



## Peritonite piogranulomatosa por *Nocardia concava* em cão – relato de caso

*Piogranulomatous peritonitis by Nocardia concava in dog - Case Report*

Y.P.A. Trevisan, F.H. Maruyama, D.A. Sonogo, R.L. Souza, A.B.P.F. Almeida,  
V. Dutra, L. Nakazato, E.M. Colodel, P.B. Néspoli,  
C.G. Campos, A.J. Mendonça, V.R.F. Sousa\*

Universidade Federal do Mato Grosso - Cuiabá, MT

### RESUMO

Nocardiose é causada por bactérias do gênero *Nocardia* do subgrupo *Actinomycetos*, que são Gram-positivas aeróbicas, filamentosas e podem apresentar ramificações. O diagnóstico baseia-se na presença de lesão inflamatória, com o microrganismo morfológicamente compatível, associada ao isolamento e à identificação microbiológica e molecular. Este trabalho tem por objetivo relatar um caso de nocardiose em canino, que desenvolveu inflamação piogranulomatosa peritoneal seis meses após ovariossalpingo-histerectomia. O animal apresentava hipertermia, distensão abdominal, taquipneia, polidipsia, hiporexia, mucosas hipocoradas e fezes pastosas. Os achados laboratoriais evidenciaram anemia leve e leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda e hipoalbuminemia. Uma massa na região mesogástrica e efusão peritoneal foram evidenciadas por meio da ultrassonografia abdominal. O líquido foi classificado como exsudato piogranulomatoso, e o animal submetido à laparotomia exploratória para lavagem abdominal e remoção da massa. Após procedimentos terapêuticos, ocorreu piora clínica e óbito. Peritonite piogranulomatosa foi a principal alteração anatomopatológica a qual foi associada à *Nocardia* spp. Molecularmente, a espécie isolada se aproxima da *N. concava*, por meio da análise filogenética. Essa espécie já foi descrita como causa de infecção em humanos na Ásia, no entanto não há registros na literatura na espécie canina, sendo este o primeiro relato.

Palavras-chave: nocardiose, inflamação piogranulomatosa, peritonite

### ABSTRACT

*Nocardiosis is caused by an aerobic, gram-positive, ramified and filamentous bacteria of the Nocardia genus, subgroup Actinomycetos. The diagnosis is based on the presence of the inflammatory lesions with the morphologically compatible microorganism associated with microbiological and molecular isolation and identification. The objective of this work is to report a case of nocardiosis in a canine that developed peritoneal pyogranulomatous inflammation six months after ovariosalpingohysterectomy. The animal had hyperthermia, abdominal distention, tachypnea, polydipsia, hyporexia, hypocorous mucosae and pasty feces. The laboratory findings revealed mild anemia and leukocytosis due to neutrophilia with left deviation and hypoalbuminemia. A mass in the mesogastric region and peritoneal effusion were evidenced by abdominal ultrasonography. The fluid was classified as pyogranulomatous exudate and the animal underwent exploratory laparotomy for abdominal lavage and mass removal. Despite the therapeutic procedures and clinical alterations the dog died. Piogranulomatous peritonitis was the main anatomopathological alteration which was associated with Nocardia spp. Molecularly, the isolated species approaches the N. concava species through phylogenetic analysis. This specie was described as a cause of infection in humans in Asia; however, there are no records in literature on the canine species, being this the first report.*

Keywords: nocardiosis, pyogranulomatous inflammation, peritonitis

Recebido em 18 de dezembro de 2017

Aceito em 28 de dezembro de 2018

\*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: valeriaregia27@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Nocardia* são Gram-positivas estritamente aeróbicas finas, filamentosas e podem apresentar ramificações; ficam azul-claras na coloração de Romanowsky, são argentafins e parcialmente ácidas em técnicas álcool-ácido-resistente (Macneil *et al.*, 2010); pertencem à família *Nocardiaceae*, da ordem Actinomycetales (Fatahi-Bafghi, 2018). Uma característica morfológica importante é a formação de hifas e substratos aéreos que podem se fragmentar em elementos bacilares e cocoides, sendo erroneamente classificadas como fungo. O gênero *Nocardia* inclui uma variedade de espécies patogênicas com grande heterogeneidade, necessitando de técnicas moleculares e bioquímicas para classificar e, até mesmo, reclassificar quando necessário. Esses microrganismos são considerados saprófitas, responsáveis pela degradação de matéria orgânica. São encontrados em poeira doméstica, areia de praia, solo de jardim e piscinas (Coinville *et al.*, 2018).

O diagnóstico de nocardiose requer o isolamento e a identificação dos organismos na amostra clínica. Como a maioria dos casos envolve o pulmão, os materiais mais enviados incluem lavado bronquial, mas podem ser encaminhados exsudatos, líquido cerebrospinal ou abscessos (Corti e Fioti, 2003). Testes moleculares são usados na medicina veterinária para confirmar e identificar as espécies de *Nocardia*, sendo as mais comumente encontradas *N. asteroides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarium* e *N. abscessus*. Além desses, o diagnóstico histopatológico mostra intensa reação piogênica

na forma de abscessos supurativos contendo hifas filamentosas e ramificadas (Coinville *et al.*, 2018). Relatam-se caso clínico, procedimentos diagnósticos e terapêuticos de nocardiose, em canino com peritonite piogranulomatosa associada à *Nocardia concava*.

## CASUÍSTICA

Um canino, fêmea, sem raça definida, com 10 anos de idade, 13kg, foi atendido no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Mato Grosso (Hovet-UFMT), Cuiabá, Mato Grosso, seis meses após histórico de aborto e ovariossalpingo-histerectomia. Ao exame clínico, notou-se hipertermia, distensão abdominal, mucosas hipocoradas, taquipneia, fezes pastosas com muco e sangue, polidipsia e hiporexia.

A ultrassonografia abdominal evidenciou massa na região mesogástrica e presença de líquido livre na cavidade abdominal, que foi coletado e citologicamente classificado como exsudato piogranulomatoso. Na radiografia torácica, não foram detectadas anormalidades. Exames hematológicos e bioquímicos mostraram anemia leve e leucocitose por neutrofilia com desvio à esquerda e hipoalbuminemia (Tab. 1). Recomendou-se laparotomia exploratória, na qual se verificou moderada quantidade de líquido livre e massa irregular e amorfa no omento e nas alças intestinais, no pâncreas e nos vasos esplênicos. Por dissecação, pâncreas e intestino delgado foram liberados, e o baço e parte do omento retirados em bloco após ligadura da vascularização esplênica viável.

Tabela 1. Valores hematológicos do canino, fêmea, sem raça definida, com 10 anos de idade, Cuiabá, Mato Grosso, com infecção por *Nocardia* spp.

	Valores de referência	Dia 1	Dia 8	Dia 14
Eritrócitos	5,5-8,5 x10 <sup>3</sup> /μL	4,15x10 <sup>3</sup> /μL	2 x10 <sup>3</sup> /μL	1,5 x10 <sup>3</sup> /μL
Hemoglobina	12-18g/dl	8,8g/dL	4,9g/dl	3,3g/dL
Hematócrito	37-55%	25,6%	13,3%	10%
PPT	6-8g/dl	8g/dL	6,2g/dL	6,6g/dL
Leucócitos totais	6-18 x10 <sup>3</sup> /μL	25,2 x10 <sup>3</sup> /μL	32,7 x10 <sup>3</sup> /μL	27 x10 <sup>3</sup> /μl
Metamielócitos	0-0	0,2	00	00
Bastonetes	0-0,3	1,3	0,3	00
Neutrófilos segmentados	3-11,5	20,4	29,4	25,4
Eosinófilos	0,1-1,25	1,3	1,3	00
Basófilos	0-0,1	00	00	00
Linfócitos	1-4,8	1,5	0,6	0,5
Monócitos	0,15-1,35	0,5	1,0	1,1
Plaquetas	200-500x10 <sup>3</sup> /μL	194x10 <sup>3</sup> /μL	228 x10 <sup>3</sup> /μL	196 x10 <sup>3</sup> /μL

PPT- Proteínas plasmáticas totais.

Na histologia, na superfície capsular do baço e no omento, notou-se intensa inflamação, em que predominavam macrófagos com citoplasma amplo e multivacuolizado, células epitelioides e células gigantes multinucleadas. Essas células circundavam polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, que envolviam centralmente agregados bacterianos amplos,

granular e basofílicos circundados por reação de Splendore-Hoeppli. Esses agregados foram irregularmente marcados pela técnica de Ziehl-Neelsen, de acordo com Arrington (1992), evidenciando bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR) compatíveis com *Nocardia* spp. (Fig. 1).

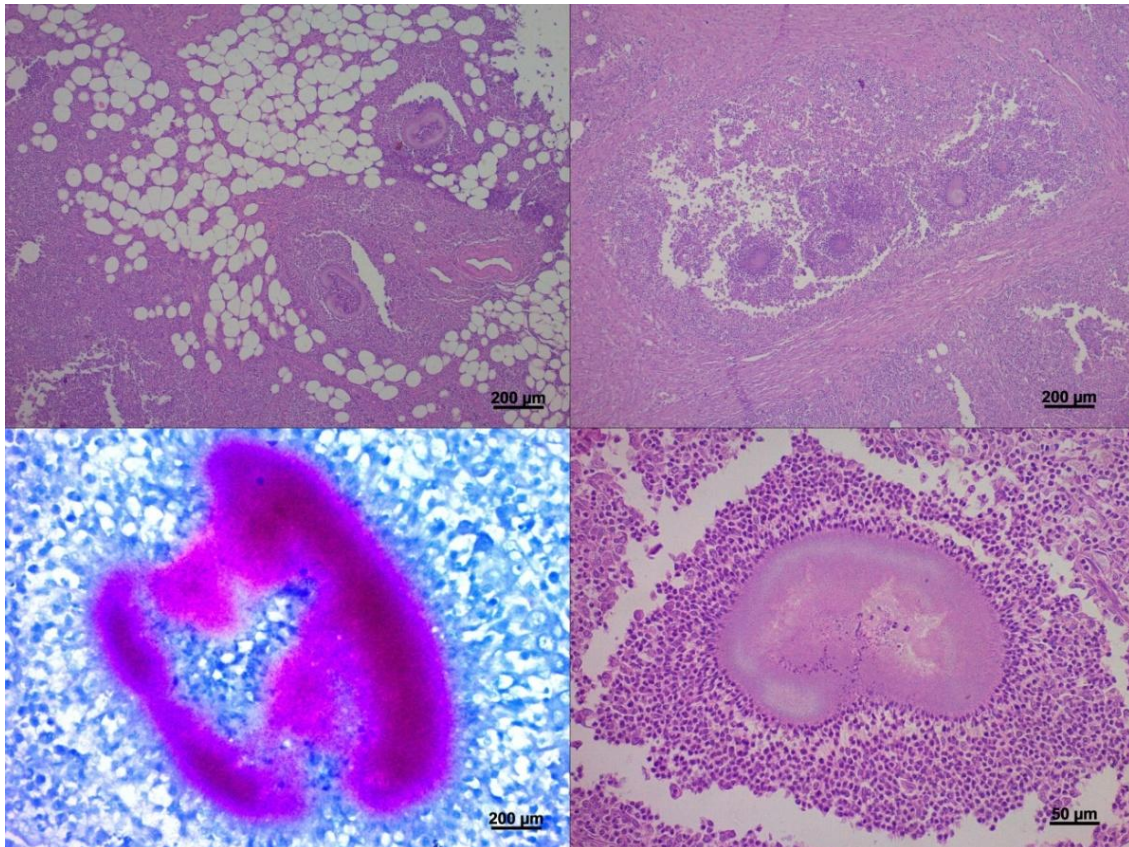


Figura 1. A, B e D – Reação de Splendore-Hoeppli no omento, circundada por neutrófilos (HE). C – Bacilo-álcool-ácido resistente, compatível com *Nocardia* spp., em esfregaço de tecido (Ziehl-Neelsen).

A efusão peritoneal e fragmentos do omento e do baço foram processados e inoculados nos meios ágar sangue ovino, ágar MacConkey e ágar Sabouraud dextrose com e sem acréscimo de cloranfenicol, em aerobiose, e incubados a 37°C e 30°C. Foram isoladas colônias amarelas secas, com aderência nos meios e de formato asteroide. Não foi observada hemólise da colônia em ágar sangue. As colônias foram submetidas às colorações de Gram e Ziehl-Neelsen e ao teste de catalase, observando-se bacilos Gram-positivos, álcool-ácido resistentes e catalase positiva, o que corrobora estudo de Kageyama *et al.* (2005). Os exames preliminares da cultura da efusão

peritoneal sugeriram infecção bacteriana por *Nocardia* spp.

Para identificação molecular, a cultura foi submetida à extração de DNA, seguindo o método de pérola de vidro e fenol-clorofórmio de acordo com Sambrook e Russel (2001). Em seguida, o DNA extraído foi amplificado pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos universais (27f e 1492r) para região 16S rDNA (Lane, 1991; Turner *et al.*, 1999). Após a amplificação, a amostra foi purificada utilizando-se o kit GFX™ PCR DNA Purification Kit & Gel

### Peritonite piogranulomatosa...

Band (GE Healthcare®), sequenciada pelo sequenciador automático ABI-PRISM 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems) e, posteriormente, analisada pelo programa BLAST NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). O produto da amplificação foi depositado no

Genbank (MF979111) e apresentou identidade de 97% com 16S rDNA *Nocardia*. Desse modo, na análise filogenética realizada pelo software Muscle, observou-se que a posição do isolado possui maior proximidade com a *Nocardia concava* que de outras espécies (Fig. 2).

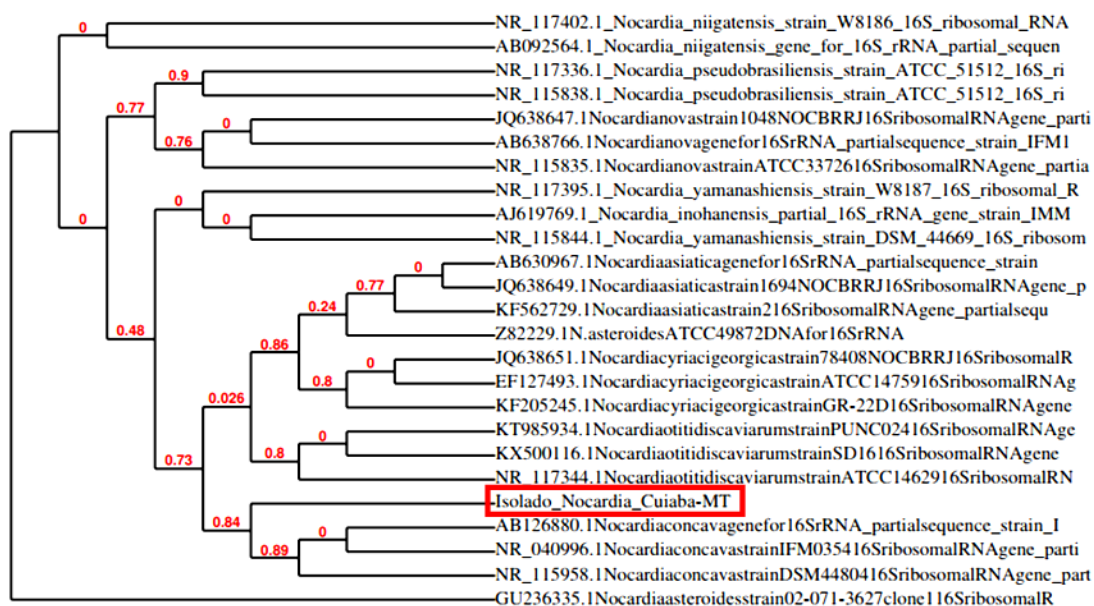


Figura 2. Análise filogenética, da região 16S rDNA, mostrando a máxima verossimilhança, realizada pelo software Muscle 3.8.31, do isolado de *Nocardia* spp.

No pós-operatório imediato, optou-se pela utilização dos antibióticos metronidazol (15mg/kg/BID) e enrofloxacin (5mg/kg/BID) e inicialmente houve estabilização dos parâmetros vitais. Porém, os exames pós-operatórios indicaram azotemia e acentuada anemia. Na gasometria arterial, foi possível identificar acidose metabólica (pH 7,17 [7,35-7,45]; bicarbonato 10mmol [23 a 26mmol]) e alcalose respiratória compensatória (PCO<sup>2</sup> 27,1mmHg [35 a 45mmHg]). Foi, então, iniciada terapia com bicarbonato de sódio a 8,4% para correção do desequilíbrio acidobásico. Para auxiliar a manter a pressão oncótica dos capilares, devido à hypoalbuminemia, foi instituída terapia com colóide.

Após resultados microbiológicos, foram alterados os antibióticos para amoxicilina com ácido clavulânico (20mg/kg/BID) em associação com metronidazol (15mg/kg/BID). Cinco dias após a cirurgia, houve melhora no quadro

clínico, com redução da azotemia, porém a anemia se mostrou mais acentuada e arregenerativa. Dessa maneira, iniciou-se aplicação de eritropoietina (100UI/kg/QOD/SC) e, após 10 dias da terapia, o hematócrito se elevou com melhora do estado geral. Contudo, após 14 dias de tratamento, o canino novamente apresentou distensão abdominal com efusão peritoneal, apatia, anemia intensa e azotemia; mesmo com transfusão sanguínea, houve piora no quadro geral, evoluindo para óbito.

As principais alterações notadas ao exame de necropsia foram restritas à cavidade abdominal, notando-se que o mesentério estava espessado e multinodular. Havia aderência difusa de vísceras abdominais, hepatomegalia moderada com evidência do padrão lobular, linfonodos mesentéricos e hepáticos aumentados e com fluxo de conteúdo viscoso e amarelado ao corte (Fig. 3).

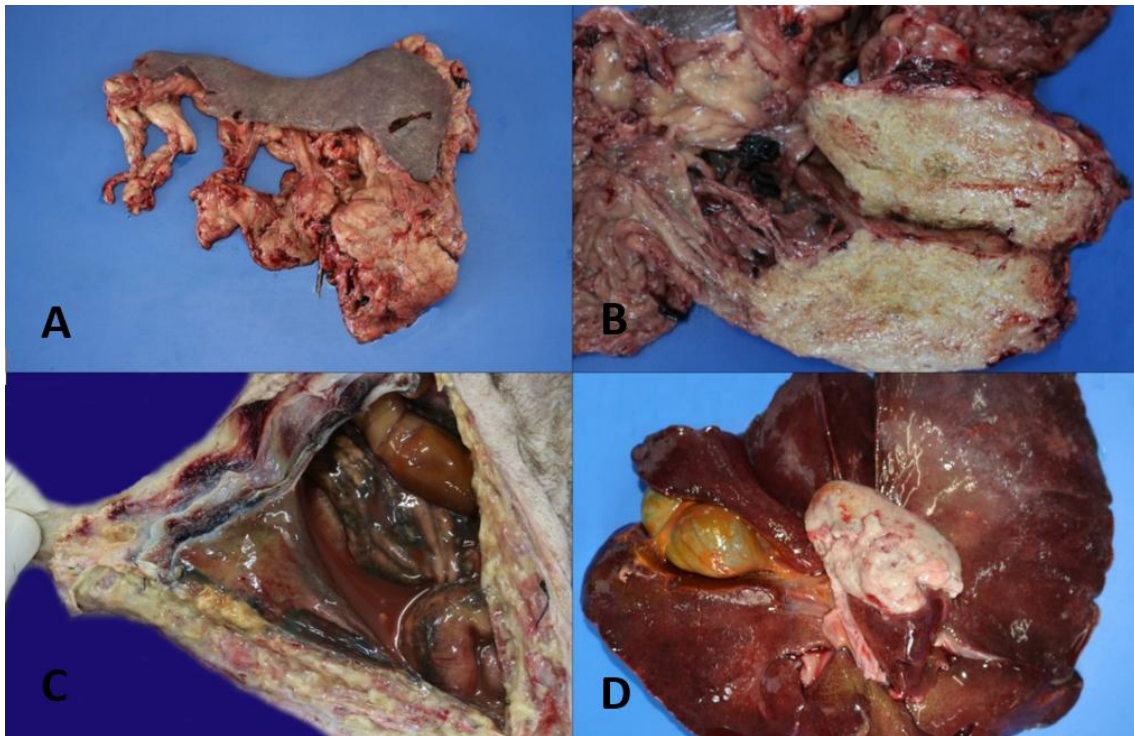


Figura 3. A e B – Massa aderida no omento e no baço, retirada após laparotomia exploratória. C – Presença de líquido em cavidade abdominal. D – Fígado com evidência de padrão lobular e nódulo hepático.

Na microscopia, nos linfonodos hepáticos e nos nódulos abdominais havia desorganização acentuada de arquitetura tecidual com extensa necrose caseosa e infiltrado com predomínio de macrófagos e neutrófilos. Essas células circundavam reação de Splendore-Hoeppli com agregados bacterianos BAAR, filamentosos compatíveis com *Nocardia* spp.

### DISCUSSÃO

O histórico clínico e as alterações clínicas somadas aos achados microbiológicos e patológicos descritos nesse cão caracterizaram o quadro de nocardiose. Entre os achados clínicos, com a idade avançada é frequente ocorrer imunossenescência, aumentando a suscetibilidade a infecções (Macneil *et al.*, 2010), como no caso relatado. Alguns autores relatam outros fatores de risco para a nocardiose, como uso prolongado de corticosteroides e doenças crônicas. No entanto, predisposição sexual e/ou racial não foi determinada (Hirayama *et al.*, 2016). Ademais, um ambiente cirúrgico contaminado também contribui para a ocorrência de infecções após procedimentos hospitalares.

Segundo Silva *et al.* (2013), surtos de infecção hospitalar podem estar associados à contaminação de filtros de ar-condicionado por bioaerossóis, como fungo, bactérias e ácaros, além de fômites, contato direto com a equipe hospitalar ou entre pacientes.

Os sinais clínicos da nocardiose muitas vezes são inespecíficos, podendo ser confundidos com diversas doenças. A apresentação clínica mais comum é a nocardiose pulmonar devido ao fato de o pulmão ser a principal porta de entrada da infecção. Além disso, podem ocorrer febre, perda de peso, anorexia, tosse, dispneia e hemoptise. Os casos de peritonite associados à infecção por *Nocardia* spp. foram descritos em pacientes submetidos à dialise peritoneal, diferindo deste relato, que não possuía cateter como via de entrada da infecção, mas histórico de ovariossalpingo-histerectomia havia seis meses. Em relação à anemia e aos desequilíbrios acidobásicos, não há associação direta à infecção, todavia esses podem decorrer da gravidade do quadro clínico associado à peritonite ou à septicemia, descritas nos casos de nocardiose (Fatahi-Bafghi, 2018).

Os exames de imagem são indicados principalmente para nocardiose pulmonar, pois a radiografia possibilita visualizar infiltrados nos lobos, nas efusões pleurais, nos nódulos ou nos abscessos pulmonares. Na nocardiose cerebral, os sinais são inespecíficos e variam de acordo com o local do cérebro acometido. Nas alterações cutâneas, pode haver celulite, abscessos, linfadenopatia e progressão lenta. Em casos severos, a intervenção cirúrgica é necessária, como em abscessos cerebrais, efusões mediastinais e nocardiose pulmonar com pericardite. O diagnóstico diferencial para metástase pulmonar, tuberculose ou outros agentes infecciosos deve ser realizado em pacientes que apresentam alterações pulmonares agudas, subagudas ou crônicas (Corti e Fioti, 2003). No entanto, apesar de o canino deste relato apresentar taquipneia constantemente, a radiografia torácica não evidenciou alterações em campo pulmonar, contribuindo para exclusão de metástase ou abscessos pulmonares.

A remoção cirúrgica, associada aos antibióticos administrados, contribuiu para minimizar a infecção e a efusão piogranulomatosa, entretanto, após 13 dias da ressecção cirúrgica, o animal apresentou outros focos de infecção constatados no exame *post mortem*. Esse fato pode se relacionar à escassez de conhecimentos sobre a terapia mais indicada, já que a nocardiose é uma doença rara, e o agente terapêutico apropriado, a via de administração e a duração do tratamento ainda não estão elucidados. A sulfonamida é o agente mais recomendado, porém, em pacientes com doenças sistêmicas, a taxa de mortalidade com esse antibiótico isoladamente é alta. Espécies diferentes de *Nocardia* apresentam susceptibilidades diferentes aos antimicrobianos, sendo necessário o uso inicial de dois ou três agentes terapêuticos (Condas *et al.*, 2015). No paciente relatado, a multiterapia antibacteriana foi instituída precocemente, porém não obteve sucesso terapêutico. Essa complicação é encontrada em muitos relatos de pacientes com nocardiose, mesmo quando submetidos ao teste de sensibilidade (Hirayama *et al.*, 2016).

O diagnóstico da nocardiose requer o isolamento e a identificação dos organismos na lesão (Corti e Fioti, 2003). Após o isolamento do agente, testes laboratoriais bioquímicos podem ser realizados para identificação da espécie, contudo

a taxonomia ainda está continuamente sendo revisada, necessitando de testes moleculares, como a PCR, para confirmação (Coinville *et al.*, 2018). Logo, a definição da *Nocardia* spp. não deverá ser apenas pela análise microbiológica e pelas características quimiotaxonômicas, mas também pela análise filogenética (Kageyama *et al.*, 2005). Assim, segundo Hu *et al.* (2011), as características morfológicas não são suficientes para a identificação quanto à espécie da *Nocardia*, sendo o método molecular baseado na região ribossomal 16S rDNA considerado “padrão ouro” para a identificação dos isolados de *Nocardia* no tocante às espécies. Neste relato, a análise microbiológica da efusão peritoneal foi o que possibilitou isolar o agente causador da infecção para prosseguir com o tratamento.

Hirayama *et al.* (2016) apresentaram todos os casos reportados de nocardiose por *N. concava*, sendo o primeiro em 2011, na China, em uma mulher com 42 anos de idade, com histórico de uso contínuo de corticoide e drogas imunossupressoras por dois anos. Nesse caso, o teste de sensibilidade foi restrito aos antibióticos tobramicina, ciprofloxacina, gentamicina e canamicina. Em 2012, na Coreia do Sul, houve o primeiro relato de abscesso na musculatura deltoide em paciente decorrente do uso de corticoide por dois meses, sensível à sulfonamida associada ao trimetopim, à amicacina e à linezolidina, sendo resistente à amoxicilina com ácido clavulânico, à cefepima, à ceftriaxona, ao imipenem e à claritromicina. Em 2016, foi relatado outro caso de *N. concava* no pulmão de uma paciente imunossuprimida sensível à ceftriaxona, à cefepima, à gentamicina, à claritromicina, à minociclina e ao levofloxacino. À exceção dos casos no Japão, em que não houve relatos em detalhes da evolução clínica, dos pacientes com *N. concava*, todos foram tratados com sulfonamida associada ao trimetoprim, no entanto somente na China houve óbito do paciente (Hirayama *et al.*, 2016).

Apesar de ser recomendado, o teste de susceptibilidade a antimicrobianos para *Nocardia* spp. não foi realizado. Glupczynski *et al.* (2006) descreveram que a interpretação dos dados do antibiograma deve ser feita com cautela, pois o não conhecimento sobre a correlação entre a resposta ao tratamento *in vivo* e o teste *in vitro*, aliado ao lento crescimento, à possível ocorrência de agregados e à dificuldade de

preparação de um inóculo uniforme e homogêneo, pode promover errôneo desempenho e interpretação equivocada dos testes.

### CONCLUSÃO

O isolamento e a edificação filogenética sugerem *Nocardia concava* como agente etiológico dessa peritonite piogranulomatosa. Este é o primeiro relato da infecção em um canino com peritonite piogranulomatosa e da espécie *Nocardia concava* no continente americano.

### REFERÊNCIAS

- ARRINGTON J.B. Bacteria, Fungi and other microorganisms. In: PROPHET E.B.; MILLS B.; ARRINGTON J.B. et al. (Eds.). *Laboratory methods in histotechnology* – Armed Forces Institute of Pathology. Washington: American Registry of Pathology, 1992. p.203-246.
- COINVILLE, P.S.; BROWN-ELLIOTT, B.A.; SMITH, T. et al. The complexities of *Nocardia* taxonomy and identification. *J. Clin. Microbiol.*, v.56, p.e01419-17, 2018.
- CONDAS, L.A.Z.; RIBEIRO, M.G.; MURO, M.D. et al. Molecular identification and antimicrobial resistance pattern of seven clinical isolates of *Nocardia* spp. in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, v.57, p.251-256, 2015.
- CORTI, M.E.; FIOTI, M.F.V. Nocardiosis: a review. *Int. J. Infect. Dis.*, v.7, p.243-250, 2003.
- FATAHI-BAFGHI, M. Nocardiosis from 1888 to 2017. *Microb. Pathog.*, v.114, p.369-384, 2018.
- GLUPCZYNSKI, Y.; BERHIN, C.; JANSSENS, M. et al. Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from clinical specimens by Etest. *Clin. Microbiol. Infect.*, v.12, p.905-912, 2006.
- HIRAYAMA, T.; TAKAZONO, T.; HORAI, Y. et al. Pulmonary nocardiosis caused by *Nocardia concava* with a literature review. *Intern. Med.*, v.55, p.1213-1217, 2016.
- HU Y.; ZHENG D.; TAKIZAWA K. et al. Systemic nocardiosis caused by *Nocardia concava* in China. *Med. Mycol.*, v.49, p.662-6, 2011.
- KAGEYAMA A.; YAZAWA K.; TANIGUCHI H. et al. *Nocardia concava* sp. nov., isolated from Japanese patients. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v.55, p.2081-2083, 2005.
- LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT E.; GOODFELLOW M. (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons, 1992. p.115-175.
- MACNEIL, A.L.; STEEIL, J.C.; DOSSIN, O. et al. Disseminated nocardiosis caused by *Nocardia abscessus* in a dog. *Vet. Clin. Pathol.*, v.3913, p.381-385, 2010.
- SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. (Eds.) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor, 2001. 2344p.
- SILVA, D.P.; NAZARÉ, D.L.; MUNIZ, J.W.C. et al. Infecções hospitalares associadas à qualidade do ar em ambientes climatizados. *Rev. Epidemiol. Control. Infec.*, v.3, p.153-157, 2013.
- TURNER S.; PRYER K.M.; MIAO V.P. et al. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J. Euk. Microbiol.*, v.46, p.327-338, 1999.