

***Rhodococcus equi* virulento aislado de potrillos Fina Sangre de Carrera en Chile**

Virulent *Rhodococcus equi* isolated from thoroughbred foals in Chile

Jorge C. Lohse^{1,2,5}, Enrique Paredes², Danilo Vargas³, Shinji Takai⁴

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue establecer el diagnóstico y aislado de variantes virulentas de la cepa *Rhodococcus equi* y su asociación con trastornos respiratorios, digestivos o de ambos en potrillos Fina Sangre de Carrera. Se obtuvo muestras de sangre de 86 ejemplares entre 1 y 6 meses de edad con presencia de signos clínicos respiratorios y digestivos entre 2006 y 2008 en nueve haras de la Región Metropolitana, Chile. Todas las muestras se procesaron y analizaron mediante PCR para detección de presencia de *R. equi* y sus proteínas asociadas a la virulencia (*Vap*) (A, C, D, E, F, G, H). El 41.9% de los potrillos fueron positivos a *R. equi*. Los factores de virulencia detectados en potrillos con trastornos respiratorios fueron *vapA*, *vapC* y *vapG* en el 5.8% de la población muestreada, con valores de asociación de Spearman de $r=0.885$; $r=0.976$; $r=0.885$, respectivamente. No se identificaron variantes virulentas de *R. equi* en los potrillos con signos clínicos digestivos.

Palabras clave: *Rhodococcus equi*; potros; Vap; bronconeumonía

ABSTRACT

The aim of this study was to establish the diagnosis and isolation of virulent variants of *Rhodococcus equi* strains and their association with respiratory and digestive disorders or both in Thoroughbred foals. Blood samples were collected from 86 foals ranging 1 to

¹ Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad Viña del Mar, Viña del Mar, Chile

² Instituto de Patología Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

³ Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Pedro de Valdivia, Santiago, Chile

⁴ School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Towada, Aomori, Japan

⁵ E-mail: lohse.j@gmail.com

El estudio fue financiado por FIDUM 1787 de la Universidad Mayor

Recibido: 19 de octubre de 2018

Aceptado para publicación: 29 de junio de 2019

6 months of age with presence of respiratory and digestive clinical signs between 2006 and 2008 in nine farms of the Metropolitan Region, Chile. All samples were processed and analysed by PCR to detect the presence of *R. equi* and its virulence-associated proteins (*Vap*) (A, C, D, E, F, G, H). Results showed that 41.9% of the foals were positive to *R. equi*. The virulence factors detected in foals with respiratory disorders were *vapA*, *vapC* and *vapG* in 5.8% of the sampled population, with Spearman's association values of $r = 0.885$; $r = 0.976$; $r = 0.885$ respectively. No virulent variants of *R. equi* were identified in foals with digestive disorders.

Key words: *Rhodococcus equi*; foals; Vap; bronchopneumonia

INTRODUCCIÓN

Rodococosis es una enfermedad causada por *Rhodococcus equi*, que provoca bronconeumonía aguda o crónica y enteritis en potrillos, siendo una de las mayores causas de morbilidad y mortalidad en potrillos (Ainsworth *et al.*, 1997; Sellon *et al.*, 2000; Meijer y Prescott, 2004; Son *et al.*, 2006; Chhabra *et al.*, 2015; Gressler *et al.*, 2018). *R. equi* es una bacteria facultativa grampositiva, pleomorfa y patógeno intracelular facultativo de macrófagos y habitante saprofita del suelo, aerobio estricto, con pocos requerimientos para su crecimiento y desarrollo (McQueen *et al.*, 2015). La infección por *R. equi* también se describe en otras especies (Bertone, 1998), y en el humano se asocia a neumonías, mayormente en pacientes inmunocomprometidos (Byrne *et al.*, 2001). Las principales vías de infección son la inhalación (partículas de polvo) y la ingestión del organismo (Hondalus, 1997; Leadon *et al.*, 2007).

A diferencia de la mayoría de los *R. equi* aislados del medioambiente, aquellos aislados de potrillos con neumonía poseen un plásmido que codifica una proteína altamente inmunogénica y lipomodificada asociada a virulencia (*Vap*), (Takai *et al.*, 2000; Byrne *et al.*, 2001; Valero-Rello *et al.*, 2015). El genoma de *R. equi* posee un total 5 043 170 pb, contiene ADN cromosómico genéticamente estable y un plásmido de virulencia de 80 a 90 kb, que es el principal determinante

de la patogenicidad (Letek *et al.*, 2010; Giguère *et al.*, 2011). La virulencia de *R. equi* se basa en la capacidad del organismo para replicarse en macrófagos, que depende de su capacidad para interferir con la maduración endosomal después de la fagocitosis y para prevenir la acidificación de la vacuola en la que reside (Hondalus y Mosser, 1994; Toyooka *et al.*, 2005).

Este plásmido presenta una isla de patogenicidad adquirida (PAI), que le confiere capacidad de infectar macrófagos (Hondalus y Mosser, 1994; Giguère *et al.*, 1999; Takai *et al.*, 2000; Coulson *et al.*, 2015). En *vap* PAI existe un conjunto de genes homólogos que codifican para una familia de proteínas de *Vap* asociados estrechamente, designados como *VapA*, *VapC*, *VapD*, *VapE*, *VapG*, and *VapH*. También contiene un número de genes no-*vap*, en particular el operón *vir* albergando dos reguladores (*virR* y *virS*) que activan la expresión de la PAI (Byrne *et al.*, 2001). Adicionalmente hay tres pseudogenes *vapF*, *vapI* and *vapX*. Se desconoce el rol de estos genes adicionales *Vap* y si codifican proteínas con funciones superpuestas o redundantes (Okoko *et al.*, 2015). El *vapA* se considera esencial en la patogénesis de la rodococosis (Valero-Rello *et al.*, 2015) y se describe como una proteína inmunodominante en los aislados clínicos (Takai *et al.*, 1991a,b; Tan *et al.*, 1995).

Actualmente, muchos criaderos con alta prevalencia de neumonía por *R. equi* examinan a los potrillos utilizando técnicas como el

recuento de glóbulos blancos, determinación de la concentración plasmática de fibrinógeno, radiografía y ultrasonido de tórax para poder detectar casos subclínicos (Giguère *et al.*, 2003; Vener *et al.*, 2012). El diagnóstico definitivo de rodococosis es a través del cultivo bacteriológico y la amplificación de los genes *vap* por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en aspirados traqueo-bronqueales (ATB) de potrillos con signos clínicos de tracto respiratorio inferior, o evidencia citológica de inflamación séptica de vías aéreas y/o evidencia radiológica o de ultrasonido de bronconeumonía (Sellon *et al.*, 2001; Giguère *et al.*, 2011).

El ensayo de PCR multiplex para la familia del gen de *vap* ha permitido la identificación y caracterización de aislados virulentos en una reacción simple en un solo paso (Chhabra *et al.*, 2015). La formulación de una vacuna efectiva contra la infección por *R. equi* se encuentra aún en proceso. Actualmente, el uso de una vacuna oral viva ha generado resultados prometedores *in vivo*, al igual que vectores bacterianos en modelo murino (Dawson *et al.*, 2010; Giles *et al.*, 2015). La inmunidad celular mediada es considerada crucial para superar una infección causada por este patógeno (Giles *et al.*, 2015).

En Chile se ha aislado la bacteria y se le ha diagnosticado por PCR en equinos (Paredes *et al.*, 2000; Miranda, 2003; Márquez, 2006). El presente estudio tuvo como objetivo identificar cepas virulentas de *R. equi* mediante PCR, así como determinar la asociación entre cepas de variantes virulentas y signos clínicos respiratorios, digestivos o ambos en potrillos Fina Sangre de Carrera en la zona central de Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio fue realizado entre los años 2006 y 2008. Se colectaron muestras de sangre de 86 potrillos Fina Sangre de Carrera

(FSC), entre 1 y 6 meses de edad, pertenecientes a nueve haras de la Región Metropolitana, Chile. El criterio de inclusión fue la presencia de signos clínicos respiratorios, gastrointestinales o de ambos. Las muestras de sangre fueron obtenidas por punción de la vena yugular utilizando tubos EDTA K₂ Vacutainer® y almacenadas a 4 °C hasta su procesamiento. La extracción de ADN, a partir de muestras de sangre, se efectuó según lo descrito por Hoos y Paabo (1993). La cuantificación del ADN extraído de las bacterias se efectuó mediante un espectofotómetro (UV-VIS, Agilent Technologies®), por absorción a 260 y 280 nm, donde una unidad de densidad óptica equivale a 50 µg/ml de ADN de doble hebra (Sambroock *et al.*, 1989). Para establecer el Índice de Pureza (IP) del ADN se utilizaron los cocientes de absorbancia (DO) a 260 y 280 nm, según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989): IP = DO a 260 nm / DO a 280 nm.

La mezcla de reacción que se utilizó en la identificación de *R. equi* desde muestras biológicas, es la descrita por Miranda (2003) y el programa de termociclado fue el descrito por Takai *et al.* (1995). La estandarización de PCR se efectuó según lo descrito por Miranda (2003). La resolución de los productos de amplificación (amplicones) se realizó por electroforesis en gel de agarosa (1% p/v) teñido con bromuro de etidio (0.005 µg/ml) en tampón de corrida TBE (0.09M tris-borato; 0.002M EDTA, pH 8.0). La observación de las bandas de ADN amplificado se efectuó por medio de un transiluminador de luz ultravioleta (50 watts, Vilber Lourmat®, Francia) y los resultados se registraron por fotografías con cámara Olympus® N° C-5060 para su posterior interpretación. La confirmación del genoma de *R. equi* se efectuó por purificación y posterior secuenciación del ADN amplificado.

Además, se utilizaron los cebadores empleados por Byrne *et al.* (2001) para *R. equi* obtenidos del plásmido virulento ATCC 33701 al igual que para la variante virulenta *vapA*. Los cebadores desde *vapC* al *vapH*

Cuadro 1. Secuencia de cebadores utilizados en el estudio

Bacteria-Vap	Cebador	Secuencia (5'-3')
<i>R. equi</i>	DM.1	TCG TCC GTG AAA ACT TGG G
<i>R. equi</i>	DM.2	CGA CCA CAA GGG GGC CGT
<i>R. equi</i> VapA	RX-1	GAC TCT TCA CAA GAC GGT
<i>R. equi</i> VapA	RX-2	TAG GCG TTG TGC CAG CTA
<i>R. equi</i> VapC	VapC-1	TCC AAA TCG ATA GCC GTT GT
<i>R. equi</i> VapC	VapC-2	ACC AAA TGC CAT CGC CCA TT
<i>R. equi</i> VapD	VapD-1	ATC GCA ACG GTC TCA ATG GGA
<i>R. equi</i> VapD	VapD-2	ATA CTG TCC CAG CAG CAC CA
<i>R. equi</i> VapE	VapE-1	TCC GAA AGG AGATTA ATA T
<i>R. equi</i> VapE	VapE-2	ATT TGG CAG GGT TAA ACT T
<i>R. equi</i> VapF	VapF-1	AAT ATG CCT GGT ATG GGC CGT
<i>R. equi</i> VapF	VapF-2	TGA ACA CTC CCA AGA ATG CCA
<i>R. equi</i> VapG	VapG-1	GAT GGA TCC AGA CTG CAC GT
<i>R. equi</i> VapG	VapG-2	TGA GTG TTC GGA CCC TTT TG
<i>R. equi</i> VapH	VapH-1	CGA AAG TTC CTA TCA AGG AC
<i>R. equi</i> VapH	VapH-2	ACC TCC GCC AAT ACC GAT TA

Se usaron los partidores empleados por Byrne *et al.* (2001) para *R. equi* obtenidos del plásmido virulento ATCC 33701, al igual que para la variante virulenta VapA. Los partidores desde *VapC* al *VapH* fueron realizado por Invitrogen® [secuencia enviada por Takai (2006)].

fueron preparados por la empresa Invitrogen (Cuadro 1). La cuantificación del ADN se efectuó según procedimiento descrito por Sambrook *et al.* (1989). El programa de termociclación que se utilizó es el descrito por Takai *et al.* (1999), con 30 ciclos de amplificación. Las condiciones cíclicas fueron: desnaturalización 90 s a 94 °C, hibridación 1 min a 55 °C y extensión 2 min a 72 °C.

La resolución de las muestras de ADN amplificadas se efectuó por cámara de electroforesis horizontal (Wide Mini-Sub®, BIO-RAD) en gel de agarosa al 1% P/V, teñido con bromuro de etidio (0.005%), según procedimiento estándar, utilizando como solución amortiguadora de corrida TBE 0.5 X (0.09 M Tris-Borato, 0.002M EDTA pH 8.0). La resolución del amplicón característico de *R.*

equi se efectuó por electroforesis en gel de agarosa 1%P/V, según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989), con marcadores de peso molecular Ladder de 100 pares de base (pb) Gybco BRL®. Para el amplicón de 441 pb se utilizaron los cebadores descritos por Sellon *et al.* (2001).

Análisis Estadístico

Se realizó un análisis estadístico descriptivo. Los resultados se expresaron en porcentaje. El coeficiente de correlación de Spearman fue usado para determinar asociación entre rodococosis y los genes *vap* encontrados con el tipo de trastorno digestivo y/o respiratorio. Se utilizó el programa estadístico IBM SPSS® y un nivel de significancia de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se colectaron muestras de 86 potrillos. De estos, 64 presentaron signos clínicos respiratorios, 17 con signos gastrointestinales y 5 con ambos tipos de signos clínicos. La mayoría de las muestras fueron tomadas durante la época de verano, en el mes de febrero (52%). Las muestras de ADN promediaron una concentración de 133 ng/μl, con un IP de 1.8.

Se encontraron 36 potrillos (41.9%) positivos a *R. equi*, siendo 5.8% *vapA* (5/86), 1.2% *vapC* (1/86) y 5.8% *vapG* (5/86) (Figuras 1-3). Por otra parte, solo en 1.2% (1/86) de las muestras se observó presencia de *vapA*, *vapC* y *vapG*, y en 4.6% (4/86) *vapA* y *vapG*. Los *Vap D, E, F, H* no fueron identificados en la población de estudio. Las muestras positivas a *Vap* se observaron únicamente en potrillos con signos clínicos respiratorios.

El coeficiente de correlación de Spearman entre *vapA*, *vapC*, *vapG* y signos clínicos de desordenes respiratorios fue de

$r=0.885$, $r=0.976$ y $r=0.885$, respectivamente; asociación alta y positiva que indica alta confiabilidad.

DISCUSIÓN

Este estudio demuestra la presencia en Chile de variantes virulentas de *R. equi* en potrillos FSC con trastornos respiratorios en la zona central de Chile, siendo las variantes virulentas encontradas *VapA*, *VapC* y *VapG*. El 41.9% de los potrillos fue positivo a *R. equi*, porcentaje mayor del 35% encontrado por Miranda (2003) en una población de potrillos con y sin signos clínicos de tipo respiratorio y digestivo y del 33% reportado por Márquez (2006).

R. equi había sido reportado en el país mediante cultivo desde absceso pulmonar en un potrillo FSC (Paredes *et al.*, 2000) y confirmado mediante PCR desde muestra de sangre y secreción nasofaríngea (Miranda, 2003). Así mismo, Marquez (2006) identificó una variante *VapA* por PCR desde mues-

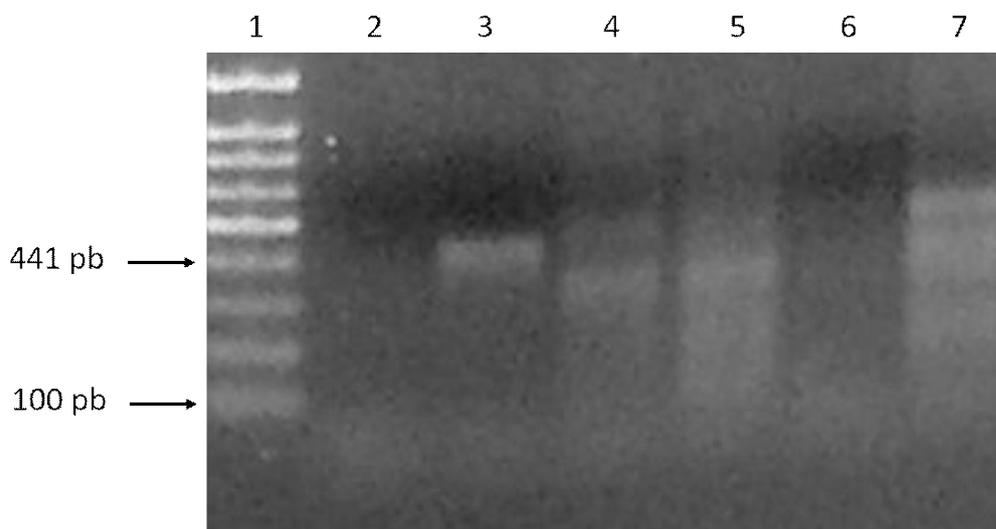


Figura 1. PCR en muestras de sangre de potrillos con signos clínicos respiratorios. Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio al 0.005%. Carril 1: Ladder Gibco BRL®. Indicador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: Control negativo de amplificación (agua). Carril 3: 280 ng de ADN extraídos a partir de cepa ATCC 6939 (control positivo). Carriles 4, 5, 7: Muestras de sangre positiva a *R. equi* de potrillos. Carril 6: Muestra de sangre negativa a *R. equi* de potrillos.

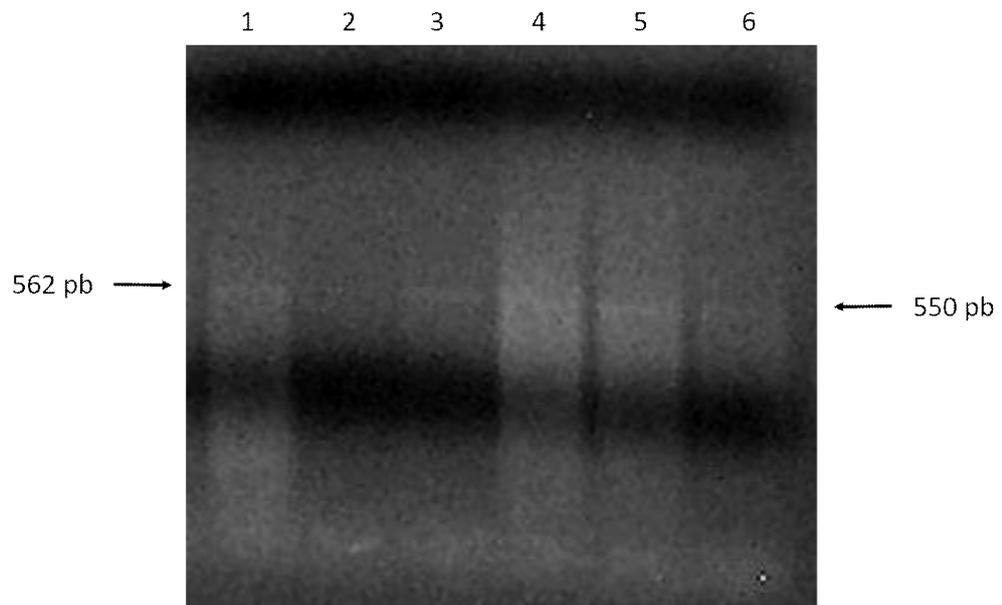


Figura 2. Aplicación de PCR para detectar *VapA* en muestras de sangre de potrillos con signos clínicos respiratorios. Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio al 0.005%. Carril 1, 2: ADN procedente de muestra de sangre positiva a *VapA* de *R. equi*. Carril 3: Muestra de sangre negativa a *VapA* de *R. equi*. Carril 4, 5, 6: ADN procedente de muestra de sangre positiva a *VapA* de *R. equi*

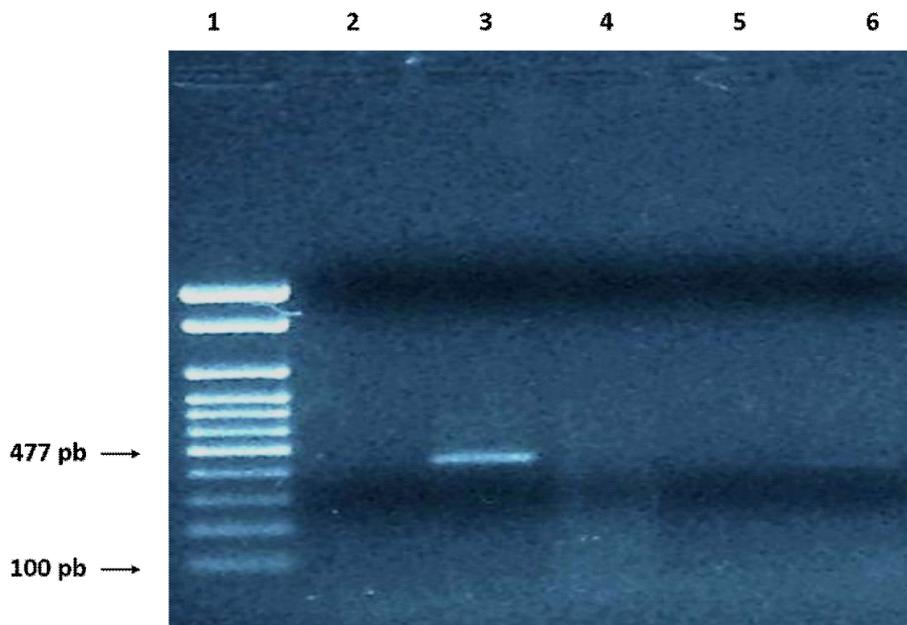


Figura 3. Aplicación de PCR para detectar *VapC* en muestras de sangre de potrillos con signos clínicos respiratorios. Electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v teñido con bromuro de etidio al 0.005%. Carril 1: Ladder Gibco BRL®. Indicador de peso molecular de 100 pb. Carril 2: Control negativo de amplificación (agua). Carril 3: 280 ng de ADN extraídos de la cepa ATCC 6939 (control positivo). Carril 4, 5: Muestra de sangre negativa a *VapC* de *R. equi*. Carril 6: ADN procedente de muestra de sangre positiva a *VapC* de *R. equi*

tra sanguínea en potrillos FSC clínicamente sanos. Gressler *et al.* (2018) también identificaron *R. equi* en cavidad nasal mediante la técnica PCR múltiple en equinos clínicamente sanos, indicando que está presente como parte de la flora bacteriana normal de la cavidad nasal en ejemplares criados en pasturas.

Los ejemplares positivos a *Vap* presentaron edades entre 3 y 4 meses de edad, rango etario en que la concentración de anticuerpos disminuye y, por lo tanto, los potrillos son más susceptibles a contraer la enfermedad (Vivrette, 1992). Los resultados encontrados de acuerdo con la época del año coinciden con Meijer y Prescott (2004), quienes mencionan como factores predisponentes a los ambientes calurosos, secos, polvorientos. En este estudio, las muestras fueron obtenidas de criaderos que poseen una alta densidad de población equina, lo que concuerda con lo descrito por Chaffin *et al.* (2003), quienes correlacionan positivamente densidad poblacional con *R. equi* patógeno.

La asociación obtenida en este estudio de potrillos con *R. equi* con variantes *VapA*, *VapC* y *VapG* con signos clínicos respiratorios fue significativa y positiva y de alta confiabilidad, no encontrando *Vap* en potrillos con trastornos gastrointestinales. Se describe que puede existir trastornos extrapulmonares en potros con neumonía por *R. equi*, encontrándose hasta un 74% de potros afectados (Johns, 2013). Estos trastornos pueden ser: artritis séptica, osteomielitis, absceso abdominal o colitis, o como consecuencia de una reacción inmune mediada, uveítis, sinovitis no séptica (típicamente de articulaciones múltiples), y anemia hemolítica inmuno mediada.

El plásmido de virulencia de *R. equi* ha sido reconocido por su asociación con la enfermedad causada por esta bacteria, y el plásmido *VapA* se indica como factor primario determinante en la virulencia de rodococosis (Okoko *et al.*, 2015; Valero-Rello *et al.*, 2015). Makrai *et al.* (2002) mostraron que el 88% de los aislamientos de *R. equi* en potros tienen *VapA*.

Se ha descrito que el cultivo microbiológico de muestras obtenida por ATB ha sido utilizado para el diagnóstico clínico de neumonía causada por *R. equi*, pero su sensibilidad es baja y se describen falsos negativos (Sweeney *et al.*, 1987; Woolcock *et al.*, 1987). El análisis de sangre e imagenología también se usan para los diagnósticos presuntivos clínicos (Giguère *et al.*, 2011). El diagnóstico serológico ha sido propuesto, pero con limitaciones (Arriaga *et al.*, 2002). La técnica de PCR no solo es aplicable a secreciones de ATB, sino también a muestras de sangre (Bell *et al.*, 1996; Sellon *et al.*, 1997), saliva o exudados, evitando de esta manera el empleo de cultivos bacteriológicos (Bell *et al.*, 1996). Se han estudiado otros métodos como el PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR) en muestras fecales para el diagnóstico temprano de neumonía en potrillos con *R. equi* (Madrigal *et al.*, 2016); sin embargo, debe evaluarse la posibilidad de extrapolar resultados de estos análisis a otras poblaciones (Shaw *et al.*, 2015).

LITERATURA CITADA

1. **Ainsworth DM, Yeagar AM, Eicker SW, Erb HE, Davidow E. 1997.** Athletic performance of horses previously infected with *R. equi* pneumonia as foal. P Annu Conv Am Equin 43: 81-82.
2. **Arriaga JM, Cohen ND, Derr JN, Chaffin MK, Martens RJ. 2002.** Detection of *Rhodococcus equi* by polymerase chain reaction using species-specific nonproprietary primers. J Vet Diagn Invest 14: 347-353. doi: 10.1177/104063870201400416
3. **Bell KS, Philp JC, Christofi N, Aw DW. 1996.** Identification of *Rhodococcus equi* using the polymerase chain reaction. Lett Appl Microbiol 23: 72-74. doi: 10.1111/j.1472-765X.1996.tb00033.x
4. **Bertone J. 1998.** Pneumonia and other disorders associated with *Rhodococcus equi*. In: Reed S, Bayly W (eds). Equine internal medicine. 2nd ed. Philadelphia: Saunders. p 970-978.

5. **Byrne BA, Prescott JF, GH Palmer, Takai S, Nicholson V, Alperin DC, Hines S. 2001.** Virulence plasmid of *Rhodococcus equi* contains inducible gene family encoding secreted proteins. *Infect Immun* 69: 650-656. doi: 10.1128/IAI.69.2.650-656.2001
6. **Chaffin MK, Cohen ND, Martens RJ. 2003.** Evaluation of equine breeding farm characteristics as risk factors for development of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Am Vet Med Assoc* 222: 467-475.
7. **Chhabra S, Khurana SK, Kapoor PK, Singha H, Singh Y, Khirbat R. 2015.** Characterization of *Rhodococcus equi* isolates from foals with respiratory problems using a multiplex PCR for the vap Genes. *Adv Anim Vet Sci* 3: 28-32. doi: 10.14737/journal.aavs/2015/3.1s.-28.32
8. **Coulson GB, Miranda-CasoLuengo AA, Miranda-Caso Luengo R, Wang X, Oliver J, Willingham-Lane JM, Meijer WG, et al. 2015.** Transcriptome reprogramming by plasmid-encoded transcriptional regulators is required for host niche adaptation of a macrophage pathogen. *Infect Immun* 83: 3137-3145. doi: 10.1128/IAI.00230-15
9. **Dawson TR, Horohov DW, Meijer WG, Muscatello G. 2010.** Current understanding of the equine immune response to *Rhodococcus equi*. An immunological review of *R. equi* pneumonia. *Vet Immunol Immunop* 135: 1-11. doi: 10.1016/j.vetimm.2009.12.004
10. **Giguère S, Hernandez J, Gaskin JM, Miller C, Bowman JL. 2003.** Evaluation of WBC concentration, plasma fibrinogen concentration, and an agar gel immunodiffusion test for early identification of foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J Am Vet Med Assoc* 222: 775-781. doi: 10.2460/javma.2003.-222.775
11. **Giguère S, Hondalus MK, Yager JA, Darrah P, Mosser DM, Prescott JF. 1999.** Role of the 85-kilobase plasmid and plasmid-encoded virulence-associated protein A in intracellular survival and virulence of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 67: 3548-3557.
12. **Giguère S, Cohen ND, Chaffin MK, Hines SA, Hondalus MK, Prescott JF, Slovis NM. 2011.** *Rhodococcus equi*: clinical manifestations, virulence, and immunity. *J Vet Intern Med* 25: 1221-1230. doi: 10.1111/j.1939-1676.2011.-00804.x
13. **Giles C, Vanniasinkam T, Ndi S, Barton MD. 2015.** *Rhodococcus equi* (*Prescottella equi*) vaccines; the future of vaccine development. *Equine Vet J* 47: 510-518. doi: 10.1111/evj.12310
14. **Gressler LT, Machado G, da Silveira BP, Cohen ND, Corbellini LG, Leotti VB, Diehl GN, et al. 2018.** Prevalence of *Rhodococcus equi* from the nasal cavity of 1010 apparently healthy horses. *Equine Vet J* 50: 667-671. doi: 10.1111/evj.12804
15. **Hondalus MK. 1997.** *Rhodococcus equi*: pathogenesis and virulence. In: XLIII Annual Convention Proceedings of American Association of Equine Practitioners. USA.
16. **Hondalus MK, Mosser DM. 1994.** Survival and replication of *Rhodococcus equi* in macrophages. *Infect Immun* 62: 4167-4175.
17. **Hoos M, Paabo S. 1993.** DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21: 3913-3914. doi: 10.1093/nar/21.16.3913
18. **Johns IC, Desrochers A, Wotman KL, Sweeney RW. 2011.** Presumed immune-mediated hemolytic anemia in two foals with *Rhodococcus equi* infection. *J Vet Emerg Crit Care.* 21: 273-278. doi: 10.1111/j.1476-4431.2011.00633.x
19. **Johns I. 2013.** Management of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet Med Res Rep* 4: 49-59. doi: 10.2147/VMRR.S39716
20. **Leadon DP, Klay M, Buckley T, Fogarty U, Lewis AD, Vazquez-Boland JA. 2007.** A review of foal pneumonias with an assessment of the importance of *R. equi*. Satellite Meeting of the World Equine Veterinary Association. Valdivia, Chile.

21. **Letek M, Gonzalez P, Macarthur I, Rodriguez H, Freeman TC, Valero-Rello A, Blanco M, et al. 2010.** The genome of a pathogenic *Rhodococcus*: cooptive virulence underpinned by key gene acquisitions. *PLoS Genet* 6(9): e1001145. doi: 0.1371/journal.pgen.1001145
22. **Madrigal RG, Shaw SD, Witkowski LA, Sisson BE, Blodgett GP, Chaffin MK, Cohen ND. 2016.** Use of serial quantitative PCR of the *vapA* gene of *Rhodococcus equi* in feces for early detection of *R. equi* pneumonia in foals. *J Vet Intern Med* 30: 664-670. doi: 10.1111/jvim.13828
23. **Makrai L, Takai S, Tamura M, Tsukamoto A, Sekimoto R, Sasaki Y, Kakuda T, et al. 2002.** Characterization of virulence plasmid types in *Rhodococcus equi* isolates from foals, pigs, humans and soil in Hungary. *Vet Microbiol* 88: 377-384.
24. **Márquez K. 2006.** Estudio de la incidencia de *Rhodococcus equi* y su relación con variantes génicas virulentas del agente etiológico en potrillos FSC en haras de la zona central de Chile. Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Univ. Mayor. 60 p.
25. **McQueen CM, Dindot SV, Foster MJ, Cohen ND. 2015.** Genetic susceptibility to *Rhodococcus equi*. *J Vet Intern Med* 29: 1648-1659. doi: 10.1111/jvim.13616
26. **Meijer WG, Prescott JF. 2004.** *Rhodococcus equi*. *Vet Res* 35: 383-396. doi: 10.1051/vetres:2004024
27. **Miranda DA. 2003.** Identificación genómica de *Rhodococcus equi* a partir de muestras biológicas procedentes de equinos FSC de la zona central de Chile. Tesis de Médico Veterinario. Santiago: Univ. Mayor. 68 p.
28. **Okoko T, Blagova EV, Whittingham JL, Dover LG, Wilkinson A. 2015.** Structural characterisation of the virulence-associated protein VapG from the horse pathogen *Rhodococcus equi*. *Vet Microbiol* 31: 42-52. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.01.027
29. **Paredes E, Gallego R, Canal AM, Araya O, Chahuán E, Thomas P, Zamora J. 2000.** Primer caso descrito en Chile de neumonía y colitis por *Rhodococcus equi* en un potrillo. *Arch Med Vet* 32: 101-106. doi: 10.4067/S0301-732X2000000100013
30. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1546 p.
31. **Sellon DC, Walket K, Suyemoto M, Altier C. 1997.** Nucleic acid amplification for rapid detection of *Rhodococcus equi* in equine blood and tracheal wash fluids. *Am J Vet Res* 58: 1232-1237.
32. **Sellon D, McConnico RS, Vivrette S. 2000.** Diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals: PCR or culture? *P Annu Conv Am Equin* 46: 268-269.
33. **Sellon DC, Besser TE, Vivrette SL, McConnico RS. 2001.** Comparison of nucleic acid amplification, serology, and microbiologic culture for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Clin Microbiol* 39: 1289-1293. doi: 10.1128/JCM.39.4.1289-1293.2001
34. **Shaw SD, Cohen ND, Chaffin MK, Blodgett GP, Syndergaard M, Hurych D. 2015.** Estimating the sensitivity and specificity of real time quantitative PCR of fecal samples for diagnosis of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *J Vet Intern Med* 29: 1712-1717. doi: 10.1111/jvim.13631
35. **Son W, Lee D, Yamatoda N, Hatori F, Shimizu N, Kakuda T, Sasaki Y, et al. 2006.** Molecular typing of VapA-positive *Rhodococcus equi* isolates from Jeju native horses, Korea. *J Vet Med Sci* 68: 249-153.
36. **Sweeney CR, Sweeney RW, Divers TJ. 1987.** *Rhodococcus equi* pneumonia in 48 foals: response to antimicrobial therapy. *Vet Microbiol* 14: 329-336. doi: 10.1016/0378-1135(87)90120-9
37. **Tan C, Prescott JF, Patterson MC, Nicholson VM. 1995.** Molecular characterization of a lipid-modified

- virulence-associated protein of *Rhodococcus equi* and its potential in protective immunity. *Can J Vet Res* 59: 51-59.
38. **Takai S, Koike K, Ohbushi S, Izumi C, Tsubaki S. 1991a.** Identification of 15- to 17-kilodalton antigens associated with virulent *Rhodococcus equi*. *J Clin Microbiol* 29: 439-443.
39. **Takai S, Sekizaki T, Ozawa T, Sugawara T, Watanabe Y, Tsubaki S. 1991b.** Association between a large plasmid and 15- to 17-kilodalton antigens in virulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 59: 4056-4060.
40. **Takai S, Ikeda T, Sasaki Y, Watanabe Y, Ozawa T, Tsubaki S, Sekizaki T. 1995.** Identification of virulent *Rhodococcus equi* by amplification of gene coding 15-to 17- Kilodalton antigens. *J Clin Microbiol* 33: 1624-1627.
41. **Takai S, Shoda M, Sasaki Y, Tsubaki S, Fortier G, Pronost S, Rahal K, et al. 1999.** Restriction fragment length polymorphisms of virulence plasmids in *Rhodococcus equi*. *J Clin Microbiol.* 37: 3417-3420.
42. **Takai S, Anzai T, Fujita Y, Akit O, Shoda M, Tsubaki S, Wada R. 2000.** Pathogenicity of *Rhodococcus equi* expressing a virulence-associated 20kDa protein (*VapB*) in foals. *Vet Microbiol* 76: 71-80. doi: 10.1016/S0378-1135(00)-00226-1
43. **Toyooka K, Takai S, Kirikae T. 2005.** *Rhodococcus equi* can survive a phagolysosomal environment in macrophages by suppressing acidification of the phagolysosome. *J Med Microbiol* 2005: 1007-1015. doi: 10.1099/jmm.0.46086-0
44. **Valero-Rello A, Hapeshi A, Anastasi E, Alvarez S, Scorttia M, Meijer WG, et al. 2015.** An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*. *Infect Immun* 83: 2725-2737. doi: 10.1128/IAI.00376-15
45. **Venner M, Rödiger A, Laemmer M, Giguère S. 2012.** Failure of antimicrobial therapy to accelerate spontaneous healing of subclinical pulmonary abscesses on a farm with endemic infections caused by *Rhodococcus equi*. *Vet J* 192: 293-298. doi: 10.1016/j.tvjl.2011.07.004
46. **Vivrette S. 1992.** The diagnosis, treatment, and prevention of *Rhodococcus equi* pneumonia in foals. *Vet Med* 87: 144-149.
47. **Woolcock JB, Mutimer NM, Bowles PM. 1987.** The immunological response of foals to *Rhodococcus equi*: a review. *Vet Microbiol* 14: 215-224.