

Caracterização patológica e imuno-histoquímica das lesões de actinobacilose em bovinos¹

Daniele Andreazza², Angelica T.B. Wouters^{2*}, Tatiane T.N. Watanabe², Fabiana M. Boabaid², Flademir Wouters², Felipe S. Souza², Suyene O. Souza² e David Driemeier²

ABSTRACT.- Andreazza D, Wouters A.T.B., Watanabe T.T.N., Boabaid F.M., Wouters F., Souza F.S., Souza S.O. & Driemeier D. 2013. **[Pathological and immunohistochemical characterization of actinobacillosis lesions in cattle.]** Caracterização patológica e imuno-histoquímica das lesões de actinobacilose em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(3):305-309. Setor de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: angelicawouters@yahoo.com.br

Actinobacillosis is a not contagious infectious disease, usually chronic, and characterized by pyogranulomatous inflammatory reaction that occurs in cattle and is less common in sheep, pig, and horse. Soft tissues of head, mouth, and regional lymph nodes are affected. In this retrospective study, lesions suggestive of Actinobacillosis from 18 cases of anatomopathologic bovine samples were retrieved from the archives of *Setor de Patologia Veterinária* of *Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, from January 1997 to May 2011. The lesions were classified histologically, evaluated by histochemistry, and immunohistochemistry (IHC) in order to standardize inflammatory infiltration. The most frequent histological findings were typical pyogranulomas of actinobacillosis contained radiating eosinophilic clubs surrounded by neutrophils, macrophages, lymphocytes and abundant fibrous connective tissue. Gram-negative coccobacillus bacteria were shown in all lesions by Gram stain. Abundant macrophages were immunopositive for CD68, especially epithelioid cells and multinucleated giant cells. In addition, a positive immunostaining for CD3 (T lymphocyte) was observed in proportion of 1:3 in lymphocyte inflammatory infiltration, while IHC for CD79 α cy (B lymphocytes) was obtained in proportion of 2:3. These results indicated that B lymphocytes are the majority of lymphocyte in the inflammatory area.

INDEX TERMS: *Actinobacillus lignieresii*, actinobacillosis, diseases of cattle, immunohistochemistry.

RESUMO.- Actinobacilose é uma doença infecciosa, não contagiosa, geralmente crônica, caracterizada por reação inflamatória piogranulomatosa que ocorre em bovinos e, menos comumente, em ovinos, suínos e equinos. Tecidos moles de cabeça, pescoço e linfonodos regionais são afetados. Neste estudo foram compilados e avaliados 18 casos de bovinos dos livros de registro de janeiro de 1997 a maio de 2011 com diagnóstico de actinobacilose. As lesões foram caracterizadas histologicamente, avaliadas por técnicas de histoquímica e imuno-histoquímica. No exame histológico foram evidenciados piogranulomas típicos de actinobacilose contendo

clavas eosinofílicas radiadas, circundadas por neutrófilos, macrófagos, linfócitos e abundante tecido conjuntivo fibroso. Todas as lesões apresentaram cocobacilos Gram negativos na coloração de Gram histológico. Abundantes macrófagos tiveram marcação positiva para CD68, especialmente células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Foi observada marcação positiva para CD3 (Linfócitos T) em cerca de 1:3 das células do infiltrado inflamatório linfocitário, e marcação positiva para CD79 α cy (Linfócitos B) em 2:3 dos linfócitos, indicando que estes correspondem à maioria dos linfócitos nas áreas inflamatórias das lesões de actinobacilose.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Actinobacillus lignieresii*, actinobacilose, doença de bovinos, imuno-histoquímica.

INTRODUÇÃO

A actinobacilose é uma doença infecciosa, não contagiosa, geralmente crônica, caracterizada por inflamação piogran-

¹ Recebido em 23 de outubro de 2012.

Aceito para publicação em 16 de janeiro de 2013.

² Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. *Autor para correspondência: angelicawouters@yahoo.com.br

nulomatosa. Acomete bovinos e, com menor frequência, ovinos, suínos e equinos (Coetzer & Tustin 2004, Radostits et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007).

É causada por *Actinobacillus lignieresii*, cocobacilo Gram-negativo, comensal do trato digestório dos bovinos. Alimentos fibrosos ou grosseiros, que induzem lesões traumáticas na cavidade oral, facilitam a instalação do microrganismo e seu acesso a linfonodos regionais e/ou outros órgãos, via hematogênica ou linfática (Riet-Correa et al. 2007).

A doença tem distribuição mundial, mas geralmente é de ocorrência esporádica (Bazargani & Tafti 2010). No entanto, no Rio Grande do Sul tem sido descritos surtos de actinobacilose em bezerras e novilhos pastoreando em restingas de arroz ou soja com forragem grosseira, como talos que permanecem após a colheita de grãos e que podem induzir lesões por trauma na mucosa oral (Mondadori et al. 1994). Um surto de actinobacilose foi associado a pastoreio de bovinos em pastagens compostas predominantemente por anoni, gramínea grosseira acidentalmente introduzida no Rio Grande do Sul, com cerca de 15% de 800 bovinos de corte clinicamente afetados (Loss et al. 2006) e outro surto, com doença em 90% de 200 bovinos, é também descrito (Albuquerque et al. 1983).

A transmissão é favorecida quando há animais com descargas infectantes que contaminam alimentos, cochos e bebedouros (Coetzer & Tustin 2004, Radostits et al. 2007, Riet-Correa et al. 2007, Peli et al. 2009).

Em bovinos as lesões localizam-se preferencialmente em língua e linfonodos de cabeça e pescoço, principalmente nos linfonodos retrofaríngeos, parotídeos, sublinguais e mandibulares e, menos comumente, em outros tecidos, como proventrículos, pulmões, útero e pele (Coetzer & Tustin 2004). A língua pode ser afetada parcial ou totalmente (Riet-Correa et al. 2007). A sua palpação pode evidenciar aumento de volume e rigidez, daí o nome popular da actinobacilose de "língua de pau"; particularmente na base da língua, e sua manipulação provoca dor e repulsa nos animais acometidos (Radostits et al. 2007). Na superfície lingual é possível perceber nódulos firmes de tamanhos variados, cuja incisão pode revelar múltiplos nódulos arredondados, esbranquiçados, que variam de alguns milímetros a cerca de três centímetros de diâmetro, contendo pequenos grânulos amarelados, semelhantes a grãos de enxofre. Essas alterações interferem na mastigação e na deglutição, com resultantes sialorreia, dificuldade na apreensão de alimentos e perda de peso (Brown, Baker & Barker 2007, Bazargani & Tafti 2010). Milne et al. (2001) descrevem actinobacilose cutânea em três bovinos, com lesões acentuadas e restritas à pele da face.

As alterações histológicas são caracterizadas por inflamação piogranulomatosa com coleções centrais de cocobacilos, cercadas por clavas eosinofílicas compostas por imunocomplexos. As clavas são dispostas radialmente, cercadas por quantidade variável de neutrófilos e rodeadas por macrófagos e/ou células gigantes multinucleadas. Infiltrados de linfócitos e plasmócitos estão presentes nas adjacências, além de tecido de granulação e fibrose reativa (Brown et al. 2007).

O objetivo do presente trabalho é descrever os achados

patológicos de 18 casos de actinobacilose e caracterizar seu infiltrado inflamatório com auxílio da técnica de imuno-histoquímica.

MATERIAL E MÉTODOS

Dezoito Casos de bovinos do arquivo de exames anatomopatológicos e de necropsias do Setor de Patologia Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (SPV-UFRGS), do período de janeiro de 1997 a maio de 2011 e que tiveram lesões de actinobacilose foram avaliados.

Nas necropsias e das amostras de abatedouro/frigorífico enviadas refrigeradas/congeladas foram colhidos fragmentos de diversos órgãos, fixados em solução de formalina 10% e processados na técnica de rotina histológica. Amostras de linfonodos e da língua foram colhidas e remetidas para cultivo bacteriológico. Dados referentes a raça, sexo, idade, histórico clínico e achados macroscópicos foram compilados dos livros de registro e analisados.

Foram realizadas as técnicas histoquímicas de coloração de Brown-Hopps modificada (Gram) e a de Tricrômio de Masson (TM) (Prophet et al. 1992), esta para a evidenciação de tecido conjuntivo fibroso. Casos do arquivo diagnosticados como granulomas actinomicoides ou lesões sugestivas de actinobacilose foram caracterizados, com base nos aspectos morfológicos e na coloração histológica de Gram.

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi empregada para a caracterização de linfócitos T (anticorpo anti-CD3), de linfócitos B (anti-CD79 α cy) e de macrófagos (anti-CD68), em nove dos 18 Casos. Utilizaram-se o método da estreptavidina ligada à peroxidase para o anticorpo anti-CD68 e o método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina para os anticorpos anti-CD3 e anti-CD79 α cy. Os protocolos utilizados para a identificação de macrófagos e de linfócitos T foram realizados conforme Sonne et al. (2011). Na realização da IHQ para o marcador de linfócitos B, foi utilizado tampão citrato pH 6,0 para a recuperação antigênica em forno micro-ondas por 20 minutos em potência máxima. O anticorpo primário (Dako M7050, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) foi diluído a 1:30. As lâminas foram incubadas em câmara úmida *overnight* a 4°C e reveladas com Permanent Red (Dako, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos. O infiltrado linfocitário foi classificado relacionando quantidades de células com marcação positiva para linfócitos T ou B. Com o intuito de determinar as proporções do tipo linfocitário, foi feita uma classificação em três grupos; até 1/3; 2/3; e 3/3 de células positivas, com avaliação de, no mínimo, cinco piogranulomas com clava central em cada caso.

RESULTADOS

Dos dezoito bovinos do estudo, oito eram fêmeas e nove machos e, em um caso, o sexo não havia sido informado. A idade, informada em dezesseis casos, variou de um ano e meio a oito anos. A raça foi informada em 12/18 casos, com oito bovinos mestiços, dois da raça Holandesa, um Jersey e um Aberdeen Angus. Quanto a origem dos casos, 3/18 são de necropsias realizadas no SPV-UFRGS; 3/18 foram amostras de tecidos/órgãos enviadas por veterinários de campo e 12/18 amostras enviadas por veterinários de abatedouro/frigorífico, para exame anatomopatológico. O material proveniente de abatedouro/frigorífico incluiu linfonodos cervicais, língua e, em um dos casos, omento.

Os animais necropsiados apresentavam clinicamente mau estado corporal, sialorreia, regurgitação de alimento e aumento de volume submandibular; neste eram palpados diversos nódulos firmes. Em um dos animais havia

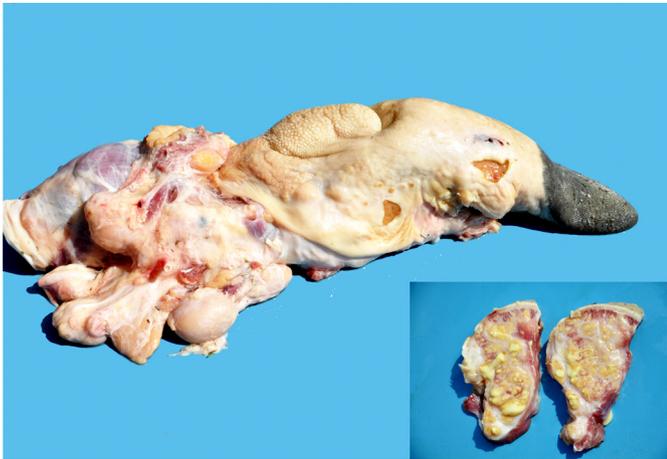


Fig.1. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Aspecto macroscópico da língua em um bovino necropsiado. Aumento de volume da língua e de linfonodos regionais. Detalhe: superfície de corte da língua; múltiplos nódulos com exsudato branco-amarelado.

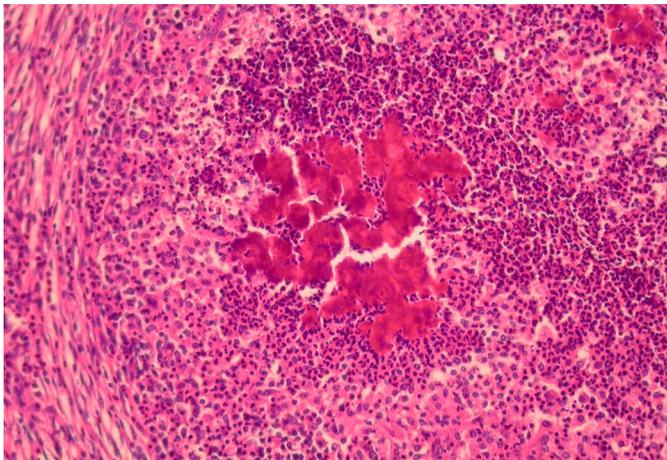


Fig.2. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Características histológicas da lesão de actinobacilose. Reação inflamatória piogranulomatosa com clava eosinofílica central, envoltas por tecido conjuntivo fibroso. HE, obj.20x.

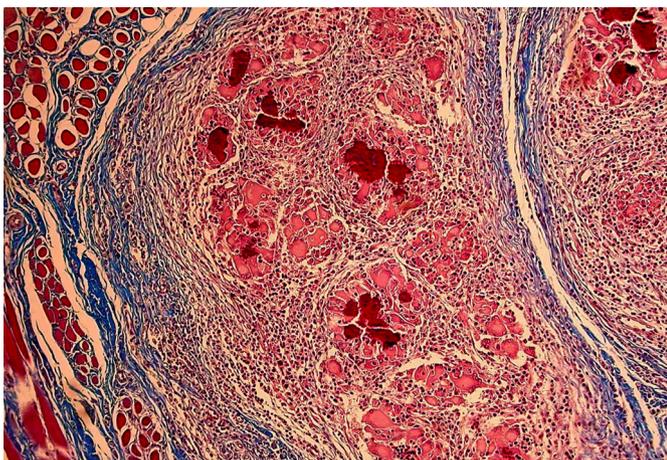


Fig.3. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Tecido conjuntivo fibroso neoformado circundando a lesão. Coloração de Tricrômio de Masson, obj.10x.

respiração ruidosa. Na necropsia, lesões foram observadas na língua, em linfonodos da cabeça e do pescoço e nos pulmões.

As lesões eram constituídas por língua aumentada de volume e consistência, nódulos arredondados de dimensões variadas e firmes em língua, linfonodos e pulmões. Ao corte dos nódulos havia material amarelado friável e, em vários deles, exsudato fluido a pastoso branco-amarelado (Fig.1).

Os achados histopatológicos foram semelhantes em todos os casos e consistiram de piogranulomas, caracterizados por infiltrado inflamatório multifocal composto por macrófagos epitelioides, células gigantes multinucleadas, linfócitos, neutrófilos, plasmócitos e eosinófilos, dispostos ao redor de formações eosinofílicas em forma de clavas (Fig.2), nas quais eram observadas bactérias cocobacilares. Adjacentes às clavas predominavam neutrófilos. Aglomerados celulares, predominantemente linfocíticos, localizavam-se periféricamente, associados a tecido conjuntivo neoformado, o qual foi evidenciado pela coloração de Tricrômio de Masson (Fig.3). Na língua, além da reação inflamatória, havia atrofia e necrose de fibras musculares, entremeadas por abundante tecido conjuntivo fibroso. Em alguns casos foram observadas extensas áreas com necrose multifocal, circundadas por clavas eosinofílicas e reação inflamatória multifocal, ocasionalmente em focos coalescentes. Cocobacilos Gram negativos foram evidenciados no interior das clavas nas amostras analisadas (Fig.4). Em um caso de necropsia foi isolado *Actinobacillus lignieresii*.

A marcação citoplasmática com anticorpo anti-CD68 foi positiva em todos os casos avaliados, com evidência de abundantes macrófagos e células gigantes multinucleadas (Fig.5). A imunomarcação em citoplasma de linfócitos B (Fig.6) e T (Fig.7), com o uso dos anticorpos anti-CD79 α cy e anti-CD3, respectivamente, permitiu caracterizar o infiltrado inflamatório linfocitário; linfócitos B foram predominantes nas lesões e corresponderam a, no mínimo, 2:3 do infiltrado linfocitário, enquanto os linfócitos T representa-

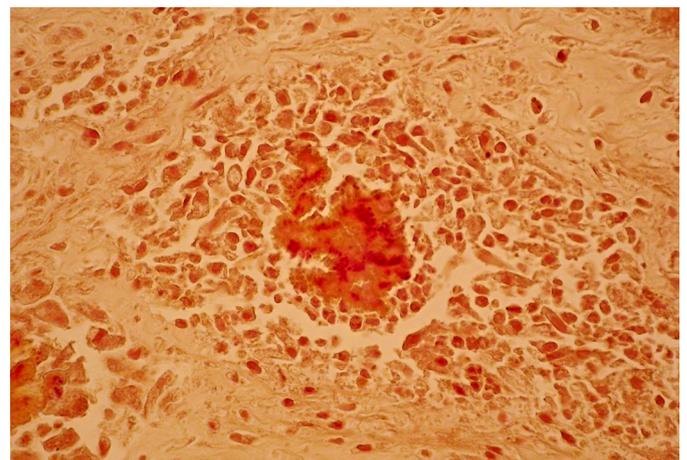


Fig.4. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Cocobacilos Gram-negativos, corados em magenta pela fucsina, evidenciados no interior das clavas centrais. Coloração de Brown-Hopps modificada, obj.20x.

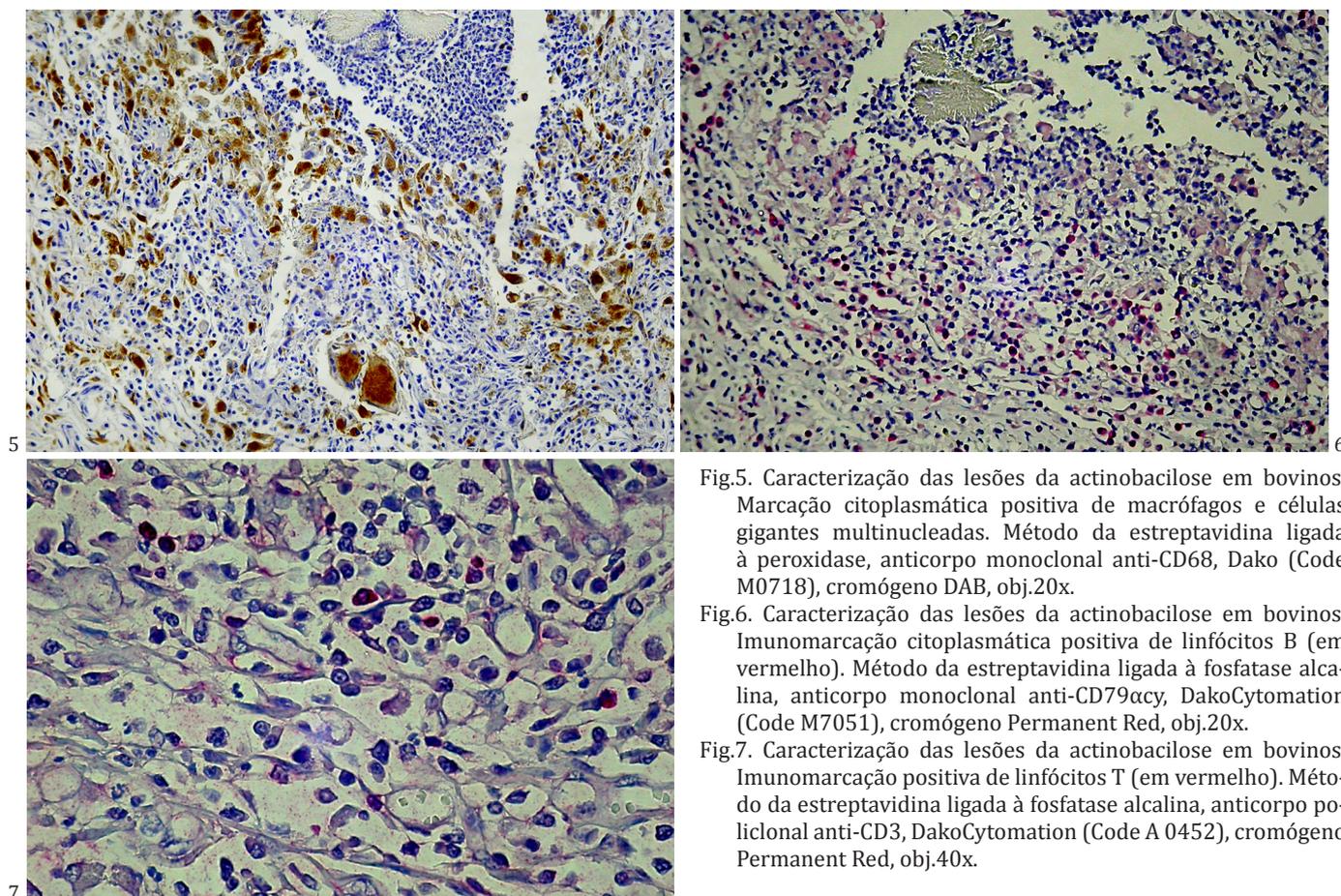


Fig.5. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Marcação citoplasmática positiva de macrófagos e células gigantes multinucleadas. Método da estreptavidina ligada à peroxidase, anticorpo monoclonal anti-CD68, Dako (Code M0718), cromógeno DAB, obj.20x.

Fig.6. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Imunomarcção citoplasmática positiva de linfócitos B (em vermelho). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, anticorpo monoclonal anti-CD79 α cy, DakoCytomation (Code M7051), cromógeno Permanent Red, obj.20x.

Fig.7. Caracterização das lesões da actinobacilose em bovinos. Imunomarcção positiva de linfócitos T (em vermelho). Método da estreptavidina ligada à fosfatase alcalina, anticorpo policlonal anti-CD3, DakoCytomation (Code A 0452), cromógeno Permanent Red, obj.40x.

ram até 1:3 do infiltrado. Os achados obedeceram a padrão semelhante nos nove casos avaliados.

DISCUSSÃO

O diagnóstico de actinobacilose nos bovinos deste estudo foi baseado nos achados macroscópicos, histológicos, na coloração de Gram e no isolamento bacteriano.

Cocobacilos Gram negativos foram evidenciados no interior das clavas em todas as amostras analisadas, o que indicou a presença de *Actinobacillus* sp. nas infecções. Cocobacilos Gram negativos localizados centralmente às clavas são característicos de lesões de actinobacilose em bovinos e diferenciam esta doença de outras inflamações piogranulomatosas causadas por bactérias Gram positivas como *Actinomyces bovis*, *Nocardia* sp. e *Staphylococcus aureus*; uma vez que doenças como a botriomicose e a actinomicose possuem achados histológicos semelhantes (Weiss & Santos 1992).

No presente estudo, 50% dos Casos examinados apresentaram lesões na língua, índice considerado expressivo, pois outros surtos ocorridos no Brasil descrevem lesões predominantes em linfonodos (Riet-Correa et al. 2007) e, em estudo realizado em abatedouros de bovinos do Rio Grande do Sul, com avaliação da frequência de lesões diagnosticadas com actinobacilose, de um total de 131 animais com a doença 72,5% apresentavam lesões em linfonodos parotídeos, mandibulares e retrofaríngeos (Mondadori et al. 1994).

Fatores como interação entre bactérias e receptores celulares, células alvo, toxinas, moléculas capsulares anti-fagocíticas e outros fatores contribuem para a patogenicidade de *Actinobacillus lignieresii*, mas ainda não estão bem compreendidos. No entanto, parece que a bactéria consegue escapar da ação de neutrófilos e macrófagos e, assim, colonizar lesões em tecidos orais. Provavelmente os lipopolissacarídeos (LPS) da parede celular bacteriana desempenham fator importante na inflamação piogranulomatosa, bem como na fibroplasia que ocorre. As bactérias colonizam o tecido conjuntivo da submucosa oral e ali ocorrem repetidos ciclos de fagocitose, crescimento e replicação bacteriana, liberação de elevado número de novas bactérias, recrutamento de células adicionais e resposta reparativa, perpetuando e expandindo o processo (Zachary & McGavin 2011).

Antígenos persistentes e de difícil degradação pelo hospedeiro, como *Actinobacillus lignieresii*, podem induzir, em sua superfície externa, agregados proteínáceos e eosinofílicos de imunoglobulinas, fenômeno denominado Splendore-Hoeppli. Em infecções crônicas os linfócitos B contribuem para a inflamação por captura de antígenos presentes e/ou diferenciação em plasmócitos (Zachary & McGavin 2011). Nesse estudo, a proporção significativamente maior de linfócitos B encontrada nas lesões sugere sua relação com a produção de imunoglobulinas e origem das clavas eosinofílicas, características nas lesões de actinobacilose.

O presente estudo permite concluir que a caracteriza-

ção histológica das lesões e a coloração de Gram são importantes na definição diagnóstica das lesões de actinobacilose e que a inflamação piogranulomatosa induzida por *A. lignieresii* apresenta população de linfócitos B proporcionalmente maior que a de linfócitos T, diferente do que ocorre em inflamações granulomatosas de tuberculose, em que predominam linfócitos T, com dominância de resposta imune celular (Pollock et al. 2001, Beytut 2011).

Agradecimentos.- Aos colegas do Setor de Patologia Veterinária da UFRGS pela ajuda neste trabalho, ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Albuquerque A.J.D., Badke M.R.T., Barcellos A.R. & Santos A.F. 1983. Epizootia de actinobacilose em bovinos de abate. Anais 8º Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Porto Alegre, RS, p.23. (Resumo)
- Bazargani T.T. & Tafti A.K. 2010. An unusual occurrence of actinobacillosis in heifers and cows in a dairy herd in Tehran suburb-Iran. Archives of Razi Institute 65(2):105-110.
- Beytut E. 2011. Immunohistochemical evaluation of surfactant proteins and lymphocyte phenotypes in the lungs of cattle with natural tuberculosis. Res. Vet. Sci. 91:119-124.
- Brown C.C., Baker D.C. & Barker I.K. 2007. Alimentary system, p.1-296. In: Maxie M.G. (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Vol.2. 5th ed. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- Coetzer A.W. & Tustin R.C. 2004. Infectious Diseases of Livestock. Vol.3. 2nd ed. University Press, Cape Town, p.1427-2159.
- Loss D.E., Vogg G., Bandarra P.M., Raymundo D.L., Conceição E.O., Dalto A.G.C., Oliveira M.B. & Driemeier D. 2006. Ocorrência em surto de actinobacilose em bovinos mantidos em área de capim anoni (*Eragrostis plana*) no Rio Grande do Sul. Anais 2º Encontro Nacional de Laboratórios de Diagnóstico Veterinário, Campo Grande, MS, p.41-42. (Resumo)
- Milne M.H., Barrett D.C., Mellor D.J., O'Neill R. & Fitzpatrick J.L. 2001. Clinical recognition and treatment of bovine cutaneous actinobacillosis. Vet. Rec. 148:273-274.
- Mondadori A.J., Riet-Correa F., Carter G.R. & Mendez M.D.C. 1994. Actinobacilose em bovinos no Rio Grande do Sul. Ciência Rural 24(3):571-577.
- Peli A., Spadari A., Romagnoli N., Bettini G., Scarpa F. & Pietra M. 2009. An atypical case of respiratory actinobacillosis in a cow. J. Vet. Sci. 10:265-267.
- Pollock J.M., McNair J., Welsh M.D., Girvin R.M., Kennedy H.E., Mackie D.P. & Neill S.D. 2001. Immune responses in bovine tuberculosis. Tuberculosis 81(1/2):103-107.
- Prophet E.B., Mills B., Arrington J.B. & Sobin L.H. 1992. Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 279p.
- Radostits O.M., Gay C.C., Hinchcliff K.W. & Constable P.D. 2007. Veterinary Medicine. 10th ed. Saunders Elsevier, Edinburgh. 2156p.
- Riet-Correa F., Schild A.L., Méndez M.C. & Lemos R.A.A. 2007. Doenças de Ruminantes e Equinos. Vol.2. Pallotti, Santa Maria. 694p.
- Sonne L., Raymundo D.L., Boabaid F.M., Watanabe T.T.N., Oliveira L.G.S., Vaz Jr I.S. & Driemeier D. 2011. Achados patológicos e imuno-histoquímicos em bovinos com doença granulomatosa sistêmica pelo consumo de *Vicia villosa* (Leg. Papilionoideae) no Rio Grande do Sul. Pesq. Vet. Bras. 31(4):307-312.
- Weiss R.D.N. & Santos M.N. 1992. Determinação da etiologia de granulomas actinomicóides em bovinos no Rio Grande do Sul através da histoquímica. Pesq. Vet. Bras.12(3/4):71-76.
- Zachary J.F. & McGavin M.D. 2011. Pathologic Basis of Veterinary Disease. 5th ed. Elsevier, St Louis. 1322p.