brno***, v. 56, p. 337-342, 1987.
- 564 PRESCOTT, J.F. *Rhodococcus equi*: an animal and human pathogen. ***Clinical***
565 ***Microbiology Reviews***, v. 4, p. 20–34, 1991.

- 566 QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B.; CARTER, G. R. *Corynebacterium*
567 species and *Rhodococcus equi*. In: **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe,
568 p. 137–143, 1994.
- 569 QUINN, P.J.; MARKEY, B.K.; CARTER, M.E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, F.C.
570 **Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas**. 1ºed., Edt.Artmed, Porto Alegre, p.
571 106- 114, 2005.
- 572 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W; CONSTABLE, P.D.**Vetreinary**
573 **Medcine**. 10ºed., Edt. Elsevier, Spain, p. 2156, 2007.
- 574 RAMOS MC, MORAES MJ, CALISNI AL, ROSCANI GN, PICOLLI EA. A
575 retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired
576 immune deficiencie syndrome (AIDS). **Brazilian Journal Infectious Diseases**, 4:86-90,
577 2000.
- 578 RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; LARA, G.H.B.; SIQUEIRA, A.K.; FERNANDES,
579 M.C. Fatores de virulência de *Rhodococcus equi*. Implicação na epidemiologia e
580 controle da rodococose nos animais e no homem. **Veterinária e Zootecnia**, v.14, n.2,
581 p.147-163.
- 582 ROPPA, L. Brasil: o consumo de carnes passado a limpo. Revista Porkworld, n.43,
583 p.17–20, 2008.
- 584 ROXO, E. Tuberculose bovina: Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.63, n.2,
585 p.91-97, 1996.
- 586 SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T. Rodococoses. In: VERONESI, R; FOCACCIA, R.
587 **Tratado de Infectologia**. São Paulo: Atheneu, 2v, p.1032–1033, 1996.
- 588 SILVA V. S.; MORÉS N.; DUTRA, V.D.; FERREIRA NETO, J.S.; SAAD, M.H.F.
589 Estudo da transmissão horizontal de *Mycobacterium avium-intracellulare* em suínos.
590 **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**., v.52, n.6, p.562-566, 2000.

- 591 SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D.; BARBER, T.W.; RICH, J.; VON REYN, C.F.;
592 PIECIAK, W.; BARLOW, M.A.; MASLOW, J.N. Polyclonal infections due to
593 Mycobacterium avium complex in patients with AIDS detected by pulsed-field
594 gel electrophoresis of sequential clinical isolates. ***Journal of Clinical***
595 ***Microbiology***, v. 32(7), p.1773-1778, 1994.
- 596 SMITH, B.P. ***Tratamento de Medicina Interna de Grandes Animais***. 1^o
597 ed., Edt Manole LTDA, São Paulo, p, 620-621, 1993.
- 598 TAKAI, S.; FUKUNGA, N.; OCHIAI, S. et al. Identification of intermediately virulent
599 *Rhodococcus equi* isolates from pigs. ***Journal of Clinical Microbiology***, v.34, n.4,
600 p.1034–1037, 1996.
- 601 TAKAI, S. Epidemiology of *Rhodococcus equi* infections: A review. ***Veterinary***
602 ***Microbiology***, v. 56, p. 167–176, 1997.
- 603 TAKAI, S; THARAVICHITKUL, P.; SASAKI, C. et al. Identification of virulence–
604 associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from patients with acquired
605 immune deficiency syndrome and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from
606 domestic animal farms in Chiang Mai, Thailand. ***American Journal Tropical Medicine***
607 ***Hygiene***, v.66, n.1, p.52–55, 2002.
- 608 VERONESI, R. ***Tratado de Infectologia***. 3.ed. Atheneu: São Paulo, 2005.
- 609 VERVILLE, T.D.; HUYCKE, M.M.; GREENFIELD, R.A.; FINE, D.P.; KUHLS, T.L.;
610 SLATER, L.N. *Rhodococcus equi* infections in humans. *Medicine*, v.73, p.119–132,
611 1994.
- 612 WHIMBEY, E.; WONG, B.; MCCLATCHY, J.K.; ARMSTRONG, D. Infections
613 caused by Mycobacterium avium complex in immunocompromised patients:
614 diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility

615 tests, and morphological and seroagglutination characteristics. ***Journal of***
616 ***Clinical Microbiology***. v. 21(2), p. 168-173, 1985.

617 WORLD HEALTH ORGANIZATION–WHO. ***Joint United Nations Programme on***
618 ***HIV/AIDS***. Net., out. 2005. Disponível em: <www.unaids.org/wad
619 [2004/epi_graphics.html](http://www.unaids.org/wad2004/epi_graphics.html)> Acesso em: 03 out. 2005.

620

Revista Arquivos do Instituto Biológico**Normas Editoriais**

Forma de apresentação: os trabalhos deverão ser digitados em Word 97 ou versão superior, página A4, com margens de 2,5 cm, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaço duplo e páginas numeradas em seqüência. As linhas deverão ser numeradas de forma contínua, utilizando a ferramenta Layout em Configurar Página. O máximo de páginas será 25 para artigos de revisão, 20 para artigos científicos e 10 para comunicação científica, incluindo tabelas e figuras.

Artigo de revisão: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Artigo científico: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, introdução, material e métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências

Comunicação científica: compreenderá os seguintes itens: título, nome do(s) autor(es), endereço do primeiro autor e local de origem dos demais autores, resumo em português, palavras-chave, título em inglês, abstract, key words, texto sem subdivisões e referências.

Quando o trabalho envolver estudos em animais de experimentação e/ou organismos geneticamente modificados, incluir o número do processo

no trabalho e encaminhar uma cópia da aprovação fornecida pelo respectivo Comitê responsável da Instituição de origem do primeiro autor.

Idioma: o trabalho poderá ser redigido em português, espanhol ou inglês. Quando escrito em português, o resumo deverá ter uma versão em inglês. No caso de artigo escrito em inglês ou espanhol deverá ter um resumo em inglês ou espanhol e outro em português.

Título: embora breve, deverá indicar com precisão o assunto tratado no artigo, focalizando bem a sua finalidade principal.

Endereço(s) do(s) autor(es): abaixo do(s) nome(s) do(s) autor(es), com chamada numérica. Descrever endereço postal (Instituição/Universidade, Centro/Faculdade, Laboratório/Departamento, estado, país) e eletrônico do autor principal. No rodapé da primeira lauda descrever somente a Instituição e Departamento dos demais autores.

Resumo: deverá apresentar concisamente o objetivo do trabalho, material e métodos e conclusões, em um único parágrafo. Não ultrapassar 250 palavras.

Palavras-chave: abaixo do resumo e separado por um espaço, citar no máximo cinco palavras-chave, separadas por vírgula. Evitar termos que apareçam no título.

Abstract: apresentar uma tradução para o inglês, do título do trabalho e do resumo. A seguir, relacionar também em inglês (ou espanhol) as mesmas palavras-chave (key words, palabras-clave) já citadas. Não ultrapassar 250 palavras.

Introdução: descrever a natureza e o objetivo do trabalho, sua relação com outras pesquisas no contexto do conhecimento existente e a justificativa da pesquisa feita.

Material e Métodos: apresentar descrição breve, porém suficiente para permitir uma repetição do trabalho. Técnicas e processos já publicados, exceto quando modificados, deverão ser apenas citados. Nomes científicos de espécies, bem como drogas, deverão ser citados de acordo com regras e padrões internacionais.

Resultados: apresentá-los acompanhado de tabelas e/ou figuras, quando necessário. As tabelas e figuras devem ser inseridas após as referências.

Discussão: discutir os resultados obtidos comparando-os com os de outros trabalhos publicados (resultados e discussão poderão fazer parte de um único item).

Tabelas e Figuras: incluir título claro e conciso que possibilite o seu entendimento sem consultas ao texto. As tabelas não deverão conter linhas verticais. No texto, use a palavra abreviada (ex.: Fig. 3). As figuras devem estar no formato jpg (fotos) ou gif (gráficos e esquemas) e com tamanho inferior a 500 Kb. As figuras originais ou com maior resolução poderão ser solicitadas após o aceite. Devem ser enviadas em arquivos individuais e nomeadas de acordo com o número da figura. Exemplos: Fig1.gif, Fig2.jpg.

Conclusões: serão citadas em ordem de importância. Poderão constituir um item à parte ou serem incluídas na discussão.

Agradecimentos: poderão ser incluídos a pessoas ou instituições.

Referências e citações no texto: citações no texto e referências estão diretamente vinculadas. Todos os autores citados devem figurar nas referências, exceção para informações obtidas por canais informais que deverão ser citadas apenas no texto: (JUNQUEIRA, comunicação pessoal), (JUNQUEIRA, informação verbal). A referência no texto deve seguir o sistema sobrenome do autor e ano de publicação e deverá estar em caixa alta reduzida ou versalete, tal como: 1 autor - ALLAN (1979) ou (ALLAN, 1979); 2 autores – LOPES; MACEDO (1982) ou (LOPES; MACEDO, 1982); mais de 2 autores - BESSE *et al.* (1990) ou (BESSE et al., 1990); coincidências de autoria e ano de publicação - (CURI, 1998a), (CURI, 1998b) ou (CURI, 1998a, 1998b). Nas referências seguir as recomendações da Norma NBR 6023/2002, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT); as referências deverão estar em ordem alfabética de primeiro autor e serem apresentadas em folha à parte. A exatidão dos dados nas referências é da responsabilidade dos autores.