

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw J.C. Huizinga-Heringa  
POSTBUS 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 8 juli 2010  
**KENMERK** CGM/100708-01  
**ONDERWERP** Advies: Veterinaire studie naar *Rhodococcus equi* vaccin in paarden

Geachte mevrouw Huizinga,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IM 09-004 met de titel 'Een niet-pathogene *Rhodococcus equi* stam als vaccin in paarden' van Intervet International BV, deelt de COGEM u het volgende mee.

#### **Samenvatting**

De COGEM is gevraagd te adviseren over een veterinaire studie met de bacteriestam *Rhodococcus equi* RG2837. De RG2837 stam mist vier genen die betrokken zijn bij het metabolisme van steroïden. Door de deletie van deze genen is de stam verzwakt in paarden. In deze stam is geen 'nieuw' DNA geïntroduceerd. De aanvrager is van plan *R. equi* RG2837 als vaccin te testen in veulens en verzoekt een vergunning voor de introductie in het milieu van RG2837.

*R. equi* komt wereldwijd in de bodem voor en kan in jonge veulens een ernstige ziekte veroorzaken waaraan meer dan de helft van de getroffen veulens overlijdt. In *in vivo* studies met de vaccinstam toont de aanvrager aan dat deze stam in veulens geen ziekte veroorzaakt of andere bijwerkingen heeft. Tevens veroorzaakt deze vaccinstam geen ziekte in geteste niet-doelwitorganismen. Het aantal infecties van gezonde personen door wildtype *R. equi* is beperkt en goed te behandelen met antibiotica. De aanvrager geeft aan dat de persistentie van de vaccinstam in humane macrofagen lager is dan van de uitgangsstam.

De door aanvrager overlegde gegevens geven volgens de COGEM voldoende bewijs voor de attenuatie van de RG2837 stam in veulens. Tevens ziet zij geen aanleiding om aan te nemen dat de vaccinstam in de mens en in niet-doelwitorganismen virulenter is dan de wildtype *R. equi* bacterie, die overal in het milieu voorkomt. Doordat de vaccinstam in eerdere studies door veulens uitgescheiden werd, acht de COGEM de kans reëel dat de vaccinstam tijdens de voorgenomen studie in het milieu geïntroduceerd zal worden. Zij is daarbij van mening dat RG2837 zich na introductie in het milieu zal kunnen handhaven. Aangezien de vaccinstam een schone deletiemutant is, waarin geen additioneel DNA is geïntroduceerd en de vaccinstam in de geteste condities in grond- en watermonsters eenzelfde persistentie vertoont als de wildtype bacterie, voorziet de COGEM geen nadelige effecten van de introductie in het milieu van deze vaccinstam. Derhalve acht de COGEM de risico's van de onderhavige veterinaire studie met de vaccinstam RG2837 voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

A handwritten signature in black ink, consisting of a large loop followed by a horizontal line and a small dash.

Prof. dr. ir. Bastiaan C.J. Zoeteman  
Voorzitter COGEM

c.c. Drs. H.P. de Wijs  
Dr. I. van der Leij

# Introductie in het milieu van *Rhodococcus equi* vaccinstam

## COGEM advies CGM/100708-01

### Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag voor een veterinaire studie buiten inperking met een genetisch gemodificeerde *Rhodococcus equi* vaccinstam. Voor de ontwikkeling van een vaccin tegen *R. equi* wil Intervet International BV de *R. equi* vaccinstam RG2837 testen in paardenveulens. In het kader van deze studie verzoekt de aanvrager de vaccinstam in het milieu te mogen introduceren.

### *Rhodococcus equi*

De bacterie *Rhodococcus equi* (familie *Nocardiaceae*) is een pathogene, niet-sporenvormende coccobacillus die wereldwijd in de bodem voorkomt.<sup>1</sup> De bacterie wordt ook aangetroffen in zout en zoet water. De natuurlijke gastheer van *R. equi* is het paard. Mensen, huisdieren en vee kunnen ook geïnfecteerd worden, maar dit is relatief zeldzaam.<sup>2,3</sup>

Het inhaleren van stofdeeltjes besmet met *R. equi* vormt de voornaamste bron van besmetting, naast opname van grond en mest bij grazen.<sup>4</sup> Oudere paarden zijn meestal resistent tegen *R. equi*, die wordt aangetroffen in hun maag-darmkanaal en in de mest. In veulens van één tot zes maanden oud kan *R. equi* een ernstige ziekte veroorzaken die gekenmerkt wordt door chronische longontsteking, meestal in combinatie met een zwerende dikkedarmontsteking.<sup>5</sup> In gemiddeld 60% van de gevallen leidt de ziekte tot de dood van de veulens.<sup>6</sup>

Na infectie persisteert en repliceert de bacterie in de macrofagen van de gastheer, die uiteindelijk gedood kunnen worden.<sup>7</sup> De virulentie van de bacterie wordt in belangrijke mate bepaald door de aanwezigheid van een virulentieplasmide. Dit plasmide is 70-100 kB groot en codeert onder andere voor zogenaamde 'virulence associated proteins' (Vaps). Volvirulente stammen bezitten het VapA antigeen, terwijl middelmatig virulente stammen het gerelateerde VapB antigeen bezitten.<sup>7</sup> Avirulente stammen hebben geen virulentieplasmide. De specifieke rol die Vaps in het virulentiemechanisme van *R. equi* spelen, is nog niet bekend. De *R. equi* stammen die in paarden worden aangetroffen bezitten allen een virulentieplasmide dat codeert voor het VapA antigeen.<sup>7</sup>

De standaardbehandeling van zieke veulens bestaat uit de toediening van de antibiotica erythromycine en rifampicine. Een vaccin tegen *R. equi* is nog niet beschikbaar. De preventieve toediening van hyperimmuun plasma afkomstig van gevaccineerde paarden aan pasgeboren veulens kan leiden tot vermindering van ziekte en sterfte.<sup>5</sup>

### *Humane infectie*

Het aantal *R. equi* infecties in mensen met een normaal functionerend immuunsysteem is zeer laag. Sinds de melding van de eerste *R. equi* infectie bij mensen in 1967 zijn er tot 2001 slechts

negentien gevallen beschreven van een *R. equi* infectie in immunocompetente mensen.<sup>8</sup> De helft van deze gevallen betrof lokale infecties. Twee van de negentien patiënten overleden, de anderen genazen van de *R. equi* infectie door behandeling met antibiotica.<sup>8</sup> De overleden patiënten hadden beide een pulmonaire *R. equi* infectie. Een van de overleden patiënten leed naast de *R. equi* infectie ook aan een chronische amoebedysenterie met leverabscessen en een bronchobiliaire fistel. De andere overleden patiënt was 83 jaar, werd behandeld met verkeerde antibiotica en overleed voordat *R. equi* als oorzaak was geïdentificeerd.

Immuungecompromiteerde patiënten, waaronder HIV-geïnfecteerde personen of patiënten die worden behandeld met immuunonderdrukkende middelen, zijn gevoeliger voor een infectie met *R. equi*. In de periode van 1986 tot 2008 zijn 272 gevallen van een *R. equi* infectie in HIV-geïnfecteerde personen gepubliceerd.<sup>9</sup> In 78% van de gevallen werden de patiënten behandeld met antibiotica. Ongeveer de helft van de patiënten is overleden waarvan 17% toegeschreven kan worden aan de directe gevolgen van de *R. equi* infectie. Overdracht van mens op mens is eenmalig waargenomen bij HIV-geïnfecteerde personen.<sup>1</sup>

#### ***Enzymatische karakteristieken van het Rhodococcus genus***

De bacteriën in het genus *Rhodococcus* worden gebruikt voor biotechnologische en milieutoepassingen vanwege hun unieke enzymatische eigenschappen en katabolische diversiteit.<sup>10</sup> Ze zijn in staat om schadelijke stoffen zoals PCBs, toluen en herbiciden te metaboliseren en zwavelgroepen in fossiele brandstof te verwijderen.<sup>11</sup> Daarnaast kunnen ze steroïden zoals phytosterolen en cholesterol verwerken tot bioactieve stoffen zoals steroïdhormonen (o.a. testosteron).<sup>12</sup> *R. equi* is in staat om plantaardige en dierlijke steroïden als enige koolstof- en energiebron te gebruiken.<sup>13</sup>

#### ***Vaccinstam R. equi RG2837***

De *R. equi* vaccinstam RG2837 is afgeleid van de wildtype pathogene *R. equi* stam RE-1. Deze wildtype stam is in Nederland in 2007 geïsoleerd uit een veulen met pyogranulomateuze longontsteking.<sup>13</sup> Uit RE-1 zijn vier genen verwijderd om RG2837 te verkrijgen. De betreffende genen coderen voor de enzymen IpdA en IpdB. De aanvrager geeft aan dat deze genen een rol spelen in de afbraak van organische verbindingen, waaronder natuurlijke steroïden. De genen liggen in het *ipdAB* operon, waarvan twee kopieën op het chromosoom aanwezig zijn. Hierdoor zijn er vier *ipdA* en *ipdB* genen: *ipdA*<sub>1</sub>, *ipdA*<sub>2</sub>, *ipdB*<sub>1</sub> en *ipdB*<sub>2</sub>.

Voor de vervaardiging van de vaccinstam zijn het *ipdAB* en het *ipdAB2* operon met behulp van een homologe-recombinatietechniek bijna geheel verwijderd uit het genoom van *R. equi* RE-1. Deze techniek laat geen vectorsequenties of 'vreemd' DNA achter in het organisme.<sup>13</sup> Het virulentieplasmide dat de RE-1 stam bezit, wordt niet verwijderd en is ook aanwezig in de vaccinstam.

#### **Eerder COGEM advies**

*R. equi* is in de Regeling ggo ingeschaald als een klasse 2 pathogeen. In 2006 heeft de COGEM geadviseerd over werkzaamheden met genetisch gemodificeerde *R. equi*.<sup>14</sup> Aangezien de

aanvrager destijds geen gebruik maakte van stammen met een bewezen verminderd virulent of avirulent karakter of van geattenueerde stammen, adviseerde de COGEM de vervaardiging van en handelingen met gg-*R. equi* conform de Regeling GGO in te schalen op ML-II niveau.

In 2009 heeft de COGEM geadviseerd over een vaccinatiestudie met dezelfde *R. equi* vaccinstam als in onderhavige vergunningaanvraag.<sup>15</sup> De studie werd uitgevoerd in veulens van 3 dagen tot 3 weken oud die gezoogd werden door niet-gevaccineerde merries. Het vaccin werd meerdere malen oraal toegediend in een dosis van  $1 \times 10^7$  tot  $5 \times 10^{10}$  kolonievormende eenheden *R. equi* RG2837. De COGEM was van mening dat de veiligheid voor mens en milieu voldoende was gewaarborgd als de benodigde werkzaamheden met deze vaccinstam plaats zouden vinden op ML-I en DM-I inperkingsniveau. Hierbij adviseerde de COGEM de volgende aanvullende voorschriften:

- de merries worden voorafgaand aan de proef getest op afwezigheid van wildtype *R. equi*,
- de veulens worden tijdens de proef op shedding getest,
- de merries worden na de proef elke dag op shedding getest,
- de agar-test en de PCR-test worden beide uitgevoerd om shedding bij merries te detecteren.

In reactie op het verzoek om de merries na het experiment buiten inperking te mogen huisvesten was de COGEM van mening dat de merries zeven opeenvolgende dagen negatief dienden te zijn voor *R. equi* en *R. equi* RG2837 in zowel de agar- als de PCR-test. Als aan deze voorwaarde werd voldaan, achtte de COGEM de risico's die verbonden zijn aan een huisvesting buiten inperking, voor mens en milieu verwaarloosbaar klein. De veulens werden in deze aanvraag na afloop van het experiment opgeofferd voor nader onderzoek.

### **Voorgenomen werkzaamheden**

In de voorgenomen studie is de aanvrager van plan de RG2837 vaccinstam op grote schaal te testen in jonge veulens. Daartoe zal de stam maximaal twee keer oraal of rectaal toegediend worden aan veulens, die 3 dagen tot 6 maanden oud zijn. De doseringen variëren van  $1 \times 10^7$  tot  $5 \times 10^{10}$  kolonievormende eenheden *R. equi* RG2837.

De effectiviteit van het vaccin zal serologisch gevolgd worden, waarvoor 3-5 bloedmonsters worden afgenomen. Aangezien uit eerdere experimenten duidelijk is geworden dat paarden de vaccinstam tijdelijk in geringe hoeveelheden uit kunnen scheiden, is de aanvrager niet van plan de uitscheiding opnieuw te monitoren. De gevaccineerde dieren zullen in stallen of afgerasterde weilanden worden gehouden en komen niet in aanraking met dieren die niet deelnemen aan de studie. Na afloop van het experiment wil de aanvrager de dieren de proef levend laten verlaten zonder extra maatregelen. Ook voor de afvoer van de mest in de stallen acht de aanvrager het niet nodig speciale maatregelen te treffen. De mest zal zonder enige behandeling op het land uitgereden worden.

## Overweging

### **Karakterisatie van *R. equi* RG2837**

Ten opzichte van de wildtype uitgangsstam zijn uit de vaccinstam de *ipdAB* en *ipdAB2* operons uit het chromosomaal DNA verwijderd. De aanvrager heeft met behulp van PCR de deletie van beide operons aangetoond. Tevens zijn de sequenties die het *ipdAB* en *ipdAB2* operon flankeren met PCR onderzocht. De aanvrager heeft op deze wijze geen onverwachte genomische re-arrangement waargenomen. De aanvrager concludeert daaruit dat er geen vector DNA in de vaccinstam is achtergebleven en de *ipdAB* en *ipdAB2* genen op de voorgenomen manier uit het *R. equi* genoom zijn verwijderd.

De COGEM is van mening dat de deleties in de vaccinstam op deze wijze adequaat in kaart zijn gebracht. Zij beschouwt de vaccinstam als een schone deletiemutant, waarin geen DNA aanwezig is dat niet tot het *R. equi* genoom behoort.

### **Pathogeniteit van RG2837 in het paard**

Zowel de vaccinstam RG2837, waaruit de *ipdAB* en *ipdAB2* operons zijn verwijderd als een enkelvoudige deletiemutant, waaruit alleen het *ipdAB* operon is verwijderd (RE1ΔAB), zijn door de aanvrager *in vivo* getest in een aantal veulens.

Een intratracheale toediening van RE1ΔAB veroorzaakte in een vijftal veulens van 3 tot 7 weken oud geen longontsteking of andere bijwerkingen. Daarentegen leidde de toediening van de wildtype stam in alle betreffende veulens tot pyogranulomateuze longontstekingen. Ook de orale toediening van RE1ΔAB in twaalf veulens leidde niet tot ziekte of enige bijwerkingen.

De pathogeniteit van de vaccinstam RG2837 is ook onderzocht na intratracheale en orale toediening in respectievelijk zestien en elf veulens. In geen van de gevaccineerde veulens werd enig klinische bijwerking geconstateerd die geassocieerd werd met de vaccinstam. De aanvrager merkt op dat na toediening een tijdelijke uitscheiding van lage hoeveelheden RG2837 wordt waargenomen. De zogenaamde 'contact veulens' die in deze studies waren opgenomen, werden echter niet besmet door de vaccinstam.

Aangezien de *ipdAB* deletiemutanten in geen van de *in vivo* experimenten klinisch nadelige effecten laten zien, is de COGEM van mening dat de vaccinstam RG2837 in de gastheer geattenuëerd is.

### **Pathogeniteit van *R. equi* RG2837 in mens**

Het aantal infecties met wildtype *R. equi* in personen met een normale afweer is beperkt.<sup>8</sup> Daarbij leidt de behandeling van de infectie met geschikte antibiotica in ruim 90% van de gevallen tot genezing. Er zijn geen wetenschappelijke gegevens bekend over de pathogeniteit van de vaccinstam in mensen.

De aanvrager merkt op dat *R. equi* sterk verwant is aan *Mycobacterium tuberculosis* en de infectie van *R. equi* in veulens sterk lijkt op de *M. tuberculosis* infectie bij mensen. Bovendien is uit recent onderzoek gebleken dat *M. tuberculosis* een sterk verminderde persistentie heeft in macrofagen na inactivatie van genen die betrokken zijn bij de import van cholesterol van de gastheer.<sup>16</sup> Deze genen van het cholesterol katabolisme zijn zeer geconserveerd binnen de

Corynebacteriaceae, waartoe zowel *M. tuberculosis* als *R. equi* behoren. In *M. tuberculosis* worden deze genen geïnduceerd tijdens de groei in macrofagen en blijken een aantal genen essentieel voor overleving in macrofagen en muizen.<sup>17,18</sup> De aanvrager heeft de persistentie van de vaccinstam RG2837 onderzocht in een humane macrofagencelijn. Hieruit blijkt dat de vaccinstam in deze cellijn minder goed overleeft dan de wildtype bacteriestam.

Gebaseerd op de beschikbare literatuur beschouwt de COGEM *R. equi* als een opportunistisch pathogeen voor mensen. Aangezien de vaccinstam ten opzichte van wildtype *R. equi* een verminderde pathogeniteit in paarden heeft en een gereduceerde persistentie in humane macrofagen laat zien, ziet de COGEM geen aanleiding om aan te nemen dat de vaccinstam voor mensen pathogener is dan de uitgangsstam.

#### ***Effect van RG2837 in niet-doelwitorganismen***

Om het effect van de vaccinstam op niet-doelwitorganismen te onderzoeken heeft de aanvrager zowel de vaccinstam als de wildtype stam aan groepen ratten, muizen, kippen, kalveren en varkens toegediend. In de ratten, muizen en kippen werden beiden stammen alleen oraal toegediend, in de kalveren en varkens zijn de stammen zowel oraal als nasaal toegediend. Gedurende drie weken na toediening werden de dieren dagelijks klinisch geobserveerd. Na deze drie weken werden de dieren tevens post-mortem onderzocht op nadelige effecten van de toediening van de vaccinstam of de wildtype variant. In geen van de onderzochte dieren werd enig klinisch effect waargenomen dat geassocieerd kon worden met de toediening van hetzij de vaccinstam hetzij de wildtype stam. Met het oog op de uitkomst van deze experimenten in genoemde niet-doelwitorganismen en het feit dat het virulentieplasmide de betreffende *R. equi* stam een zekere mate van soortspecificiteit geeft, ziet de COGEM geen reden om aan te nemen dat RG2837 een nadelig effect zal hebben op niet-doelwitorganismen.

#### ***Shedding van vaccinstam***

Bij een natuurlijke *R. equi* infectie scheiden besmette veulens gedurende enkele weken ongeveer  $10^4$  kolonievormende eenheden *R. equi* per gram feces uit.<sup>19</sup> Onder voor de bacterie gunstige condities kan *R. equi* in het milieu met een factor  $10^4$  toenemen in twee weken.<sup>20</sup> Zoals door de aanvrager wordt aangegeven, is uit de eerdere veterinaire studies in veulens gebleken dat er gedurende enkele weken na toediening beperkte uitscheiding van de vaccinstam op kan treden. Drie weken na vaccinatie wordt in 25% van de dieren nog uitscheiding waargenomen. In deze groep is de mate van uitscheiding bepaald op  $3 \times 10^4$  tot  $3 \times 10^5$  bacteriën per gram feces. De aanvrager is niet van plan om de shedding opnieuw te monitoren of preventieve maatregelen te nemen om te voorkomen dat het ggo door shedding in het milieu geïntroduceerd zal worden.

#### ***Overleving van de vaccinstam in het milieu***

Om inzicht te verkrijgen in de stabiliteit van de vaccinstam in het milieu heeft de aanvrager de persistentie van de vaccinstam onder verschillende omstandigheden in aarde en in water onderzocht. De persistentie van de vaccinstam en wildtype bacteriestam is tot op heden over een periode van 39 weken gevolgd. Gedurende deze periode is geen verschil in overleving waar te

nemen tussen de vaccinstam en de uitgangsstam. Hieruit concludeert de aanvrager dat de vaccinstam buiten de gastheer niet of nauwelijks geattenuëerd zal zijn.

De COGEM is van mening dat vanuit evolutionair oogpunt verwacht mag worden dat de genen die geen nut hebben voor een organisme op den duur uit dit organisme verdwijnen. De aanwezigheid van de *ipdAB* en *ipdAB2* operons in het wildtype *R. equi* doet derhalve vermoeden dat ze van belang zijn voor het overleven van de bacterie. De verwijdering van overtollige genen is in de natuur echter mede afhankelijk van de condities waaronder het betreffende organisme leeft en de frequentie waarmee de deletie van deze genen ontstaat. Hierdoor kan de COGEM niet uitsluiten dat de *ipdAB* en *ipdAB2* operons in *R. equi* voor de overleving in de bodem geen toegevoegde waarde hebben, maar toch nog in het genoom aanwezig zijn.

Op basis van de aangeleverde gegevens is de COGEM van mening dat RG2837 buiten de natuurlijke gastheer in het milieu waarschijnlijk net zo fit is als de uitgangsstam. De COGEM acht de kans derhalve reëel dat de vaccinstam zich na introductie in het milieu zal kunnen handhaven. Hierdoor moet rekening gehouden worden met een mogelijke permanente aanwezigheid van de deletiemutant in de natuur. Aangezien de vaccinstam geen transgen bezit of anderszins voor *R. equi* vreemde sequenties bevat, worden bij deze introductie in het milieu geen nieuwe sequenties geïntroduceerd die niet reeds aanwezig zijn door het voorkomen van het wildtype *R. equi*. Derhalve acht de COGEM de kans verwaarloosbaar klein dat door onderhavige introductie in het milieu nieuwe eigenschappen worden overgedragen op andere micro-organismen.

#### *Reversie naar volvirulente stam*

Bacteriën wisselen van nature continu genetische informatie uit. Aangezien het wildtype *R. equi* algemeen voorkomt in de natuur, is het waarschijnlijk dat de vaccinstam bij introductie in het milieu in contact zal komen met het wildtype. Alhoewel de COGEM de kans zeer klein acht, dat de chromosomale deletie van de betreffende genen ongedaan wordt gemaakt, kan zij niet uitsluiten dat door recombinatie de *ipdAB* en *ipdAB2* genen op den duur weer in het genoom van de vaccinstam worden geïncorporeerd. Doordat de vaccinstam een zuivere deletiemutant is, waarin geen transgenen of ander vreemd DNA in aanwezig is, zal dit in het ergste geval kunnen leiden tot het ontstaan van het uitgangsorganisme. Gebaseerd op het feit dat het uitgangsorganisme algemeen voorkomt in de bodem, is de COGEM van mening dat een dergelijke reversie geen nadelige gevolgen heeft voor mens en milieu.

#### **Conclusie**

De *R. equi* vaccinstam RG2837 is een deletiemutant van wildtype *R. equi*, waaruit de *ipdAB* en *ipdAB2* operons uit het chromosomaal DNA zijn verwijderd. Het virulentieplasmide van de wildtype stam is nog aanwezig in de vaccinstam.

Op basis van de overlegde gegevens is de COGEM van mening dat het een stam betreft met een verminderde pathogeniteit voor paarden. Er is er geen reden om aan te nemen dat de vaccinstam pathogeen zal zijn voor niet-doelwitorganismen inclusief de mens. Onder de geteste condities lijkt de persistentie van de vaccinstam in de natuurlijke habitat van *R. equi*, de bodem, vergelijkbaar met de persistentie van de wildtype bacterie. Hierdoor acht de COGEM de kans



reëel dat de vaccinstam zich na introductie in het milieu zal kunnen handhaven en mogelijk niet meer uit de bodem verdwijnt.

Afgezien van de verwijdering van vier genen uit het chromosomale DNA is de vaccinstam gelijk aan de wildtype *R. equi* bacterie en bevat het geen additioneel DNA. Hierdoor zal met de introductie van de vaccinstam geen 'nieuw' DNA in het milieu gebracht worden dat aan andere micro-organismen overgedragen kan worden. Derhalve is de COGEM van mening dat de introductie van de vaccinstam in het milieu geen nadelig effect zal hebben op mens en milieu. Op grond van genoemde overwegingen acht de COGEM de risico's van de onderhavige veterinaire studie met de vaccinstam RG2837 voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

### Referenties

1. Weinstock DM & Brown AE (2002). *Rhodococcus equi*: an emerging pathogen. Clin. Infect. Dis. 34:1379-1385
2. Takai S et al. (2003). Virulence of *Rhodococcus equi* isolated from cats and dogs. J. Clin. Microbiol. 41:4468-4470
3. Takai S et al. (1996). Identification of intermediately virulent *Rhodococcus equi* isolates from pigs. J. Clin. Microbiol. 34: 1034-1037
4. Takai S et al. (1991). Prevalence of virulent *Rhodococcus equi* in isolates from soil and feces of horses from horse-breeding farms with and without endemic infections. J. Clin. Microbiol. 29:2887-2889
5. Giguère S (2000). *Rhodococcus equi* infections. In: Recent advances in equine neonatal care. Wilkins PA en Palmer JE (eds). Published online by International Veterinary Information Service
6. Dungworth DL (1993). *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* infection. In: Jubb KVF, Kennedy PC, en Palmer N (eds), Pathology of Domestic Animals, 4th edn, 652-655. Academic Press, San Diego, CA
7. Meijer WG & Prescott JF (2004). *Rhodococcus equi*. Vet. Res. 35:383-396
8. Kedlaja I et al. (2001). *Rhodococcus equi* infections in immunocompetent hosts: case report and review. Clin. Infect. Dis. 32:e39-47
9. Topino S et al. (2010). *Rhodococcus equi* infection in HIV-infected individuals: case reports and review of the literature. Aids Patient Care STDs. 24:211-222
10. Geize van der R & Dijkhuizen L (2004). Harnessing the catabolic diversity of rhodococci for environmental and biotechnological applications. Curr. Opin. Microbiol. 7:255-261
11. Martinková L et al. (2009). Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. Environ. Int. 35:162-177
12. Fernandes P et al. (2003). Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Enzyme Microbial Tech. 32:688-705
13. Geize van der R et al. (2008). A novel method to generate unmarked gene deletions in the intracellular pathogen *Rhodococcus equi* using 5-fluorocytosine conditional lethality. Nucleic Acids Res. 36:e151
14. COGEM (2006). Omlaagschaling van werkzaamheden met *Rhodococcus equi*. Advies CGM/060314-05
15. COGEM (2009). Omlaagschaling werkzaamheden *Rhodococcus equi* vaccinstam. Advies CGM/090416-01

16. Pandey AK & Sasseti CM (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:4376-4380
17. Sasseti CM (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:12989-12994
18. Geize van der R *et al.* (2007). A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:1947-1952
19. Takai S *et al.* (1986). Quantitative aspect of fecal *Rhodococcus (Corynebacterium) equi* in foals. J. Clin. Microbiol. 23:794-796
20. Giguère S & Prescott JF (1997). Strategies for the control of *Rhodococcus equi* infections on enzootic farms. AAEP Proc. 43:65-70