



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA

Allyne Isabela Teixeira Ribeiro

**Pleuropneumonia piogranulomatosa por *Nocardia asiatica* em um cão com cinomose:  
Relato de caso**

Cuiabá-MT  
Abril/2018

Allyne Isabela Teixeira Ribeiro

**Pleuropneumonia piogranulomatosa por *Nocardia asiatica* em um cão com cinomose:  
Relato de caso**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós-graduação de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito para obtenção do título de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária Preventiva.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Cuiabá-MT  
Abril/2018

Allyne Isabela Teixeira Ribeiro

**Pleuropneumonia piogranulomatosa por *Nocardia asiatica* em um cão com cinomose:  
Relato de caso**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Pós-graduação de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso, como requisito para obtenção do título de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária Preventiva

BANCA EXAMINADORA

Cuiabá, 06 de Abril de 2018.

---

Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Presidente da Banca – UFMT

---

Ms. Alessandra Tammy Hayakawa Ito de Sousa

Membro da Banca – UFMT

---

Ms. Stéfano Luís Cândido

Membro da Banca – UFMT

### **Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.**

R484p Ribeiro, Allyne Isabela Teixeira.  
Pleuropneumonia piogranulomatosa por Nocardia asiatica em um cão com  
cinomose: Relato de caso / Allyne Isabela Teixeira Ribeiro. -- 2018  
27 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.  
TCC (especialização em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Mato  
Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Residência Uniprofissional  
em Medicina Veterinária, Cuiabá, 2018.  
Inclui bibliografia.

1. hsp65. 2. co-infecção. 3. actinomicetos. 4. sequenciamento. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.**



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA UNIPROFISSIONAL EM MEDICINA VETERINÁRIA  
Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2367 - Boa Esperança - Cep: 78060900 - CUIABÁ/MT  
Tel : +55 65 3615 8627

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: "Pleuropneumonia piogranulomatosa por *Nocardia asiatica* em um cão coinfectado com o vírus da cinomose canina: Relato de caso".**

**AUTOR: Médica Veterinária Residente Allyne Isabela Teixeira Ribeiro**

**Monografia defendida e aprovada em 06/04/2018.**

### Composição da Banca Examinadora:

---

Presidente Banca / Orientador      Doutor  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

  
Daniel Moura de Aguiar

Examinador Interno      Mestre  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

  
Alessandra Tammy Hayakawa Ito de Sousa

Examinador Interno      Mestre  
Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

  
Stéfano Luís Cândido

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus primeiramente por tudo que conquistei até hoje. Por me dar força para correr atrás dos meus sonhos mesmo achando por muitas vezes não conseguiria. O senhor é o meu Pastor e nada me faltará!

Aos meus pais que me deram toda a base e suporte para chegar até aqui. Sem vocês não sou nada. A vocês meu amor e gratidão eterna. Aos meus irmãos, cunhado e sobrinhos que conseguem me alegrar mesmo nos momentos mais difíceis. Ricardo e Ana Júlia a tia ama vocês.

Ao meu namorado por me apoiar em todas as decisões e fazer enxergar que posso ser cada dia melhor e conseguir tudo que almejo.

Aos meus colegas de residência, pela parceria, trocas de conhecimentos e amizades nesses dois anos convivendo diariamente. Torço por cada um de vocês.

Ao meu orientador Prof. Daniel pelos ensinamentos e principalmente pela paciência nesses dois anos de residência. Te admiro muito.

E por fim, mas não menos importante, aos pacientes, aqueles que me motivam a estudar sempre mais e que com apenas uma lambida nos faz sentir aquela sensação de amor incondicional e de dever cumprido.

**Pleuropneumonia piogranulomatosa por *Nocardia asiatica* em um cão infectado pelo vírus da cinomose: Relato de caso**

**Piogranulomatous pleuropneumonia by *Nocardia asiatica* in a dog infected by canine distemper virus: Case report**

<sup>1</sup>Allyne Isabela Teixeira Ribeiro<sup>1</sup>; Mayara da Cruz Burema<sup>1</sup>; Pedro Eduardo Brandini Néspoli<sup>2</sup>; Vanessa Cristina de Melo Bruno<sup>1</sup>; Valéria Dutra<sup>2</sup>; Luciano Nakazato<sup>2</sup>; Ana Paula de Souza Borges<sup>1</sup>; Edson Moleta Colodel<sup>2</sup>; Fernando Henrique Furlan Gouvêa<sup>2</sup>; Aline Oliveira de Magalhães<sup>1</sup>; \*Daniel Moura de Aguiar<sup>2</sup>

**RESUMO**

Este relato descreve o primeiro caso de *N. asiatica* causando pleuropneumonia em um cão com cinomose no Brasil. O diagnóstico foi realizado através de PCR e sequenciamento do gene hsp65. Apesar das medidas terapêuticas, o paciente veio a óbito. Os principais achados macro e microscópicos na necropsia foram encontrados no pulmão e pleura.

**PALAVRAS-CHAVE:** hsp65; Co-infecção; Actinomicetos; Sequenciamento.

**ABSTRACT**

This report describes the first case of *N. asiatica* causing pleuropneumonia in a dog with distemper from Brazil. The diagnosis was made through PCR and sequencing of the hsp65 gene. Although the therapeutic measures, the patient died. The major macro and microscopic findings at necropsy were found in the lung and pleura.

**KEY-WORD:** hsp65; Co-infection; Actinomycetes; Sequencing.

---

<sup>1</sup> Residente do Programa Uniprofissional em Medicina Veterinária- Faculdade de Medicina Veterinária (FAVET), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2.367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. E-mail: [allyneribeiro@hotmail.com](mailto:allyneribeiro@hotmail.com); [mayaraburema.vet@gmail.com](mailto:mayaraburema.vet@gmail.com); [vanessabruno@hotmail.com](mailto:vanessabruno@hotmail.com); [aline\\_04oliveiram@hotmail.com](mailto:aline_04oliveiram@hotmail.com); [anaborgesmv@gmail.com](mailto:anaborgesmv@gmail.com).

<sup>2</sup> Docente Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Avenida Fernando Corrêa da Costa, 2.367, Bairro Boa Esperança, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. E-mail: [danmoura@ufmt.br](mailto:danmoura@ufmt.br) \*(autor para correspondência); [nespolipb@gmail.com](mailto:nespolipb@gmail.com); [valdutra@ufmt.br](mailto:valdutra@ufmt.br); [lucnaka@gmail.com](mailto:lucnaka@gmail.com); [moleta@gmail.com](mailto:moleta@gmail.com); [fhfurlan@gmail.com](mailto:fhfurlan@gmail.com)

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**

BID = A cada 12 horas

PCR = Reação em cadeia pela Polimerase

SID = A cada 24 horas

TID = A cada 8 horas

UI = Unidade Internacional

CHGM = Concentração de hemoglobina globular média

VGM = Volume globular médio

RNA = Ácido ribonucleico

CDV = Vírus da cinomose canina

EDTA = Ácidoetilenodiamino tetra-acético

PCR= Reação em cadeia da polimerase

nm = Nanômetro

ml = Mililitro

kg = Quilograma

µl = Microlitro

mm<sup>3</sup> = Milímetro cúbico

dl = Decilitro

mg = Miligrama

g = Grama

% = Por cento

°C = Grau Celsius



## SUMÁRIO

|   |            |
|---|------------|
| <b>INTRODUÇÃO .....</b>                 | <b>11</b>  |
| <b>RELATO DE CASO.....</b>              | <b>11</b>  |
| <b>DISCUSSÃO .....</b>                  | <b>17</b>  |
| <b>CONCLUSÃO.....</b>                   | <b>22</b>  |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b> | <b>220</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>                   | <b>26</b>  |

## **CONSIDERAÇÕES GERAIS**

Este presente artigo será submetido à revista *Brazilian Journal of Microbiology* como uma comunicação curta. Para artigos nesse formato, a revista orienta a não dividir o texto em tópicos. Devido a característica formal da apresentação de um trabalho de conclusão de Residência, optou-se por dividi-lo. Ao submeter à revista, serão colocados nas normas por ela publicada.

## INTRODUÇÃO

As bactérias denominadas nocardias, são actinomicetos, pertencentes a família *Nocardiaceae*<sup>1</sup>. Caracterizam-se como microrganismos saprófitos, telúricos<sup>2</sup>, encontrado em água doce, salgada e na vegetação em decomposição<sup>3-4</sup>. São aeróbias, Gram-positivas e catalase positiva. Foi descrita pela primeira vez pelo médico veterinário Edmond Nocard, no ano de 1988<sup>1</sup>. Atualmente, 92 espécies são reconhecidas, e dessas, 54 possuem importância clínica<sup>2</sup>. Apesar de possuir inúmeras espécies relatadas em literatura, sua classificação ainda é motivo de controvérsia, uma vez que os métodos de diagnóstico molecular vêm evoluindo gradativamente, e com frequência ocorrem alterações taxonômicas<sup>3</sup>. Apesar da divergência quanto à classificação, as principais espécies associadas aos cães e gatos são *Nocardia asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. otidiscavarium*, *N. transvalensis*, *N. nova*, *N. farcinica* e *N. africana*<sup>4</sup>.

As formas de infecção por esses agentes variam desde inoculação do microrganismo por traumas perfurocortantes a aerossóis em hospedeiros imunocompetentes, ocasionando de abscessos percutâneos até nas formas mais graves, com acometimento pulmonar e/ou neurológico<sup>3</sup>. Bactérias do gênero *Nocardia* possuem resistência à fagocitose, facilitando sua disseminação e manutenção no organismo<sup>5</sup>. Geralmente é associada à condição imunossupressora. Em humanos, é associada a pacientes imunocomprometidos, seja pelo uso de medicações imunossupressoras ou devido à infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida<sup>6-7</sup>. Já em cães é comumente relatado em pacientes coinfectados pelo vírus da cinomose canina<sup>5-8</sup>.

A cinomose canina é causada por um vírus (CDV), do gênero *Morbilivirus*, família Paramyxoviridae. É um vírus relativamente grande (150 a 200 nm), diâmetro variável, possuindo um filamento único de RNA<sup>9</sup>. É uma doença infectocontagiosa, acomete os epitélios, sistema nervoso e sistema imune de canídeos domésticos. Em cães os sinais clínicos podem iniciar com diarreia, hiperqueratose de coxins e plano nasal, evoluindo para secreção ocular e nasal à uma pneumonia e alterações neurológicas graves. O CDV se propaga através de gotas de aerossóis entrando em contato com o epitélio do trato respiratório superior. De 4 a 6 dias pós-infecção essas partículas virais replicam-se principalmente no sistema linfoide, aumentando a temperatura corporal do hospedeiro. Devido a destruição das células linfoides, ocorre leucopenia, causando extenso período de imunossupressão a qual pode permitir

infecções oportunistas e secundárias, agravando o quadro clínico do animal. Ainda não existe um tratamento antiviral específico, recomenda-se então o tratamento sintomático. O prognóstico é de reservado a desfavorável, e uma vez que iniciada a fase neurológica, a doença torna-se de difícil reversão<sup>10</sup>.

O aparecimento de lesões linfocutâneas, como formação de abscessos, nódulos e úlceras em cães, principalmente em região cervicofacial, são os primeiros sintomas clínicos da nocardiose e pode evoluir causando grave celulite e destruição do tecido afetado. Em casos mais avançados, migram através da via linfo-hemática e afetam órgãos parenquimatosos, como o pulmão. Menos comumente, pode haver propagação para o sistema nervoso central. Após alguns dias de bacteremia, os hospedeiros podem desenvolver sinais sistêmicos como, apatia, febre, hiporexia, dificuldade respiratória e secreção nasal purulenta<sup>5</sup>. Abscessos ou fistulas que não respondem ao tratamento convencional são os principais indícios da infecção durante a avaliação do paciente<sup>11</sup>.

O diagnóstico é baseado no histórico do paciente, achados de exame físico e exames complementares. Para diagnóstico laboratorial é necessário identificar a bactéria através de citologia pela coloração de Gram e Giemsa, e posterior cultura em Ágar Sabouraud dextrose, ágar sangue ou ágar chocolate, em condição de aerobiose a 37°C. Em casos de nocardiose pulmonar podem ser coletadas amostras através de aspiração do material purulento do abscesso e/ou do lavado traqueo-brônquico. Microscopicamente são agentes Gram-positivos, filamentosos, frisados e facilmente identificados, com 0,5 a 1 µm de diâmetro. O crescimento em semeadura ocorre entre 2 a 14 dias, mas aguardam-se pelo menos quatro semanas para favorecer crescimento de cepas fastidiosas<sup>11</sup>. Para diagnóstico relacionado à espécie, o padrão-ouro para sua identificação são os métodos moleculares, especificamente, o sequenciamento do gene 16S RNA<sup>12-13</sup>.

O tratamento para nocardiose constitui na escolha de antibióticos de amplo espectro aliados principalmente a testes de sensibilidade microbiana *in vitro*. Apesar da existência de inúmeros antibióticos, poucos ainda conseguem atingir concentrações terapêuticas suficientes no foco da lesão. Existem diversas variáveis que tornam o tratamento pouco eficaz, dentre elas, a escolha do fármaco sem o respaldo do antibiograma, refratariedade da bactéria a tratamentos convencionais, localização intracelular da mesma nos fagócitos e também à coinfeção com doenças depressoras<sup>5</sup>.

Devido a importância em saúde pública, decorrente dos relatos em humanos, e também em medicina veterinária, no presente artigo, é relatado infecção por *Nocardia* spp. em um canino jovem, com cinomose desenvolvendo um quadro de pleuropneumonia piogranulomatosa.

## RELATO DE CASO

Foi admitido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso Campus Cuiabá, setor de Moléstias Infecciosas, um canino, fêmea, sem raça definida, de aproximadamente 3 meses de idade, 8 quilos, com queixa de secreção óculo-nasal purulenta, tosse e hiporexia há aproximadamente 3 dias. A vacinação contra doenças virais e vermifugação estavam desatualizados. Ectoparasitos eram esporadicamente encontrados sobre o corpo e o mesmo possuía acesso à rua.

Ao exame físico encontrava-se apática, aspecto geral regular, pulso forte, febril (39,9 °C), desidratação de 6% e mucosas normocoradas. À palpação abdominal sentia leve incômodo. Durante a consulta o paciente exibiu tosse produtiva com secreção de aspecto esbranquiçado. Os olhos possuíam secreção purulenta discreta e blefarite bilateral. Havia secreção nasal purulenta discreta. Na ausculta pulmonar, observou-se crepitação no lado esquerdo do tórax.

Como exames complementares foram realizados: Teste imunocromatográfico para detecção de antígeno do CDV(Sens Pert Cinomose™ Vet All Laboratories, Korea), hemograma completo e radiografia torácica.

O teste imunocromatográfico, foi realizado por meio de swab da mucosa ocular, que resultou positivo. Amostra de sangue coletada em tubo com Ácidoetilenodiamino tetra-acético (EDTA) foi submetida a exame hematológico, onde foram observados os seguintes valores para hemácias: Eritrócitos  $3,81 \times 10^6/\mu\text{l}$  (referencia:  $5,5 \times 10^6/\mu\text{l}$  –  $8,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ ); Hemoglobina 8,50g/dl (12g/dl - 18g/dl); Hematócrito 25% (37% - 55%); VGM 65,6fl (60fl - 70fl) e CHGM 34g/dl (32 g/dl - 36g/dl). O leucograma apresentou relevante leucocitose  $43,8 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $6 \times 10^3/\mu\text{l}$  -  $17 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) por neutrofilia  $34,2 \times 10^3/\text{mm}^3$  ( $3,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ -  $11,5 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), além de linfopenia

$0,4 \times 10^3/\text{mm}^3$  ( $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$  -  $4,8 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e monocitose  $8,3 \times 10^3/\text{mm}^3$  ( $0,15 \times 10^3/\text{mm}^3$ - $1,35 \times 10^3/\text{mm}^3$ ). A contagem de plaquetas estava dentro da normalidade com valor de  $305 \times 10^3/\mu\text{l}$  ( $200 \times 10^3/\mu\text{l}$  -  $500 \times 10^3/\mu\text{l}$ )<sup>14</sup>. Na citologia havia presença de monócitos ativados, anisocitose moderada e policromasia discreta.

O exame radiográfico torácico apresentou imagens sugestivas de efusão pleural, com perda parcial de definição da silhueta cardíaca em posição ventro-dorsal, opacificação homogênea dos lobos pulmonares esquerdos com visualização de fissuras interlobares e retração de lobo pulmonar caudal esquerdo. O lobo pulmonar caudal direito apresentou moderado incremento de radiopacidade de padrão bronquial e alveolar (Figura 1).

Diante da apresentação clínica, foi prescrito antibioticoterapia baseada em Amoxicilina + Clavulanato de potássio (20 mg/kg, BID) associado a Acetilcisteína (5mg/kg, TID) para ação mucolítica e tapotagem a cada 4 horas. Concomitantemente, o paciente foi tratado para cinomose com neuroprotetores (Gaballon® (1/4 do comprimido, BID), Vitamina A (50.000 UI, SID) e imunoestimulante (Timomodulina, 5ml, SID).

Devido ao quadro clínico, o paciente foi internado e em seguida apresentou aumento do desconforto respiratório que culminou na realização de toracocentese. Foi drenado aproximadamente 20 ml de efusão de coloração rósea e o conteúdo foi encaminhado para análise citológica no Laboratório de Patologia Animal. Na citologia, o líquido pleural apresentava alta celularidade com predominância de neutrófilos íntegros e fragmentados, ocasionais mononucleares e células mesoteliais. O núcleo celular apresentava-se arredondado, levemente pontilhado, basofílico e por vezes observavam-se dois ou mais nucléolos. Havia também células multinucleadas e algumas figuras de mitose. O líquido drenado foi encaminhado para cultura no Laboratório de Microbiologia, semeado em Ágar Sangue ovino 8%, Ágar Macconkey e Ágar Sabouraud dextrose em aerobiose, incubadas a 37°C por 72 horas. A identificação foi realizada de acordo com Quinn et.al<sup>15</sup> para diferenciação de outros gêneros semelhantes como o *Streptomyces* e *Actinomyces*. Foram identificados na cultura, *Streptococcus* sp. e *Citrobacter* sp.

Ao longo da internação, o paciente apresentou piora do estado geral, desenvolvendo anorexia, êmese, diarreia, dispneia e quadros agudos de dor abdominal. Foi acrescido no protocolo terapêutico, Citrato de maropitant (0,1mg/kg, SID), Cloridrato de tramadol (3mg/kg, TID) e Aminofilina (6mg/kg, TID). Apesar dos procedimentos terapêuticos adotados, os

sinais clínicos pioraram, principalmente a dispnéia, permanecendo então sob oxigenioterapia, porém o paciente veio a óbito no quarto dia de internação.

Macroscopicamente, exames de necropsia demonstraram a presença de lesões na cavidade torácica, que possuía aproximadamente 60 ml de líquido turvo (Figura 2) e avermelhado com grumos coagulados e fibrina. Observou-se na região de mediastino, deposição de material amorfo, irregular, de consistência macia a firme, de cor vermelho escuro e espesso, medindo entre 1-2 cm (centímetros). Sobre o saco pericárdico, havia presença de conteúdo amorfo, amarelo, macio e grumoso. Em musculatura intercostal e pleura parietal havia petéquias e sufusões. O pulmão estava hipocreptante, de consistência firme, com bordos irregulares e aproximadamente 95% do parênquima pulmonar apresentava aspecto de hepatização. Havia nos lobos esquerdos, áreas nodulares ou em placas medindo entre 1,5 a 3,5 cm de diâmetro, de coloração amarelada e com conteúdo purulento (Figura 2). Ao corte do parênquima, material de conteúdo pastoso e amarelado fluía de todos os lobos pulmonares. No saco pericárdico, havia a presença de aproximadamente 15 ml de líquido avermelhado, porém translúcido. Em face abdominal do diafragma havia massa avermelhada, firme, de superfície irregular, opaca e fracamente aderida à serosa.

Microscopicamente, no pulmão havia acentuado infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos e ocasionalmente eosinófilos. Quantidade leve a moderada de linfócitos, plasmócitos e ocasionais células multinucleadas, além de deposição de fibrina. Ainda se observou no pulmão fibrose e necrose caseosa multifocal, associada à congestão e hemorragia. A massa mediastinal localizada na base do coração e superfície pleural continha proliferação celular, com múltiplos nódulos compostos por células polimorfonucleadas e macrófagos espumosos, circundados por células epitelióides e ocasionais células multinucleadas (células gigantes). Essa infiltração estava frequentemente envolta por proliferação de tecido conjuntivo. Nas áreas com infiltrado inflamatório, ocasionalmente, à técnica de Gram Histológica, foram evidenciadas estruturas bacilares basofílicas Gram-positivas, frequentemente filamentosas e ramificadas (Figura 3), no citoplasma de macrófagos. Sob ação da coloração de Ziehl-Neelsen (Figura 3), essas bactérias apresentavam-se parcialmente Álcool-Acido-Resistentes. Do ponto de vista de patologia, concluiu-se um quadro de Pleuropneumonia Piogranulomatosa aguda a subaguda, acentuada e difusa.

Devido características microscópicas encontradas nas amostras obtidas da necropsia, optou-se por realização de PCR para diagnóstico diferencial de *Nocardia*. Material obtido dos nódulos pulmonares foram submetidos a extração de DNA genômico pelo método de fenol e clorofórmio de acordo com Sambrook e Russel<sup>16</sup>, o qual fora processado para amplificar parcialmente o gene da proteína *heat shock* de aproximadamente 65 kDa (*hsp65 heat shock protein*) de *Nocardia* spp. bem como de outros actinomicetos conforme adotado por Hoza, et al<sup>17</sup>. A reação em cadeia pela polimerase resultou na produção de um fragmento de 405 pares de base que foi purificado por meio do Kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Health care Bio-Sciences, UK) e posteriormente submetido a reação de sequenciamento utilizando o Kit Big Dye (Applied Biosystems/Perkin Elmer, USA) em sequenciador automático *ABI PRISM-310 Genetic Analyzer* de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems/Perkin, Elmer, USA). As sequências obtidas foram editadas no software BioEdit (Ibis Biosciences, Carlsband, CA) e posteriormente analisada através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) a fim de verificar a identidade com demais sequências correspondentes disponíveis no GenBank. O produto gerado pela PCR apresentou-se 100% similar a *N. asiatica* (JN041720.1, JQ782424.1, AY903631.1).

A sequência gerada na PCR foi alinhada pelo programa MUSCLE, utilizando o software SDT (Sequence Demarcation Tool) - versão 1.220<sup>18</sup>, com 8 sequências de diferentes isolados de *Nocardia* spp. de várias partes do mundo, disponíveis no Genbank: *N. asiatica* (JQ782424, JN041720, AY903631), *N. beijingensis* (KF420485), *N. pneumoniae* (AY903636), *N. araoensis* (AY903637) e *N. abscessus* (AY544983). Foram alinhados 405 caracteres. A matriz de identidade entre as diferentes sequências foi construída considerando 1-(M / N), onde "M" é o número de descasamentos e "N" é o número de posições no alinhamento. A árvore filogenética para o isolado foi inferida pelo método de Máxima Verossimilhança usando o software PhyML com o modelo substituto Jukes-Cantor. Os valores observados representam a porcentagem de 500 bootstrap de reamostragem. A sequência homologa do gene HSP de *Mycobacterium fortuitum* (KF432769) foi incluída como grupo externo (outgroup) na árvore filogenética (Figura 4). A sequência do gene *hsp65* gerada no presente relato foi depositada no GenBank sob o número de acesso "Submission ID is 2119316"



## DISCUSSÃO

Relata-se no presente estudo um caso de pleuropneumonia piogranulomatosa associada à *N. asiatica* no Brasil. Por ser uma bactéria de comportamento oportunista, encontra nos hospedeiros imunocomprometidos, uma condição ideal para sua instalação. Neste caso, a coinfeção pela cinomose causou um grave comprometimento imunológico facilitando a infecção por *Nocardia* spp. Os relatos deste tipo são cada vez mais frequentes<sup>9</sup>. Em um estudo realizado por Ribeiro et al.<sup>19</sup>, foi avaliada características clínico-epidemiológicas de 9 cães com nocardiose localizada ou disseminada. A maioria deles não possuíam vacina. Cinco dos cães estudados (55,5%) eram coinfectados com vírus da cinomose, ressaltando a importância da imunossupressão com o estabelecimento e a patogenia da doença.

Pela análise da árvore filogenética, a sequência do isolado obtido de nódulos pulmonares, foi incluída em clado composto por outros isolados de *N. asiatica*. As espécies mais acometidas em humanos são a *N. asteroides* e *N. brasiliensis*<sup>3</sup>. Foram isoladas cepas de *Nocardia* de pacientes humanos com infecções pulmonares e disseminadas, e em 79% dos pacientes foram identificadas *N. asteroides*, *N. brasiliensis* e *N. otidiscavarium*, além de uma espécie não caracterizada<sup>6</sup>. Em contra partida, em animais domésticos além de ambas, a *N. otidiscavarium* tem se destacado e sido relatada com certa frequência<sup>4-9-20</sup>.

O primeiro caso de *N. asiatica* relatado em humanos foi em 2004, onde isolaram 5 cepas de pacientes com nocardiose e concluíram que essas amostras faziam parte de uma mesma espécie<sup>21</sup>. Há na literatura estudos pontuais relacionados a *N. asiatica*, causando abscesso cerebral<sup>22-23</sup>, pulmonar<sup>24</sup> e nódulos em mediastino<sup>25</sup>. Todos os casos envolvem imunossupressão por alguma doença de base<sup>22-23-24-25</sup>. Na medicina veterinária ainda não possui registros na literatura dessa espécie em animais de companhia.

Não foi estabelecido com precisão qual a forma de infecção pela *Nocardia* sp., no paciente relatado, pois o mesmo não possuía lesões dermatológicas ou histórico de traumas por brigas ou objetos perfuro cortantes. A única informação relatada pelos proprietários, é que tinha acesso à rua, podendo então, a inalação de aerossóis em ambientes secos serem a porta de entrada do agente, cursando com sua replicação e disseminação.

No exame hematológico, a principal alteração observada foi uma marcante leucocitose por neutrofilia além de leve anemia microcítica normocrômica. O leucograma de pacientes com pneumonia bacteriana associada, geralmente, é inflamatório, caracterizado por neutrofilia com ou sem desvio a esquerda<sup>26</sup>.

A principal manifestação da nocardiose em humanos é a pulmonar. Em animais de companhia, a principal é a linfocutânea, com formação de abscessos, nódulos, úlceras e linfadenopatia em região cervicofacial e inguinal, e com menos frequência a pulmonar<sup>8-9</sup>. O paciente estudado não possuía lesões cutâneas supracitadas. Os sinais clínicos observados no mesmo são inespecíficos, podendo ser característico tanto da nocardiose quanto da cinomose<sup>16</sup>. Dentre as principais sintomatologias, as mais similares incluem anorexia, perda de peso, tosse, dispneia, secreção óculo nasal, diarreia e febre.

A efusão pleural torna a avaliação pulmonar dificultosa, uma vez que pode ocultar informações importantes como a presença de massas tanto na superfície pulmonar quanto em mediastino<sup>27</sup>. Nesse caso, as características observadas nas imagens radiológicas foram de extrema importância para direcionar a conduta médica, bem como estimar um prognóstico do caso. O derrame pleural é um achado inespecífico, que pode ser resultado de vários processos patológicos<sup>27</sup>, dentre eles uma grave pneumonia<sup>28</sup>. As características do líquido drenado da cavidade torácica neste presente relato concomitante com cultura positiva (*Citrobacter* spp., e *Streptococcus* spp) são indicativos de exsudato séptico<sup>27-29</sup>. Pela predominância de neutrófilos no derrame, e pelos indicativos morfológicos observados, como resultado citológico, tem-se reação inflamatória aguda, provavelmente causada pelas bactérias encontradas na cultura e replicação pulmonar da *Nocardia*. A definição e classificação do líquido pleural é de extrema importância, para diagnósticos diferenciais e tratamentos adequados<sup>27-29</sup>. O isolamento de *Nocardia* não foi atingido no cultivo bacteriano. Deve-se considerar que o crescimento dessa bactéria pode ocorrer em até 4 semanas, no presente estudo foi semeado apenas por 72 horas o que não permitiu seu crescimento, que é mais lento que as demais<sup>11</sup>.

A cinomose também cursa com disseminação viral no trato respiratório, causando desde uma leve bronquite até uma broncopneumonia. Na nocardiose pulmonar os sinais clínicos mais observados são os mesmos encontrados no relato, alguns ainda podem desenvolver hemoptise<sup>5-9-22</sup>. A disseminação da doença ocorre devido à capacidade das lesões desenvolverem-se nos espaços alveolares, e com certa frequência erodirem em vasos

sanguíneos<sup>9</sup>. Menos comumente, pode ocorrer disseminação para pulmão<sup>9-30</sup>, cérebro<sup>9-5-31</sup>, ossos<sup>6-32</sup> e não raramente pode comprometer estruturas que contenham íntima aproximação com o tórax, como a pleura, mediastino e o pericárdio<sup>9</sup>.

O tratamento para nocardiose apresenta eficácia de moderada a baixa<sup>4</sup> devido vários fatores, dentre eles: formação de piogranulomas, dificultando a penetração dos antibióticos; a localização intracelular das mesmas, não permitindo uma boa atuação dos mecanismos de defesa do organismo do hospedeiro; e principalmente a coinfeção com doenças imunossupressoras. O tratamento é prolongado, variando de 1 a 6 meses e inclui antibióticos de amplo espectro<sup>9</sup>. O antimicrobiano adotado para o canino relatado foi a Amoxicilina associado ao Clavulanato de potássio, que pode ser usado como monoterapia, ou em associação a outros fármacos<sup>4</sup>. Em um estudo de 10 cães com nocardiose e cinomose, foi avaliada a sensibilidade microbiana de cepas de *Nocardia* em lesões cutâneas e os antibióticos mais sensíveis foram o Ceftiofur (100%) e Amicacina (88,9%). Em contraste a Amoxicilina e Clavulanato de potássio apresentou somente 14% de sensibilidade. Apenas um cão sobreviveu<sup>8</sup>. Em outro estudo<sup>19</sup> foi relatado 28 casos de nocardiose, sendo 28 bovinos e 9 caninos e foi testada a sensibilidade de vários antibióticos, resultando em maiores índices de sensibilidade para Sulfametoxazol + Trimetropim (92,8%), Amicacina (92,8%) e Gentamicina (85,8%). A Amoxicilina + Clavulanato de potássio apresentou sensibilidade mediana (60,7%). Dentre esses nove caninos relatados, cinco eram coinfectados com o vírus da cinomose canina, e apenas um sobreviveu também. Apesar do tratamento instituído, o cão deste presente relatado veio a óbito abruptamente, o que vêm de encontro com resultados dos estudos citados e reforçam a baixa eficácia do tratamento, bem como o prognóstico reservado, principalmente em cães que possuem doenças imunossupressoras.

Foram observados no paciente, nódulos em pulmão e face abdominal do diafragma, com tamanhos variando de 1,5 a 2cm. Esses nódulos por vezes eram múltiplos, como no pulmão, ou isolados, como em diafragma. Os nódulos pulmonares, ao corte continham em seu interior conteúdo purulento. Nossos resultados vão de encontro com os relatados na literatura. Os principais achados macroscópicos na necropsia são os abscessos e nódulos tanto em pele quanto em órgãos torácicos e abdominais<sup>4-9</sup>. Nas lesões macroscópicas de órgãos internos, se encontrados, os nódulos podem ser de tamanhos variados, podendo estar isolados ou coalescentes, elevados e de coloração branca a branca-acizentada<sup>9</sup>. No pulmão pode haver congestão<sup>4-9</sup>, pneumonia, consolidação pulmonar, necrose, além de nódulos eliminando material caseoso-purulento<sup>4</sup>. O pulmão apresentava-se com aspecto hepatizado, com

aproximadamente 95% do seu parênquima consolidado e com intenso conteúdo purulento fluindo de todos os lobos. Outras lesões também frequentemente encontradas são: linfadenopatia, com linfonodos maciços, firmes ou flutuantes com presença de líquido caseoso a purulento em seu interior; e exsudatos castanho-avermelhados, no espaço pleural e/ou peritoneal e também dentro de abscessos<sup>9</sup>. Neste relato havia também presença de exsudato avermelhado em cavidade torácica e saco pericárdico.

No pulmão, continha acentuado infiltrado inflamatório, com presença de necrose caseosa, composto predominantemente por macrófagos. Havia também infiltrado inflamatório na massa mediastinal e na superfície pleural, compostos por células polimorfonucleadas e macrófagos, circundadas por células epitelioides e ocasionais células gigantes. Esses infiltrados eram envoltos por proliferação de tecido conjuntivo. Histologicamente, as áreas acometidas, caracterizam-se por piogranulomas, com inflamação supurativa e necrose tecidual localizada no centro da lesão. Essas áreas podem ser circundadas de células epitelioides, neutrófilos, macrófagos, e em menos frequência, linfócitos, plasmócitos e células gigantes, envoltos por cápsula fibrosa. Raramente pode conter colônias de microorganismos, denominados grânulos de enxofre<sup>4-9</sup>.

Os principais achados microscópicos no relato, foram encontrados no pulmão, onde amostras foram preparadas com coloração de Gram, identificando estruturas bacilares, gram-positivas, frequentemente filamentosas e ramificadas. Essas bactérias na técnica de Ziehl-Neelsen apresentavam-se parcialmente Álcool-ácido-resistentes. As características encontradas no exame citológico solidificam estar diante de uma infecção do gênero *Nocardia*. Amostras coletadas através de citologia aspirativa com agulha fina de lesões em pele e linfonodos podem ser coradas pelos métodos de Gram, Giemsa e Panótico, para caracterizar morfológicamente microrganismos de *Nocardia* a nível de gênero<sup>4-1</sup>. O exame citológico revela estruturas Gram-positivas, filamentosas ou ramificadas, podendo estar isolados ou agrupados, circundados por grande quantidade de fagócitos. Podem ser submetidos também a colorações mais específicas, como as Kinyoun ou Ziehl-Neelsen modificadas, onde aparecem microrganismos parcialmente álcool-acido-resistentes, devido presença de ácido micólico em sua parede<sup>1-4-9</sup>.

Os métodos de identificação de espécies baseados em análises fenotípicas não garantem uma identificação precisa. Outros gêneros como *Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Gordonia*, possuem características bioquímicas semelhantes<sup>1</sup>, limitando o seu uso, além de

que a interpretação desses resultados requer um período de incubação prolongado e conhecimentos específicos<sup>11</sup>. Recentemente os métodos mais fidedignos para classificação ao nível de espécie são os métodos moleculares, como a avaliação do fragmento genômico conservado 16S rna por PCR e RFLP (Análise de restrição de fragmentos polimórficos), sequenciamento molecular e análise filogenética<sup>4-9</sup>. Com o avanço de estudos moleculares, foi possível a reclassificação e a introdução de novas espécies de *Nocardia*. Esses estudos são de extrema importância, e vem tornando-se cada vez mais útil na identificação de novas espécies<sup>11</sup>.

A PCR aliada ao sequenciamento de genes foi um dos primeiros métodos moleculares para caracterizar e identificar espécies pertencentes ao gênero *Nocardia*<sup>1</sup>. Atualmente para esse tipo de identificação são utilizados o sequenciamento de dois genes, o *16S RNA* e o *hsp65*<sup>3-33</sup>. Foi realizado um estudo onde testaram a eficácia do *16S RNA* com um total de 28 cepas de referências e 71 isolados que incluíam membros do gênero *Streptomyces*, *Tsukamurella*, *Gordonia* e *Nocardia*. Foi comprovado que o sequenciamento desse gene é eficaz, mas que também é limitado, pois existe um grau elevado de divergência de sequência dentro da própria espécie, resultando então, em vários microrganismos identificados, mas sem taxonomia<sup>34</sup>. Vários estudos compararam a utilização do sequenciamento dos dois genes, onde foi comprovada a superioridade do *hsp65* em relação ao 16S RNA na identificação de espécies de *Nocardia*, uma vez que ele é três a quatro vezes mais discriminatório que a *16S RNA*. No entanto, essas sequências obtidas pelo *hsp65*, não estão amplamente disponíveis em bancos de dados públicos para comparação, limitando o seu uso<sup>34-35</sup>. Rodríguez-Nava, et al (2006)<sup>33</sup>, recomendam que ambos sejam utilizados em conjunto, formando uma nova base para identificação de espécies, principalmente para aquelas que possuem sequências de 16S RNA semelhantes. O sequenciamento é uma alternativa útil para identificação de isolados bacterianos que crescem lentamente, mas devido altos custos de implantação, a sua utilização ainda é limitada<sup>34</sup>. No caso relatado, foi utilizado o *hsp65*, pois os resultados anatomopatológicos, principalmente os relacionados à morfologia, os microrganismos encontrados, possuem não só características patognômicas de *Nocardia*, mas também de outros agentes semelhantes. Portanto, para um diagnóstico mais preciso e confiável, foi utilizado o sequenciamento desse gene.

## CONCLUSÃO

Conclui-se que este é o primeiro relato de pleuropneumonia causada por *N. asiatica* em um cão. Observou-se que a coinfeção com doença imunossupressora, como a cinomose, leva o animal a um quadro clínico de difícil reversão, como foi o do paciente relatado.

Esses estudos são de extrema importância pois a nocardiose ainda é subestimada em animais de companhia, seja pela sintomatologia inespecífica ou pela falta de acesso a laboratórios que realizem diagnósticos morfológicos e moleculares. O emprego de técnicas moleculares agiliza o diagnóstico, além de ser o padrão-ouro por ser altamente sensível e específico. Com o avanço de doenças imunossupressoras, como a cinomose, a suspeita, torna-se imprescindível, pelo comportamento oportunista que a bactéria possui. O íntimo contato com animais de companhia é ainda motivo de estudo em relação aos mesmos serem ou não fonte de contaminação, uma vez que esses microrganismos são ubíquos e é onde os animais permanecem a maior parte do tempo. A constante evolução da biologia molecular é útil não só para classificação taxonômica da *Nocardia*, mas também para avaliação de patogenicidade, virulência, padrões de susceptibilidade a antibióticos e epidemiologia, colaborando assim, com diagnósticos e tratamento precoces, resultando em prognóstico favorável para os hospedeiros acometidos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fatahi-Bafghi M. **Nocardiosis from 1888 to 2017**. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 369-384.
2. Corti M.E, Fioti M.F.V. **Nocardiosis: a review**. *Int. J. Infect. Dis.* 2003; 243-50.
3. Brown-Elliott B.A, Brown J.M, Conville P.S, Wallace R.J. **Clinical and laboratory features of the *Nocardia spp.* based on current molecular taxonomy**. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 259-282.
4. Jericó M.M, Neto J.P.A, Kogika M.M. **Nocardiose e Actinomicose**. *Tratado de Medicina Interna de cães e gatos*. 2014. Volume 1. 895.

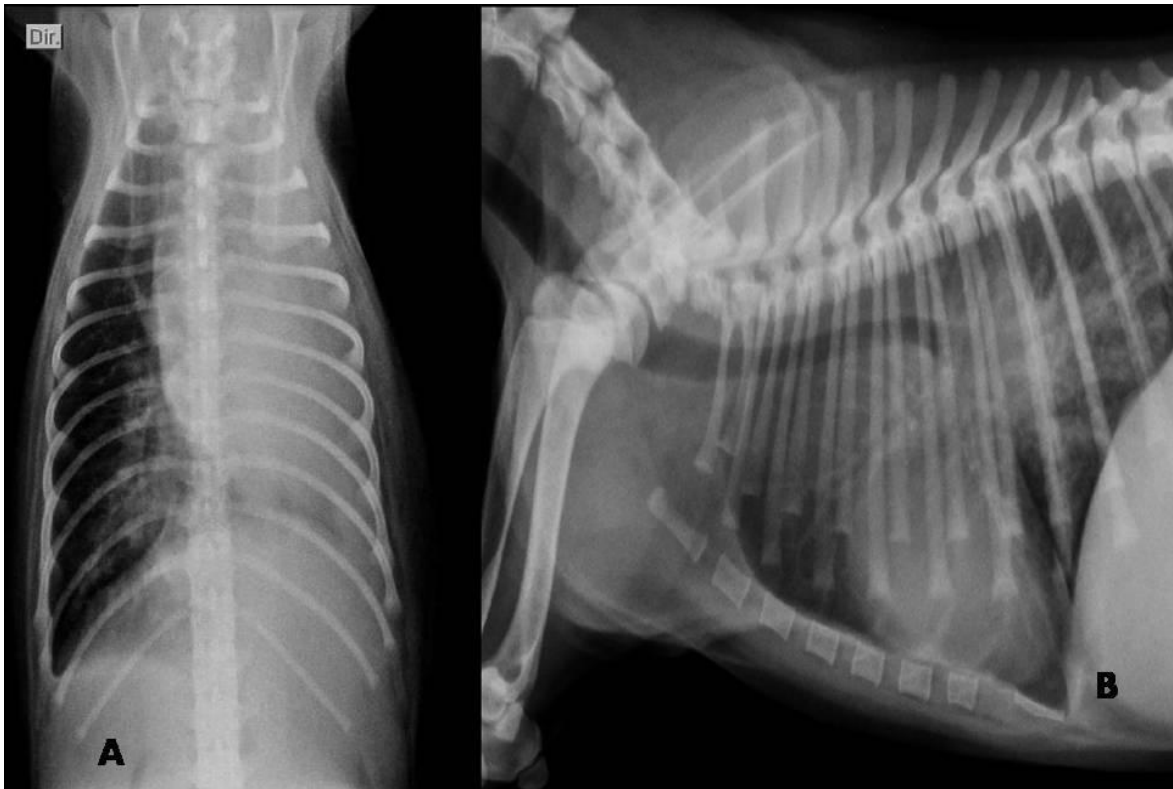
5. Ribeiro, M.G; Condas, L.A.Z. **Enfermidades pelo gênero *Nocardia*. Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** 2016; 1ed. 199-211.
6. Wang H.K, Sheng W.H, Hung, C.C, et al. **Clinical characteristics, microbiology, and outcomes for patients with lung and disseminated nocardiosis in a tertiary hospital.** *J. Formos. Med. Assoc.* 2013; 742-749.
7. Liu W.L, Lai C.C, Hsiao C.H, et al. **Bacteremic pneumonia caused by *Nocardia veterana* in an HIV-infected patient.** *Int J Infect Dis.* 2011; 430–432.
8. Ribeiro. M.G, Aguiar D.M, Paes A.C, et al., **Nocardiose cutânea associada à cinomose em cães. Relato de dez casos.** *Clin Vet.* 2002; 34-42.
9. Greene C.E. **Actinomicose e Nocardiose.** *Doenças infecciosas em cães e gatos.* 2015; 4 ed. 1057-1067.
10. Mangia, S.H; Paes, A.C. **Cinomose.** *Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.* 2016; 1ed. 560-579.
11. Conville P.S, Brown- Elliot B.A, Smith T, Zelazny A.M. **The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification.** *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56: e01419-17.
12. Brown-Elliott B.A, Conville P, Wallace R.J. **Current status of *Nocardia* taxonomy and recommended identification methods.** *Clin. Microbiol. Newsl.* 2015; 25-32.
13. Saubolle M.A, Susslan D. **Nocardiosis: Review of clinical and laboratory experience.** *J. Clin. Microbiol.* 2003; 4497- 4501.
14. Feldman, B.V, Zinkl, J.G, Jain, N.C, Schalm, O.W. **Schalm's Veterinary hematology.** .2000; 5 ed. 787.
15. Quinn, P.J, Carter M.E, Markey, B. **Clinical veterinary microbiology.** 1994; *London: Wolfe.* 237-242.
16. Sambrook J, Russel D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2004. 3 ed. p. 6.5-6.6.
17. Hoza A.S, Mfinanga, S.G.S, Moser I, et al. **Isolation, biochemical and molecular identification of *Nocardia* species among TB suspects in northeastern, Tanzania; a forgotten or neglected threat?** *BMC Infec. Dis.* 2017; 17: 407.
18. Muhire B.M, Varsani A, Martin D.P. **A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation.** *PLoS ONE* 9. 2014; e108277.
19. Ribeiro M.G, Salerno T, Mattos-Guaraldi A.L., et al. **Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs.** *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 2008; 177-185.

20. Beaman B.L, Beaman L. ***Nocardia* Species: host-parasite relationships.** *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994. 7: 213-264.
21. Kageyama A, Poonwan K, Yazawa Y, et al. ***Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan, and clinical specimens from Thailand.** *J. Syst. Evol. Microbiol.* 2004;. 54:125-130.
22. Jeong J.H, Moon S.M, Park P.W, et al. **Multiple brain abscesses caused by *Nocardia asiatica* in a patient with systemic lupus erythematosus: The first case report and literature review.** *Ann. Lab. Med.* 2017; 459-461.
23. Uneda A, Suzuki K, Okubo S, et al. **Brain abscess caused by *Nocardia asiatica*.** *Surg. Neurol. Int.* 2016; 70-74.
24. Okawa S, Sonobe K, Nakamura Y, et al. **Pulmonary nocardiosis due to *Nocardia asiatica* in an immunocompetent host.** *J. Nippon Med. Sch.* 2015; 159-162.
25. El-Herte, R.I, Kanj S.S, Araj G.F, et al. **First report of *Nocardia asiatica* presenting as an anterior mediastinal mass in a patient with myasthenia gravis: a case report and review of the literature.** *Case Rep Infect Dis.* 2012; 325- 1-4.
26. Dear J.D. **Bacterial pneumonia in Dogs and Cats.** *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2014; 143- 159.
27. Dempsey S.M, Ewing P.J. **A review of the pathophysiology, classification, and analysis of canine and feline cavity effusions.** *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 201; 47:1–11.
28. Thrall D.E. **O espaço pleural.** *Diagnóstico de radiologia veterinária.* 2010; 5<sup>a</sup> ed. 555-559.
29. Alleman A.R. **Abdominal, thoracic, and pericardial effusions.** *Vet. Clin. Small Anim.* 2003. 89-118.
30. Baldi B.G, Santana A.N.C, Takagaki T.Y. **Nocardiose pulmonar e cutânea em paciente usuário de corticosteróide.** *J. Bras.Pneumol.* 2006; 592-595.
31. Jeffery N.D. **Brain abscess in a dog immunosuppressed using cyclosporine.** *Vet. J.* 2007; 675-678.
32. Hilligas J, Van Wie E, Russell K.E. **Vertebral osteomyelitis and multiple cutaneous lesions in a dog caused by *Nocardia pseudobrasiliensis*.** *J. Vet. Intern. Med.* 2014; 1621-1625.
33. Rodriguez-Nava V, Couble A, Devulder G, et al. **Use of PCR-Restriction enzyme pattern analysis and sequencing database for hsp65 Gene-Based identification of *Nocardia* Species.** *J. Med.Microbiol.* 2006; 536-546.



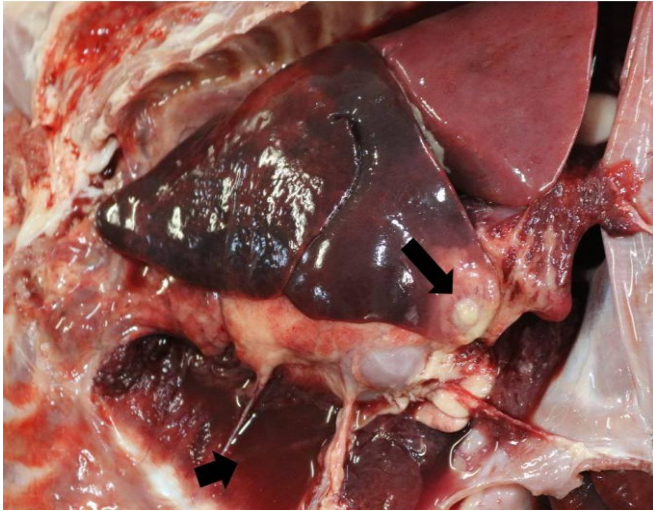
34. Patel J.B, Wallace JrR.J, Brown-Elliot B.A, et al. **Sequence-based identification of aerobic *Actinomycetes***. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 2530- 2540.
35. Rudramurthy S.M, Honnavar P, Kaur H, et al. **Molecular identification of clinical of *Nocardia* isolates from India**. *J. Med. Microbiol.* 2015; 1216-1225.

## APÊNDICE

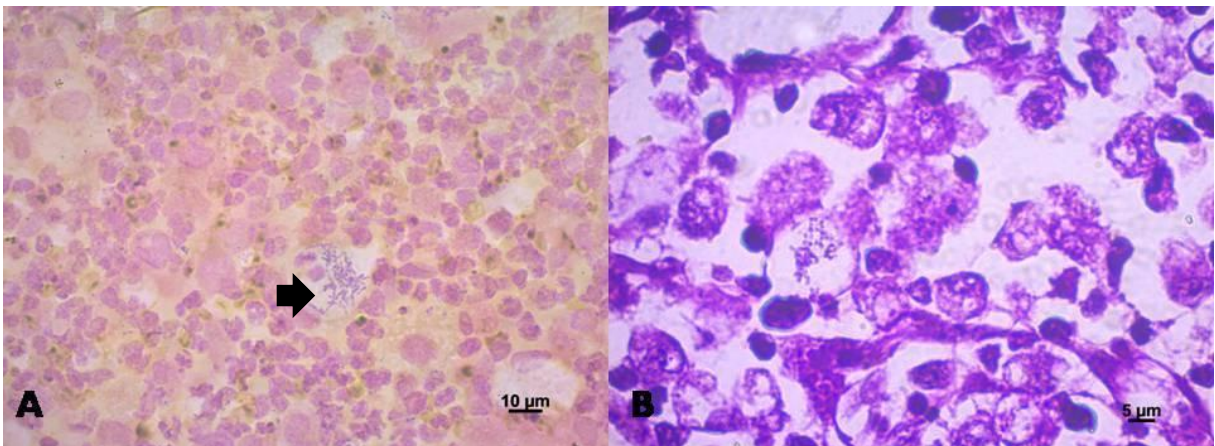


**Figura 1:** A- Radiografia Posição Ventro-Dorsal. Imagem compatível com Efusão Pleural. Observa-se em lobo pulmonar caudal direito moderado incremento de radiopacidade de padrão bronquial.

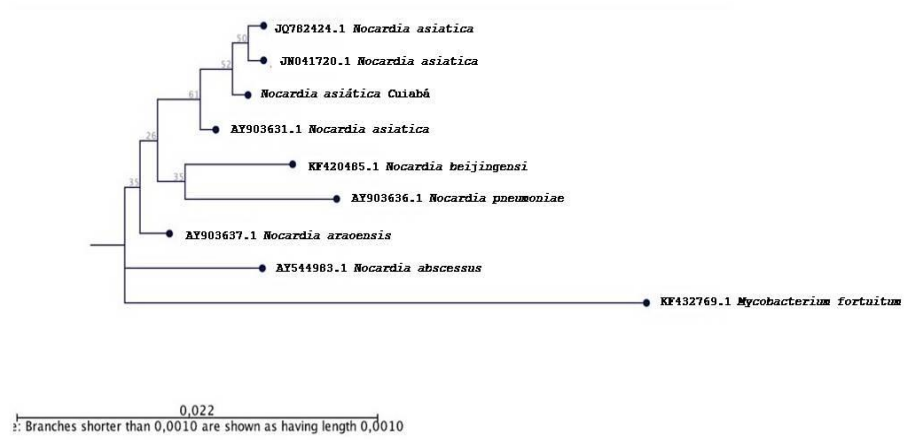
B- Radiografia em posição Latero-Lateral. Lobo pulmonar caudal direito apresentando moderado incremento de radiopacidade de padrão alveolar.



**Figura 2:** Seta menor- Líquido turvo e avermelhado na cavidade torácica  
Seta maior- Nódulo em pulmão



**Figura 3:** A- Estruturas bacilares basofílicas Gram-positivas, filamentosas e ramificadas (seta).  
B- Microorganismos parcialmente álcool-ácido-resistentes à técnica de Ziehl-Neelsen.



**Figura 4:** Árvore filogenética construída a partir de alinhamento de múltiplas seqüências do gene hsp 65. Foi montada utilizando o método da Máxima Verossimilhança usando o software PhyML. Seqüência de *Mycobacterium fortuitum* foi incluído como *outgroup*.