

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E
TERMORRESISTÊNCIA À FERVURA EM LINHAGENS DE
Nocardia spp. ISOLADAS DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E
HUMANOS**

LARISSA ANUSKA ZENI CONDAS

**BOTUCATU, SP
MARÇO/ 2011**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE HIGIENE VETERINÁRIA E SAÚDE PÚBLICA**

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E TERMORRESISTÊNCIA
À FERVURA EM LINHAGENS DE *Nocardia* spp. ISOLADAS DE ANIMAIS
DOMÉSTICOS E HUMANOS**

LARISSA ANUSKA ZENI CONDAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação do Curso de Medicina Veterinária da FMVZ – UNESP Botucatu, visando obtenção do título de Mestre, na área de Saúde Animal, Saúde Pública Veterinária e Segurança Alimentar.

ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRCIO GARCIA RIBEIRO

BOTUCATU, SP
MARÇO/ 2011

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação Divisão Técnica de Biblioteca e Documentação - Campus De Botucatu - UNESP
Bibliotecária responsável: *Sulamita Selma Clemente Colnago* - CRB 8/4716

Condas, Larissa Anuska Zeni.

Caracterização fenotípica, genotípica e termorresistência à fervura em linhagens de *Nocardia* spp. isoladas de animais domésticos e humanos / Larissa Anuska Zeni Condas. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Márcio Garcia Ribeiro

Capes: 50502034

1. Animais domésticos - Doenças - Diagnóstico. 2. Diagnóstico microbiológico.

Palavras-chave: Animais de companhia; Animais de produção; *Nocardia* sp; Mastite bovina; Termorresistência

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação

A Deus,

Inspiração de fé, bondade e respeito ao próximo

Aos meus pais Luiz Carlos Condas e Sara Jane Soares Zeni Condas

por me mostrarem o valor do amor, da honestidade e do conhecimento

Aos meus avós Ana Elizabeth Harttman, Iolanda Harttman Condas,

Armando e Enedina Zeni , Carmela e Emílio Zeni

por representarem o que espero como família e por serem meu refúgio de carinho

Ao meu esposo Guilherme Borges Bond

pelo amor, incentivo, cumplicidade e companheirismo

Aos animais

Aos quais devo meu desejo incondicional de aperfeiçoamento e vontade de um mundo

onde todos os seres sejam respeitados como iguais.

Obrigada por fazerem parte da minha vida

AGRADECIMENTOS

- * *Ao Professor Márcio Garcia Ribeiro, por acreditar na minha capacidade em realizar este trabalho e por conduzir meus passos em mais uma etapa profissional;*
- * *Ao Professor Marconi Rodrigues de Farias, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, colaborador deste trabalho. Sempre serei grata ao seu empenho na minha formação, aos conselhos e à amizade;*
- * *À FAPESP pelo financiamento deste projeto;*
- * *À Professora Marisol Domingues Muro, Universidade Federal do Paraná – Hospital de Clínicas, pelo carinho e amizade ao longo da minha formação; e pela cessão de linhagens para este trabalho;*
- * *À Professora Agueda Castagna Vargas, Universidade Federal de Santa Maria, pela colaboração essencial no levantamento de dados e cessão de linhagens para este trabalho;*
- * *À Dra. Karen Spadari, da Universidade Federal de São Paulo; e a Dra. Lia Luft, do Instituto Adolf Lutz; e ao Professor Carlos Eduardo Larsson, da Universidade de São Paulo; Dra. Priscilla Melville, da Universidade de São Paulo; Dra. Sônia Biesdorf, do Laboratório Marcos Enrietti – Paraná, pela cessão de linhagens;*
- * *Ao Professor Tohru Gono, do Centro de Estudos de Micologia e Actinomicetos da Universidade de Chiba, Japão, pela realização da identificação molecular e pela possibilidade de estudos em cooperação;*
- * *Ao professor Rogério Giuffrida, Universidade do Oeste Paulista, pelo auxílio com tratamento estatístico dos resultados;*
- * *Ao Professor José de Almeida Paes de Almeida Nogueira Pinto pelas orientações na realização deste trabalho;*

- * *Ao Professor Antônio Carlos Paes pelas orientações em laboratório e sala de aula, bem como, pelo convívio agradável;*
- * *À professora Sandra Moraes de Gimenes Bosco, pela amizade e carinho; além do incentivo nos estudos da biologia molecular e mútua paixão pela micologia veterinária.*
- * *Ao técnico do laboratório de Microbiologia da FMVZ-UNESP/ Botucatu, Fernando José Paganini Listoni, por ensinar-me a elaborar as ferramentas necessárias na realização deste trabalho.*
- * *Aos pós-graduandos Tatiana Salerno, Thays Mizuki Lucas, Thiago Zamprogna, Amanda Keller Siqueira, Marta Catarina Fernandes, Marília Masello Junqueira Franco, pela imensurável ajuda na realização deste trabalho e principalmente pela amizade inestimável que ajudam a suportar a distância de casa.*
- * *Às pós-graduandas Mariana Isa Palumbo Poci, Ariani Cristina e Verônica Oliveira, Jaqueline Kurissio pela companhia agradável ao longo desses dois anos.*
- * *Aos meus queridos amigos, ainda que distantes, Lílian Parabocz, Camila Franco de Carvalho, Sávia Calyne Santos Paiva, Palloma Rose, Janaína Berbere Doro, Victhor Falcão, Alyne Sant'Anna, Carine Budziak Dangelo, Rodrigo Friesen, que sempre me deixam saudades;*
- * *A todos os funcionários, demais residentes e pós-graduandos do Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, pela colaboração, convívio e respeito profissional nas atividades do ambiente de trabalho.*
- * *A minha família – pais, avós, primos, sogros, tios, cunhados – que me deram apoio nos momentos difíceis e me trouxeram muitas alegrias.*
- * *A todos os meus “afilhados bichos” de Botucatu, Pietra, Pandora, Thor, Belinha, Júnior, Catifunda, Kyoto, Nhanhau, Olívia, Thoru, Rambo, Tochi, Tubaina, Fifi e a minha querida “irmã felina” Ludovica Anabella Zeni Condas e aos meus filhotes Athos e Basko Bond pela receptividade cativante e companhia feliz.*

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1 – Seqüência sugerida na identificação fenotípica de espécies de *Nocardia* provenientes de isolados clínicos. 66
- Anexo 2 – Substratos utilizados na diferenciação fenotípica de espécies do gênero *Nocardia*..... 85
- Anexo 3 – Interpretação dos halos de inibição na prova de difusão com discos para bactérias fastidiosas aeróbicas. 86
- Anexo 4 – Valores de referência para interpretação da concentração inibitória mínima para bactérias aeróbicas fastidiosas. 87
- Anexo 5 – Molecular identification and termorresistance to boiling of *Nocardia nova* from bulk tank milk – Short Communication (Research in Veterinary Science)..... 88
- Anexo 6 – Normas para publicação da Revista Research in Veterinary Science. 92

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Padrões de sensibilidade aos antimicrobianos em espécies do gênero *Nocardia*..... 8
- Tabela 2 – Distribuição de diferentes afecções em 88 linhagens de *Nocardia* sp isoladas de animais domésticos. Botucatu, SP, 2011..... 29
- Tabela 3 – Distribuição de diferentes afecções em sete linhagens de *Nocardia* sp isoladas de humanos. Botucatu, SP, 2011. 29
- Tabela 4 – Identificação fenotípica de 95 linhagens de *Nocardia* spp obtidas de afecções de animais domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011. 41
- Tabela 5 – Classificações bioquímicas concordantes e discordantes com os métodos moleculares de 95 linhagens de *Nocardia* sp. Botucatu, SP, 2011. 42
- Tabela 6 – Perfil geral de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em 95 linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011. 44
- Tabela 7 – Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em sete linhagens de *Nocardia* spp isoladas de humanos. Botucatu, SP, 2011. 45
- Tabela 8 – Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em 88 linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos. Botucatu, SP, 2011. 47

| | |
|--|----|
| Tabela 9 – Concentração inibitória mínima geral de 95 linhagens de <i>Nocardia</i> spp isoladas de animais domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011 | 49 |
| Tabela 10 – Concentração inibitória mínima de sete linhagens de <i>Nocardia</i> spp isoladas de humanos. Botucatu, SP, 2011. | 49 |
| Tabela 11 – Concentração inibitória mínima de 88 linhagens de <i>Nocardia</i> spp isoladas de animais domésticos. Botucatu, SP, 2011..... | 50 |
| Tabela 12 – Valores de CIM responsáveis pela inibição dos 95 isolados de <i>Nocardia</i> spp. Botucatu, SP, 2011. | 51 |
| Tabela 13 – Índices Kappa (k) de concordância entre os métodos de disco-difusão com disco E-test para avaliação de resistência microbiana, significância estatística (p) e interpretação de resultados para seis antimicrobianos avaliados. Botucatu, SP, 2011 | 51 |

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fotos obtidas em microscopia eletrônica de varredura das espécies *N. nova* e *N. farcinica* provenientes de afecções em animais domésticos, em a aumentos de 2336 x (A) e 4957 x (B). Botucatu, SP, 2011. 52
- Gráfico 1 – Percentuais de linhagens viáveis de *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos e humanos submetidas à condições de fervura. Botucatu, SP, 2011. 53

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

µg - micrograma

µL - microlitro

Aids - Síndrome da imunodeficiência adquirida

Água Milli Q™ - água purificada pelo sistema Milli Q da Millipore Corporation

API® - Applied system for microorganisms identification

BCYE - Buffered charcoal yeast extract

BLAST - Basic local alignment search tool

CIM - concentração inibitória mínima

CMT - California mastitis test

EUA - Estados Unidos da América

Etest® - método para determinação de CIM fabricado pela BioMérieux

FMVZ - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GenBank - banco de dados de seqüências nucleotídicas

HCl - ácido clorídrico

K - índice kappa

kDa - quilodáltons

kg - quilograma

®/™ - marca registrada

> - maior que

< - menor que

mg - miligrama

mL - mililitro

mm - milímetro

mM - miliMolar

NCCLS/ CLSI - National Committee for Clinical Laboratory Standards/ Clinical and Laboratory Standards Institute

n^o - número

°C - graus Celsius

ORVA - obstrução recorrente das vias aéreas

P - significância estatística

PCA - Plate count agar

PCR: reação em cadeia pela polimerase

PMN: polimorfonucleares

%: porcentagem

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

rpm: rotações por minuto

rRNA/ rDNA: ácido ribonucleotídico ribossomal

SID: uma dose ao dia

SMX-TMP: sulfametoxazol/ trimetoprim

SOD: superóxido dismutase

UFC: unidades formadoras de colônia

UNESP: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

* Em virtude do uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem sua grafia no inglês.

RESUMO

CONDAS, L.A.Z. **Caracterização fenotípica, genotípica e termorresistência à febre em linhagens do gênero *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos e humanos.** 2011, 104p, dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP.

Nocardia é um microorganismo ubíquo, relacionado a processos piogranulomatosos supurativos de difícil resolução terapêutica em humanos e animais. Foi investigada caracterização fenotípica, genotípica, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, e termorresistência à febre em 95 linhagens de *Nocardia* spp. provenientes de animais domésticos e humanos. Em animais de produção a afecção mais comum foi mastite bovina identificada em 71 linhagens (74,73%). Em animais de companhia obteve-se mais isolamento nos cães com 12 linhagens (12,63%), principalmente de tecido cutâneo. Foram estudados sete isolados de *Nocardia* spp. obtidos de humanos, com quadros cutâneos e neurológicos. A caracterização molecular e análise filogenética realizada por PCR da fração 16S rRNA identificaram as seguintes espécies: *Nocardia nova* (68,42%), *Nocardia farcinica* (13,68%), *Nocardia cyriacigeorgica* (4,58%), *Nocardia puris* (3,67%), *Nocardia veterana* (3,67%), *Nocardia africana* (2,10%), *Nocardia asiatica* (0,91%) e *Nocardia arthritidis* (0,91%). A ocorrência de multirresistência a três ou mais e a cinco ou mais antimicrobianos ocorreu em, respectivamente, 42,88% e 14,28%. A comparação entre perfil de sensibilidade por disco-difusão e concentração inibitória mínima mostrou correlação fraca, exceto para amicacina. Na avaliação da termorresistência à febre foi observado reisolamento de 84,21% das linhagens após atingir 100°C no leite, 50,52% após um minuto de febre a 100°C e 2,10% após cinco minutos. Depreendeu-se no estudo alta similaridade entre linhagens de *Nocardia* sp. isoladas de animais domésticos e humanos, elevada multirresistência aos antimicrobianos utilizados na terapia da

nocardiose em animais e humanos, e a termorresistência à fervura do leite, ressaltando riscos de consumo do leite de animais com nocardiose mamária.

Palavras-chave: *Nocardia* sp., nocardiose, animais de companhia, animais de produção, termorresistência

ABSTRACT

CONDAS, L. A. Z. **Phenotypic and genotypic characterization and thermoresistance to boiling of strains of the *Nocardia* spp. genus isolated from domestic animals and humans.** 2011, 104p, dissertation (Masters degree) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, SP.

Nocardia is an ubiquitous microorganism, environmental, related to suppurative pyogranulomatous of difficult treatment in humans and domestic animals. The phenotypic and genotypic characterization, antimicrobial susceptibility profile and thermoresistance to boiling of 95 strains of *Nocardia* spp., from both domestic animals and humans, were investigated. In production animals the most common affection was the bovine mastitis, identified in 71 strains (74,73%). Among the small animal, most of the isolates were from dogs, a total of 12 strains (12,63%), especially from cutaneous manifestations. Seven isolates were obtained from humans, with emphasis for cases with cutaneous and neurological signs. The molecular characterization and the phylogenetic analysis made through PCR of the 16S rRNA resulted in the identification: *Nocardia nova* (68,42%), *Nocardia farcinica* (13,68%), *Nocardia cyriacigeorgica* (4,58%), *Nocardia puris* (3,67%), *Nocardia veterana* (3,67%), *Nocardia africana* (2,10%), *Nocardia asiatica* (0,91%) and *Nocardia arthritidis* (0,91%). The occurrence of multi-resistance to three or more and five or more antimicrobials was observed in 42,88% and 14,28% of the studied strains, respectively. The comparison between the susceptibility profile through disc diffusion and the minimum inhibitory concentration showed a weak correlation, except for amikacin. In the evaluation of thermoresistance to boiling 84,21% of the strains were re-isolated after reaching 100°C in milk, 50,52% after boiling for one minute at 100°C and 2,10% after boiling for 5 minutes. This study showed high similarity between *Nocardia* sp. strains isolated from domestic animals and humans, increased multi-resistance to some of the most used antimicrobials in the therapy of nocardiosis in animals and humans, thermoresistance to the

boiling conditions of milk, emphasizing the risk of consuming products from animals with mammary nocardiosis.

Keywords: *Nocardia* sp., nocardiosis, companion animals, production animals, thermoresistance.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 5 |
| 2.1 Taxonomia e propriedades gerais do gênero <i>Nocardia</i> | 5 |
| 2.2 Patogenicidade e virulência..... | 10 |
| 2.3 Nocardiose nos animais..... | 12 |
| 2.3.1 Nocardiose em animais de companhia | 12 |
| 2.3.2 Nocardiose em animais de produção..... | 17 |
| 2.4 Aspectos de Saúde pública | 21 |
| 3 OBJETIVOS | 27 |
| 3.1 Geral | 27 |
| 3.2 Específicos..... | 27 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 4.2 Diagnóstico das mastites por <i>Nocardia</i> sp | 30 |
| 4.3 Diagnóstico da nocardiose em animais de companhia | 30 |
| 4.4 Isolamento de <i>Nocardia</i> sp..... | 30 |
| 4.5 Identificação fenotípica de <i>Nocardia</i> spp..... | 31 |
| 4.5.1 Hidrólise da xantina, hipoxantina, caseína e tirosina | 31 |
| 4.5.2 Hidrólise da Esculina | 32 |
| 4.5.3 Prova da urease e utilização do citrato..... | 32 |
| 4.5.4 Multiplicação a 45°C | 33 |
| 4.6 Estoque dos isolados | 33 |
| 4.7 Perfil de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos e detecção de isolados multirresistentes | 33 |
| 4.8 Concentração inibitória mínima - CIM | 34 |
| 4.9 Avaliação da termorresistência “in vitro” dos isolados às condições de fervura..... | 35 |
| 4.10 Microscopia eletrônica de varredura | 36 |
| 4.11 Identificação molecular dos isolados de <i>Nocardia</i> | 36 |
| 4.11.1 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA | 37 |
| 4.11.1.1 Preparo do inóculo..... | 37 |
| 4.11.1.2 Amplificação e Sequenciamento da fração 16S rRNA..... | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 4.11.2 Hibridização de DNA | 38 |
| 4.11.3 Análise filogenética | 38 |
| 4.11.4 PCR e RFLP da proteína de choque térmico 65 kDa..... | 38 |
| 4.12 Análise estatística | 39 |
| 5 RESULTADOS | 40 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 54 |
| 7 CONCLUSÕES..... | 65 |
| 8 REFERÊNCIAS | 66 |
| 9 ANEXOS..... | 84 |

1 INTRODUÇÃO

Os actinomicetos aeróbicos compõem grupo complexo de bactérias. *Nocardia*, *Rhodococcus*, e *Corynebacterium* são os gêneros mais patogênicos para os animais e humanos (Radostitis et al., 2007). As infecções pelos actinomicetos nos animais e humanos são caracterizadas por lesões abscedantes, piogranulomatosas, de evolução crônica, de difícil resolução terapêutica (Beaman e Beaman, 1994; Lerner, 1996). O gênero *Nocardia* compreende microrganismos ubíquos, encontrados principalmente no solo, matéria orgânica, plantas e água.

Nos últimos anos, a nocardiose tem sido considerada em vários países como doença emergente (Acha e Szyfres, 2003; Corti e Villafañe-Fioti, 2003; Edwards, 2006; Radostits et al., 2007). Classicamente, *Nocardia asteroides* (*N. asteroides*) é reconhecida como a espécie mais patogênica para humanos e animais. Manifestações clínicas atípicas do microrganismo, ou mesmo a similaridade microbiológica ou clínica com outros actinomicetos, tem resultado provavelmente no subdiagnóstico da doença em medicina humana e veterinária. A patogenicidade do gênero *Nocardia* é atribuída à localização intracelular do organismo nos fagócitos, à indução de reações piogranulomatosas, à resistência aos antimicrobianos convencionais, e ao comportamento oportunista do agente, exacerbado em animais e humanos imunossuprimidos (Acha e Szyfres, 2003).

As lesões tegumentares e pulmonares são as principais manifestações clínicas da nocardiose em animais de companhia. A infecção em cães e gatos geralmente é secundária à penetração percutânea do organismo, ou por inalação após aerossolização, em ambientes excessivamente secos (Kirpensteijn e Fingland, 1992). No Brasil, os estudos com a nocardiose em animais de companhia são pontuais, ficando restritos basicamente aos relatos de caso, fato que dificulta o esclarecimento do real impacto da doença em cães e gatos no país (Ribeiro et al., 2002; 2008).

A mastite bovina é a principal manifestação clínica da nocardiose em animais de produção. *Nocardia* sp. são microrganismos considerados de origem ambiental na infecção mamária de animais de produção. A nocardiose

1 mamária é encontrada comumente em animais provenientes de propriedades
2 com deficiências no manejo higiênico da ordenha, com excesso de material
3 orgânico no ambiente entre-ordenhas, após contaminação da água utilizada na
4 sala de ordenha, ou contaminação na terapia intra-mamária (Radostits et al.,
5 2007; Ribeiro et al., 2008).

6 No Brasil, pouca ênfase tem sido dada à nocardiose mamária.
7 Interessantemente, os poucos estudos realizados no país têm apontado
8 reiteradamente para o crescimento da casuística e para a gravidade dos
9 processos mamários envolvendo o gênero *Nocardia* (Costa et al., 1996b; Costa
10 et al., 1998). A cronicidade da infecção mamária, a alta capacidade de
11 disseminação intra-rebanho, a refratariedade à terapia, somados ao potencial
12 zoonótico do agente, tem resultado na recomendação da ablação química dos
13 tetos acometidos ou mesmo no descarte do animal (Ribeiro et al., 2008).
14 Ademais, investigações “in vitro” da termorresistência de linhagens de
15 *N. asteroides* isoladas de vacas com mastite no Brasil, mostraram que o
16 microrganismo resiste às condições do binômio tempo/temperatura utilizadas
17 no processo convencional da pasteurização lenta e rápida (Costa et al., 1996a),
18 podendo ser agrupada como representante dos patógenos termodúricos de
19 importância no controle da qualidade do leite (Robinson et al., 2000). A fervura
20 do leite é um dos procedimentos mais antigos recomendados para a inativação
21 de microorganismos patogênicos no leite (Furlanetto et al., 2009). Entretanto,
22 dentre a literatura consultada, não existem no país estudos conduzidos na
23 avaliação do efeito da fervura, frente a isolados de *Nocardia* sp. obtidos do leite
24 de animais. Com efeito, a termorresistência de *Nocardia* sp. merece
25 preocupação por parte dos profissionais de saúde e da área de qualidade do
26 leite, em virtude dos riscos de transmissão do patógeno para os humanos pelo
27 leite, mesmo submetendo o produto ao tratamento térmico convencional
28 (Ribeiro et al., 2008).

29 A nocardiose em animais e em humanos se notabiliza pela
30 refratariedade à terapia convencional. Sulfonamidas-trimetoprim,
31 cefalosporinas, amicacina, ampicilina, imipeném e minociclina são fármacos
32 que apresentam boa efetividade “in vitro”. Contudo, a terapia “in vivo” não
33 apresenta resultados satisfatórios, provavelmente pela dificuldade dos

1 antimicrobianos convencionais atingirem concentrações terapêuticas no interior
2 dos piogranulomas (Edwards, 2006; Radostits et al., 2007). Paralelamente,
3 tem-se dado ênfase ao aumento da multirresistência aos antimicrobianos por
4 linhagens de *Nocardia* sp. isoladas de animais e de pacientes humanos, tanto
5 no Brasil como em outros países (Saubolle e Sussland, 2003; Glupczynski et
6 al., 2006; Ribeiro et al., 2008).

7 A nocardiose humana é considerada doença emergente em diferentes
8 países, incluindo no Brasil (Corti e Villafañe–Fioti, 2003; Chedid et al., 2007;
9 Agterof et al., 2007). As infecções pelo gênero *Nocardia* são reconhecidas
10 como oportunistas. Predominam em certos grupos de risco ou de
11 vulnerabilidade, que possuem em comum, doenças de base
12 imunossupressivas (hepatopatas, lupus, tuberculose, acometidos por
13 neoplasias), em pacientes submetidos a tratamentos com fármacos
14 imunossupressores (transplantados) ou envolvidos em comportamento de risco
15 à saúde (dependentes químicos). Nas últimas décadas, é crescente também a
16 preocupação dos profissionais sanitários quanto à coinfeção de *Nocardia* sp.
17 em indivíduos acometidos pelo vírus da imunodeficiência adquirida – Aids
18 (Castelli et al., 1994; Acha e Szyfres, 2003), incluindo o Brasil (Castro et al.,
19 1999; Silva et al., 2000). Sugere-se que a principal forma de transmissão do
20 gênero *Nocardia* para os humanos seria representada pela contaminação de
21 lesões tegumentares ou pela inalação de bactérias, após aerossolização em
22 ambientes excessivamente secos e contaminados. Entretanto, permanece
23 incerto o risco do contato com animais domésticos na transmissão da
24 nocardiose para os humanos, a despeito da descrição recente de casos de
25 transmissão do microrganismo para os humanos, secundária à arranhadura e
26 mordedura de gatos (Beaman e Sugar, 1983; Sachs, 1992; Bottei et al., 1994).
27 Outras incerteza se encontra no papel no consumo do leite proveniente de
28 vacas com mastite, sendo sugerida a contaminação através deste alimento
29 apenas por Pier et al.(1961).

30 A classificação dos microrganismos do gênero *Nocardia* foi objeto de
31 grande controvérsia entre os taxonomistas. Recentemente, foi sugerida nova
32 classificação do gênero com base em características fenotípicas e moleculares
33 (Kiska et al., 2002; Roth et al., 2003; Conville e Witebsky, 2004). *N. asteroides*,

1 *Nocardia brasiliensis* (*N. brasiliensis*), *Nocardia otitidiscaviarum*
2 (*N. otitidiscaviarum*) e *Nocardia nova* (*N. nova*) são as espécies do gênero
3 *Nocardia* mais patogênicas para humanos e animais domésticos (Acha e
4 Szyfres, 2003; Edwards, 2006; Radostits et al., 2007). Recentemente, a análise
5 genética das linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais e humanos, tem
6 permitido a confirmação da classificação fenotípica, bem como a proposta de
7 novas espécies (Kageyama e Mikami, 2007).

8 Estudos realizados no Brasil constataram certa similaridade entre as
9 espécies de *Nocardia* isoladas de vacas com mastite e de cães com lesões
10 tegumentares, e as espécies do patógeno identificadas em pacientes humanos,
11 com e sem imunossupressão, acometidos pelo microorganismo (Chedid et al.,
12 2007; Ribeiro et al., 2008). Contudo, não existem estudos no país comparando
13 as características genotípicas e/ou de virulência em grande número de
14 linhagens de *Nocardia* sp. isoladas de humanos e animais domésticos (Ribeiro
15 et al., 2008). Certamente que investigações desta natureza poderiam contribuir
16 no esclarecimento da epidemiologia das infecções por *Nocardia* sp. no Brasil, e
17 subsidiar prováveis ações de controle e profilaxia, bem como os riscos em
18 saúde pública da doença.

19 Com efeito, o presente estudo investigou as principais características
20 fenotípicas (caracterização de espécies, morfotintoriais e de microscopia
21 eletrônica), identificação molecular e análise filogenética, a multirresistência
22 aos antimicrobianos e a termorresistência à temperatura de fervura, em
23 linhagens de *Nocardia* sp. isoladas de vacas com mastite, de diferentes
24 afecções em cães e gatos, e de pacientes humanos acometidos por nocardiose
25 no Brasil.

26

27

28

29

30

31

32

33

1 2 REVISÃO DA LITERATURA

2

3 2.1 Taxonomia e propriedades gerais do gênero *Nocardia*

4

5 As espécies de *Nocardia* são bactérias Gram-positivas, sob a forma de
6 cocobacilos ou de filamentos ramificados. São organismos ubíquos,
7 encontrados no solo, terra, vegetais ou na água (Beaman e Beaman, 1994).

8 O isolamento do microrganismo é obtido em aerobiose ou microaerofilia
9 nos meios convencionais de ágar sangue ovino ou bovino que, a partir de 72
10 horas, a 37°C, mostram colônias de um mm de diâmetro. As colônias são
11 ressecadas, convexas, aderidas ao meio, de aspecto pulverulento (“pó de giz”),
12 de tonalidade geralmente branca mas, que com o envelhecimento das culturas,
13 podem assumir tonalidades que variam de branco, amarelo, alaranjado,
14 acastanhado ou róseo, além do enrugamento central das colônias (Brown e
15 McNeil, 2003; Brown-Elliott et al., 2006).

16 No ágar Sabouraud dextrose são observadas entre 3 a 5 dias, em
17 aerobiose a 37°C, mostrando colônias de aspecto circular, úmidas, convexas,
18 nas mesmas tonalidades supracitadas. Outros meios também podem ser
19 utilizados no isolamento como ágar infusão cérebro-coração, ágar nutriente,
20 ágar Sabourad dextrose sem cloranfenicol e ágar Lowenstein-Jensen. Quando
21 os espécimes clínicos provêm de locais demasiadamente contaminados –
22 como micetomas cutâneos fistulizados –, pode-se optar pelo cultivo em meios
23 enriquecidos e suplementados com antimicrobianos, como o Thayer Martin e o
24 Agar BCYE (*Buffered Charcoal Yeast Extract*). Outra forma de se obter a
25 descontaminação é obtida pela diluição do espécime clínico em soluções de
26 baixo pH previamente a semeadura em agar, semelhante à descontaminação
27 recomendada para isolamento de *Mycobacterium* sp. (Vickers et al., 1992;
28 Brown-Elliott, 2006).

29 Após algumas horas de multiplicação nos meios de cultura, o
30 microrganismo sofre o processo denominado de “fragmentação”, modulando-
31 se em organismos filamentosos ou ramificados. O processo de fragmentação,
32 formação de “micélios aéreos” ou “pseudo-hifas” gera o aspecto macroscópico
33 “pulverulento ou aveludado” das colônias. O microrganismo multiplica-se em

1 ampla variedade de temperatura (20 a 45°C), com ideal ao redor de 37°C
2 (Corrêa e Corrêa, 1992; Quinn et al., 1994; Beaman e Beaman, 1994). Nos
3 métodos tintoriais clássicos (Gram, Panótico, Giemsa) os microrganismos do
4 gênero *Nocardia* se apresentam como bactérias Gram–postivas, sob a forma
5 de cocobacilos delicados ou pleomórficos, caracteristicamente ramificados,
6 lembrando “raiz de árvore”. São imóveis, não esporulados, catalase e oxidase–
7 positivos, e parcialmente ácido–resistentes, propriedade que permite a
8 caracterização do gênero utilizando os métodos tintoriais de Kinyoun ou Ziehl–
9 Neelsen modificado (Corrêa e Corrêa, 1992; Quinn et al., 1994). Na coloração
10 modificada de Kinyoun o microorganismo pode apresentar ramificações
11 fracamente álcool–ácido resistentes. Colônia velhas podem apresentar aumento
12 de formas cocobacilares de *Nocardia*, dificultando o diagnóstico por
13 profissionais não familiarizados com a bactéria (Brown-Elliott et al., 2006).

14 A história taxonômica do gênero *Nocardia* possui controvérsias. O
15 organismo foi inicialmente isolado por Edmond Nocard, em 1888, em bovino
16 acometido por linfadenite caseosa. Em 1889, Trevisan caracterizou e nomeou o
17 agente como *Nocardia farcinica*. Posteriormente, Gordon (1974) identificou
18 linhagens do actinomiceto com características fenotípicas similares, que
19 culminaram com a reclassificação como *Nocardia asteroides*. Em 1969,
20 Tsukamura identificou diferenças fenotípicas inclusive dentro do grupo indicado
21 como *N. asteroides*. Gordon, Mihn, Goodfellow e Mishra (1980) desenvolveram
22 várias provas bioquímicas, utilizadas até os dias atuais, que possibilitam a
23 identificação fenotípica de algumas espécies (Brown-Elliott et al., 2006). Essas
24 provas incluíam a observação das colônias, a hidrólise de proteínas, a
25 assimilação de açúcares e cromatografia de frações de parede celular.

26 Há aproximadamente 15 anos, apenas três espécies e um complexo
27 (*N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*, *N. transvalensis* e complexo *N. asteroides*)
28 eram bem definidos utilizando como base da identificação a hidrólise de
29 xantina, hipoxantina, caseína e tirosina, e a utilização de açúcares segundo
30 Goodfellow (Kiska et al., 2002; Brown-McNeil, 2003). Esses meios, geralmente
31 não estão disponíveis comercialmente, são mantidos por três semanas
32 incubados a 25°C-35°C, para permitirem a classificação do microorganismo.

1 A necessidade de estudos de epidemiologia e virulência estimulou maior
2 investimento na determinação das espécies, culminando com a elaboração de
3 “kits” para o diagnóstico fenotípico (Kiska et al., 2002). As provas adicionadas
4 ao diagnóstico fenotípico clássico passíveis de manufatura em laboratório
5 incluem hidrólise da esculina, liquefação de gelatina, opacificação do meio
6 Middlebrook, redução de nitrato, hidrólise da acetamida, presença de
7 arilsulfatase, além da análise do ácido mesodiapimérico e da identificação de
8 mesoquinona (Brown e McNeil, 2003; Winn et al., 2005; Wauters et al., 2005).

9 A termotolerância é outra característica comum a vários actinomicetos,
10 apesar do aumento da temperatura induzir mudanças morfológicas que
11 impedem o crescimento em micélio aéreo, culminando em colônias em forma
12 de “cogumelos” (Erikson, 1955). No entanto, este fenômeno não é deletério
13 para os actinomicetos, o que torna a multiplicação de espécies de *Nocardia* a
14 45°C valiosa em etapas decisivas na classificação bioquímica e como auxílio
15 na identificação molecular (Conville e Witebsky, 2004; Brown-Elliott et al., 2006)

16 Dentre os “kits” estão disponíveis comercialmente para o diagnóstico API
17 ID 32C¹, API Coryne¹, API RapID CB Plus¹, e mais recentemente o API 20C
18 AUX¹, bem como painéis com substratos cromogênicos API ZYM¹, ANA*
19 (Rapid Anaerobe Identification) e HNID* (Haemophilus-Neisseria Identification).
20 Porém, o API 20 C AUX ainda é o “kit” que possui melhor aplicabilidade por
21 incluir espécies mais recentemente identificadas (Biehle et al., 1996; Kiska et
22 al., 2002) [Anexos 1 e 2].

23 Outra forma de classificação descrita por Wallace et al. (1988) classifica
24 as espécies de *Nocardia* em grupos com base no perfil de sensibilidade aos
25 antimicrobianos. Foi constatado que os isolados identificados como *N.*
26 *asteroides* mostravam diferentes padrões de sensibilidade aos diferentes
27 antimicrobianos, sugerindo a divisão dos isolados em seis grupos (Tabela 1)
28 [Beaman e Beaman, 1994].

29
30

¹ API strips™, BioMérieux, Hazelwood, Missouri

* ANA e HNID strips™, Dade MicroSan Inc, West Sacramento, California

1 Tabela 1 – Padrões de sensibilidade aos antimicrobianos em espécies do
 2 gênero *Nocardia*.

| ESPÉCIES | GRUPOS FENOTÍPICOS | ANTIMICROBIANOS |
|---|--------------------|--|
| <i>N. abscessus</i> | I | Resistente a ciprofloxacina e claritromicina |
| Complexo <i>N. brevicatena</i> , <i>N. paucivorans</i> | II | Resistente a gentamicina e claritromicina |
| Complexo <i>N. nova</i> (<i>N. nova</i> , <i>N. veterana</i> , <i>N. africana</i> , <i>N. kruczakiae</i>) | III | Resistente a amoxicilina com ácido clavulânico |
| Complexo <i>N. transvalensis</i> | IV | Resistentes a todos os aminoglicosídeos |
| <i>N. farcinica</i> | V | Resistente a ampicilina e aminoglicosídeos, exceto amicacina |
| <i>N. asteroides</i> | VI | Resistente a ampicilina, amoxicilina com ácido clavulânico e claritromicina |
| <i>N. asteroides tipo VI</i> , <i>N. cyriaciageorgica</i> | VI | Sensível à ampicilina e demais drogas seguem padrão do grupo VI |
| <i>N. brasiliensis</i> | Não se aplica | Sensível à ampicilina e demais drogas seguem padrão do grupo VI |
| <i>N. otitidiscaviarium</i> | Não se aplica | Resistente a ceftriaxona, ampicilina, carbepenicilina, imipenem, amoxicilina com ácido clavulânico |
| <i>N. pseudobrasiliensis</i> | Não se aplica | Resistente a kanamicina, cefamandole, ampicilina, minociclina, amoxicilina com ácido clavulânico |

3 Fonte: Adaptado de Beaman e Beaman, 1994.

4 .

5

6

7

8

1 Com o advento do diagnóstico molecular, várias espécies do gênero
2 *Nocardia* foram renomeadas. Recentemente se reconhece cerca de 70
3 espécies, das quais 25 reportadas em afecções em humanos e em animais.
4 Destas, a espécie mais comumente encontrada em infecções animais é
5 *N. asteroides*, seguido de infecções por *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum*,
6 *N. nova* e *N. farcinica* (Acha e Szyfres, 2003). A partir de 1990, técnicas de
7 biologia molecular foram introduzidas na taxonomia de *Nocardia* sp.,
8 determinando modificações na designação das espécies concomitante à
9 diminuição do tempo dispensado na identificação fenotípica (Brown-Elliott et al.,
10 2006). Inicialmente o diagnóstico molecular pela reação em cadeia pela
11 polimerase (PCR) foi baseado na identificação da fração 16S rRNA.
12 Subsequentemente foi desenvolvida a identificação baseada no polimorfismo
13 dos fragmentos genéticos após clivagem com enzimas de restrição (RFLP),
14 analisando especificamente a fração 16S rDNA, a proteína de choque térmico
15 de 65-kDa (65hsp) e o gen *secA1* (Conville e Witebsky, 2004). Ademais, foram
16 estudados na taxonomia do gênero *Nocardia* o gene *MinI* e a ribotipagem com
17 sondas marcadas de cDNA (Laurent et al., 1996; Laurent et al., 1999).

18 Apesar do aprimoramento destas técnicas muitas espécies ainda não
19 eram passíveis de descrição, fato que levou Roth et al. (2003) a realizarem o
20 sequenciamento molecular completo da porção 16S rRNA, utilizando como
21 base as observações realizadas por Chun e Goodfellow (1995). A análise
22 filogenética usando o sequenciamento dessa fração genômica tem sido
23 aplicada a várias linhagens de *Nocardia* spp. Tem-se observado que a
24 heterogeneidade entre as espécies é baixa, enquanto que, a heterogeneidade
25 intraespécie ocorre com muita frequência, *N. nova* é descrita como uma das
26 espécies com maior variabilidade intraespécie (Roth et al., 2003). Em 2010, o
27 sequenciamento de outro gene trouxe novo avanço em relação ao uso da
28 filogenia na determinação de espécies. Takeda et al. (2010) descreveram a
29 filogenia baseada no sequenciamento do gen *gyrB*, a qual codifica a
30 subunidade *b* da DNA girase, comum na estrutura das bactérias, revelando
31 uma viabilidade discriminatória 3,8 vezes maior na diferenciação entre o gênero
32 *Nocardia* e os demais actinomicetos, e 3,6 vezes maior na diferenciação
33 interespecies em relação ao gene 16S rRNA.

1 2.2 Patogenicidade e virulência

2

3 Os mecanismos de patogenicidade do microorganismo são
4 representados principalmente pela capacidade de evadir e neutralizar os
5 mecanismos de defesa do susceptível. A apresentação clínica de
6 piogranulomas cutâneos e pulmonares em humanos e animais está
7 relacionada, respectivamente, com infecções secundárias às injúrias
8 perfurantes nas quais o microrganismo é inoculado por meio da lesão
9 transcutânea e, ocasionalmente, por inalação de organismos do solo. Lesões
10 secundárias ou disseminadas ocorrem pela migração hematogena ou linfática
11 do agente, podendo se instalar em locais como pleura, mediastino, pericárdio,
12 linfonodos, associado ou não a bacteremia transitória. A imunidade celular
13 constitui o principal mecanismo de resistência ao microrganismo, enquanto a
14 imunidade humoral não parece representar papel crucial na defesa contra a
15 bactéria (Mandell et al., 2000; Saubolle e Sussland, 2003). Grande número de
16 animais infectados apresenta diminuição da imunidade, denotando o
17 comportamento oportunista do microrganismo, embora nem todos os animais
18 infectados mostrem relação direta com fatores imunossupressivos (Bacciarini et
19 al., 1999; Edwards, 2006).

20 Classicamente as infecções por *Nocardia* sp. em humanos e animais
21 induzem a reações do tipo piogranulomatosa. A patogenicidade da bactéria
22 está intimamente relacionada à capacidade de manutenção intracelular em
23 fagócitos (neutrófilos e macrófagos), à inibição do fagolisossomo, e à
24 resistência aos mecanismos enzimáticos de defesa do susceptível, que incluem
25 a viabilidade do agente frente a produtos ácidos e oxidativos. A resistência do
26 microrganismo às defesas dos animais susceptíveis e, conseqüentemente, a
27 virulência das linhagens é creditada, em parte, à presença de ácido micólico,
28 ácido mesodiamopimélico, arabinose, galactose e lipopolisacarídeos presentes
29 na parede bacteriana (Beaman e Beaman, 1994; Corti e Villafaña–Fioti, 2003).

30 Após o ingresso da bactéria nos animais pela pele, por via oral ou
31 respiratória, ocorre a fagocitose ativa do microrganismo por neutrófilos e, mais
32 tardiamente, por macrófagos. Estas células, mediadas por mecanismos
33 humorais e celulares, são responsáveis pela apresentação dos antígenos,

1 incitando a reação de mais células no foco infeccioso. Os neutrófilos e demais
2 polimorfonucleares (PMN) apesar de não inativarem a bactéria, retardam o
3 processo infeccioso até que linfócitos citotóxicos e macrófagos ativados
4 possam combater o agente (Shankar et al., 2005). Tal ineficiência dos PMN
5 provou-se recentemente estar relacionada à presença de catalase, de
6 superóxido dismutase (SOD), de fosfatases e de liberação de substâncias
7 ácidas pelo microorganismo.

8 A composição da parede celular bacteriana interfere na atividade dos
9 macrófagos, estimulando a atividade quimiotática ao promover a migração de
10 células citotóxicas e liberar interleucina 1, embora diminua a capacidade de
11 fagocitose. Demais fatores considerados na virulência bacteriana e que
12 contribuem nesse mecanismo incluem a presença do fator corda, do ácido
13 tuberculoesteárico, e a manutenção intracitoplasmática do organismo em
14 fagócitos (Beaman e Beaman, 1994; Shankar et al., 2005). O conjunto destes
15 fatores culmina com reação tipo piogranulomatosa, decorridas duas a três
16 semanas de infecção. Este tipo especial de processo inflamatório é constituído
17 por arcabouço celular típico, contendo o microorganismo no interior da lesão –
18 livre ou no interior do citoplasma de fagócitos – imerso em grande quantidade
19 de *caseum*, circundado por células epitelióides, grande número de neutrófilos,
20 macrófagos e, eventualmente, células gigantes. Secundariamente, o
21 piogranuloma apresenta contingente variável de outras células como linfócitos
22 e plasmócitos, delimitado externamente por cápsula fibrosa (Shankar et al.,
23 2005). A arquitetura clássica dos piogranulomas é característica de infecções
24 causadas por microrganismos refratários – como os actinomicetos –, cuja
25 resposta tecidual visa circundar o microorganismo em contingente celular
26 delimitado por cápsula fibrosa, com vistas a impedir a disseminação sistêmica
27 ou por contigüidade do agente (Corrêa e Corrêa, 1992; Radostits et al., 2007).

28 O microorganismo pode então ficar restrito ao local de infecção ou,
29 ocasionalmente, evadir para órgãos adjacentes por contigüidade ou via linfo-
30 hemática, e se disseminar para outros órgãos parenquimatosos (Corrêa e
31 Corrêa, 1992).

32 A presença do piogranuloma dificulta a ação de antimicrobianos
33 convencionais, que não atingem concentrações terapêuticas no interior do foco

1 infeccioso, ou mesmo apresentam dificuldade de ação na presença do
2 conteúdo purulento (Ribeiro et al., 2008).

3

4 **2.3 Nocardiose nos animais**

5

6 Em mamíferos a infecção natural por *Nocardia* foi reportada em
7 canídeos, felídeos, bovinos, suínos, eqüinos, ovinos, cervídeos e cetáceos,
8 além do relato da doença em aves e peixes (Pier et al., 1970; Corrêa e Corrêa,
9 1992; Bacciarini et al., 1999).

10 Não existem vetores tampouco transmissores especiais na transmissão
11 do microorganismo em animais domésticos, visto que o agente está
12 amplamente distribuído no ambiente (Beaman e Beaman, 1994).

13 Nos animais domésticos a nocardiose historicamente foi considerada
14 uma doença com baixa freqüência. No entanto, nas duas últimas décadas tem-
15 se notado na literatura especializada o aumento do número de notificações,
16 particularmente em animais de companhia e na mastite bovina, tanto em
17 animais hígidos como com algum grau de debilidade orgânica (Ribeiro et al.,
18 2008).

19

20 2.3.1 Nocardiose em animais de companhia

21

22 *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. otitidiscaviarum* e *N. nova* são as
23 principais espécies do gênero que acometem os animais de companhia
24 (Edwards, 2006). No Brasil, são escassas as investigações visando o
25 envolvimento das afecções provocadas pelo gênero *Nocardia* em cães e gatos.
26 A maioria das descrições está restrita ao relato individual de casos (Ribeiro et
27 al., 2002).

28 A primeira notificação de nocardiose canina no país ocorreu na Bahia,
29 em animal com grave afecção pulmonar (Correa et al., 1973).
30 Subsequentemente foi reportada nocardiose em cão coinfectado com o vírus
31 da cinomose no estado de São Paulo, no qual foi ressaltada a gravidade da
32 infecção pulmonar e a refratariedade à terapia, assim como a disseminação
33 hepática e esplênica do microorganismo (Corrêa et al., 1973).

1 Nos animais de companhia, a nocardiose apresenta maior frequência em
2 cães machos, abaixo de dois anos de idade. Nos EUA, estudo clínico–
3 epidemiológico de 53 casos de nocardiose em cães revelou que a doença foi
4 três vezes mais freqüente em machos que em fêmeas, dos quais 65,4% e
5 82,7%, respectivamente, com menos de um e dois anos de idade (Beaman e
6 Sugar, 1983).

7 A transmissão da nocardiose em cães e gatos ocorre principalmente por
8 via transcutânea, decorrente da penetração de corpos estranhos, vulnerações
9 ou traumatismos cutâneos, especialmente nos períodos de reprodução. Em
10 felinos domésticos, a transmissão do patógeno está relacionada às disputas
11 por fêmeas ou pelo território. A inalação de aerossóis também deve ser
12 considerada na cadeia epidemiológica da doença em cães e gatos,
13 particularmente em ambientes contaminados e excessivamente secos. Outra
14 forma aventada de transmissão seria representada pela via digestória, que
15 parece representar maior importância para animais de produção (Corrêa et al.,
16 1973; Edwards, 2006). À semelhança do que ocorre com os humanos, as
17 infecções por *Nocardia* sp. em animais de companhia também estão
18 relacionadas às doenças imunossupressivas, notadamente a cinomose em
19 cães e as retroviroses (imunodeficiência e leucemia) dos felinos (Malik et al.,
20 2006). O estado de debilidade orgânica determinado por estas doenças
21 favorece o comportamento oportunista do microrganismo, determinando casos
22 graves de nocardiose, geralmente com prognóstico reservado (Fawi et al.,
23 1971; Scott et al., 2001; Edwards, 2006).

24 Caracteristicamente, as afecções por *Nocardia* sp. nos cães e gatos são
25 manifestadas por lesões tegumentares (abscessos, micetomas), tendendo à
26 fistulização, acompanhadas por linfadenite e linfangite regional, febre, anorexia
27 e emagrecimento. As principais complicações da enfermidade resultam da
28 disseminação do microrganismo da pele e linfonodos para órgãos
29 parenquimatosos (Scott et al., 2001; Edwards, 2006). Estudo recente no Brasil
30 com nove linhagens isoladas de cães com nocardiose assinalou *N. asteroides*,
31 *N. otitidiscaviarum* e *N. nova* como as principais espécies da bactéria, isoladas
32 de animais jovens com lesões predominantemente na pele, em região cervical,
33 coinfectados com o vírus da cinomose (Ribeiro et al., 2008).

1 Apesar da maior frequência de sinais clínicos em animais de companhia
2 ser representada pelas lesões cutâneas e pneumonia, ocasionalmente o
3 microrganismo pode se disseminar para fígado, baço, rim, linfonodos internos,
4 ossos, articulações e sistema nervoso central (Beaman e Beaman, 1994;
5 Edwards, 2006). Quando há envolvimento pulmonar são observados sinais de
6 hemoptise, dispnéia, colapso respiratório, hipertermia, anorexia, apatia e
7 descarga nasal mucopurulenta. A auscultação pulmonar revela aumento de
8 murmúrio vesicular ou áreas de silêncio devido a presença de empiema.
9 Exames radiográficos torácicos mostram áreas pulmonares radiopacas, com
10 padrão bronco-intersticial ou broncoalveolar, aliada a consolidação lobular,
11 efusão e linfadenopatia hilar (Kirpensteijn e Fingland, 1992). A disseminação de
12 *Nocardia* sp. para o sistema nervoso central determina meningoencefalite
13 piogranulomatosa e ventriculite – que bloqueiam o aqueduto mesencefálico –,
14 com conseqüente acúmulo de líquido cefalorraquidiano, determinando
15 hidrocefalia. Raramente o agente acomete ossos e articulações. Nestes casos,
16 os animais apresentam lise óssea, reação periosteal e remodelação (Bross e
17 Gordon, 1991; Edwards, 2006).

18 O diagnóstico de rotina da nocardiose em animais de companhia é
19 realizado aliando os achados clínico–epidemiológicos, exames microbiológicos
20 e citológicos (Edwards, 2006). Exames hematológicos revelam leucocitose por
21 neutrofilia com desvio a esquerda, monocitose e discreta anemia (Kirpensteijn
22 e Fingland, 1992; Ribeiro et al., 2002).

23 Diferentes autores têm recomendado o uso da citologia aspirativa com
24 agulha fina como método adicional na rotina diagnóstica da nocardiose em
25 cães e gatos. O método mostra–se de fácil execução, de baixo custo e
26 acessível, que propicia diagnóstico presuntivo em curto espaço de tempo
27 (Kirpensteijn e Fingland, 1992; Scott et al., 2001; Edwards, 2006), além de
28 permitir o isolamento da bactéria do material aspirado (Ribeiro et al., 2002,
29 2008). Contudo, recomenda–se que o diagnóstico definitivo seja firmado com
30 base no isolamento do microrganismo, em virtude da similaridade à
31 microscopia e das manifestações clínicas do gênero *Nocardia* com outros
32 actinomicetos, especialmente com o gênero *Actinomyces* (Kirpensteijn e
33 Fingland, 1992).

1 A avaliação retrospectiva de 48 cães com lesões cutâneas e/ou
2 pulmonares sugestivas de nocardiose ou actinomicose, revelaram o predomínio
3 do comprometimento da região cervico-facial cutânea. Nessas lesões cutâneas
4 o diagnóstico foi confirmado por cultura microbiológica e citologia do material
5 aspirado das lesões (Kirpensteijn e Fingland, 1992).

6 O diagnóstico da nocardiose em dez cães no Brasil infectados por
7 *N. asteroides*, coinfectados com o vírus da cinomose, foi realizado pela
8 citologia e cultura microbiológica do material aspirado de linfonodos, oriundo de
9 lesões cutâneas e de pulmão. As lesões foram observadas principalmente nas
10 regiões cervicofacial e inguinal. Somente em um dos cães o microrganismo foi
11 isolado do pulmão (Ribeiro et al., 2002).

12 O tratamento da nocardiose em cães e gatos apresenta prognóstico
13 incerto, visto que poucos antimicrobianos atingem concentrações terapêuticas
14 no interior dos focos piogranulomatosos. A localização intracelular da bactéria
15 também dificulta a eficácia terapêutica dos fármacos convencionais (Edwards,
16 2006). Recomenda-se o uso de associações de antimicrobianos por período
17 prolongado, aliado à antissepsia e debridação cirúrgica de feridas,
18 notadamente em lesões cutâneas e osteomielite (Ackerman et al., 1982;
19 Bradney et al., 1985). O sucesso no tratamento de empiema em gato com
20 nocardiose foi reportado em 1975 por Campbell e Scott. Em contraste,
21 Ackerman et al. (1982) relataram o insucesso da terapia de sete casos de
22 nocardiose nos EUA. Ribeiro et al. (2002) no Brasil também observaram baixa
23 efetividade da terapia em dez cães com nocardiose coinfectados com o vírus
24 da cinomose.

25 Linhagens de *Nocardia* sp. isoladas de animais domésticos mostram
26 ampla variação de sensibilidade “in vitro” aos antimicrobianos. Sulfonamidas
27 combinada com trimetoprim, aminoglicosídeos e cefalosporinas são os grupos
28 de antimicrobianos mais efetivos “in vitro” em isolados do gênero *Nocardia*
29 obtidos de animais. Estudo “in vitro” do perfil de sensibilidade microbiana de 19
30 linhagens de *Nocardia* spp. isoladas de vacas com mastite e nove de afecções
31 em cães no Brasil, também mostrou maior eficácia da amicacina, ceftiofur,
32 gentamicina, sulfa/trimetoprim. No mesmo estudo, a despeito do uso do

1 tratamento nos cães ter sido instituído com o respaldo do antibiograma, cinco
2 dos animais evoluíram ao óbito (Ribeiro et al., 2008).

3 Resistência múltipla em linhagens de *Nocardia* isoladas de animais tem
4 sido observada frente aos derivados do grupo beta-lactâmicos,
5 fluorquinolonas, macrolídeos e certos aminoglicosídeos (Glupczynski et al.,
6 2006; Edwards, 2006). Estes achados reforçam para a complexidade da terapia
7 na nocardiose em animais, e reiteram para a necessidade de realização de
8 testes de sensibilidade microbiana “in vitro” previamente à instituição de
9 protocolos terapêuticos em animais domésticos (Ribeiro et al., 2008).

10 Em estudo realizado nos EUA utilizando sete cães com nocardiose
11 apresentando lesões cutâneas, pneumonia, encefalite, osteomielite e/ou artrite,
12 o tratamento logrou êxito somente em um animal (Ackerman et al., 1982). No
13 Brasil, a infecção por *N. asteroides* em 10 cães mostrou que ceftiofur (100,0%),
14 gentamicina (88,9%) e amicacina (85,7%) foram os antimicrobianos mais
15 efetivos “in vitro” frente aos isolados de *N. asteroides*. No entanto, dos dez
16 animais, nove vieram a óbito mesmo com a pronta instituição do tratamento,
17 com base em testes de sensibilidade microbiana (Ribeiro et al., 2002).

18 A evolução da doença em cães e gatos pode ser aguda ou crônica,
19 levando ao óbito poucas semanas após o início dos sinais clínicos. O
20 prognóstico é desfavorável em animais acometidos por doenças de base
21 imunossupressivas (Edwards, 2006).

22 Nos felinos domésticos, os casos são similares aos observados em
23 cães, embora com menor prevalência. Entretanto, nesta espécie, a forma
24 cutânea com formação de micetomas é a mais comum comparativamente aos
25 cães. Nos felinos há grande ocorrência de lesões em extremidade dos
26 membros e regiões inguinal e cervical ventral. A disseminação da bactéria em
27 gatos determina quadros severos de pleurite, peritonite e piotórax (Hattori et al,
28 2003; Malik et al., 2006; Ramos-Vara et al., 2007).

29 Malik et al. (2006) apresentou uma revisão de 17 casos de nocardiose
30 em felinos na Austrália causados principalmente por *N. nova*, com lesões
31 predominantemente cutâneas, com progressão para o quadro sistêmico. Em
32 geral, eram animais imunocompetentes, embora número considerável dos
33 animais estivessem imunossuprimidos, que incluíam um transplantado renal,

1 três submetidos à terapia prolongada com corticóides e três acometidos pelo
2 vírus da imunodeficiência felina.

3 O prognóstico da nocardiose em pequenos animais é reservado e não
4 existem medidas específicas recomendadas para o controle da doença
5 (Edwards, 2006).

6

7 2.3.2 Nocardiose em animais de produção

8

9 As infecções por *Nocardia* spp. em animais de produção são
10 diagnosticadas geralmente sob a forma de micetomas, linfadenite, inflamações
11 mamárias, cutâneas e pulmonares (Radostits et al., 2007).

12 Nestas espécies de interesse zootécnico, a doença provoca igualmente
13 lesões piogranulomatosas, com tendência ao desenvolvimento de processos
14 crônicos, de difícil resolução tecidual, refratários à terapia com antimicrobianos
15 convencionais (Beaman e Beaman, 1994).

16 A infecção da glândula mamária é a principal forma de apresentação
17 clínica da nocardiose em animais de produção (Radostits et al., 2007). A
18 mastite – definida como infecção da glândula mamária –, representa o principal
19 entrave na criação de animais de exploração de leite, em virtude dos prejuízos
20 com a queda na produção, agravos ao tecido mamário, depreciação dos
21 constituintes do produto, gastos com medicamentos e honorários veterinários,
22 descarte prematuro de fêmeas e morte ocasional de animais (Zafalon et al.,
23 2005; Ribeiro et al., 2008). *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova* e *N. brasiliensis*
24 são reconhecidas com as principais espécies do patógeno na casuística de
25 mastite em ruminantes domésticos (Radostits et al., 2007).

26 A nocardiose mamária em bovinos tem sido motivo de crescente número
27 de registros no Brasil (Costa et al., 1996b; Costa et al., 1998; Ribeiro et al.,
28 2008) e em outros países (Tarabla et al., 1993; Brown et al., 2007; Pisoni et al.,
29 2008; Radostits et al., 2007). No entanto, são escassos os estudos no país
30 envolvendo grande número de estirpes, ou mesmo voltados à caracterização
31 genotípica e de virulência dos isolados (Ribeiro et al., 2008). À semelhança
32 dos cães e gatos, as descrições da nocardiose em vacas são pontuais, restritas
33 a relatos ou número reduzido de animais (Ribeiro et al., 2002).

1 *Nocardia* sp. são microrganismos classificados com ambientais na
2 casuística da mastite em animais domésticos. Este grupo de microrganismos
3 de habitat telúrico promove a infecção da glândula mamária principalmente a
4 partir do ambiente contaminado das entre-ordenhas, em propriedades que
5 apresentam deficiências de higiene no momento da ordenha, acúmulo de
6 material fecal, contaminação da água utilizada na sala de ordenha, em
7 soluções de pré e pós-dipping, ou mesmo secundária à contaminação de
8 cânulas no momento da terapia intramamária (Santos e Fonseca, 2007; Ribeiro
9 et al., 2008).

10 No Brasil, a nocardiose mamária bovina tem sido notificada de maneira
11 crescente na última década, notando-se nestes registros ênfase à
12 refratariedade do agente à terapia, a gravidade das lesões nos animais e a
13 capacidade de disseminação intra-rebanho. Nestes estudos tem-se observado
14 também preocupação em investigar a epidemiologia da nocardiose mamária,
15 com vistas a subsidiar ações de controle e profilaxia (Costa et al., 1996b; Costa
16 et al., 1998). Neste contexto, foi investigada a etiologia e características
17 epidemiológicas da nocardiose em animais de produção no Brasil, revelando o
18 isolamento de 24 linhagens de *N. asteroides* e duas *N. brasiliensis* obtidas, em
19 sua grande maioria, do leite de vacas com mastite (Costa et al., 1987). O leite
20 de 20.310 quartos mamários oriundos de 5.216 vacas submetido ao exame
21 microbiológico acusou o isolamento de *Nocardia* sp. em 6,6% dos isolados
22 (Costa et al., 1998). Estudo similar avaliando a etiologia da mastite bovina em
23 91 vacas em lactação e 47 secas revelou o isolamento de *Nocardia* spp em
24 4,55% e 2,15%, respectivamente, em animais em lactação e no período seco
25 (Costa et al., 1996b). Estudo subsequente conduzido pelo mesmo grupo de
26 pesquisadores alertou para o aumento da incidência de mastite por agentes
27 ambientais no Brasil, incluindo *Nocardia* sp. (Costa et al. 1996a).
28 Recentemente, Ribeiro et al. (2008) descreveram pioneiramente mastite bovina
29 por *N. otitidiscaviarum* em vacas do estado de São Paulo, que, aliado a
30 *N. asteroides*, foram às espécies mais freqüentes nos animais.

31 Na espécie caprina a nocardiose mamária ainda é incomum. Em outros
32 países (Bassam et al., 1997; Hamid et al., 2007) e no Brasil (Megid et al.,

1 1990), as manifestações clínicas da nocardiose mamária em cabras são
2 semelhantes às vacas.

3 A nocardiose mamária geralmente é manifestada sob a forma de mastite
4 clínica, aguda ou predominantemente crônica, com formação de abscessos e
5 nódulos, tendendo à fistulização (Santos e Fonseca, 2007).

6 *Nocardia* spp. determina reações piogranulomatosas com destruição do
7 parênquima mamário e redução da capacidade funcional glandular.
8 Comumente se observa baixa efetividade do tratamento intramamário, que
9 poderia ser creditado, em parte, à instituição da terapia sem o respaldo do
10 antibiograma, à dificuldade dos fármacos em atingirem concentrações
11 terapêuticas no interior do piogranuloma, ou mesmo a refratariedade do
12 microrganismo aos antimicrobianos convencionais (Radostits et al., 2007).

13 O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” de 19 linhagens de
14 *N. asteroides*, *N. otitidiscaviarum*, *N. nova* e *N. farcinica* isoladas de casos de
15 mastite bovina, clínica e subclínica, foi investigado no Brasil. Resistência
16 múltipla dos isolados a três ou mais e a cinco ou mais antimicrobianos foi
17 observada em, respectivamente 35,7% e 10,7%, em particular com o uso de
18 cloxacilina, cefoperazone e ampicilina. Curiosamente, estes princípios ativos de
19 antimicrobianos compõem os principais anti-mastíticos comercializados no
20 país para a terapia da mastite bovina, fato que reforça a importância de
21 estudos continuados do perfil de sensibilidade de linhagens de *Nocardia* sp
22 isoladas de animais com mastite (Ribeiro et al., 2008).

23 Em virtude da baixa eficácia dos tratamentos na nocardiose mamária,
24 recomenda-se a terapia somente com o respaldo do antibiograma. Nos animais
25 não responsivos ao tratamento, se recomenda a secagem do animal, a ablação
26 química dos tetos, ou mesmo o descarte da fêmea. Paralelamente, devem ser
27 instituídos ou adequados procedimentos de profilaxia e controle para mastite
28 de origem ambiental em propriedades rurais de exploração leiteira, quais
29 sejam: retirada do excesso de matéria orgânica do ambiente das entre-
30 ordenhas, orientação quanto à ordenha higiênica dos animais, cloragem da
31 água de sala de ordenha, limpeza e troca diária da solução anti-séptica dos
32 recipientes de pré e pós-dipping, oferecimento de alimento na pós-ordenha,
33 além de estimular a realização periódica de testes diagnósticos como prova de

1 Tamis, Califórnia Mastitis Test (CMT), contagem de células somáticas e cultivo
2 microbiológico do leite (Santos e Fonseca, 2007; Ribeiro et al., 2008).

3 A infecção pelo gênero *Nocardia* em outros animais de produção tem
4 sido registrada de forma infreqüente na literatura (Radostits et al., 2007). A
5 linfangite bovina por *Nocardia* sp se caracteriza pela formação de abscessos
6 em articulações e nódulos linfáticos em região da cabeça, peri-auricular, pré-
7 escapular, pré-crural e ao longo da mandíbula (Beaman e Sugar, 1983).
8 Revisão realizada por Shigidi et al. (1981) descreveu o isolamento de 21
9 linhagens de *N. asteroides* em casos de linfangite no Sudão. Outra forma rara
10 da doença é o abortamento na espécie bovina, com relato recente no Kansas,
11 caracterizada genotipicamente a espécie *N. farcinica* como agente causal
12 (Bawa et al., 2010).

13 No Brasil, *N. asteroides* foi descrita em piogranuloma mandibular em
14 equino (Corrêa et al., 1979), na linfadenite em suínos (Gottschalk et al., 1971) e
15 em bovino (Corrêa e Corrêa, 1980). Nocardiose nodular em músculo de bovino
16 e em linfonodo de suíno foram identificadas na linha de abate (Benites et al.,
17 2005).

18 Em equinos, a nocardiose também é considerada incomum. Em revisão
19 abrangendo 18 anos de atendimento clínico em Hospital Veterinário na
20 Califórnia, foram relatados 16 casos manifestando principalmente pneumonia
21 de curso severo em animais imunossuprimidos, com posterior disseminação da
22 doença e óbito na maioria dos equinos. Os sinais clínicos podem variar desde
23 tosse intermitente até incapacidade para realização de exercícios, febre,
24 intensa secreção mucopurulenta, narinas diltadas e dispnéia expiratória
25 acentuada a exemplo dos sinais encontrados em relato no Brasil por Olivo et
26 al., 2010. À necropsia dos animais foram observados pleurite e nodulações ao
27 longo de parênquima pulmonar (Biberstein et al., 1985). O abortamento
28 secundário a nocardiose foi descrito em suínos e bovinos. Éguas que
29 abortaram após infecção por *Nocardia* sp, mostraram córion com alteração de
30 pigmentação e o feto com microorganismos ramificados em fígado e pulmões
31 (Arguedas, 2007). No Brasil há descrição recente de isolamento de *Nocardia*
32 sp. de pulmão, secundária à imunossupressão por obstrução respiratória das

1 vias aéreas superiores, com recuperação do animal após tratamento com
2 sulfonamida (Olivo et al., 2010).

3

4 **2.4 Aspectos de Saúde Pública**

5

6 A nocardiose em humanos é reconhecida como doença oportunista, que
7 acomete indivíduos hígidos ou imunossuprimidos, causada principalmente por
8 *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. nova* e, recentemente, *N.*
9 *otitidiscaviarum* (Acha e Szyfres, 2003; Corti e Villafañe-Fioti, 2003; Tan et al.,
10 2009; Tremblay et al., 2010).

11 A real ocorrência das infecções por *Nocardia* sp em humanos
12 provavelmente não é conhecida ou sub-diagnosticada, visto que não se trata
13 de doença de notificação compulsória e o microrganismo possui similaridades
14 nas manifestações clínicas determinadas por outros actinomicetos (Acha e
15 Szyfres, 2003; Shankar et al., 2005). Em anos recentes, diversos países têm a
16 apontado como doença emergente para os humanos (Acha e Szyfres, 2003;
17 Corti e Villafañe-Fioti, 2003), incluindo o Brasil (Chedid et al., 2007).

18 A doença está intimamente relacionada a determinados grupos de risco
19 ou de vulnerabilidade, que compreendem indivíduos com doenças de base
20 imunossupressivas, incluindo acometidos por neoplasias (linfoma,
21 linfosarcoma), cirrose, diabetes, hepatopatias, tuberculose, tratados por
22 períodos prolongados com drogas imunossupressoras (transplantados) e
23 pacientes com comportamento de risco, como dependentes químicos (Acha e
24 Szyfres, 2003; Corti e Villafañe-Fioti, 2003). Nas últimas décadas assume
25 grande preocupação por parte da comunidade médica a ocorrência de
26 nocardiose em pacientes co-infectados com o vírus da Aids (Mandell et al.,
27 2000 ; Saubolle e Sussland, 2003; Conville e Witebsky, 2004; Agterof et al.,
28 2007; Tan et al., 2009; Tremblay et al., 2010).

29 Estima-se que 39,4 milhões de pessoas convivam atualmente com a
30 Aids em todo o mundo. No ano de 2004, a doença determinou 3,1 milhões de
31 óbitos, com expectativa de 4,9 milhões de novos casos/ano. Na América
32 Latina, ao redor de 1,7 milhões de indivíduos são soropositivos - dos quais
33 95.000 evoluíram para óbito - com estimativa de 240.000 novos casos/ano

1 (Who, 2005). No Brasil, o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
2 registrou que, entre 1980 e 2004, ocorreram 362.364 casos de Aids
3 oficialmente notificados, dos quais 8.763 na região norte, 34.424 na região
4 nordeste, 63.519 na região sul, 20.248 na região centro-oeste e 235.410 na
5 região sudeste. A doença vitimou 28.609 pessoas, das quais 23.561 na região
6 sudeste, que figura com a região mais prevalente do território nacional. Nota-
7 se, de forma preocupante, a tendência de progressão da doença no Brasil,
8 apesar dos esforços do Ministério da Saúde em conter a doença (Brasil,
9 2005a,b). O avanço no número de pessoas infectadas reflete-se certamente no
10 aumento de doenças reconhecidas como emergentes e re-emergentes –
11 notadamente causadas por agentes oportunistas – como a nocardiose.

12 Contudo, nos EUA, 384 dentre 1000 casos de nocardiose humana foram
13 descritos em indivíduos sem histórico de imunossupressão, fato que configura
14 a nocardiose também como doença primária para os humanos (Beaman e
15 Beaman, 1994). Em revisões de casos humanos tem-se observado maior
16 ocorrência em pacientes do sexo masculino, entre 35 a 40 anos, embora os
17 fatores epidemiológicos que determinem tal predisposição etária não estejam
18 completamente elucidados (Chedid et al., 2007).

19 A transmissão para os humanos ocorre principalmente pela inalação da
20 bactéria em ambientes contaminados, secos, que favorecem a aerossolização.
21 Secundariamente, traumatismos com fômites contaminados também devem ser
22 considerados dentre as vias de transmissão. Os gatos e cães têm recebido
23 atenção especial em virtude da transmissão do microorganismo para os
24 humanos, decorrente principalmente de mordeduras e arranhaduras. Até o
25 momento, não existem descrições de transmissão da nocardiose entre
26 humanos (Beaman e Beaman, 1994; Acha e Szyfres, 2003). A via digestória
27 também deve ser levada em consideração na cadeia epidemiológica de
28 transmissão da nocardiose para os humanos (Pier e Enright, 1961). Desta
29 modo, assume importância o consumo de leite e derivados de bovinos
30 infectados via mamária (Costa et al., 1996a).

31 *N. asteroides*, *N. brasiliensis*, *N. farcinica*, *N. otitidiscaviarum* e *N. nova*
32 são as principais espécies do gênero descritas na nocardiose em humanos
33 (Acha e Szyfres, 2003; Corti e Villafañe-Fioti, 2003), incluindo o Brasil (Chedid

1 et al, 2007). Interessantemente, estas espécies também figuram dentre as mais
2 patogênicas para animais de produção e de companhia (Lerner, 1996;
3 Edwards, 2006; Radostits et al., 2007). No entanto, a real participação dos
4 animais de companhia e de produção na cadeia epidemiológica de transmissão
5 da nocardiose não está completamente esclarecida. Nos primórdios de
6 descrição do microrganismo por grandes tratadistas, a nocardiose para os
7 humanos era considerada doença infecciosa, em virtude do habitat telúrico do
8 microrganismo. Na última década, várias descrições de nocardiose em
9 pacientes humanos transmitidas por lesões de pele foram determinadas por
10 arranhaduras ou mordeduras de felinos (Sachs, 1992; Bottei et al., 1994; Scott
11 et al., 2001; Luque et al., 2002), conotando assim, comportamento também de
12 ordem infecto-contagiosa do microrganismo, reforçando o impacto no contexto
13 de saúde pública.

14 Clinicamente, as manifestações da nocardiose em humanos são
15 semelhantes às afecções nos animais. Pneumonia, encefalite, linfadenite,
16 linfangite e lesões em tecido cutâneo e/ou subcutâneo (micetomas) são os
17 principais sinais observados nos humanos (Saubolle e Sussland, 2003). O
18 quadro pulmonar determina a formação de abscessos ou piogranulomas, com
19 inflamação peribronquial, determinando tosse, dispnéia, febre, inapetência,
20 emagrecimento, secreção nasal e orofaríngea mucopurulenta. O organismo
21 pode ficar restrito ao tecido cutâneo ou linfonodos. Ocasionalmente, via
22 aerógena ou hemo-linfática, pode disseminar-se para outros órgãos
23 parequimatosos, determinando quadros severos em encéfalo, coração,
24 articulações, fígado e rins (Corti e Villafañe-Fioti, 2003; Acha e Szyfres, 2003;
25 Brown e Mcneil, 2003). As lesões cutâneas podem evoluir para celulite,
26 nodulações eritematosas ou supurativas de consistência endurecida – dolorosas
27 à palpação – linfadenite regional, com drenagem de material sero-
28 sanguinolento a purulento. Quadros de encefalite por *Nocardia* sp. provocam
29 dores de cabeça, vômito, letargia e estado comatoso (Bross e Gordon, 1981).

30 No Brasil os micetomas e pneumonia são as apresentações clínicas
31 mais freqüentes da nocardiose em humanos (Petrillo et al., 1978; Chedid et al.,
32 2007). Micetoma severo por *N. asteroides* foi descrito em criança de nove anos
33 que, em virtude da gravidade do caso, foi necessário a amputação do membro

1 (Saraça et al., 1993). Investigação clínico epidemiológica de 41 casos de
2 micetoma na cidade de São Paulo, revelou a participação de actinomicetos em
3 68% dos pacientes, dos quais *N. brasiliensis* foi isolada de 13 indivíduos
4 (Castro et al., 1993). Em 71 pacientes que vieram a óbito decorrentes de
5 complicações de transplantes renais, *Nocardia* sp foi isolada em 10,6% da
6 casuística (Reis et al., 1995). Estudo retrospectivo de 22 casos de nocardiose
7 em Porto Alegre, RS, entre 1977 a 1998, revelou que sete casos foram
8 causados por *N. asteroides*, um por *N. brasiliensis* e 14 por *Nocardia* sp.,
9 predominantemente (17 casos) em pacientes imunossuprimidos (Chedid et al.,
10 2007).

11 O tratamento da nocardiose utiliza, basicamente, os mesmos princípios
12 ativos de antimicrobianos utilizados em animais. A terapia é prolongada e o
13 sucesso terapêutico depende principalmente da espécie bacteriana, órgãos
14 acometidos, tempo de evolução e higidez do susceptível. Nos casos de
15 disseminação sistêmica o prognóstico é reservado (Acha e Szyfres, 2003).

16 Dentre as possíveis via de contaminação em humanos levanta-se a
17 possibilidade do leite representar uma via de contaminação (Pier et al., 1961).
18 O leite é considerado alimento ricamente nutritivo. No entanto, esta
19 característica possibilita a proliferação de microrganismo patogênicos, além de
20 poder veicular agentes de toxiiinfecção alimentar (Furlanetto et al., 2009).

21 Nos últimos anos, tem-se observado o aumento do número de casos de
22 infecção mamária bovina por *Nocardia* sp. no Brasil (Costa et al., 1987; Costa
23 et al., 1998; Costa et al., 1996a,b). O leite, portanto, pode ser considerado uma
24 fonte importante de veiculação do microrganismo. Neste contexto, torna-se
25 relevante, a exemplo de diversos experimentos com *Mycobacterium bovis*,
26 estudar a eficácia de diferentes tratamentos térmicos para o gênero *Nocardia* e
27 alertar a população quanto ao consumo de leite cru, visto que o microrganismo
28 possui potencial de risco à saúde pública (Pier e Enright, 1961).

29 Muitos microrganismos podem ser destruídos termicamente. No entanto,
30 existem bactérias termodúricas ou formadoras de esporos altamente
31 resistentes ao calor, que permanecem viáveis no leite após o processamento
32 térmico (Ribeiro, 2009). Para garantir a segurança alimentar da população faz-
33 se imprescindível tratar termicamente o leite e a maioria de seus derivados

1 (Furlanetto et al., 2009). Porém estima-se que 30% da produção do leite
2 nacional, seja comercializado de maneira “informal”. Soma-se a este fato, a
3 crença popular de que o leite cru é mais “saudável e natural” (Nero et al.,
4 2003), aumentando os riscos de veiculação de bactérias patogênicas pelo
5 consumo do produto e derivados sem fiscalização e ou tratamento térmico.

6 A introdução do leite pasteurizado no início do século constituiu um
7 avanço em segurança alimentar. Compreende-se por pasteurização, segundo a
8 legislação brasileira, o emprego de calor com fim de destruir totalmente os
9 microorganismos patogênicos sem alterar seus elementos bioquímicos e
10 propriedades organolépticas (Brasil, 1952). O processo consiste no
11 aquecimento do leite entre 62°C e 65°C por 30 minutos (pasteurização lenta),
12 ou entre 72 e 75°C por 15 a 20 segundos (rápida). Estes binômios foram
13 estabelecidos com base na resistência térmica do gênero *Mycobacterium* spp.
14 e da *Coxiella burnetti*. Além do tempo e temperatura, fatores como carga
15 bacteriana inicial e final, pH, proteínas e gordura também afetam a inativação
16 dos microorganismos pelo efeito térmico (Ribeiro, 2009).

17 Apesar dos parâmetros tempo e temperatura da pasteurização serem
18 baseados em bactérias patogênicas termorresistentes, também são conhecidos
19 microrganismos como a espécie *Nocardia sevivovans*, que se mantem viáveis
20 quando submetidos a temperatura de 60 e 80 °C, por até dois minutos (Erikson,
21 1955). Este fato pode ser creditado à composição estrutural lípida da parede
22 bacteriana, a capacidade de agregar alta celularidade em seu entorno e a
23 secreção de metabólitos bacterianos que propiciam isolamento físico do
24 patógeno, como os biofilmes (Ribeiro, 2009).

25 Neste contexto, foi investigado experimentalmente a termorresistência
26 de oito linhagens de *N. asteroides*, isoladas do leite de vacas, ao binômio
27 tempo/temperatura empregado nos processos de pasteurização lenta (65°C/30
28 minutos) e rápida (75°C/20 segundos). Todas as oito linhagens foram
29 resistentes à pasteurização lenta e sete a pasteurização rápida, alertando para
30 a termotolerância “in vitro” do microrganismo aos procedimentos de
31 pasteurização, e os riscos da transmissão da bactéria pelo leite, mesmo em
32 produtos submetidos a tratamento térmico (Costa et al., 1996a), visto que os

1 actinomicetos são considerados microrganismos termodúricos, que se
2 multiplicam em altas temperaturas (Robinson et al., 2000).

3 Além da preocupação em relação ao leite cru ou “informal”, deve-se
4 considerar que também podem ocorrer falhas no tratamento térmico da
5 pasteurização. Moraes et al. (2000) sugerem ainda que o leite pasteurizado
6 deveria submetido à fervura simples, para minimizar os riscos da presença de
7 patógenos no leite, visto que a população ainda consome leite pasteurizado
8 tipo C.

9 Ainda que a fervura do leite seja reconhecida como um dos
10 procedimentos mais antigos utilizado na eliminação dos principais patógenos
11 do produto provenientes de animais de produção (Furlanetto et al., 2009), não
12 foram encontrados na literatura consultada, estudos que garantissem a
13 eliminação do gênero *Nocardia* por este tipo de processamento térmico.

14 Considerando o aumento dos registros de nocardiose em humanos e
15 animais domésticos, a termorresistência da bactéria e a escassez de estudos
16 voltados à classificação genotípica de isolados no Brasil; o presente estudo
17 investigou a caracterização fenotípica, genotípica e a termorresistência às
18 condições de fervura em linhagens de *Nocardia* spp. isoladas de animais
19 domésticos e humanos.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

1 **3 OBJETIVOS**

2

3 **3.1 Geral**

4 Realizar a caracterização fenotípica, genotípica e de termorresistência
5 às condições de fervura em linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais
6 domésticos e humanos.

7

8 **3.2 Específicos**

9

10 1. Avaliar as principais características fenotípicas dos isolados, utilizando
11 métodos tintoriais e bioquímicos;

12 2. Determinar o perfil de sensibilidade microbiana e a concentração inibitória
13 mínima “in vitro” dos isolados frente aos principais antimicrobianos utilizados no
14 tratamento da nocardiose em animais e nos humanos;

15 3. Verificar a presença de isolados multirresistentes aos antimicrobianos;

16 4. Investigar a termorresistência dos isolados frente às condições de
17 fervura;

18 5. Caracterizar genotipicamente os isolados com base na identificação
19 molecular do fragmento 16S rRNA.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 4 MATERIAL E MÉTODOS

2

3 4.1 Microrganismos

4

5 Foram utilizadas 88 linhagens do gênero *Nocardia* isoladas de diferentes
6 afecções em animais domésticos e sete de humanos. As tabelas 2 e 3
7 apresentam as diferentes afecções em humanos e em animais domésticos nas
8 quais foram isoladas linhagens de *Nocardia* sp utilizadas no estudo.

9 Dos 95 isolados de animais, 25 pertencem à bacterioteca do Serviço de
10 Enfermidades Infecciosas dos Animais e Diagnóstico Microbiológico de Mastite
11 em Animais da FMVZ–UNESP/Botucatu, SP, sob a responsabilidade do Prof.
12 Dr. Márcio Garcia Ribeiro e seis pertencem ao Núcleo de Pesquisa em Mastites
13 da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, coordenado pelo Prof. Titular Dr. Hélio
14 Langoni. Os outros 45 isolados foram cedidos pelo Laboratório de Doenças
15 Infectocontagiosas da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade
16 Federal de Santa Maria, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Agueda
17 Castagna de Vargas, RS. Ainda, seis isolados foram cedidos pelo Laboratório
18 de Microbiologia do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti pertencente à
19 Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado do Paraná, sob a
20 responsabilidade da Dr^a. Sônia Biesdorfe; três isolados cedidos pela Dr^a.
21 Priscilla Melville, da FMVZ-USP; e um isolado do Serviço de Clínica Médica de
22 Animais de Companhia, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná –
23 PUCPR, Curitiba, PR, sob a responsabilidade do Prof. Ass. Marconi Rodrigues
24 de Farias.

25 Dentre os isolados de origem humana foram utilizados cinco linhagens
26 do Serviço de Diagnóstico Micológico do Hospital de Clínicas da Universidade
27 Federal do Paraná, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Marisol Domingues
28 Muro; uma linhagem proveniente da Universidade Federal de São Paulo –
29 UNIFESP Diadema, SP, cedida pela Prof^a. Adj. Karen Spadari Ferreira; e uma
30 linhagem cedida da bacterioteca do Instituto Adolf Lutz, sob responsabilidade
31 da Dr^a. Lia Luft.

32

- 1 Tabela 2 – Distribuição de diferentes afecções em 88 linhagens de *Nocardia* sp
2 isoladas de animais domésticos.

| ESPÉCIE ANIMAL nº de linhagens na espécie/ total de linhagens (%) | TIPO DE AFECÇÃO | Nº DE CASOS/ TOTAL DE CASOS NA ESPÉCIE (%) |
|--|-------------------------------|---|
| BOVINA 71/88* (80,68%) | Mastite clínica | 60/81 (74,07%) |
| | Mastite subclínica (12/81) | 11/81 (13,58%) |
| EQUINA 1/88 (1,13%) | Pneumonia | 1/1 (100,00%) |
| CAPRINA 1/88 (1,13%) | Mastite subclínica | 1/1 (100,00%) |
| CANINA 12/88 (13,63%) | Celulite e micetoma | 6/12 (50,00%) |
| | Sinais neurológicos | 2/12 (16,66%) |
| | Pneumonia | 3/12 (33,33%) |
| FELINA 3/88 (3,41%) | Linfadenomegalia | 1/12 (8,3%) |
| | Celulite e micetoma | 3/3 (100,00%) |

3 nº - número % - percentual

4 * nas amostras oriundas da espécie bovina estão inclusas duas linhagens
5 obtidas de amostragem de dois tanques de expansão individuais.

6
7

- 8 Tabela 3 – Distribuição de diferentes afecções em sete linhagens de
9 *Nocardia* sp isoladas de humanos.

| | TIPO DE AFECÇÃO | Nº DE CASOS/ TOTAL DE CASOS NA ESPÉCIE (%) |
|-----------------------|------------------------|---|
| HUMANOS (7) | Pneumonia | 1/7 (14,28%) |
| | Celulite e micetoma | 2/7 (28,57%) |
| | Sinais neurológicos | 2/7 (28,57%) |
| | Desconhecido | 3/7 (42,85%) |

nº - número % - percentual

1 **4.2 Diagnóstico das mastites por *Nocardia* sp**

2

3 A caracterização dos animais com mastite clínica por *Nocardia* sp foi
4 realizada com base nas alterações macroscópicas do leite na prova da caneca
5 telada de fundo escuro (presença de pus, grumos, estrias, sangue ou dessora
6 do leite) na presença de sinais clínicos de inflamação na glândula mamária (dor
7 à palpação, hiperemia, edema, nódulos, hipertermia) e/ou sistêmicos nos
8 animais (febre, atonia ruminal, decúbito, dificuldade respiratória, taquicardia)
9 [Radostits et al., 2007]. A mastite subclínica foi diagnosticada utilizando o
10 método clássico de “Califórnia Mastitis Test” – CMT, escores de 1+ a 3+
11 (Schalm e Noorlander, 1957).

12

13 **4.3 Diagnóstico da nocardiose em animais de companhia**

14

15 Para obtenção dos isolados de cães e gatos, todos os animais com sinais
16 compatíveis de nocardiose foram submetidos a exame clínico completo.
17 Lavados traqueobrônquicos foram realizados de maneira asséptica em animais
18 com sinais respiratórios (secreção nasal, tosse, aumento de sons
19 broncovesiculares ou de silêncio pulmonar). A citologia aspirativa com agulha
20 fina foi realizada assepticamente nos animais com lesões tegumentares e em
21 linfadenopatia, sugestivas de nocardiose (Ribeiro et al., 2002; Ribeiro et al.,
22 2008).

23

24 **4.4 Isolamento de *Nocardia* sp.**

25

26 Material obtido do leite de vacas ou cabras, de lesões cutâneas e lavado
27 traqueal de animais de companhia, ou outros materiais diversos suspeitos de
28 nocardiose em animais de produção ou de companhia, foram submetidos à
29 cultura microbiana nos meios de ágar sangue ovino (5%) desfibrinado e
30 mantidos em condições de aerobiose, a 37°C, por até cinco dias.
31 Paralelamente, o mesmo material foi submetido à cultura microbiana em agar
32 Sabouraud–dextrose, em aerobiose, a 37°C, mantido por até 15 dias.
33 Organismos sugestivos do gênero *Nocardia* foram submetidos às colorações

1 de Gram e Kinyoun (Ziehl–Neelsen modificado) [Quinn et al., 1994]. O
2 isolamento e re-isolamento das linhagens pertencentes às bacteriotecas foram
3 realizadas no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais da FMVZ –
4 UNESP/ Botucatu, SP.

6 **4.5 Identificação fenotípica de *Nocardia* spp.**

8 Após avaliação morfo-tintorial foi realizada a caracterização bioquímica
9 dos isolados sugestivos do gênero *Nocardia*, com base nas provas clássicas de
10 hidrólises de substratos (caseína, xantina, hipoxantina, tirosina e esculina) e
11 utilização de citrato e urease. Paralelamente, os isolados foram submetidos a
12 cultura microbiana a 45°C no meio de ágar sangue, mantido nas mesmas
13 condições do item 4.4. A confirmação das espécies de *Nocardia* e a
14 diferenciação fenotípica das espécies foram realizadas utilizando o “kit”
15 comercial API 20C AUX², que contempla a assimilação dos seguintes
16 substratos: glicose, glicerol, galactose, glicosamina, inositol, adonitol, trealose
17 (Kiska et al., 2002; Saubolle e Sussland, 2003). Todas as avaliações
18 fenotípicas de classificação dos isolados foram realizadas no Laboratório de
19 Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

21 4.5.1 Hidrólise da xantina, hipoxantina, caseína e tirosina

23 A utilização dos substratos xantina, hipoxantina, caseína e tirosina foi
24 realizada segundo os critérios propostos por Gordon (Brown e McNeil, 2003).
25 Os meios elaborados foram acondicionados em garrafas plásticas esterilizadas
26 de cultivo celular, que permitissem a incubação em estufa a 35°C, por cerca de
27 14 dias. Para a realização das provas foi semeado cerca de 10µL de
28 suspensão do microorganismo com base na turbidez do tubo n^o 01 de
29 McFarland, diluído em solução salina estéril.

30 Os resultados foram interpretados com base no clareamento do
31 entorno das colônias nos diferentes meios. As linhagens que hidrolisaram

² API 20C AUX stripsTM, BioMérieux, Hazewoold, Missouri

1 caseína e xantina foram identificadas fenotipicamente como *N. brasiliensis*; os
2 isolados que hidrolisaram somente xantina foram identificados como
3 *N. otitidiscaviarum*, enquanto os isolados que não hidrolisaram nenhum destes
4 substratos foram identificados como pertencentes ao complexo *N. asteroides*
5 (Biehle et al., 1996).

6 7 4.5.2 Hidrólise da Esculina

8
9 A hidrólise da esculina foi realizada semeando 10 µL de suspensão de
10 todos os isolados com base no tubo 1 da escala de McFarland, diluído em
11 solução salina estéril. A reação positiva foi considerada quando o meio
12 assumiu coloração enegrecida. O meio foi incubado por 96 horas em estufa a
13 37°C. Resultados esculina positivos são observados para *N. brasiliensis* e *N.*
14 *otitidiscaviarum*, enquanto resultados negativos para o complexo *N. asteroides*
15 (Winn et al., 2005, Brown e McNeil, 2003).

16 17 4.5.3 Prova da urease e utilização do citrato

18
19 Todos os isolados de *Nocardia* sp foram semeados diretamente em
20 tubos individuais contendo o meio de uréia e citrato. Os tubos foram incubados
21 em condições de aerobiose a 35°C, por 72 horas, com avaliação a cada 24
22 horas. Estes dois testes foram realizados semeando a colônia diretamente nos
23 meios de urease e citrato, com avaliações em 48 a 72 horas. Nas linhagens
24 citrato negativas os tubos mantêm a coloração verde original, enquanto que
25 nas positivas assumiram coloração azul escura (Winn et al., 2005).

26 Nas linhagens não produtoras de urease, os tubos contendo agar uréia
27 de Christensen mantêm a tonalidade alaranjada, enquanto nos isolados urease
28 positivos, os tubos assumiram coloração rosa (Winn et al., 2005).

29
30
31
32

1 4.5.4 Multiplicação a 45°C

2

3 A totalidade dos isolados dos animais domésticos e de humanos foi
4 submetida a cultura microbiana no meio de agar sangue ovino desfibrinado a
5 5%, em condições de aerobiose, a 45°C, com vistas a avaliação da
6 multiplicação em temperatura elevada. As placas foram mantidas nas
7 condições supracitadas por sete dias, avaliadas a cada 24 horas. Foram
8 considerados positivos (termotolerantes) os isolados que apresentaram
9 qualquer número de colônias viáveis (Brown e McNeil, 2003).

10

11 **4.6 Estoque dos isolados**

12

13 Após a identificação fenotípica, todos os isolados utilizados no estudo
14 foram semeados, em duplicata em tubos de vidro com tampa de borracha,
15 contendo meio de Lignières, em condições de aerobiose a temperatura de
16 37°C, por 48 a 72 horas. Após a observação das colônias os tubos foram
17 mantidos em temperatura ambiente (25°C).

18

19 **4.7 Perfil de sensibilidade microbiana pelo método de difusão com discos** 20 **e detecção de isolados multirresistentes**

21

22 As 95 linhagens de *Nocardia* spp isoladas foram submetidas à prova de
23 sensibilidade microbiana utilizando o método clássico de difusão com discos
24 (CLSI, 2003; CLSI, 2005). Os halos de inibição dos isolados foram avaliados
25 com base na recomendação de interpretação para bactérias aeróbias
26 fastidiosas (Wallace, 1977; Ambaye et al., 1997; CSLI, 2003; CSLI, 2005) [Anexo
27 3]. Foram utilizados antimicrobianos recomendados no tratamento da
28 nocardiose em animais domésticos e nos humanos, quais sejam: amicacina
29 (30µg), ampicilina (10µg), amoxicilina/ ácido clavulânico (20/10µg), ceftiofur
30 (30µg), cefoperazona sódica (75µg), ceftriaxona (30µg), cloxacilina (5µg),
31 cefalexina (30µg), cefuroxima (30µg), cefalônio (30 µg), imipeném (10µg),
32 gentamicina (10µg) e sulfametoxazole–trimetoprim (25µg). Foram considerados

1 multirresistentes os isolados que apresentaram resistência simultânea a três ou
2 mais antimicrobianos.

3

4 **4.8 Concentração inibitória mínima - CIM**

5

6 Os 95 isolados de *Nocardia* sp. foram submetidos aos teste de
7 concentração inibitória mínima utilizando “tiras” impregnadas com diferentes
8 gradientes de concetração de cada antimicrobiano, disponibilizadas no “kit”
9 comercial (E-test™)³, conforme metodologia descrita por Glupckzynski et al.
10 (2006). Os isolados foram semeados inicialmente em ágar sangue ovino (5%)
11 desfibrinado, em duplicata, para verificar a pureza das linhagens. Após 48
12 horas, os isolados foram semeados em BHI e incubados em estufa a 37°C por
13 48 horas. A turbidez da multiplicação neste meio foi avaliada com base na
14 turbidez do tubo da escala 1 de McFarland. A turbidez foi ajustada com água
15 MiliQ™* estéril e as colônias dissolvidas em vortex por dois minutos, com
16 intuito de diminuir os grumos. Quando necessário foram adicionadas pérolas de
17 vidro aos tubos antes de submeter à agitação em vortex. Em seguida, os
18 isolados foram semeados em agar Mueller Hinton e as placas incubadas a
19 37°C, em aerobiose, avaliadas após 48 a 72 horas.

20 Foram utilizados no estudo os seguintes antimicrobianos: amicacina
21 (0.016 – 256 µg/mL), ampicilina (0.016 – 256 µg/mL), amoxicilina/ ácido
22 clavulânico (0.016 – 256 µg/mL), ceftriaxona (0.016 – 256 µg/mL), gentamicina
23 e sulfametoxazol/ trimetoprina (0.002 – 32 µg/mL). Os resultados foram
24 interpretados conforme os valores pré-estabelecidos por outros autores
25 (Beaman e Sugar, 1983; Biehle et al., 1994; Ngui-Yen et al. 1994;) e pelo CLSI,
26 2003 [Anexo 4].

27

28

29

³ E-test™, AB biodisk, BioMérieux, Dalvågen, Sweden.

MilliQ™, Millipore, Massachuttes, USA

4.9 Avaliação da termorresistência “in vitro” dos isolados às condições de fervura

Todos os isolados foram submetidos “in vitro” às condições de fervura. Para a preparação dos inóculos, inicialmente os isolados foram cultivados em agar sangue ovino (5%) desfibrinado e mantidos em aerobiose, a 37°C, por 72 horas. Em seguida, duas a três colônias típicas foram re-suspendidas em 4mL de água Mili-Q™ (ultra-pura) esterilizada, dispostas em tubos, e ajustada a turvação por densidade óptica, com base no tubo 1 da escala de McFarland (Bier, 1984). A partir desta suspensão, os tubos foram homogeneizados e elaboradas diluições na escala decimal (1/10), a saber: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e assim, sucessivamente, até 10^{-10} . Alíquotas de 0,1mL foram colhidas em duplicata para cultivo em agar padrão “Plate count agar” (PCA), utilizando a técnica de “pour plate” ou rotineiramente conhecida como “derramamento em placa”, com auxílio de bastão de vidro em “L”, mantendo-se incubadas a 37°C, em aerobiose, por até 96 horas. A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) foi aferida pela visualização macroscópica das colônias no meio de cultura. Foram utilizados como inóculos as diluições decimais que apresentaram multiplicação microbiana da ordem de 10^5 UFC/mL, as quais geralmente correspondiam entre as diluições 10^{-3} e 10^{-2} .

Subsequentemente, alíquotas de 1mL de todos os isolados contendo 10^5 UFC/mL foram dispostas em tubos de vidro tampados com algodão hidrófobo, e submetidas à elevação da temperatura, em banho maria, até atingir 100°C (fervura 1). Para a aferição da temperatura, foi disposto termômetro esterilizado em um dos tubos contendo isolados de *Nocardia*. O mesmo procedimento foi repetido para todos os isolados (também com inóculos da ordem de 10^5 UFC/mL), mantendo-se os tubos por 1 minuto após atingir 100°C (fervura 2). Em seguida, o procedimento foi novamente executado mantendo os tubos por cinco minutos após 100°C (fervura 3). Em seguida, alíquotas de 0,01 mL dos tubos de todos os três grupos de tratamentos térmicos (fervura 1, 2 e 3), foram submetidos à cultura microbiana em agar sangue ovino (5%) desfibrinado, em aerobiose a 37°C, com vistas a avaliar o reisolamento microbiano dos isolados após os tratamentos térmicos.

1 **4.10 Microscopia eletrônica de varredura**

2

3 A microscopia eletrônica de varredura foi realizada em seis isolados das
4 principais espécies de *Nocardia* spp. identificadas, escolhidos ao acaso, a citar
5 *N. nova*, *N. farcinica*, *N. cyriacigeorgica*, *N. puris*, *N. veterana* e *N. africana*,
6 (Ribeiro et al., 2008). Foram utilizadas cinco a seis colônias puras das
7 linhagens reisoladas no meio de ágar sangue (5%), e resuspendidas em 5 mL
8 de solução de cloreto de sódio (0.85%), em tubos de vidro. A fixação da parede
9 bacteriana foi realizada utilizando glutaraldeído a 2,5% (0.1M de tampão
10 fosfato, pH 7,2). Em seguida, foram realizadas três lavagens de dez minutos
11 em água destilada e fixadas em solução de tetróxido de ósmio (1%), no mesmo
12 tampão supracitado, por 30 minutos. Subsequentemente, o material foi
13 desidratado em soluções de concentração crescente de etanol – na presença
14 de CO₂ –, e embebido posteriormente em solução de ouro (10 nm) em
15 Metalizador Baltec SCD 050 (Ribeiro et al., 2008). O material foi avaliado e
16 fotografado utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura (Quanta 200 Fey
17 Company), no Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu, SP.

18

19 **4.11 Identificação molecular dos isolados de *Nocardia***

20

21 A caracterização molecular da totalidade dos isolados foi realizada sob a
22 responsabilidade do Prof. Dr. Tohru Gono e equipe, do Centro de Fungos
23 Patogênicos e Toxinas Microbianas da Universidade de Chiba, Japão. As
24 linhagens de *Nocardia* spp. foram enviadas em tubos de vidro lacrados, em
25 meio de Lignières, acondicionados conforme exigência do Serviço de Defesa
26 Animal do MAPA, contendo a permissão de importação do Ministério da
27 Agricultura do Japão.

28

29 Para a determinação molecular das espécies de *Nocardia* sp. foram
30 utilizados o seqüenciamento molecular da fração 16S rRNA, DNA-DNA
31 hibridização, amplificação e análise RFLP da proteína de choque 65 kDa,
32 seguida de análise filogenética (Kageyama et al., 2002; Kageyama e Mikami,
33 2007).

33

1 4.11.1 Amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA

2

3 4.11.1.1 Preparo do inóculo

4

5 Para extração do DNA os isolados foram cultivados em caldo infusão
6 cérebro-coração por quatro dias a 32°C. Aproximadamente 1 mL da cultura foi
7 centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos. O “pellet” resultante foi ressuspensão
8 em 200 µL de tampão TE (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8), 250 µL de
9 reagente GTP (6M de guanidina thiocinato dissolvido em 50mM Tris/HCl, pH
10 8,3) e 450 µL de Tris-fenol tamponado (pH 8). Os tubos foram dispostos em
11 banho-maria a 100°C, por 15 minutos. Em seguida, o material foi extraído com
12 250 µL de clorofórmio com álcool isoamílico na proporção 24:1. Após 10
13 minutos foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm. O sobrenadante foi
14 transferido para tubo contendo 500 µL de 2-propanol a 100% e 500 µL de
15 acetato de sódio 3M. Foi descartado novamente o sobrenadante. O “pellet” foi
16 centrifugado a 12.000 rpm, por 15 minutos, a 4°C. Traços de GTP foram
17 removidos pela adição de 500µL de etanol 70%, resfriado ao núcleo do pellet,
18 seguido por nova centrifugação a 12.000 rpm, por vinte minutos. Finalmente, o
19 “pellet” foi ressuspensão em 50 µL de tampão TE.

20

21 4.11.1.2 Amplificação e Sequenciamento da fração 16S rRNA

22

23 O gene 16S rDNA foi amplificado e seqüenciado utilizando a reação em
24 cadeia de polimerase (PCR), utilizando primers padrões de 16S rRNA
25 procariótico: 8F (59-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-39), 691R (59-
26 ACCGCTACACCAGGA-39), 520F (59-CAGCAGCCGCGGTAATAC-39), 1100R
27 (59-GGGTTGCGCTGTTG-39), 926F (59-AAACTCAAAGGA ATTGACGG-39),
28 1542R (59-ACAAAGGAGGTGATC-39). A reação foi realizada com
29 termociclador (TaKaRa) nas seguintes condições: de 35 ciclos de desnaturação
30 a 94°C por 60 segundos, anelamento a 60° por 60 segundos e extensão a 72°C
31 por 120 segundos. Os produtos de PCR foram purificados com Centri-Sep
32 column (Princeton Separations). O sequenciamento do DNA foi avaliado em
33 analisador de sequencias automáticas (ABI PRISM 31000 PE Applied

1 Biosystems) utilizando “BigDye terminator cycle sequencing ready reaction” (PE
2 Applied Biosystems).

3

4 4.11.2 Hibridização de DNA

5

6 Para a hibridização de DNA, colônias puras dos isolados foram
7 semeadas em BHI contendo com 2% de glicose e 2% de glicina, por três dias,
8 a 32°C (Saito e Miura, 1983). A composição de bases de DNA foi estimada por
9 cromatografia líquida de alto desempenho (Tamaoka e Komagata, 1984). Os
10 níveis de similaridade DNA-DNA foram determinados conforme Ezaki et al.
11 (1989).

12

13 4.11.3 Análise filogenética

14

15 A análise dos resultados encontrados foram avaliadas utilizando
16 programa de alinhamento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool –
17 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), confrontando os resultados com as bases
18 genéticas de dados. Os dados de sequencia de espécies foram retirados do
19 GenBank. Taxas de substituição de nucleotídeos foram estimadas segundo
20 Kimura e Ota, 1972 e as árvores filogenéticas foram
21 construídas pelo método *neighbor-joining* (Saitou e Nei,1987). A similaridade
22 das árvores foi avaliada por análise de sequências gênicas pelo programa
23 Clustal W (Thompson et al., 1994), calculados segundo Saito e Miura, 1983.

24

25 4.11.4 PCR e RFLP da proteína de choque térmico 65 kDa

26

27 Cada fração de DNA extraída foi submetida a PCR para amplificação de
28 439 pares do gene da proteína de choque térmico 65 kDa, usando os primers
29 TB11 (5-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3) e TB12 (5-CTTGTCGAACCGCATA
30 CCCT-3), conforme descrito por Telenti et al. (1993). A reação foi realizada
31 obedecendo as seguintes condições: 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 60
32 segundos, anelamento a 55°C por 60 segundos e extensão a 72°C por 60
33 segundos. Os 439 pares de base amplificados foram digeridos com enzima de

1 restrição *Hae III*, a 37°C, por duas horas, de acordo com as instruções do
2 fabricante. Os padrões de fragmentação foram visualizados em reação de
3 eletroforese em gel de agar a 3% (Nippon Gene, Tokyo, Japan).

4 5 **4.12 Análise estatística**

6
7 Para estudar a concordância entre os resultados dos testes de disco-
8 difusão e E-test empregou-se o cálculo do índice Kappa de concordância. O
9 índice Kappa também foi empregado para avaliar a concordância entre os
10 métodos de classificação bioquímica convencional, método API e molecular. A
11 avaliação da concordância dos testes, segundo os valores aferidos, seguiu os
12 critérios estabelecidos por Thrusfield (1995). Todas as estatísticas foram
13 realizadas empregando-se os pacotes computacionais Bioestat v. 5.0 (Ayres et
14 al., 2007) e SPSS v.14 (Maroco, 2007).

15 As diferenças entre os percentuais de isolados termorresistentes nos
16 três campos de fervura foram calculados pelo teste de Mac Nemar, com
17 correção de continuidade cujo nível de significância foi ajustado para 0,167 ($p =$
18 $0,05/3 = 0,167$).

19 O teste de Qui-quadrado e teste de exato de Fischer foram utilizados
20 para provar se os percentuais de resistência de *Nocardia* sp para cada
21 antibiótico testado no método de disco-difusão se distribuíam de forma
22 homogênea entre as linhagens isoladas de animais de produção (bovinos,
23 eqüino e caprino), de humanos e de animais de companhia (caninos e felinos),
24 adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância do teste (Everitt, 1977).

25
26
27
28
29
30
31
32
33

1 5 RESULTADOS

2

3 A análise molecular possibilitou identificar 88 espécies de *Nocardia*
4 isoladas de animais domésticos e sete de humanos.

5 Dentre as espécies domésticas houve predomínio de linhagens obtidas
6 de animais de produção, identificadas em 71 vacas com mastite, um eqüino
7 com pneumonia e uma cabra com mastite (Tabela 2, referente ao item 4.1).
8 Destas foram isoladas com maior freqüência *N. nova* (56 isolados), *N. farcinica*
9 (sete isolados), *N. puris* (quatro isolados) e *N. cyriacigeorgica* (três isolados)
10 [Tabela 4].

11 Em animais de companhia foi constatada distribuição mais
12 homogêneas espécies de *Nocardia*, apesar do predomínio de *N. nova* (seis
13 isolados), *N. farcinica* (dois isolados), *N. veterana* (três isolados) e
14 *N. cyriacigeorgica* (dois isolados) [Tabela 4].

15 A análise molecular dos seis isolados obtidos de humanos revelou a
16 presença de três linhagens de *N. farcinica*, duas de *N. nova*, uma de *N. asiatica*
17 e uma de *N. veterana* [Tabela 4].

18 Em contraste, a análise fenotípica dos mesmos isolados mostrou grande
19 variabilidade se comparada à caracterização molecular, embora tenha
20 apresentado boa concordância entre as análises. A tabela 5 apresenta-se as
21 probabilidades de classificação das espécies de *Nocardia* utilizando métodos
22 fenotípicos de identificação, e na Tabela 6 mostra-se a concordância dos
23 métodos de identificação fenotípica, tendo como base de comparação a
24 identificação molecular.

25

26

27

28

29

30

31

32

- 1 Tabela 4 – Identificação fenotípica de 95 linhagens de *Nocardia* spp. obtidas de
2 afecções de animais domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011.

| Espécies de <i>Nocardia</i> spp | CLASSIFICAÇÃO GENOTÍPICA | CLASSIFICAÇÃO FENOTÍPICA | ESPÉCIES DE ANIMAIS e HUMANOS ACOMETIDOS | | | | |
|---------------------------------|--|---|--|-----|-----|-----------------|---------|
| | Nº total de isolados/ Nº de linhagens (%) | Nº de linhagens prováveis/ Nº total da espécie (probabilidade de classificação) | BOV * | CAN | FEL | OUTRAS | HUMANOS |
| <i>N. abscessus</i> | - | <i>N. abscessus</i> ou <i>N. nova</i> | - | - | - | - | - |
| <i>N. africana</i> | 02/95 (2,10%) | <i>N. farcinica</i> (n = 1) | 01 | - | 01 | - | - |
| <i>N. arthritidis</i> | 01/95 (0,91%) | <i>N. africana</i> (n = 1) | 01 | - | - | - | - |
| <i>N. asiatica</i> | 01/95 (0,91%) | <i>N. nova</i> ou <i>N. abscessus</i> (n = 1) | | | | | 01 |
| <i>N. cyriacigeorgica</i> | 5/95 (4,58%) | <i>N. cyriacigeorgica</i> (n = 3) (60% de probabilidade) <i>N. farcinica</i> (n = 2) (40% de probabilidade) | 3 | 2 | - | - | - |
| <i>N. farcinica</i> | 13/95 (13,68%) | <i>N. farcinica</i> (n = 8) (61,83% de probabilidade) <i>N. nova</i> (n = 5) (38,46% de probabilidade) | 07 | 02 | - | 01 ¹ | 03 |
| <i>N. nova</i> | 65/95 (68,42%) | <i>N. nova</i> (n = 32) (57,14% de probabilidade) <i>N. cyriacigeorgica</i> (n = 8) (14,28% de probabilidade) <i>N. farcinica</i> (n = 6) (10,71% de probabilidade) <i>N. brevicatena</i> (n = 10) (17,85% de probabilidade) | 56* | 05 | 01 | 01 ² | 02 |
| <i>N. puris</i> | 4/95 (3,67%) | <i>N. puris</i> (n = 1) (25% de probabilidade) <i>N. brevicatena/ cárnea</i> (n = 2) (50% de probabilidade) <i>N. pseudobrasiliensis</i> (n = 1) (25% de probabilidade) | 04 | - | - | - | - |
| <i>N. veterana</i> | 4/95 (3,67%) | <i>N. nova</i> ou <i>N. veterana</i> (n = 4) | 01 | 02 | 01 | | |

Nº - número % - percentual BOV – bovina CAN- canina FEL – felina OUTRAS – esquinha e caprina

*Em BOV há duas linhagens isoladas de tanque de expansão individual

¹ovino, ²equino

- 1 Tabela 5 – Classificações bioquímicas concordantes e discordantes com os
 2 métodos moleculares de 95 linhagens de *Nocardia* sp. Botucatu, SP, 2011.
 3

| ESPÉCIE | BIOQUÍMICO CONVENCIONAL | | SISTEMA API | |
|--|---|---|---|---|
| | Nº de resultados concordantes/Nº de amostras testadas (%) | Nº de resultados discordantes/Nº de amostras testadas (%) | Nº de resultados concordantes/Nº de amostras testadas (%) | Nº de resultados discordantes/Nº de amostras testadas (%) |
| <i>N. africana</i> | 1/1(100) | 0/1 (0) | 0/1(0) | 1/1(100) |
| <i>N. arthritidis</i> | 0/1 (0) | 1/1 (100) | 1/1(100) | 0/1 (0) |
| <i>N. asiatica</i> | 0/1 (0) | 1/1 (100) | 0/1 (0) | 1/1 (100) |
| <i>N. cyriacigeorgica</i> | 5/5 (100) | 0 (0) | 5/5 (100) | 0/5 (0) |
| <i>N. farcinica</i> | 11/11(100) | 0/11(0) | 7/11 (63,6) | 4/11 (36,4) |
| <i>N. nova</i> | 42/68 (61,7) | 26/68 (38,3) | 59/68 (86,7) | 9/68 (13,6) |
| <i>N. puris</i> | 1/4 (25) | 3/4 (75) | 0/4 (0) | 4/4 (100) |
| <i>N. veterana</i> | 3/3 (100) | 0/3 (0) | 3/3 (100) | 0/3 (0) |
| <i>N. africana</i> + <i>N. veterana</i> | 1/1 (100) | 0/1 (0) | 0/1 (0) | 1/1 (100) |
| Total | 64 (67,3) | 31 (32,7) | 75 (78,9) | 20 (21,1) |

4 Nº - número % - percentual

5

6

7 Foi observado predomínio de casos de mastite clínica (72 animais), nos
 8 quais nas glândulas afetadas foi evidenciado edema, fibrose, presença de
 9 nódulos, abscessos e fístulas. O leite dos quartos afetados apresentava
 10 aspecto viscoso, seropurulento, com presença de grumos e coloração
 11 amarelada. Os casos de mastite subclínica (nove animais) acusaram reações
 12 entre 2 e 3 + no CMT.

13 Em animais de companhia o maior número de linhagens foi isolado em
 14 cães (12 animais), afetando principalmente o tecido cutâneo (seis animais),
 15 seguido por quadros de pneumonia (três animais), enquanto nos felinos todos
 16 os quadros envolveram tecido cutâneo (três animais). Em cães a doença
 17 atingiu animais jovens (entre quatro meses e dois nos de idade), sem raça
 18 definida, com predomínio de machos (oito animais). As lesões cutâneas
 19 caracterizaram-se por abscessos em continuidade com tratos fistulosos,
 20 presença de celulite extensa e secreção seropurulenta contendo grânulos
 21 esbranquiçados. Nos cães que apresentaram pneumonia, foram observados
 22 sinais de aumento de sons broncovesiculares, tosse alta e produtiva e

1 secreção mucopurulenta. Os cães com acometimento do sistema nervoso
2 central revelaram sinais de convulsão, nistagmo, hipermetria extensora e apoio
3 em ampla base.

4 Nos felinos, a doença ocorreu em adultos jovens entre 2 e 4 anos de
5 idade, dois machos e uma fêmea, sem raça definida, com graves sinais de
6 afecção cutânea desenvolvendo extensa celulite e inúmeras fístulas drenantes
7 em abdômen, região dorsal caudal e cervical ventral.

8 Nos pacientes humanos não foi possível obter os dados clínico-
9 epidemiológicos detalhados dos casos. No entanto, cinco pacientes eram do
10 sexo masculino, em idade adulta, dos quais dois apresentando coinfeção com
11 o vírus da imunodeficiência adquirida humana. As manifestações clínicas
12 envolviam sinais cutâneos, respiratórios e neurológicos [Tabela 3, no item 4.1].

13 Ao avaliarmos o perfil geral de sensibilidade microbiana, na prova de
14 difusão com discos, nas 95 linhagens estudadas, foi observado que os
15 antimicrobianos mais efetivos foram amicacina (95,79%), cefuroxima (94,74%),
16 imipenem (88,42%), cefalônio (80%), cefalexina (77,89%) e gentamicina
17 (77,89%). Em contraste, a maior ocorrência de resistência dos isolados foi
18 observada com o uso de cloxacilina (77,89%), ampicilina (54,74%),
19 sulfametoxazol/trimetoprim (45,26%) e cefoperazona (44,21%) [Tabela 6].

20 O perfil geral de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com
21 discos, revelou nas sete linhagens obtidas de nocardiose em humanos, que os
22 antimicrobianos mais efetivos foram amicacina (100%), amoxicilina/ ácido
23 clavulânico (100%), cefalexina (100%), cefalônio (100%) e ceftiofur (100%),
24 seguido de ceftriaxona (85,71%) e imipenem (71,43%). Dentre estes isolados,
25 a maior ocorrência de resistência foi observada para cloxacilina (71,43%),
26 gentamicina (42,86%), sulfametoxazol/ trimetropim (42,86%) e ampicilina
27 (28,57%) [Tabela 7].

28

29

30

31

32

33

1 Tabela 6 – Perfil geral de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de
 2 difusão com discos, em 95 linhagens de *Nocardia* spp. isoladas de animais
 3 domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011.

4

| ANTIMICROBIANOS | SENSIBILIDADE | | | | | |
|-----------------------------------|---------------|-------|---------------|-------|------------|-------|
| | Sensível | | INTERMEDIÁRIO | | RESISTENTE | |
| | linhagens | (%) | linhagens | (%) | linhagens | (%) |
| AMICACINA | 91 | 95.79 | - | - | 4 | 4.21 |
| AMOXACILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 74 | 77.89 | 6 | 6.32 | 15 | 15.79 |
| AMPICILINA | 30 | 31.58 | 13 | 13.68 | 52 | 54.74 |
| CEFALEXINA | 75 | 78.95 | 3 | 3.16 | 17 | 17.89 |
| CEFALÔNIO | 76 | 80.00 | 2 | 2.11 | 17 | 17.89 |
| CEFOPERAZONA | 44 | 46.32 | 9 | 9.47 | 42 | 44.21 |
| CEFTIOFUR | 74 | 77.89 | 8 | 8.42 | 13 | 13.68 |
| CEFTRIAXONA | 62 | 65.26 | 8 | 8.42 | 25 | 26.32 |
| CEFUROXIMA | 90 | 94.74 | 1 | 1.05 | 4 | 4.21 |
| CLOXACILINA | 20 | 21.05 | 1 | 1.05 | 74 | 77.89 |
| GENTAMICINA | 74 | 77.89 | 7 | 7.37 | 14 | 14.74 |
| IMIPENEM | 84 | 88.42 | 1 | 1.05 | 10 | 10.53 |
| SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRINA | 48 | 50.53 | 4 | 4.21 | 43 | 45.26 |

5 % - percentual

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

Tabela 7 – Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com discos, em sete linhagens de *Nocardia* spp isoladas de humanos. Botucatu, SP, 2011.

| ANTIMICROBIANOS | SENSIBILIDADE | | |
|-------------------------------|---------------|--------------|--------------|
| | HUMANOS | | |
| | S | PS | R |
| | isolados | isolados | isolados |
| | (%) | (%) | (%) |
| Amicacina | 7 (100.00) | - (-) | - (-) |
| Amoxicilina/Ácido clavulânico | 7 (100.00) | - (-) | - (-) |
| Ampicilina | 3 (42.86) | 2 (28.57) | 2 (28.57) |
| Cefalexina | 7 (100.00) | - (-) | - (-) |
| Cefalônio | 7 (100.00) | - (-) | - (-) |
| Cefoperazona | 3 (42.86) | 3 (42.86) | 1 (14.29) |
| Ceftiofur | 7 (100.00) | - (-) | - (-) |
| Ceftriaxona | 6 (85.71) | 1 (14.29) | - (-) |
| Cefuroxima | 5 (71.43) | - (-) | 2 (28.57) |
| Cloxacilina | 2 (28.57) | - (-) | 5 (71.43) |
| Gentamicina | 4 (57.14) | - (-) | 3 (42.86) |
| Imipenem | 5 (71.43) | 1 (14.29) | 1 (14.29) |
| Sulfametoxazole/Trimetoprim | 3 (42.86) | 1 (14.29) | 3 (42.86) |

S – sensível PS – parcialmente sensível R – resistente

% - percentual

1 O perfil de sensibilidade microbiana, na prova de difusão com discos,
2 revelou que a amicacina (95,77%), cefuroxima (95,77%) e imipenem (87,32%)
3 foram os antimicrobianos mais efetivos para os isolados obtidos da espécie
4 bovina, enquanto a maior resistência das linhagens foi constatada para
5 cloxacilina (84,51%), ampicilina (57,75%), sulfametoxazol/ trimetoprim (50,70%)
6 e cefoperazona (49,30%) [Tabela 8].

7 Para os isolados de cães, os antimicrobianos mais efetivos foram
8 cefuroxima (100%), amicacina (91,67%), gentamicina (91,67%), imipenem
9 (91,67%), ceftiofur (83,33%) e ceftriaxona (83,33%), enquanto a maior
10 frequência de resistência das linhagens foi observada para ampicilina
11 (58,33%), cloxacilina (58,33%), cefalexina (33,33%) e cefoperazona (33,33%)
12 [Tabela 8].

13 Nos isolados de felinos, os antimicrobianos mais efetivos foram
14 amoxicilina/ ácido clavulânico (100%), cefalexina (100%), cefalônio (100%),
15 cefuroxima (100%), gentamicina (100%) e imipenem (100%). E os menos
16 efetivos foi cloxacilina (33,33%), tendo os demais apresentado efetividade
17 intermediária.

18 Para os isolados provenientes de afecções nas espécies caprina e
19 equina os mais efetivos foram: amoxicilina/ácido clavulânico (100%),
20 cefalexina (100%), cefoperazona (100%), ceftiofur (100%) e imipenem (100%).

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 Tabela 8 – Perfil de sensibilidade microbiana “in vitro”, na prova de difusão com
 2 discos, em 88 linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos.
 3 Botucatu, SP, 2011.

4

| Antimicrobianos | SENSIBILIDADE | | | | | |
|-----------------------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|--------------|--------------|
| | BOVINOS* | | | CANINA | | |
| | S | PS | R | S | PS | R |
| | isolados (%) | | | isolados (%) | | |
| AMICACINA | 68 (95,77) | - (-) | 3 (4,23) | 11 (91,67) | - (-) | 1 (8,33) |
| AMOXACILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 55 (77,46) | 2 (2,82) | 14 (19,72) | 8 (66,67) | 3 (25,00) | 1 (8,33) |
| AMPICILINA | 19 (26,76) | 11 (15,49) | 41 (57,75) | 5 (41,67) | - (-) | 7 (58,33) |
| CEFALEXINA | 56 (78,87) | 3 (4,23) | 12 (16,9) | 8 (66,67) | - (-) | 4 (33,33) |
| CEFALÔNIO | 56 (78,87) | 2 (2,27) | 13 (14,77) | 9 (75,00) | - (-) | 3 (25,) |
| CEFOPERAZONA | 30 (42,25) | 6 (8,45) | 35 (49,3) | 7 (58,33) | 1 (8,33) | 4 (33,33) |
| CEFTIOFUR | 53 (74,65) | 6 (8,45) | 12 (16,9) | 10 (83,33) | 1 (8,33) | 1 (8,33) |
| CEFTRIAXONA | 42 (59,15) | 7 (9,86) | 22 (30,99) | 10 (83,33) | - (-) | 2 (16,67) |
| CEFUROXIMA | 68 (95,77) | 1 (1,41) | 2 (2,82) | 12 (100,00) | - (-) | - (-) |
| CLOXACILINA | 11 (15,49) | - (-) | 60 (84,51) | 5 (41,67) | - (-) | 7 (58,33) |
| GENTAMICINA | 56 (78,87) | 6 (8,45) | 9 (12,68) | 11 (91,67) | - (-) | 1 (8,33) |
| IMIPENEM | 62 (87,32) | - (-) | 9 (12,68) | 11 (91,67) | - (-) | 1 (8,33) |
| SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRIM | 32 (45,07) | 3 (4,23) | 36 (50,7) | 9 (75,00) | 1 (8,33) | 2 (16,67) |

5

6

7

8

9

10

11

12

1 A presença de linhagens isoladas dos animais domésticos com
2 resistência múltipla a três ou mais e a cinco ou mais antimicrobianos foi
3 observada em, respectivamente, 63,38% e 43,66% dos isolados. Dentre os
4 isolados de origem humana, foi constatada a ocorrência de resistência
5 simultânea a três ou mais e a cinco ou mais antimicrobianos em,
6 respectivamente, 42,88% e 14,28% das linhagens.

7 Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) entre os
8 percentuais de resistência observados para antimicrobianos testados pelo
9 método de difusão com discos.

10 Considerando o teste de difusão com discos, a ocorrência de isolados
11 resistentes à cloxacilina obtidos de animais de produção foi estatisticamente
12 superior ($p = 0,0166$) aos resultados obtidos em linhagens de animais de
13 companhia.

14 As tabelas 09, 10 e 11 apresentam os valores da concentração inibitória
15 mínima nas 95 linhagens de *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos e
16 humanos. Dos isolados de origem humana, somente um foi resistente no MIC
17 para sulfametoxazol/ trimetoprim (Tabela 10). A maior ocorrência de resistência
18 no teste de MIC nas linhagens isoladas de animais de produção foi observada
19 com o uso de sulfametoxazol/ trimetoprim (seis isolados), gentamicina (seis
20 isolados) e ceftriaxona (cinco isolados), enquanto para os animais de
21 companhia, somente uma linhagem foi resistente a amicacina e outra a
22 gentamicina (Tabela 11). A totalidade dos isolados apresentam MIC₉₀, ou seja,
23 todas as 95 linhagens apresentaram 90% ou mais de sensibilidade aos
24 antimicrobianos utilizados (Tabela 12). Não foram observadas linhagens
25 multirresistentes na concentração inibitória mínima.

26 Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre os percentuais de
27 resistência aos antimicrobianos no MIC nas 95 linhagens.

28 A Tabela 13 sumaria os índices de concordância entre os métodos de
29 difusão com discos e MIC, segundo seis antimicrobianos utilizados. Somente
30 para a amicacina foi observada boa concordância entre os métodos, enquanto
31 para os demais fármacos a concordância foi fraca.

32

33

1 Tabela 9 – Concentração inibitória mínima geral de 95 linhagens de
 2 *Nocardia* spp isoladas de animais domésticos e humanos. Botucatu, SP, 2011
 3

| ANTIMICROBIANOS | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA | | | | | |
|--------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------|------|------------|-------|
| | SENSÍVEL | | PARCIALMENTE SENSÍVEL | | RESISTENTE | |
| | linhagens | % | linhagens | % | linhagens | % |
| AMICACINA | 92 | 96.84 | - | - | 3 | 3.16 |
| AMPICILINA | 90 | 94.74 | 2 | 2.11 | 3 | 3.16 |
| AMOXACILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 89 | 93.68 | 5 | 5.26 | 1 | 1.05 |
| CEFTRIAXONA | 89 | 93.68 | 1 | 1.05 | 5 | 5.26 |
| SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRINA | 88 | 92.63 | - | - | 10 | 10.53 |
| GENTAMICINA | 84 | 88.42 | 4 | 4.21 | 7 | 7.37 |

4 % - percentual

5

6

7 Tabela 10 – Concentração inibitória mínima de sete linhagens de *Nocardia* spp
 8 isoladas de humanos. Botucatu, SP, 2011.

9

| ANTIMICROBIANOS | CIM | | |
|--------------------------------|---------------|---------------|--------------|
| | HUMANAS | | |
| | S | PS | R |
| | isolados (%) | isolados (%) | isolados (%) |
| AMICACINA | 7 (100.) | - (-) | - (-) |
| AMPICILINA | 6 (85.714) | 1 (14.286) | - (-) |
| AMOXICILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 7 (100.) | - (-) | - (-) |
| CEFTRIAXONA | 7 (100.) | - (-) | - (-) |
| SULFAMETOXAZOLE/TRIMETOPRIM | 5 (71.43) | - (-) | 2 (28.57) |
| GENTAMICINA | 7 (100.) | - (-) | - (-) |

10 S – sensível PS – parcialmente sensível R – resistente

11 % - percentual

1 Tabela 11 – Concentração inibitória mínima de 88 linhagens de *Nocardia* spp
 2 isoladas de animais domésticos. Botucatu, SP, 2011.

3

| ANTIMICROBIANOS | CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA | | | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| | BOVINOS | | | CANINA | | |
| | S | PS | R | S | PS | R |
| | isolados (%) | | | isolados (%) | | |
| AMICACINA | 69 (97.18) | - (-) | 2 (2.82) | 12 (92.31) | - (-) | 1 (7.69) |
| AMPICILINA | 67 (94.37) | 1 (1.41) | 3 (4.23) | 13 (100.00) | - (-) | - (-) |
| AMOXICILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 67 (94.37) | 3 (4.23) | 1 (1.41) | 12 (92.31) | 1 (7.69) | - (-) |
| CEFTRIAXONA | 66 (92.96) | - (-) | 5 (7.04) | 12 (92.31) | 1 (7.69) | - (-) |
| SULFAMETOXAZOLE/ TRIMETOPRIM | 65 (73.86) | - (-) | 6 (6.82) | 13 (100.00) | - (-) | - (-) |
| GENTAMICINA | 63 (88.73) | 2 (2.82) | 6 (8.45) | 11 (84.62) | 1 (7.69) | 1 (7.69) |

4 S – sensível PS – parcialmente sensível R – resistente
 5 % - percentual

6

7

8

9

10

11

12

13

14

Tabela 12 – Valores de CIM responsáveis pela inibição dos 95 isolados de *Nocardia* spp. Botucatu, SP, 2011.

| ANTIMICROBIANOS | MIC ₉₀ (µg/mL) | MIC (µg/mL) |
|---------------------------------|---------------------------|-------------|
| AMICACINA | 0,25 | 0,016 – 256 |
| AMOXACILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | 3 | 0,016 – 256 |
| AMPICILINA | 1 | 0,016 – 256 |
| CEFTRIAXONA | 2 | 0,016 – 256 |
| GENTAMICINA | 2 | 0,016 – 256 |
| SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRINA | 1,5 | 0,016 – 256 |

MIC – concentração inibitória mínima µg – micrograma mL – mililitro

MIC₉₀ – concentração de antibiótico responsável pela inibição de 90% dos isolados

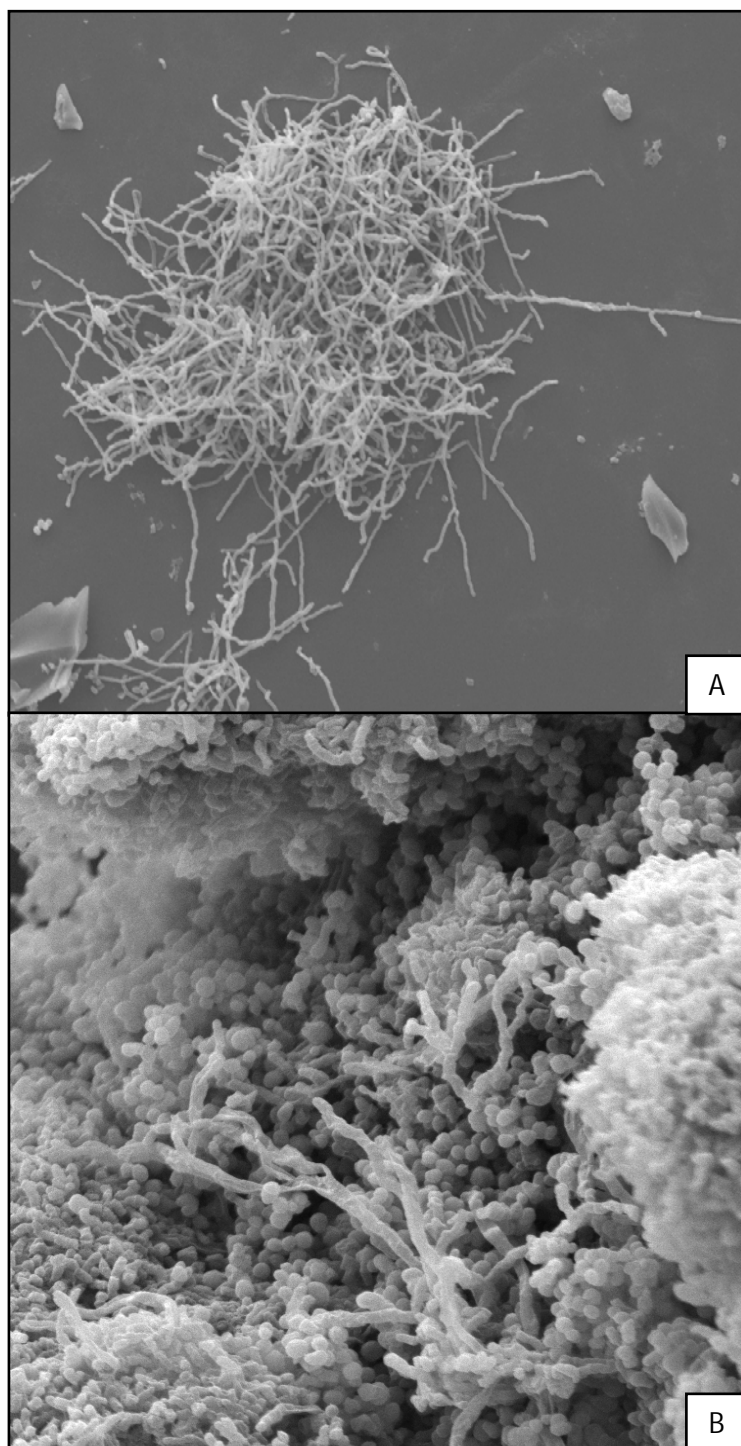
Tabela 13 – Índices Kappa (k) de concordância entre os métodos de disco-difusão com disco E-test para avaliação de resistência microbiana, significância estatística (p) e interpretação de resultados para seis antimicrobianos avaliados. Botucatu, SP, 2011

| ANTIMICROBIANO | K | p | CONCORDÂNCIA |
|-----------------------------------|---------|----------|--------------|
| AMICACINA | 0,5576 | < 0,0001 | Boa |
| AMPICILINA | -0,0167 | 0,2950 | Fraca |
| AMOXICILINA/ ÁCIDO CLAVULÂNICO | -0,0173 | 0,3449 | Fraca |
| CEFTRIAXONA | 0,0571 | 0,1890 | Fraca |
| SULFAMETOXAZOL/ TRIMETOPRIM | -0,0362 | 0,1046 | Fraca |
| GENTAMICINA | 0,2195 | 0,0067 | Fraca |

< - menor que

1 A microscopia eletrônica de varredura das seis linhagens de *Nocardia*
2 permitiu observar estruturas coco-bacilares e, caracteristicamente, formas
3 alongadas e ramificadas da bactéria (Figura 1).

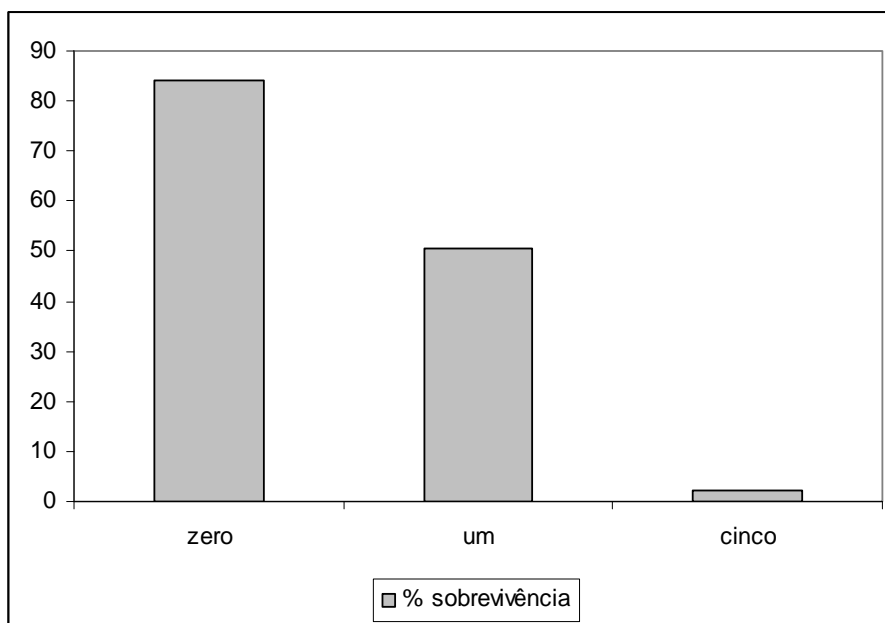
4
5 Figura 1 – Fotos obtidas em microscopia eletrônica de varredura das espécies
6 *N. nova* (A) e *N. farcinica* (B) provenientes de afecções em animais
7 domésticos, em aumentos de 2336 x e 4957 x, respectivamente. Botucatu, SP,
8 2011.



1 A termorresistência das 95 linhagens à fervura (100°C) nos três tempos
2 de estudo, revelou que no tempo zero 84,21% dos isolados (80 linhagens),
3 mostraram isolamento positivo em agar sangue após 48 a 72 horas. Após um
4 minuto de fervura 50,52% (48 linhagens) foram re-isoladas, enquanto
5 decorridos cinco minutos de fervura 2,10% dos isolados (duas linhagens, sendo
6 uma da espécie *N. nova* e outra *N. farcinica*) permaneceram viáveis (Figura 1).
7 Foram observadas diferenças significativas entre os três momentos
8 pesquisados ($p < 0,0001$).

9 As espécies *N. asiatica* e *N. arthritidis* não resistiram à fervura no
10 momento zero, enquanto todas as outras espécies foram reisoladas à simples
11 fervura e/ou à fervura por um minuto.

12
13 Gráfico 1 – Percentuais de linhagens viáveis de *Nocardia* spp isoladas de
14 animais domésticos e humanos submetidas à condições de fervura. Botucatu,
15 SP, 2011.



6 DISCUSSÃO

A classificação das espécies de *Nocardia* é objeto de divergência entre os taxonomistas nas últimas décadas (Muir e Pritchard, 1997; Roth et al., 2003; Brown-Elliott et al., 2006). Os primeiros tratadistas enquadraram o microrganismo como fungo, devido às características macroscópicas das colônias e o aspecto caracteristicamente filamentoso à microscopia do organismo nos métodos tintoriais clássicos. O uso de diferentes substratos na classificação fenotípica reposicionou o gênero como bactéria do grupo dos actinomicetos aróbcicos (Biehle et al., 1996; Kiska et al., 2002; Wauters et al., 2005). O advento recente de técnicas moleculares na classificação das espécies de *Nocardia* (Kageyama et al., 2004b) tem-se mostrado promissor, em virtude da especificidade e rapidez dos resultados da análise molecular se comparado às técnicas fenotípicas, bem como tem permitido a descrição de novas espécies patogênicas e saprófitas de *Nocardia* (Roth et al., 2003; Conville e Witebsky, 2004; Chun e Goodfellow, 1995; Laurent et al., 1999; Steingrube et al., 1995)

A caracterização fenotípica é frequentemente considerada laboriosa, em virtude da diversidade de meios utilizados, bem como a grande demanda de tempo despendida, ao redor de 15 a 30 dias para a avaliação da hidrólise de proteínas e uso de outros substratos (Kiska et al., 2002; Wauters et al., 2005). No presente estudo foram identificadas espécies em 95 isolados do gênero *Nocardia*, utilizando métodos fenotípicos e genotípicos. A identificação fenotípica adotada nos 95 isolados aliou as hidrólises de proteínas e os substratos do kit API 20C AUX. Este kit permitiu obtenção de resultados em sete dias, de maneira prática visto que não houve necessidade de elaborar tais meios em laboratório (Kiska et al., 2002), fato que dificultou a comparação da identificação de alguns isolados identificados fenotipicamente, à identificação com base molecular. A título de exemplo, na caracterização fenotípica, mesmo utilizando diferentes substratos e a multiplicação a 45°C, as espécies *N. nova*, *N. cyriacigeorgica*, *N. africana* e *N. veterana* e *N. arthritidis* possuem padrão muito similar no kit API 20C AUX e nas hidrólises protéicas, o que torna pouco precisa a diferenciação destas espécies por métodos fenotípicos (Biehle et al., 1996; Kiska et al., 2002; Brown e McNeil, 2003, Kageyama, 2004a). Apesar de

1 certas divergências entre os resultados da classificação fenotípica e molecular,
2 de maneira geral houve relativa compatibilidade entre as espécies identificadas
3 no presente estudo, com exceção na diferenciação entre isolados com
4 classificação próxima dentro do mesmo grupo proposto por Wallace (1988).

5 Em animais de companhia, tanto na classificação fenotípica como na
6 molecular, as principais espécies de *Nocardia* identificadas foram similares às
7 descritas na literatura, notadamente do complexo *N. asteroides* diagnosticadas
8 em 12 isolados, que englobam as espécies *N. nova*, *N. veterana*, *N.*
9 *cyriacigeorgica*, *N. farcinica* e *N. africana*, e reforça a virulência destas espécies
10 na nocardiose em cães e gatos (Brown-Elliott et al., 2006). Em contraste, as
11 espécies *N. otitidiscaviarum* e *N. brasiliensis*, frequentemente relatadas em
12 cães e gatos por outros autores (Ajello et al., 1961; Luque et al., 2002), não
13 foram identificadas no presente estudo. Em três dos isolados provenientes de
14 felinos, foi observado o isolamento de *N. nova*, *N. africana* e *N. veterana*. De
15 maneira similar, *N. nova* foi responsável pelo acometimento de 59% dentre 17
16 casos de nocardiose em gatos atendidos na Austrália (Malik et al., 2006). Em
17 outro estudo, *N. nova* representou 80% dos isolados em levantamento de cinco
18 casos de nocardiose em felinos domésticos atendidos nos EUA (Hirsh e Jang,
19 1999). *N. africana* foi relatada previamente no Japão em nocardiose
20 disseminada em felino arresposivo ao tratamento (Hattori et al., 2003).
21 Curiosamente, a infecção por *N. veterana* em felino doméstico identificada no
22 presente estudo, é a primeira referência que se encontra na literatura
23 consultada de nocardiose felina por esta espécie de *Nocardia*, diagnosticada
24 com base em método molecular.

25 Em cães foram isoladas no presente estudo as espécies *N. nova*, *N.*
26 *cyriacigeorgica*, *N. farcinica* e *N. veterana*. Dentre estas espécies há referência
27 prévia de isolamento de *N. nova* e *N. farcinica* em cães no Brasil, embora
28 identificadas fenotipicamente (Ribeiro et al., 2008). As demais descrições de
29 nocardiose em cães ressaltaram para o predomínio de *N. asteroides*,
30 classificadas por métodos fenotípicos, inexistindo registros baseados na
31 classificação molecular, limitando a comparação dos resultados de
32 identificação das espécies da bactéria em cães obtidas no presente estudo.

1 Em animais há uma grande variedade de manifestações clínicas da
2 nocardiose, que incluem desde afecções da glândula mamária em ruminantes
3 domésticos (bovinos e caprinos), pneumonia em eqüinos, apresentações
4 cutâneas (micetoma, celulite, úlcera), linfonomegalia, meningoencefalite,
5 piogranulomas, piotórax e peritonite em cães e gatos (Ackerman et al, 1982;
6 Biberstein et al, 1985; Edwards, 2006; Hamid et al., 2007; Costa et al., 1998).

7 Nos cães e gatos, a nocardiose manifesta-se principalmente por
8 afecções cutâneas e linfadenomegalia. Complicações ou disseminação do
9 patógeno levam a casos graves de piotórax, peritonite, pneumonia e encefalite
10 (Edwards, 2006). No presente estudo, 50% dos cães apresentaram abscessos
11 com fístulas drenantes e todos os felinos manifestaram síndrome celulite-
12 paniculite com fistulação exsudativa. As regiões de lesão cutânea mais comuns
13 em cães foram cervical ventral e inguinal, provavelmente por representarem
14 locais de predileção de ectoparasitas que levam à inoculação percutânea da
15 bactéria presente na unha ou no pêlo, pelo próprio ato de coçar do animal
16 (Kirpensteijn e Fingland, 1992; Ribeiro et al., 2002). Os linfonodos regionais ou
17 “palpáveis” adjacentes às lesões de pele se mostraram aumentados nos cães.
18 Este achado também tem sido citado por Ackerman et al. (1982) em cães,
19 notadamente em animais imunossuprimidos, com afecções disseminadas,
20 coinfectados pelo vírus da cinomose (Fawi et al., 1971; Edwards, 2006; Malik et
21 al., 2006).

22 As complicações sistêmicas da doença determinam quadros
23 pulmonares, neurológicos, articulares e abscessos em diversos órgãos. Nos
24 três cães estudados com pneumonia foram observados principalmente
25 secreção nasal mucopurulenta, hipertermia, edema, aumento de sons
26 broncovesiculares, tosse e emaciação. O diagnóstico nestes animais foi
27 firmado pelo cultivo microbiológico de lavado broncoalveolar, que tem se
28 mostrado a técnica mais fidedigna para os casos de nocardiose pulmonar
29 (Sivacolundhu et al., 2001). A ocorrência de sinais neurológicos é incomum em
30 cães e gatos com nocardiose, e são decorrentes principalmente da
31 disseminação linfohemática com formação de abscessos cerebrais (Balozet e
32 Pernot, 1936; Beaman e Sugar, 1983; Edwards, 2006). No presente estudo
33 também foram observados poucos casos de manifestação neurológica em

1 cães e gatos. No entanto, à semelhança de outros estudos, os animais com
2 doença disseminada (pneumonia, piotórax, encefalite) comumente evoluem a
3 óbito, ainda que a terapia seja prontamente instituída (Balozet e Pernot, 1936;
4 Beaman et al., 1983; Ribeiro et al., 2002; Edwards, 2006).

5 De modo geral, os cães e gatos machos são mais susceptíveis à
6 nocardiose devido ao comportamento de caça, pela procura de fêmeas em cio,
7 ou por disputas de liderança. Em estudo retrospectivo da nocardiose em 52
8 cães, a frequência de animais machos foi de 63,5% (Beaman e Sugar, 1983) e
9 de 82,35% em casos acometendo felinos (Malik et al., 2006). No presente
10 estudo também foi constatada maior ocorrência da nocardiose em cães
11 machos (71,42%) e em 100% dos casos em felinos. Também foi observado
12 que, na média, a idade dos animais acometidos se encontrou na faixa etária de
13 cães e gatos jovens. Este achado também foi citado por Beaman e Sugar
14 (1983) e poderia encontrar justificativa que, nesta faixa etária, os animais
15 possuem maior vulnerabilidade às doenças virais e bacterianas
16 imunossupressoras, maior curiosidade pelo ambiente em que vivem e início da
17 idade reprodutiva, fatores que levam os animais a interagirem mais com outros
18 animais e/ou com o seu ambiente (Overall, 1997).

19 A mastite é a apresentação clínica mais comum da nocardiose em
20 animais de produção. *N. asteroides*, *N. farcinica* e *N. nova* são referidas como
21 as principais espécies envolvidas na nocardiose mamária em vacas (Radostits
22 et al., 2007). Nas 71 vacas estudadas foram encontradas predominantemente
23 as espécies *N. nova* e *N. farcinica*, pertencentes ao complexo *N. asteroides*. De
24 maneira similar, no Canadá, *N. farcinica* foi responsável por epizootia de
25 mastite bovina (Brown et al., 2007). No Brasil *N. asteroides* (Costa et al.,
26 1996b; Costa et al., 2008), *N. farcinica*, *N. nova* e *N. otitidiscaviarum* foram
27 recentemente descritas na mastite bovina, embora diganosticadas por métodos
28 fenotípicos (Ribeiro et al., 2008). Curiosamente, foram detectados no presente
29 estudo, quatro vacas com mastite infectadas por *N. puris*. Dentre a literatura
30 consultada não foram encontrados registros envolvendo esta espécie de
31 *Nocardia* na casuística de mastite bovina, apesar das descrições de *N. puris*
32 em endoftalmite, pneumonia e abscessos cerebrais em humanos (Watanabe et
33 al., 2006). Obteve-se ainda um isolado de *N. arthritidis* nas vacas com mastite.

1 No entanto, esta espécie de *Nocardia* foi relatada somente em novilha com
2 osteomielite metatársica (Koch et al., 2009). A presença incomum de *N. puris* e
3 *N. arthritidis* causando mastite nas vacas estudadas, poderia ser justificada
4 pela adoção recente de técnicas moleculares na classificação das espécies de
5 *Nocardia* envolvidas em infecções mamárias em vacas.

6 Tanto na espécie bovina como na caprina, as infecções mamárias no
7 presente estudo foram observadas predominantemente em animais com
8 mastite clínica, geralmente em propriedades com problemas de manejo e de
9 ordenha higiênica. A presença do organismo no solo, terra e barro favorece a
10 infecção nos períodos entre ordenhas, por contaminação no ambiente pré ou
11 pós ordenha, pelas teteiras, por água contaminada de uso na sala de ordenha
12 ou contaminação no tratamento intramamário (Santos e Fonseca, 2007). As
13 propriedades rurais com isolamento de *Nocardia* spp em vacas, das quais se
14 teve acesso às informações do manejo de ordenha no presente estudo,
15 comumente apresentaram más condições na prática de ordenha, como
16 excesso de matéria orgânica no ambiente, concentrações inadequadas de anti-
17 sépticos no pré e pós “dipping”, presença de sujidade nos tetos das vacas
18 imediatamente antes da ordenha, condições impróprias de limpeza nos
19 reservatórios de água ou cloração da água usadas na limpeza de
20 equipamentos e dos tetos e uso inapropriado dos aplicadores para tratamento
21 intramamário. O conjunto destes fatores considerados predisponentes na
22 nocardiose mamária também tem sido observado em epizootias no Canadá
23 (Ollis et al., 1991; Stark e Anderson, 1990), bem como em estudos similares no
24 Brasil (Costa et al., 1996b; Costa et al., 1987; Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al.,
25 2008).

26 Estudos de celularidade no leite vacas com nocardiose ou no isolamento
27 da bactéria em tanques de expansão tem mostrado alta variabilidade de
28 resultados, desde contagens de células somáticas abaixo de 5×10^3 até
29 contagens de $8,6 \times 10^3$ células/mL. Foram isoladas duas linhagens de *N. nova*
30 em tanques de expansão individuais, nos quais as contagens de células
31 somáticas foram de 887×10^3 células/mL e de 1.966×10^3 células/ mL. Este
32 valor é superior ao permitido no Brasil pela normativa IN 51 (Brasil, 2002), cujo
33 leite deve possuir no máximo 750×10^3 células/mL. Schoonderwoerd et al.

1 (1990) descreveram infecção por *Nocardia* sp em quartos mamários de vacas e
2 nos respectivos tanques de expansão individuais, mostrando que a origem do
3 microrganismo nos tanques de expansão era proveniente dos quartos
4 infectados. Estes achados ressaltam que os casos de nocardiose mamária
5 podem apresentar grande variação na celularidade, embora geralmente
6 depreciem ou inviabilizem o uso do leite proveniente de animais infectados
7 (Stark e Anderson, 1990; Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2008).

8 Obteve-se o isolamento de uma linhagem de *N. farcinica* no leite de
9 cabra, em animal com mastite subclínica. Em contraste, a nocardiose mamária
10 em cabras tem sido associada e mastite clínica com presença de edema,
11 nodulações, hiperemia nos tetos nos tetos afetados. Na literatura consultada,
12 foi encontrado somente um relato de *N. farcinica* em cabras causando mastite
13 diagnosticado por método molecular (Hamid et al., 2007), ressaltando para a
14 ocorrência incomum desta espécie na mastite em cabras.

15 No presente estudo foi identificada também a forma rara da nocardiose
16 em eqüino por *N. nova*, secundária a obstrução recorrente das vias aéreas
17 (Olivo et al., 2010). Em equinos, as infecções pulmonares ou disseminadas
18 parecem estar relacionadas a distúrbios imunológicos que predispõem a
19 ocorrência de infecções oportunistas. Biberstein et al. (1985) investigaram 16
20 casos de nocardiose em eqüino e observaram que 90% possuíam doenças
21 imunossupressivas, como a imunodeficiência dos cavalos árabes e
22 hiperadrenocorticismos pituitário, levando a óbito por pneumonia todos os
23 animais com algum grau de imunossupressão, enquanto animais
24 imunocompetentes apresentaram somente afecções cutâneas. *N. asteroides* e
25 *N. brasiliensis* já foram descritas em afecções respiratórias em eqüinos
26 (Biberstein et al, 1985). No entanto, não foram encontrados na literatura
27 descrições de infecção por *N. nova* causando pneumonia em eqüinos, com
28 diagnóstico baseado tanto em métodos fenotípicos quanto moleculares,
29 dificultando confrontar este achado do presente estudo com a literatura
30 especializada.

31 Os antimicrobianos são utilizados desde a década de 50 no tratamento
32 de infecções bacterianas em humanos e em animais. A escolha do fármaco
33 deve ser baseada na natureza da infecção, identificação e sensibilidade dos

1 patógenos, biodisponibilidade, cinética e metabolismo dos antimicrobianos,
2 custos, praticidade e efeito residual do fármaco considerando os animais de
3 produção. Ao longo dos anos foram padronizados também testes para avaliar o
4 perfil de sensibilidade “in vitro” dos isolados aos antimicrobianos, dos quais os
5 métodos clássicos e universalmente utilizados são o de difusão com discos
6 (Bauer et al., 1966) e da concentração inibitória mínima (CLSI, 2003). O uso
7 dos testes de sensibilidade “in vitro” tem permitido investigar também a
8 ocorrência de linhagens bacterianas multirresistentes aos antimicrobianos,
9 decorrentes principalmente de mutações, conjugações ou pelo uso indevido
10 dos antimicrobianos que aumentam a pressão seletiva para isolados com
11 resistência múltipla (Giguère et al., 2010).

12 Sulfonamidas potencializadas pelo trimetoprim, aminoglicosídeos
13 (amicacina, gentamicina) e cefalosporinas (ceftiofur, ceftriaxona e cefalexina)
14 isolados ou em associação, são os antimicrobianos mais indicados no
15 tratamento da nocardiose em animais e humanos (Acha e Szyfres, 2003;
16 Edwards, 2006; Radostits et al., 2007). De maneira similar, o perfil geral de
17 sensibilidade “in vitro” das 95 linhagens de *Nocardia* spp, tanto no teste de
18 difusão com discos como na CIM, revelou que a amicacina, cefuroxima,
19 imipeném, cefalônio, cefalexina e ceftiofur foram os antimicrobianos mais
20 efetivos. Apesar da sensibilidade dos isolados, os resultados do tratamento da
21 nocardiose em animais de companhia apresentam frequentemente insucesso
22 (Beaman e Sugar, 1983), enquanto em vacas com mastite, comumente se
23 indica a ablação química do teto ou mesmo o descarte da vaca, em virtude da
24 reduzida eficiência terapêutica ou dos riscos de transmissão intrarebanho
25 (Ribeiro et al., 2006; Santos e Fonseca, 2007; Ribeiro et al., 2008).

26 A reduzida resposta dos tratamentos da nocardiose em animais
27 domésticos pode ser creditada à formação de piogranulomas pelo
28 microrganismo, que dificultam os antimicrobianos atingirem concentrações
29 terapêuticas no interior do foco infeccioso (Malik et al., 2006; Ribeiro et al.,
30 2008).

31 A ocorrência de multirresistência nas 95 linhagens de *Nocardia* isoladas
32 de animais de produção e de companhia foi elevada. Este achado pode ser um
33 resultado da adoção de tratamento de afecções bacterianas em animais

1 domésticos sem o diagnóstico do agente causal, tampouco do uso de testes de
2 sensibilidade, valendo-se muitas vezes, da experiência profissional ou do apelo
3 comercial de certos fármacos. Desta forma, a presença no presente estudo de
4 linhagens de *Nocardia* multirresistentes a diferentes fármacos reforça a
5 necessidade da adoção dos protocolos de tratamento com o respaldo de testes
6 de sensibilidade “in vitro”, e da importância do uso racional dos antimicrobianos
7 na prática veterinária (Giguère, 2010).

8 Nos 71 isolados obtidos de infecção mamária em vacas, elevada
9 resistência das linhagens foi observada para cloxacilina, ampicilina,
10 sulfametoxazol/ trimetoprim e cefoperazona. Curiosamente, estes
11 antimicrobianos constituem os principais ativos disponíveis comercialmente, no
12 Brasil, para o tratamento intramamário de vacas na lactação e no período seco
13 (Ollis et al., 1991; Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2008). Esta limitação no
14 estabelecimento do tratamento intramamário em vacas com nocardiose, reforça
15 a indicação de secagem dos quartos ou o descarte dos animais acometidos,
16 como medidas de controle e profilaxia da mastite por *Nocardia* sp em rebanhos
17 no Brasil (Costa et al., 1998; Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2008).

18 A eficácia do tratamento da nocardiose em animais de companhia é
19 controversa. Em outros países, o sucesso do tratamento de grave empiema foi
20 descrito em um gato (Campbell e Scott, 1975). Em contraste, o insucesso do
21 tratamento em sete cães com nocardiose foi reportado nos EUA (Ackerman
22 et al., 1982). No Brasil, baixa eficácia terapêutica foi relatada em nove cães
23 com nocardiose tegumentar e pulmonar, utilizando sulfa/trimetoprim ou
24 cefalosporinas, prescritos com o respaldo do antibiograma (Ribeiro et al.,
25 2008). Foi evidenciado no presente estudo, resistência dos isolados
26 predominantemente para ampicilina, cefalexina e cloxacilina.
27 Interessantemente, as cefalosporinas são um dos grupamentos de eleição na
28 prática terapêutica em animais de companhia, notadamente no tratamento de
29 afecções dos sistemas tegumentar, urinário e gastrintestinal (Ettinger e
30 Feldman, 2010). Ademais, as cefalosporinas são indicadas no tratamento da
31 nocardiose em cães e gatos (Edwards, 2006; Isik et al., 2009). Estes resultados
32 sinalizam que, mesmo diante da prescrição do tratamento antimicrobiano

1 adequado, respaldado em testes de sensibilidade, prognóstico da nocardiose
2 em animais de companhia é reservado.

3 Lowman et al. (2010) observaram baixa concordância entre os testes de
4 difusão com disco e CIM, enquanto Biehle et al. (1994) e Ambaye et al. (1997)
5 encontraram boas concordâncias entre estas técnicas de sensibilidade
6 microbiana “in vitro”. No presente estudo, foram observadas discrepâncias
7 entre os resultados do teste de difusão com discos e CIM nos 95 isolados de
8 *Nocardia* spp. O teste de difusão apresenta como vantagens o menor custo,
9 boa sensibilidade e padronização (Bauer et al., 1966). No entanto a CIM é
10 reconhecida como a técnica mais específica, também padronizada, permitindo
11 a visualização dos resultados por gradientes de concentração do fármaco e,
12 atualmente, está disponível comercialmente sob a forma de kits em tiras
13 impregnadas pelos fármacos (Ambaye et al., 1997; Tomlin et al., 2001; Hansen
14 et al., 2008). No entanto, a despeito das vantagens supracitadas, o custo da
15 CIM em kits ainda é elevado ou impeditivo na prática de rotina de diagnóstico
16 veterinário para a avaliação de sensibilidade de agentes bacterianos (Giguère
17 et al., 2010).

18 A magnificação da imagem dos seis isolados de *Nocardia* por
19 microscopia eletrônica de varredura permitiu visualizar detalhadamente
20 microrganismos cocobacilares e, caracteristicamente, formas ramificadas do
21 organismo, com tendência a “fragmentação”, sugestivos do gênero *Nocardia*.
22 De maneira similar, tais achados foram observados em isolado de
23 *N. asteroides* tipo IV isolado de mastite no Brasil (Ribeiro et al., 2008). No
24 entanto, esta técnica está restrita ao diagnóstico experimental ou em pesquisa,
25 em virtude do custo elevado e pequeno número de laboratórios em condições
26 de executar a técnica.

27 Apesar da frequência reduzida de infecções mamárias por *Nocardia* em
28 comparação com outros microrganismos na gênese da mastite bovina,
29 diferentes pesquisadores em outros países (Tarabla et al., 1993; Brown et al.,
30 2007; Pisoni et al., 2008) e no Brasil (Costa et al., 1996a), tem se preocupado
31 em avaliar a resistência térmica da bactéria, simulando condições do binômio
32 tempo e temperatura utilizados nos processos clássicos de tratamento do leite.

1 Komaid et al. (2001) notificou a resistência térmica do gênero *Nocardia*
2 entre 45°C a 60°C por até oito horas. Costa et al. (1996a) no Brasil, alertaram
3 para a resistência de *N. asteroides* isolados do leite de vacas com mastite, às
4 condições de pasteurização lenta e rápida. No presente estudo, foi observado
5 que 84, 21%, dos isolados mantiveram-se viáveis após temperatura de fervura,
6 enquanto 50,52% e 2,10% resistiram, respectivamente, a um e cinco minutos
7 de fervura. Estes achados se contrapõem às afirmações de outros autores
8 (Morais et al., 2000; Furlanetto et al. 2009), nos quais a simples expansão do
9 leite é considerado suficiente para eliminar os principais patógenos do leite. No
10 entanto, não foram encontrados na literatura especializada, estudos
11 conduzidos na avaliação da resistência térmica de isolados de *Nocardia* às
12 condições de fervura do leite. Em que pese a dificuldade de contrastar os
13 resultados da termoresistência dos 95 isolados do presente estudo, às
14 condições experimentais de fervura em linhagens isoladas do leite, os
15 resultados obtidos são preocupantes no contexto de saúde pública, pois
16 estima-se que 30% do leite produzido no Brasil são comercializados de
17 maneira “informal” e a fervura é, culturalmente, o principal e mais confiável
18 método de tratamento do produto pela população em geral (Freitas Filho et al.,
19 2009).

20 A nocardiose humana é reconhecida como doença emergente em alguns
21 países, particularmente em pacientes com algum grau de imunossupressão
22 (Muñoz et al., 2007; Tan et al., 2010; Tremblay et al., 2010). A doença se
23 manifesta principalmente sob a forma cutânea, pulmonar e, em casos severos,
24 sob a forma neurológica (Acha e Szyfres, 2003). *N. asteroides (sensu stricto)*,
25 *N. brasiliensis*, *N. farcinica* e *N. nova* são as principais espécies de *Nocardia*
26 isoladas em humanos. Menos comumente são descritas na nocardiose humana
27 *N. otitidiscaviarum* e *N. pseudobrasiliensis* e, raramente, *N. abscessus*, *N.*
28 *brevicatena*, *N. africana*, *N. paucivorans*, *N. carnea*, *N. transvalensis* e *N.*
29 *veterana* (Saboulle e Sussland, 2003).

30 No Brasil, a nocardiose humana é considerada doença rara (Pedro et al.
31 1993; Saraça et al., 1993). No presente estudo foram identificadas *N. farcinica*,
32 *N. nova* e *N. asiatica* em sete pacientes, dos quais dois acometidos pelo vírus
33 HIV.

1 Dentre a literatura consultada, o isolamento de *N. asiatica* se constitui no
2 primeiro registro de nocardiose humana por esta espécie no Brasil. Tal achado
3 pode encontrar justificativa pela inexistência de classificação molecular de
4 linhagens de *Nocardia* isoladas de humanos no país.

5 Estudo recente realizado em 22 casos de nocardiose em humanos em
6 Porto Alegre, RS, também identificou predomínio das infecções dos pacientes
7 por espécies do complexo *N. asteroides* (Chedid et al., 2007). Não está
8 completamente esclarecido na literatura o impacto dos animais domésticos na
9 transmissão de *Nocardia* spp para os humanos (Beaman e Sugar, 1983; Acha
10 e Szyfres, 2003; Edwards, 2006). Em contraste, recentemente têm sido
11 descritos casos de nocardiose humana secundários a mordeduras e
12 arranhaduras de felinos domésticos (Sachs, 1992; Bottei et al., 1994; Malik et
13 al. 2006).

14 Ao contrário dos isolados de animais, não foi observada multirresistência
15 aos antimicrobianos nas linhagens de *Nocardia* de origem humana. Apesar do
16 pequeno número de isolados, este achado sinaliza para o maior rigor no uso da
17 terapia antimicrobiana em humanos, fato que minimizaria a pressão seletiva
18 para linhagens com resistência múltipla.

19 A relativa similaridade entre as espécies de *Nocardia* isoladas de
20 humanos e animais domésticos no presente estudo, o estreito contato dos
21 humanos com animais de companhia e a termorresistência dos isolados
22 obtidos do leite às condições de fervura, sinalizam para o potencial zoonótico
23 da nocardiose em animais domésticos e a necessidade de evitar o contato de
24 humanos – particularmente imunossuprimidos – com animais de companhia
25 apresentando sinais compatíveis de nocardiose, bem como evitar o consumo
26 de leite cru de animais domésticos sem tratamento térmico adequado.

27

28

29

30

31

7 CONCLUSÕES

• O predomínio de isolamento de *N. nova* e *N. farcinica*, pertencentes ao complexo *N. asteroides*, reforça a patogenicidade destas espécies na nocardiose em humanos, animais de produção e de companhia;

• A similaridade observada entre as espécies de *Nocardia* isoladas de vacas, cães, gatos e humanos, sinaliza para o potencial zoonótico destas espécies domésticas na transmissão do patógeno para humanos;

• Foi observado isolamento incomum de *N. veterana* em infecção cutânea em gato e cão, *N. puris* e *N. arthritidis* em vacas com mastite, *N. farcinica* em cabra com mastite, *N. nova* em equino com pneumonia, o que pode ser justificado pelo uso recente de técnicas de biologia molecular na classificação de espécies de *Nocardia* em animais domésticos;

• Foi observada maior frequência de isolamento de *Nocardia* spp. nos casos de mastite clínica em vacas e em infecções cutâneas e do trato linfático em cães e gatos, confirmando o predomínio da nocardiose associada a estas manifestações clínicas em animais domésticos;

• O perfil de sensibilidade microbiana “in vitro” dos isolados no método de difusão com discos e CIM, revelaram que a amicacina e cefalosporinas (cefalexina, cefalônio, cefuroxima e ceftiofur) foram os antimicrobianos mais efetivos frente às linhagens, podendo ser indicados como opções de fármacos no tratamento da nocardiose em animais de companhia e ou em vacas;

• A presença de multirresistência aos antimicrobianos observada nos isolados de *Nocardia* spp. obtidos de animais de produção e de companhia, particularmente frente à ampicilina e cloxacilina, reforça para a necessidade da instituição dos tratamentos com respaldo nos testes de sensibilidade microbiana “in vitro” e para o uso racional dos antimicrobianos;

• A termorresistência observada nas linhagens às condições de fervura, principalmente nos isolados de leite de vaca, ressalta para a necessidade de o consumo de leite inspecionado ou submetido a processos térmicos adequados ao tratamento do produto.

1 8 REFERÊNCIAS

- 2 ACKERMAN, N.; GRAIN JR., E. e CASTLEMAN, W. – Canine nocardiosis.
3 **Journal of American Animal Hospital Association**, Denver, v.18, p. 147–
4 153, 1982.
- 5 ACHA, P.N.; SZYFRES, B. – Nocardiosis. In:____. **Zoonosis y enfermedades**
6 **transmisibles comunes al hombre y a los animals**. 3. ed. Washington,
7 Organización Panamericana de la Salud, , v.1, p.212–216. 2003.
- 8 AGTEROF, M.J.; VAN DER BRUGGEN, T.; TERSMETTE, M; TER BORG, E.J.;
9 VAN DEN BOSCH, J.M.M; BIESMA, D.H. Nocardiosis: a case series and a mini
10 review of clinical and microbiological features.**The Netherlands Journal of**
11 **Medicine**, Amsterdam, v.65. p. 199–202, 2007.
- 12 AJELLO,L.; WALKER, W.W.; DUNGWORTH, D.L.; BRUMFIELD, G. L. Isolation
13 of *Nocardia brasiliensis* from a cat with a review of its prevalence and
14 geographic distribution. **Journal of the American Veterinary Medicine**
15 **Association**, Schaumburg, v. 138, p. 370-376. 1961.
- 16 AMBAYE, A.; KOHNER, P.C.; WOLLAN, P.C.; ROBERTS, K.L.; ROBERTS,
17 G.D.; COCKERILL, F.R. Comparison of Agar Dilution, Broth Microdilution, Disk
18 Diffusion, E-Test, and BACTEC Radiometric Methods for Antimicrobial
19 Susceptibility Testing of Clinical Isolates of the *Nocardia asteroides* Complex
20 **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 4, p. 847–852. 1997.
- 21 ARGUEDAS, M.G. Actinomycosis and Nocardiosis. In:____: SELTON, D.C.;
22 LONG, M. **Equine Infectious Diseases**. Saint Louis: Elsevier, 2007. p.269-
23 275.
- 24 AYRES, M.; AYRES JR., M., AYRES, D.L. e SANTOS, A.S. **Biostat 5.0:**
25 **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**.
26 Sociedade Civil Mamirauá - Belém, MCT-CNPq – Brasília. 364p, 2007.

- 1 BACCIARINI, L.N.; POSTHAUS, H.; PAGAN, O.; MISEREZ, R. *Nocardia nova*
2 causing pulmonary nocardiosis of Black Crakes (*Limnocorax flavirostra*).
3 **Veterinary Pathology**, Madison, v.36, p. 345-347, 1999.
- 4 BALOZET, L.; PERNOT, P. Méningite du chien causée par un Actinomyces.
5 **Bulletin d'Académie Vétérinaire de France**, v. 9, p.168-177. 1936.
- 6 BENITES, N.R.; BALIAN, S.C.; FERREIRA NETO, J.S.; SAKAMOTO, S.M.;
7 GUERRA, J.L.; SOUSA, S.L.P.; PANETTA, J.C. Isolamento de *Nocardia*
8 *asteroides* de lesão granulomatosa em carne bovina. Acesso em 03 out 2010.
9 Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/artigos/ha0006.htm>
- 10 BASSAM, L.S.; HASSO, S.A. Mastitis in goats caused by *Nocardia asteroides*.
11 **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 26, p. 287-290, 1997.
- 12 BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic
13 susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal**
14 **of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- 15 BAWA, B; BAI, J.; WHITEHAIR, M.; PURVIS, T.; DEBEY, B.M. Bovine abortion
16 associated with *Nocardia farcinica*. **Journal Veterinary Investigation**, v.22,
17 p.108-111, 2010.
- 18 BEAMAN, B.L. e BEAMAN, L. *Nocardia* species: host-parasite relationships.
19 **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.7, p. 213-264, 1994.
- 20 BEAMAN, B.L.; SUGAR, A.M. *Nocardia* in naturally acquired and experimental
21 infections in animals. **Journal of Hygiene**, London, v. 91, p. 393–419, 1983.
- 22 BERGONIER, D.; DE CRÉMOUX, R.; RUPP, R.; LAGRIFFOUL, G.;
23 BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants. **Veterinary Research**,
24 London, v. 34 p. 689–716, 2003.
- 25 BIBERSTEIN, E.L.; JANG, S.S.; HIRSH, D.C. *Nocardia* asteroids in horses: A
26 review. **Journal of American Veterinary Medicine Association**,
27 **Schaumburg**, v.186, n.3, p.273 – 277, 1985.

- 1 BIEHLE, J. Comparative Evaluation of the Etest for Susceptibility Testing of
2 *Nocardia* Species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**,
3 Amsterdam, v. 19, n. 2, p.101-110, 1994.
- 4 BIEHLE, J.R.; CAVALIERI, S.J.; FELLAND, T.; ZIMMER, B.L. Novel Method for
5 Rapid Identification of *Nocardia* Species by Detection of Preformed Enzymes.
6 **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 34, n. 1, p.103–107, 1996.
- 7 BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 23.ed. São Paulo: Melhoramentos,
8 1984. 1234p.
- 9 BOTTEI, E.; FLAHERTY, J.P.; KAPLAN, L.J.; DUFFEE–KERR, L.
10 Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection via cat scratch: a second
11 case. **Clinical infectious Disease**, Oxford, v. 18, p. 649-650, 1994.
- 12 BRADNEY, I.W. Vertebral osteomyelitis due to *Nocardia* in a dog. **Australian**
13 **Veterinary Journal**, Saint Leonard, v. 62, p. 315-316, 1985.
- 14 BRASIL. Ministério da agricultura. Departamento de Inspeção de Produtos de
15 Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. **Regulamento da Inspeção**
16 **Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal**. Brasília, DF, 1952.
- 17 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução
18 Normativa n.051 de 18 de setembro de 2002. **Regulamentos técnicos de**
19 **produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite**
20 **tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento**
21 **técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel**.
22 Brasília, 2002. Disponível em: (<http://www.agricultura.gov.br/Instrução>
23 Normativa 51). Acesso em 08 de janeiro de 2008.
- 24
- 25 BRASIL. **Ministério da Saúde. Dados e Pesquisas em Doenças**
26 **Sexualmente Transmissíveis e aids**. Disponível em: <www.aids.gov.br/cgi
27 /tabcgi.exe?tabnet/sp.def>. Acesso em: 03/10/ 2005a.

- 1 BRASIL. **Ministério da Saúde. Programa Nacional de DST/Aids.** Secretaria
2 de Vigilância em Saúde, Boletim Epidemiológico DST/Aids. 2005b. 47p.
- 3 BROSS, J.E.; GORDON, G. Nocardial Meningitis: Case Reports and Reviews.
4 **Reviews of Infetious Diseases**, v.13, p. 160-165, 1991.
- 5 BROWN, J.M.; COWLEY, K.D.; MANNINEN, K.I.; MCNEIL, M.M. Phenotypic
6 and molecular epidemiologic evaluation of a *Nocardia farcinica* epizootic
7 mastitis. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.125, p.66–72, 2007.
- 8 BROWN, J.M.; MCNEIL, M.M. *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*,
9 *Actinomadura*, *Streptomyces*, and other aerobic actinomycetes In: MURRAY,
10 P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A. e YOLKEN, R.H.
11 **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed., ASM Press: Washington, 2003.
12 p.502-531.
- 13 BROWN-ELLIOTT, B.A.; BROWN, J.M.; CONVILLE, P.S.; WALLACE, R.J.
14 Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current
15 molecular taxonomy. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.19,
16 p.259–282. 2006.
- 17 CAMPBELL, B.; SCOTT, D.W. – Successful management of *Nocardial*
18 empyema in a dog and cat. **Journal of American Animal Hospital**
19 **Association**, Denver, v.11, p. 769-773, 1975.
- 20 CASTELLI, L.; ZLOTNIK, H.; PONTI, R. e VIDOTTO, V. First reported *Nocardia*
21 *otitidiscaviarum* infection in an AIDS patient in Italy. **Mycopathologia**,
22 Dordrecht, v.126, p. 131–136, 1994.
- 23 CASTRO, L.G.; BELDA JÚNIOR, W.; SALEBIAN, A.; CUCÉ, L.C. Mycetoma: a
24 retrospective study of 41 cases seen in São Paulo, Brazil, from 1978 to 1989.
25 **Mycoses**, München, v. 36, p. 89–95, 1993.
- 26 CASTRO, L.G.M.; VALENTE, N.Y.S.; GERMANO, J.A.M.; VACCARI, E.M; da
27 SILVA, LACAZ, C. Mycetoma in an HIV-infected patient. **Revista do Hospital**

- 1 **de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v.54,
2 p.169-171, 1999.
- 3 **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards
4 for antimicrobial susceptibility testing. CLSI–NCCLS, approved standard M100-
5 S15. Wayne, PA, USA, 2005.
- 6 **CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute.** Susceptibility Testing of
7 *Mycobacteria, Nocardiae*, and Other aerobic actinomycetes. Wayne, v. 23,
8 n.18, 2003.
- 9 **CONVILLE, P.S.; WITEBSKY, F.G.** Current issues pertaining to the *Nocardia*
10 species. **Clinical Microbiology Newsletter**, Syracuse, v.26, p. 57–62, 2004.
- 11 **CORRÊA, C.N.M.; CORRÊA, W.M.** Nocardiose hepática em vaca leiteira.
12 **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.8, p.27-30,
13 1980.
- 14 **CORRÊA, C.N.M.; CORRÊA, W.M.; GOTTSCHALK, A.F.; MORENO, G.**
15 Nocardiose: um caso em cão. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo,
16 v.40, n.1, p.79-83, 1973.
- 17 **CORRÊA, W.M. e CORRÊA, C.N.M.** – Nocardioses. In: __. **Enfermidades**
18 **Infeciosas dos Mamíferos domésticos**. Rio de Janeiro, Medsi, p.355–360.
19 1992.
- 20 **CORRÊA, W.M.; CORRÊA, C.N.M.; LOPES, C.A.M.** Nocardiose em égua.
21 **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v.7, p.81-5,
22 1979.
- 23 **CORTI, M.E.; VILLAFANE–FIOTI, M.F.** Nocardiosis: a review. **International**
24 **Journal of Infectious Disease**, Oxford, v. 7, p. 243-250, 2003.
- 25 **COSTA, E.O.; MACEDO, M.M.; COUTINHO, S.D.** Isolamento de
26 Actinomicetales aeróbios do gênero *Nocardia* de processos infecciosos dos
27 animais domésticos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária da**
28 **Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 24, p. 17–21, 1987.

- 1 COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; RIBEIRO, M.G.; SILVA, E.T.R.; VENZON, P.
2 *Nocardia* sp strains isolated from clinical and subclinical bovine mastitis:
3 evaluation of the thermic resistance on the milk pasteurization
4 (temperatura/time). In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 19., Edinburgh,
5 1996a. **Proceedings**. p.206–207.
- 6 COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T. PARDO, R.B.; SILVA, J.B.;
7 SANCHES, R.B. An increased incidence of mastitis caused by *Prototheca*
8 species and *Nocardia* species on a farm in São Paulo, Brazil. **Veterinary**
9 **Research Communications**, Berlim, v. 20, p. 237–241, 1996b.
- 10 COSTA, E.O.; RIBEIRO, A.R.; WATANABE, E.T.; MELVILLE, P.A. – Infectious
11 bovine mastitis caused by environment organisms. **Journal of Veterinary**
12 **Medicine, B**, Malden, v.45, p. 65–71, 1998.
- 13 CHEDID, M.B.; CHEDID, M.F.; PORTO, N.S.; SEVERO, C.B. e SEVERO, L.C.
14 *Nocardial* infections: report of 22 cases. **Revista do Instituto de Medicina**
15 **Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 49, p. 239-246, 2007.
- 16 CHUN, J.; GOODFELLOW, M. A Phylogenetic Analysis of the Genus *Nocardia*
17 with 16S rRNA Gene Sequences **International Journal of Systematic**
18 **Bacteriology**, Spencers Wood, v. 45, n. 2, p. 240–245. 1995.
- 19 EDWARDS, D.F. Actinomycosis and Nocardiosis. In:GREENE, C.E. **Infectious**
20 **diseases of the dog and cat**. 3. ed. Philadelphia: Elsevier, 2006. p.451–461.
- 21 ERIKSON, D. Thermoduric Properties of *Nocardia* sebiovorans and other
22 Pathogenic Aerobic Actinomycetes. **Journal of General Microbiology**,
23 Reading, v.13, p.127-135. 1955.
- 24 ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Textbook of Veterinary Internal Medicine**.
25 Saint Louis: Elsevier, 2010. 2208p.
- 26 EVERITT, BS. **The analysis of contingency tables**. London: Chapman and
27 Hall Ltda., 1977.

- 1 EZAKI, T.; HASHIMOTO, Y.; YABUCHI, E. Fluorometric deoxyribonucleic acid-
2 deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to
3 membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine
4 genetic relatedness among bacterial strains. **International Journal of**
5 **Systematic Bacteriology**, Reading, v. 39, p.224–229. 1989.
- 6 FAWI, M.T.; TAG EL DIN, M.H.; EL SANOUSI, S.M. Canine distemper as a
7 predisposing factor for *Nocardia asteroides* infection in the dog. **Veterinary**
8 **Record**, London, v.88, n.13, p.326-8, 1971.
- 9 FREITAS FILHO, J.F.; FILHO, J.S.; GONÇALVES, T.M.; SOUZA, J.F.; SILVA,
10 A.H.; OLIVEIRA, H.B.; BEZERRA, J.D. Caracterização físico-química e
11 microbiológica do leite 'in natura' comercializado informalmente no município
12 de Garanhuns-PE, **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta
13 Grossa, v. 03, n. 02: p. 38-46, 2009.
- 14 FURLANETTO, L. V.; SOUZA, G. O.; FIGUEIREDO E. E. S.; BALIAN, S. C.;
15 PINHEIRO, S.R.; TELLES, E.O. Avaliação da fervura na ativação de
16 patógenos em leite integral de vaca, cabra e búfala experimentalmente
17 contaminados. **Ars Veterinaria**, v. 25, n. 2, p. 63-67, 2009.
- 18 GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING,
19 P.M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária**. 4 ed. São Paulo:
20 Roca, 2010. 684 p.
- 21 GLUPCZYNSKI, Y.; BERHIN, C.; JANSSENS, M.; WAUTERS, G.
22 Determination of antimicrobial susceptibility patterns of *Nocardia* spp. from
23 clinical specimens by Etest. **Clinical Microbiology Infectious**, Malden, v.12, p.
24 905–912, 2006.
- 25 GORDON, R. E., D. A. BARNETT, J. E. HANDERHAN, and C. HORNAY
26 PANG. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin strain.
27 **International Journal of Systemic Bacteriology**, Washington, v. 24, p. 54-63.
28 1974.

- 1 GOTTSCHALK, A.F.; CORRÊA, C.N.M.; CORRÊA, W.M.; CAMPOS, C.E.O.P.
2 Isolamento de *Nocardia asteroides* de suíno. **Arquivos do Instituto Biológico**,
3 São Paulo, v.38, n.3, p.167-71, 1971.
- 4 HAMID, M. E.; EL DIN, O.A.G; EL HUSSEIN, H. A; MAHGOUB, A.;IBRAHIM, K.
5 E. E. ABDEL SALAM, E.B. Short communication: First Report of *Nocardia*
6 *farinica*-Induced Granulomatous Mastitis in a Saanen Goat in the Sudan **The**
7 **Sudan Journal of Veterinary Resesearch**, Khartoum, v. 22, p. 83-88. 2007.
- 8 HANSEN, G.; SWANZY, S.; GUPTA, R.; COOKSON, B.; LIMAYE, A.P. In vitro
9 activity of fluoroquinolones against clinical isolates of *Nocardia* identified by
10 partial 16S rRNA sequencing **European Journal of Clinical Microbiology**
11 **Infectious Disease**, Basel, v. 27, p. 115–120. 2008.
- 12 HATTORI, Y.; KANO, R.; KUNITANI, Y.; YANAI, T.; HASEGAWA, A. *Nocardia*
13 *africana* Isolated from a feline mycetoma. **Journal of Clinical Microbiology**,
14 Washington, v.41, n.2, p.908-910, 2003.
- 15 HIRSH, D.C.; JANG, S.S. Antimicrobial susceptibility of *Nocardia nova* isolated
16 from five cats with nocardiosis. **Journal of the American Veterinary Medical**
17 **Association**, Schaumburg. v. 215, p.815–817. 1999
- 18 ISIK,K.;OZDEMIR-KOCAK, F. Antimicrobial activity screening of some
19 sulfonamide derivatives on some *Nocardia* species and isolates
20 **Microbiological Research**, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 49-58. 2009.
- 21 KAGEYAMA, A., K. YAZAWA, J. ISHIKAWA, K. HOTTA, K. NISHIMURA, AND
22 Y. MIKAMI. *NOCARDIAL* infections in Japan from 1992 to 2001, including the
23 first report of infection by *Nocardia transvalensis*. **European Journal of**
24 **Epidemiology**, Dordrecht, v.19, p.383–389, 2004.
- 25 KAGEYAMA, A.; MIKAMI, Y. Taxonomy and phylogenetic analysis of infectious
26 *Nocardia* strains isolated from clinical samples. **Nippon Ishinkin Gakkai**
27 **Zasshi**, Tokyo, v.48, n.2, p.73–8, 2007.

- 1 KAGEYAMA, A.; POONWAN,N.; YAZAWA,K.; MIKAMI,Y.; NISHIMURA, K.
2 *Nocardia asiatica* sp. nov., isolated from patients with nocardiosis in Japan and
3 clinical specimens from Thailand. **International Journal of Systematic and**
4 **Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p.125–130, 2004.
- 5 KAGEYAMA, A.; SATO, H.; NAGATA, M.; YAZAWA, K.; KATSU, M.; MIKAMI,
6 Y.; KAMEI, K.; NISHIMURA, K. First human case of nocardiosis caused by
7 *Nocardia pseudobrasiliensis* in Japan **Mycopathologia**, Dordrecht, v.156 p.
8 187–192. 2002.
- 9 KIRPENSTEIJN, J.; FINGLAND, R.B. Cutaneous actinomycosis and
10 nocardiosis in dogs: 48 cases (1980–1990). **Journal of the American**
11 **Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 201, p. 917–920, 1992.
- 12 KISKA, D.L.; HICKS, K.; PETTIT, D.J. Identification of medically relevant
13 *Nocardia* species with an abbreviated battery of test. **Journal of Clinical**
14 **Microbiology**, Washington, v. 40, p.1346-1351, 2002.
- 15 KOCH, C.; DREES, R.; HARTMANN, F.A.; MCGUIRK, S.M.; PRICHARD, M.A.
16 *Nocardia arthritidis* infection in the distal metaphysis of the metatarsal III and IV
17 bone of a heifer. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**,
18 Schaumburg, v. 234, n. 5, p. 669-73. 2009.
- 19 KOMAID, A.G. Temperature resistant *Nocardia* biovarieties in Tucumán,
20 Argentina. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 154, p. 57–62. 2001.
- 21 KWON-CHUNG, K.J.; BENNETT, J.E. Nocardiosis. *In*: **Medical Mycology**.
22 Philadelphia: Lea e Febiger, 1992. p. 1074-1093.

- 1 LAI, C.C.; TAN, C.K.; LIN, S.H.; LIAO, C.H.; CHOU, C.H.; HSU, H.L.; HUANG,
2 Y.T.; HSUEH, P.R. Comparative in vitro activities of nemonoxacin, doripenem,
3 tigecycline and 16 other antimicrobials against *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia*
4 *asteroides* and unusual *Nocardia* species. **Journal of Antimicrobial**
5 **Chemotherapy**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 73-78. 2009.
- 6 LAURENT, F.; CARLOTTI, A.; BOIRON, P.; VILLARD, J.; FRENEY, J.
7 Ribotyping: a tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides*
8 complex species. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.
9 1079–1082. 1996.
- 10 LAURENT, F.J.; PROVOST, F.; BOIRON, P. Rapid Identification of Clinically
11 Relevant *Nocardia* Species to Genus Level by 16S rRNA Gene PCR **Journal of**
12 **Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 1, p. 99–102. 1999.
- 13 LERNER, P.I. Nocardiosis. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 22, p.
14 891-905, 1996.
- 15 LOWMAN, W.; AITHMA, N. Antimicrobial Susceptibility Testing and Profiling of
16 *Nocardia* Species and Other Aerobic Actinomycetes from South Africa:
17 Comparative Evaluation of Broth Microdilution versus the Etest. **Journal Of**
18 **Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 12, p. 4534–4540. 2010.
- 19 LUQUE, R.; ASTORGA, C. e TARRADAS, B. *Nocardia otitidiscaviarum*
20 infection in a cat. **Veterinary Records**, London, v.151, p. 488, 2002.
- 21 MALIK, R.; KROCKENBERGER, M.B.; O'BRIEN, C.R. et al. *Nocardia*
22 infections in cats: a retrospective multi-institutional study of 17 cases.
23 **Australian Veterinary Journal**, Saint Leonard, v.84, n.7, p.235-245, 2006.
- 24 MANDELL, GL; BENNETT, JE; DOLIN, R. *Nocardia* species. In: **Principles**
25 **and Practice of Infectious Diseases**. 5 ed. Philadelphia; Churchill Livingstone.
26 v. 2, 2000, p. 2637-2644.
- 27 MAROCO, J. **Análise Estatística - com utilização do SPSS**. 3 ed. Lisboa:
28 Símbolo, 2007, 824 p.

- 1 MEAD, R.; CURNOW, R.N. **Statistical methods in agriculture and**
2 **experimental biology**. 2.ed. London: Chapman e Hall, 1993. 415p.
- 3 MEGID, J.; MÜLLER, E.E.; FREITAS, J.C.; VIOTTI, N.M.A.; BRACARENSE,
4 A.P.F.R.L.; COSTA, E.O.; COUTINHO, S.D. Mamite caprina por *Nocardia*
5 *asteroides*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São
6 Paulo, v. 42, n.6, p.545-547. 1990.
- 7 MISHRA, S.K.; GORDON, R.E.; BARNETT, D.A. Identification of *Nocardiae* and
8 *Streptomyces* of medical importance. **Journal of Clinical Microbiology**,
9 Washington, v. 11 p. 728–736. 1980.
- 10 MORAIS, T.B.; SIGULEM, D.M. Efeito da fervura doméstica e da refrigeração
11 na carga bacteriana do leite pasteurizado tipo C **Jornal de Pediatria**, Rio de
12 Janeiro, v. 76, n.5, p. 357-360. 2000.
- 13 MUIR, D.B.; PRITCHARD, R.C. Use of the BioMerieux ID 32C Yeast
14 Identification System for Identification of Aerobic Actinomycetes of Medical
15 Importance **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.35, n.12, p.
16 3240–3243. 1997.
- 17 MUÑOZ, J.; MIRELIS, B.; ARAGÓN, L. M.; GUTIÉRREZ, N.; SÁNCHEZ, F.;
18 ESPAÑOL, M.; ESPARCIA, O.; GURGUÍ, M.; DOMINGO, P.; COLL, P. Clinical
19 and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. **Journal of Medical**
20 **Microbiology**, Washington, v. 56, p.545–550, 2007.
- 21 NERO, L.A.; MAZIERO, D.; BEZERRA, M.M.S. Hábitos alimentares do
22 consumidor de leite cru de Campo Mourão – PR. *Semina: Ciências Agrárias*,
23 v.24, n.1, p.21-26, 2003.
- 24
- 25 NGUI-YEN J.H. *et al.* **The use of Etest for susceptibility testing of *Nocardia***
26 ***asteroides***. In American Society for Microbiology, 1994, 1 cartaz, color (C326).
- 27 OLIVO, G.; GONÇALVES, R.C.; CHIACCHIO, S. B.; AMORIM, R.M.; CONDAS,
28 L.A.Z.; RIBEIRO, M.G.; BORGES, A.S. **Nocardiose pulmonar secundária à**
29 **obstrução respiratória das vias aéreas (orva) em equino – relato de caso.**

- 1 Trabalho apresentado na XI Conferência Anual da ABRAVEQ, São Paulo,
2 2010.
- 3 OLLIS, G. W.; SCHOONDERWOERD, M.; SCHIPPER, C.. An investigation of
4 risk factors for nocardial mastitis in central Alberta dairy herds. **Canadian**
5 **Veterinary Journal**, Ottawa, v. 32 p. 227-231. 1991.
- 6 OVERALL, K.L. **Clinical behavioral medicine for small animals**. Missouri:
7 Mosby, 1997, 544pg.
- 8 PEDRO, R.J.; LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MELO, N.T.; MORELLI, A.S.; ULSON,
9 C.M.; NOWAKOWSKI, A. Infecção osteoarticular por *Nocardia brasiliensis* em
10 paciente aidético: registro de uma observação **Anais Brasileiros de**
11 **Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 5, p. 247-249. 1993.
- 12 PETRILLO, V.F.; SEVERO, L.C.; LONDERO, A.T.; PORTO, N.S. Pulmonary
13 nocardiosis report of the first two Brazilian cases. **Mycopathologia**, Dordrecht,
14 v.66, p.17–20, 1978.
- 15 PIER, A.C.; ENRIGHT, J.B. Oral infectivity and Thermal Resistance of
16 *Nocardia asteroides* in milk. **Public Health Reports**, v. 76, n. 10, p.889-896.
- 17 PINTADO, V.; GOMÉZ-MAMPASO, E.; COBO, J.; QUEREDA, S.;
18 MESEGUER, M.A.; FORTÚN, J.; NAVAS, E.; MORENO, S. *Nocardial* infection
19 in patients with the human immunodeficiency virus. **Clinical Microbiology**
20 **and Infection**, Basel, v.9, p.716-720, 2003.
- 21 PISONI, G.; LOCATELLI, C.; ALBORALI, L.; ROSIGNOLI, C.; ALLODI, S.;
22 RICCABONI, P.; GRIECO, V.; MORONI, P. *Short Communication*: Outbreak of
23 *Nocardia neocaledoniensis* Mastitis in an Italian Dairy Herd **Journal of Dairy**
24 **Science**, Champaign, v. 91, n. 1, p.136–139. 2008.
- 25 QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. – The
26 Actinomycetes. In:__. **Clinical Veterinary Microbiology**. London, Wolfe, 1994.
27 p.144-155.

- 1 RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W.; CONSTABLE, P.D. –
2 Diseases of the mammary gland. In:___**Veterinary Medicine – A Textbook of**
3 **the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats.** 10. ed.
4 Philadelphia, Saunders; Elsevier, 2007. p. 673–762.
- 5 RAMOS-VARA, J.A.; CHING-WU, C.; LONG LIN, T.; MILLER, M.A. *Nocardia*
6 *tenerifensis* genome identification in cutaneous granuloma of a cat. **Journal of**
7 **Veterinary Diagnostic Investigation**, Davies, v.9, p.577-580, 2007.
- 8 REIS, M.A.; COSTA, R.S.; FERRAZ, A.S. Causes of death in renal transplant
9 recipients: a study of 102 autopsies from 1968 to 1991. **Journal of the Royal**
10 **Society of Medicine**, London, v.88, p.24–27, 1995.
- 11 RIBEIRO, L. **Inativação térmica (75°C) de Mycobacterium bovis (isolados**
12 **de origem bovina) em leite integral experimentalmente inoculado.**
13 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Departamento de Medicina
14 Veterinária Preventiva e Saúde Animal, USP, São Paulo, 2009.
- 15 RIBEIRO, M.E.R.; PETRINI, A. L.; BARBOSA, R.S. ; ZANELA, M.B.; JORGE
16 FAINÉ GOMES, J.F.; STUMPF JR., W.; SCHRAMM, R. Ocorrência de mastite
17 causada por *Nocardia spp* em rebanhos de unidades de produção de leite no
18 sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, Porto Alegre,
19 v.12, p.471-473. 2006.
- 20 RIBEIRO, M.G.; AGUIAR, D.M.; PAES, A.C. et al. – Nocardiose cutânea
21 associada à cinomose em cães. Relato de dez casos. **Clínica Veterinária**, São
22 Paulo, v.39, p.34-42, 2002.
- 23 RIBEIRO, M.G.; SALERNO, T.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; CAMELLO, T.C.F.;
24 LANGONI, H.; SIQUEIRA, A.K.; PAES, A.C.; FERNANDES, M.C.; LARA,
25 G.H.B. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and
26 dogs. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.
27 50, p. 177-185, 2008.
- 28 ROBINSON, RK; BATT, CA; PATEL, PD. In:___ **Encyclopedia of Food**
29 **Microbiology.** London: Academic Press, 2000. p.1436-1444.

- 1 RODIGHERI, S M ; FARIAS, M.R.; CAVALCANTI, C.Z; RIBEIRO, M.G.;;
2 SILLAS, T.; CHI, K.D.; GUARALDI, A.L.M. Osteomielite mandibular e celulite
3 secundárias à infecção por *Nocardia otitidiscaviarum* em gato. Relato de caso.
4 In: CONGRESSO PAULISTA DE CLÍNICOS VETERINÁRIOS DE PEQUENOS
5 ANIMAIS, 4, São Paulo - SP, 2004. **Anais...**, São Paulo: ANCLIVEPA-SP,
6 2004, p. 79-80.
- 7 ROTH, A.; ANDRESS, S.; KROPPESTEDT, R.M.; HARMSEN, D.; MAUCH,
8 H. Phylogeny of the genus *Nocardia* based on reassessed 16S rDNA gene
9 sequences reveals underspeciation and division of strains classified as
10 *Nocardia asteroides* into three established species and to unnamed taxons.
11 **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41, p.851–856, 2003.
- 12 SACHS, M.K. Lymphocutaneous *Nocardia brasiliensis* infection acquired from a
13 cat scratch: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford,
14 v.15, p.710-711, 1992.
- 15 SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for
16 reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford,
17 v.4, p.406–425. 1987.
- 18 SANTOS, M.V.; FONSECA, L.F.L. Principais agentes causadores de mastite.
19 In: _____. **Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do**
20 **leite**. São Paulo, Manole, 2007. p.24–37.
- 21 SARAÇA, G.D.; TOWERSEY, L.; HAY, R.J. et al. Mycetoma by *Nocardia*
22 *asteroides*: a 9 year follow-up. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de**
23 **São Paulo**, São Paulo, v.35, p.199–204, 1993.
- 24 SAUBOLLE, M.A.; SUSSLAND, D. Nocardiosis: review of clinical and
25 laboratory experience. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.41,
26 p.4497-4501, 2003.
- 27 SAUBOLLE, M.A.; SUSSLAND, D. Nocardiosis: Review of Clinical and
28 Laboratory Experience **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41,
29 n.10, p. 4497–4501. 2003.

- 1 SCOTT, W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Bacterial skin diseases. In: ____.
2 **Small Animal Dermatology**, 6.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 2001. p.323-
3 324.
- 4 SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.O. Experimental and observation leading to
5 development of California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary**
6 **Medical Association**, Schaumburg, v.139, p.199–204, 1957.
- 7 SCHOONDERWOERD, M.; MCFADZEN, L.L.; MANNINEN, K.I.; OLLIS, G.W.
8 Culturing of bulk tank milk for the presence of Nocardia spp. **Canadian**
9 **Veterinary Journal**, Ottawa, v.31, p.453-454.1990.
- 10 SHANKAR, S.K.; MAHADEVAN, A.; SATISHCHANDRA, P.; KUMAR, R.U.;
11 YASHA, T.C.; SANTOSH, V.; CHANDRAMUKI, A.; RAVI, V.; NATH, A.
12 Neuropathology of HIV/AIDS with an overview of the Indian scene. **Indian**
13 **Journal Medicine Research**, Ansari Nagar, v.121, p.468-488, 2005.
- 14 SHIGIDI, M. T. A.; MAMOUN, I. E. Isolation of Nocardia asteroides from cattle
15 with mastitis in the Sudan. **Bulletin of Animal Health Production (Africa)**,
16 Nairobi, v.29, p.275-278. 1981.
- 17 SILVA, A.G., MARTINS, E.M.L.; MARCHIORI, E. et al. Nocardiose pulmonar
18 em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida - Relato de caso.
19 **Radiologia Brasileira**, São Paulo, v.35, p.1-7, 2000.
- 20 SIVACOLUNDHU, R.K.; O'HARA, A.J.; READ, R. Thoracic actinomycosis
21 (arcanobacteriosis) or nocardiosis causing thoracic pyogranuloma formation in
22 three dogs **Australian Veterinary Journal**, Saint Leonard, v. 79, n. 6, p. 398–
23 402, 2001.
- 24 STARK. D.A.; ANDERSON, N.G. A case-control study of Nocardia mastitis in
25 Ontario dairy herds **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 31, p.197-
26 201.1990.
- 27 STEINGRUBE, V.A.; BROWN, B.A.; GIBSON, J.L. et al. DNA amplification and
28 restriction endonuclease analysis for differentiation of 12 species and taxa of

- 1 *Nocardia*, including recognition of four new taxa within the *Nocardia asteroides*
2 complex. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.3096-3101,
3 1995.
- 4 TAKEDA, K.; KANG, Y.; YAZAWA, K.; GONOI, T.; MIKAMI, Y. Phylogenetic
5 studies of *Nocardia* species based on *gyrB* gene analyses. **Journal of Medical**
6 **Microbiology**, Reading, v. 59 , p.165-171. 2010.
- 7 TAMAOKA, J.; KOMAGATA,K. Determination of DNA base composition by
8 reversed-phase high-performance liquid chromatography. **FEMS Microbiology**
9 **Letters**, Delft, v.25, p.125-128. 1984.
- 10 TAN, C.K.; LAI, C.C.; LIN, S.H; LIAO, C.H.; CHOU, C.H.; HSU H.L.; HUANG,
11 Y.T.; HSUEH, P.R. Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis
12 including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998–2008
13 **Clinical Microbiology and Infection**, Basel, v. 16 p.966-72. 2010.
- 14 TARABLA, H.D.; ZURBRIGGEN, M.D.; CANAVESIO, V.R.; VITULICH, C.A.;
15 CALVINHO, L.F. *Nocardia asteroides* mastitis in a small Argentinian herd.
16 **Veterinary Records**, London, v.132, p.303, 1993.
- 17 TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTRGER, E.C.;
18 BODMER, T. Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by
19 Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis **Journal of**
20 **Clinical Microbiology**, Washington, v.31 , n.2, p.175-178. 1993.
- 21 THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2ed. Cambridge: Blackwell
22 Science, 1995, 475p.
- 23 TILGNER, S.L.; ANSTEY, S.I. *Nocardial* peritonitis in a cat. **Australian**
24 **Veterinary Journal**, Saint Leonard, v.74, p.430-432,1996.
- 25 TOMLIN,P.; SAND, C.; RENNIE, R.P. Evaluation of E Test, disk diffusion and
26 broth microdilution to establish tentative quality control limits and review
27 susceptibility breakpoints for two aerobic Actinomycetes. **Diagnostic**
28 **Microbiology and Infectious Disease**, Malden, v.40, p. 179–186. 2001.

- 1 TREMBLAY, J.; THIBERT, L.; ALARIE, I.; VALIQUETTE, L.; PÉPIN, J.;
2 Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988–2008 **Clinical Microbiology and**
3 **Infection**, Basel, in press. 2011.
- 4 VICKERS, R.M.; RIHS, J.D.; YU, V.L. Clinical Demonstration of Isolation of
5 *Nocardia* asteroids on Buffered Charcoal-Yeast Extract Media **Journal Of**
6 **Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 1 p. 227-228. 1992.
- 7 WALLACE JR, R.J.; STEELE, L.C.; SUMTER, G.; SMITH, J.M. Antimicrobial
8 susceptibility patterns of *Nocardia asteroides*. **Antimicrobial Agents and**
9 **Chemotherapy**, Washington, v.2, n. 12, p. 1776-1779. 1988.
- 10 WATANABE, K; SHINAGAWA, M; AMISHIMA, M; IIDA S.; YAZAWA, K;
11 KAGEYAMA, A; ANDO, A; MIKAMI, Y. First clinical isolates of *Nocardia carnea*,
12 *Nocardia elegans*, *Nocardia paucivorans*, *Nocardia puris* and *Nocardia*
13 *takedensis* in japan **Japanese Journal of Medical Mycology**, Tokyo, v. 47,
14 p.85-89. 2006.
- 15 WAUTERS, G.; AVESANI, V.; CHARLIER, J.; JANSSENS, M.;
16 VANEECHOUTTE, M.; DELMÉE, M. Distribution of *Nocardia* species in clinical
17 samples and their routine rapid identification in the laboratory. **Journal of**
18 **Clinical Microbiology**, Washington, v.43, n.6, p. 2624–2628, 2005.
- 19 WILLIAMS, S. T.; DAVIES, F. L. Use of a Scanning Electron Microscope for the
20 Examination of Actinomycetes **Journal of General Microbiology**, Washington,
21 v.48, p.171-177. 1967
- 22 WINN, W.C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.W.;
23 SCHRECKENBERGER, P.C.; PROCOP, G.W.; WOODS, G.L. **Koneman's**
24 **Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. Baltimore :Lippincott
25 Williams e Wilkins, 2005. 1736p.
- 26 WORLD HEALTH ORGANIZATION–WHO. **Joint United Nations Programme**
27 **on HIV/AIDS**. Net., out. 2005. Disponível em: <[www.unaids.org/wad](http://www.unaids.org/wad2004/epi_graphics.html)
28 [2004/epi_graphics.html](http://www.unaids.org/wad2004/epi_graphics.html)> Acesso em: 03 out. 2005.

1 ZAFALON, L.F.; NADER FILHO, A.; AMARAL, L.A.; OLIVEIRA, J.V.;
2 RESENDE, F.D. Produção e características físico-químicas e celulares do leite
3 oriundo de quartos mamários com e sem mastite subclínica em três diferentes
4 fases da lactação. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.62, n.2,
5 p.117–124, 2005.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 **9 ANEXOS**

2

3 Anexo 1 – Seqüência sugerida na identificação fenotípica de espécies de
4 *Nocardia* provenientes de isolados clínicos.

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

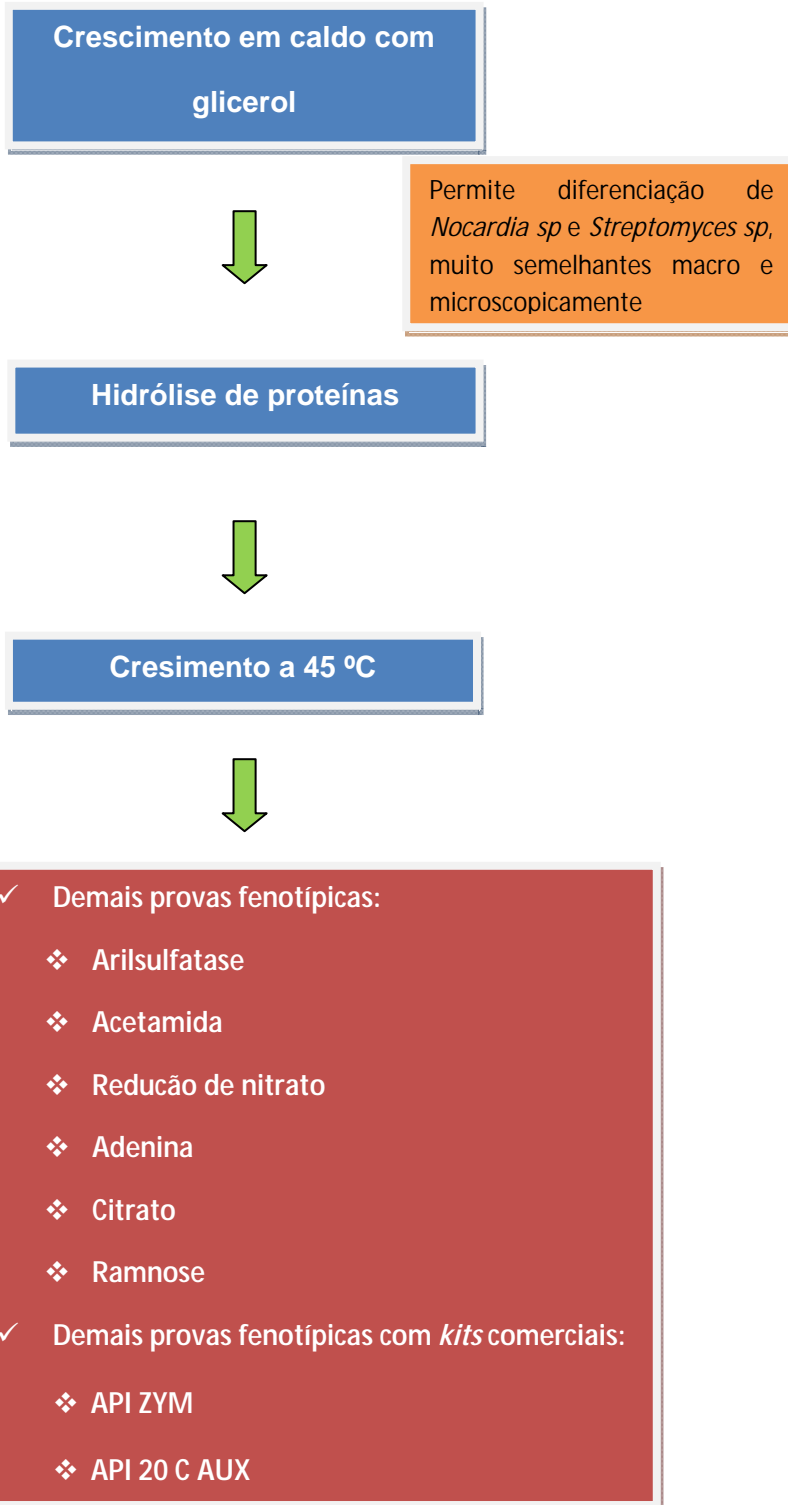
38

39

40

41

42



Fontes: Biehle et al., 1996; Kiska et al., 2002; Wauters et al., 2008

Anexo 2 – Substratos utilizados na diferenciação fenotípica de espécies do género *Nocardia*.

| HIDRÓLISE DE PROTEÍNAS | | | | BATERIA API 20C AUX | | | | | | | |
|---------------------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| PROVAS POSITIVAS | | | | HIDRÓLISES NEGATIVAS | | | | | | | |
| TIROSINA | XANTINA | CASEÍNA | HIPOXANTINA | ESCUulina | GLU | GLY | GAL | NAG | INO | ADO | TREA |
| <i>N. brasiliensis</i> | | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | <i>N. brasiliensis</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| <i>N. oostdijkavarium</i> | <i>N. oostdijkavarium</i> | | <i>N. oostdijkavarium</i> | <i>N. oostdijkavarium</i> | + | - | - | + | + | - | + |
| | | <i>N. paucivorans</i> | <i>N. paucivorans</i> | <i>N. paucivorans</i> | - | - | - | - | - | - | - |
| | | <i>N. transvelensis</i> | <i>N. transvelensis</i> | <i>N. transvelensis</i> | + | + | + | + | - | + | - |
| | | <i>N. pseudobrasiliensis</i> | <i>N. pseudobrasiliensis</i> | <i>N. pseudobrasiliensis</i> | + | + | + | + | + | - | + |
| | | <i>N. farcinica</i> | <i>N. farcinica</i> | <i>N. farcinica</i> | + | + | + | - | - | - | - |
| | | <i>N. puris</i> | <i>N. puris</i> | <i>N. puris</i> | + | - | - | - | + | - | - |
| | | <i>N. arthridioidis</i> (V) | <i>N. arthridioidis</i> (V) | <i>N. arthridioidis</i> | + | - | - | - | - | - | - |
| | | <i>N. astasia</i> | <i>N. astasia</i> | <i>N. astasia</i> | + | - | - | - | - | - | - |
| | | <i>N. brevicatena</i> | <i>N. brevicatena</i> | <i>N. brevicatena</i> | - | - | - | - | - | - | + |
| | | | | <i>N. nova</i> | + | + | - | + | - | - | - |
| | | | | <i>N. abscessus</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| | | | | <i>N. cyriacigeorgica</i> | + | + | - | - | - | - | - |
| | | | | <i>N. veterana</i> | + | - | - | - | - | - | - |

A inclusão de uma prova a mais a mais de hidrólise (esculina) e avaliação de crescimento a 45°C (+) permite obter identificação de espécies de *Nocardia* de importância médica mas ainda não permite diferenciar de espécies de *Nocardia* pertencentes aos complexos I, III, V e VI.

O API 20 CAUX foi avaliado como um dos métodos de identificação utilizando açúcares, porém pode variaridade nos resultados e necessita de mais estudos com novas espécies de *Nocardia*

Fontes : Adaptado de Biehle et al. 1996 ; Kiska et al., 2002; Kageyama et al., 2004; Wauters et al. 2005.

Anexo 3 – Interpretação dos halos de inibição na prova de difusão com discos para bactérias fastidiosas aeróbicas.

| ANTIBIÓTICO | CONCENTRAÇÃO (μg) | DIÂMETRO DA ZONA DE INIBIÇÃO (mm) | | |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------|-----------|
| | | RESISTENTE | INTERMEDIÁRIO | SENSÍVEL |
| AMICACINA | 30 μg | ≤ 14 | 15-16 | ≥ 17 |
| AMOXACILINA + ÁCIDO CLAVULÂNICO | 20/10 μg | ≥ 18 | 14-17 | ≤ 13 |
| AMPICILINA | 10 μg | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 |
| CEFALEXINA | 30 μg | ≤ 14 | 15-17 | ≥ 18 |
| CEFALÔNIO | 30 μg | ≤ 14 | 15-17 | ≥ 18 |
| CEFOPERAZONA | 30 μg | ≤ 15 | 16-20 | ≥ 21 |
| CEFTIOFUR | 30 μg | ≤ 17 | 18-20 | ≥ 21 |
| CEFTRIAXONA | 30 μg | ≥ 21 | 14-20 | ≤ 13 |
| CEFUROXIMA | 30 μg | ≤ 14 | 15-17 | ≥ 18 |
| CLOXACILINA | 30 μg | < 16 | 17 | > 18 |
| IMIPENEM | 10 μg | ≤ 13 | 14-15 | ≥ 16 |
| GENTAMICINA | 10 μg | ≤ 10 | 11-14 | ≥ 15 |
| SULFAMETOXAZOL + TRIMETOPRINA | 25 μg | ≤ 10 | 11-15 | ≥ 16 |

Fontes: Adaptado de Wauters et al., 2005; CLSI, 2003; Ambaye et al., 1997.

Anexo 4 – Valores de referência para interpretação da concentração inibitória mínima para bactérias aeróbicas fastidiosas.

| Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) | | | |
|--|----------|-----------------------|------------|
| ANTIBIÓTICO | SENSÍVEL | PARCIALMENTE SENSÍVEL | RESISTENTE |
| Amicacina | ≤8 | – | ≥16 |
| Amoxicilina + ácido clavulânico | ≤8/4 | 16/8 | ≥32/16 |
| Ampicilina | ≤8/4 | 16/8 | ≥32/16 |
| Ceftriaxona | ≤8 | 16-32 | ≥64 |
| Gentamicina | ≤4 | 8 | ≥16 |
| Sulfametoxazol + trimetropina | ≤2/38 | – | ≥4/76 |

Fonte: Adaptado de Ngui-Yen et al. 1994; CLSI, 2003; Beaman et al. 2003.

Anexo 5 – Molecular identification and termorresistance to boiling of *Nocardia nova* from bulk tank milk – Short Communication (Research in Veterinary Science)

Molecular identification and termorresistance to boiling of *Nocardia nova* from bulk tank milk

Short Communication

L.A.Z. CONDAS, M.G. RIBEIRO, T. GONOI, T. MATSUZAWA, K. YAZAWA, R.G. MOTTA, M.M.J. FRANCO, J.F.P. LISTONI.

Abstract

Two strains of *Nocardia nova* were isolated from two milk samples from individual bulk tank milk. The tanks presented high SCC (1.966.000 cells/mL and 890.000 cells/mL) and total bacterial cell count (300.000 CFU/mL and 172.000 CFU/mL). The molecular evaluation through the 16S rRNA gene and the phylogenetic analisys enable identification of two strains of *Nocardia nova*. The thermorresistance to boiling (100°C) of the two isolates was analised considering the time until expansion (boiling 1), boiling for one minute (boiling 2) and five minutes (boiling 3). The bacterial growth was observed after boiling 1 in one strain and boiling 2 in the other. The present report is first description of *N. nova* isolated from bulk tank milk. Our findings indicatethe risk of transmission of microorganism to humans through contaminated milk, including product consumed after term treatment.

Somatic cell count from bulk tank milk (BTMSCC) is a function of the percentage of quarters infected by major pathogens in a dairy herd. Eberhart et al. (1982) reported a linear relationship between BTMSCC and the percentage of quarters infected with major pathogens (Rysanek et al., 2007). The identification of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in bulk tank milk samples (BTMS) has been found to indicate the presence of cows in the herd with infectious mastitis by these pathogens. The isolation of organisms such as coliforms, yeasts, *Nocardia* spp., and *Streptococcus* spp. (non-agalactiae) in BTMS does not necessarily indicate the occurrence of environmental mastitis as their presence might be the result of direct contamination of the milk (Schoonderwoeder et al., 1990).

Nocardia sp are environmental microorganisms in etiology of bovine mastitis. It inhabits the telluric environment and infects the mammary gland from different sources, such

as: contaminated surroundings that the cows are exposed between milking periods, in farms with poor hygienic management during milking, accumulated faecal material on the mammary gland, contaminated water used during milking, contaminated pré and post dipping solutions, or even contamination of the cannula during intra-mammary treatment (Ribeiro et al., 2008). *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova* and *N. brasiliensis* are recognized as the main pathogenic species in bovine mastitis (Radostits et al., 2007). Recently, the classification of genus *Nocardia* has been based on molecular methods, using 16S rRNA gene (Kageyama et al., 2004)

Despite to considered an uncommon pathogen of Bovine mastitis, the isolation of *Nocardia* sp from mammary infections has been increasingly notified in the last years in several countries, including in Brazil (Ollis et al., 1991; Costa et al., 1998; Ribeiro et al., 2006; Ribeiro et al., 2008). These studies also show the importance of investigate the epidemiology of mammary nocardiosis, in order to subsidising control and preventive actions (Costa et al., 1998). The milk is considered an important source of transmission of *Nocardia* to humans, mainly by the consumption of raw milk and derivates or submitted to inadequate thermic treatment (Pier e Enright, 1961).

Recent studies have demonstrated the therm resistance of *Nocardia* strains isolated from bovine milk (Costa et al., 1996). The boiling of milk is one of the oldest procedures used in the elimination of pathogens from milk (Furlanetto et al., 2009). However there are no preliminary studies in order to investigate the efficacy of this thermal procedure in *Nocardia* strains isolated from milk.

Two individual bulk tank samples in the farms were collected in sterilized flasks, adequate for microbiological culture and SCC and total bacterial cell count. The total bacterial cell counts were 300.000 CFU/mL and 172 CFU/mL, while s the somatic cell counts were 1.966.000 células/mL and 890 células/ mL, respectively.

Both samples were submitted to microbiological culture on defibrinated ovine blood agar (5%) and manteined in aerobic conditions, at 37°C, for up to five days (Quinn et al., 1994). Simultaneously, the same samples were submitted to culture on agar Sabouraud–dextrose agar, in aerobiosis, at 37°C, maintained for up to 15 days (Brown-Elliot et al., 2006). After 48 hours, white, dry and strongly adhered colonies were obtained. At microscopy, Gram and Kinyoun strains revealed, delicate and branched mycelial structures, with

coccobacilli and filamentous forms suggestive of *Nocardia* sp (Quin et al., 1994; Ribeiro et al., 2008).

Preparation of genomic DNA samples for sequencing was performed using the guanidine thiocyanate method (Kageyama et al., 2004). Nearly complete 16S rRNA gene (rDNA) sequences were obtained for isolated strains. The 16S rDNA was amplified and sequenced using PCR prokaryotic 16S rDNA universal primer pairs 8F and 691R, 520F and 1100R, and 926F and 1542R. The strains were submitted to PCR using a DNA thermal cycler (TaKaRa Bio Inc., Osaka, Japan) under followed conditions: 35 cycles at 94°C for 60s for denaturation, 60°C for 60s for primer annealing, and 72°C for 120s primer extension. The PCR products was purified as Centri-Sep Columns (Princeton Separations Inc., USA). The DNA sequences were determined with an automatic sequence analyzer (ABI PRISM™ 310; PE Applied Biosystems, Chiba, Japan), using a dye terminator cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems). Sequences of the 16S rRNA genes were compared with sequence database search using BLAST. Sequence data of related species were retrieved from GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method. Topology of the trees was evaluated using a bootstrap analysis of sequence data using CLUSTAL W software. Sequence similarity values were determined visually. Sequencing analysis of the 16S rDNA segments identified the organism as *Nocardia nova* based on 99% sequence similarity to the reference sequence (GenBank accession number AB162785.1).

All isolates were exposed to “in vitro” evaluations to boiling conditions. The isolates were initially cultured in defibrinated sheep blood agar (5%) and maintained in aerobiosis at 37°C for 72 hours. Latter, two or three typical colonies were re-suspended in 4mL of sterile Mili-Q water (ultra-pure), aconditioned in tubes with the turbidity adjusted by optical density, according to the tube 1 (one) on the McFarland scale (Bier, 1984). From the suspension, the tubes were homogenized and diluted to the decimal scale (1/10), namely: 10^1 , 10^{-2} , 10^{-3} and subsequently until 10^{-10} . Aliquots of 0,1mL were collected in duplicates and cultured in “Plate count agar”-PCA, using the “pour plate” technique, and maintained incubated in aerobiosis at 37°C, for up to 96 hours. The colony-forming unit count – CFU was evaluate by the macroscopic visualization of the colonies on the culture media. The decimal dilutions that presented bacterial growth of 10^5 CFU/mL, which corresponded to the 10^{-3} and 10^{-2} dilutions, were used as inocula. Subsequently, 1mL from all the isolates containing 10^5 CFU/mL were pipetted to glass tubes closed with hidrophobic cotton and

submitted to a elevation of temperature, in a bath, until it reached 100°C (boiling 1). For temperature measurement, a sterile thermometer was placed in one of the tubes with reference strain. The same procedure was repeated for all isolates (also containing inocula with 10⁵ CFU/mL), maintaining the tubes in the bath 1 minute after they have reached 100°C (boiling 2). After these, the procedure was executed again, maintaining the tubes in the bath for 5 minutes after they have reached 100°C (boiling 3). Aliquots of 0,01 mL from the tubes from all three thermal treatment groups (boiling 1, 2 and 3) were submitted to microbiological culture in defibrilated sheep blood agar (5%), in aerobiosis at 37°C, in order to evaluate the re-isolation of strains after thermal treatment.

The thermic treatment showed that one of the strains survived to boiling at 100°C, and other survived for one minute under 100°C.

In the individual bulk tanks from which *Nocardia* sp. was isolated, the SCC was higher than recommended by the Brazilian regulations of 450.000 cells/mL (Brasil, 2002). A comparative analysis established that 200.000 cells/mL of CCS in individual bulk tanks corresponds to 15% of infected quarters in a herd, and 700.000 cells/mL represents to two thirds or more quarters infected by a pathogen (NMC, 2001). Schoonderwoerd et al., (1990) reported *Nocardia* genus in milk from affected quarters and from the respective individual bulk tanks (205.000 cells/mL of SCC), indicating that the origins of the agent in the tanks were the affected quarters, or contaminated cleaning these utensils used in the storage of milk and the tanks. These association between SCC in the bulk tank and the nocardia mastitis, indicate the importance of evaluate the SCC in bulk tank in order to evaluate the milk quality. Furthermore, the presence of *N. nova* in bulk tank milk indicate the need of increment on dairy farms of control measures against environmental agents of bovine mastitis.

N. nova was referred to as one of the main bovine mastitis in Brazilian dairy herds. However, in this study the indication of pathogen was performed by phenotypic evaluation (Ribeiro et al., 2008). The present report described by first time the molecular identification of *N. nova* in bulk tank milk from dairy herds.

Furthermore, Muñoz et al.(2007), Tremblay et al. (2010) and Tan et al. (2010) showed the isolation *N. nova* as the main species in human nocardiosis. Chedid et al., (2007) studied 22 cases of immunosuppressed patients affected by nocardiosis in Brazil and 27.27% of these cases were caused by *N. asteroides* complex, to which the *N. nova* species belongs. Although the role of animals in the transmission of *Nocardia* to humans remains unclear,

these reviews suggest evidences of the possibility of transmission of *Nocardia* between animals and humans (Pier and Enright, 1961).

The evaluation of thermoresistance of isolates showed that the pathogen resists to boiling. Other studies have submitted isolates to inferior temperatures for longer periods, such as 45°C and 50 °C for up to eight hours, with bacterial growth after thermal treatment (Komaid, 2001). Likewise, *Nocardia asteroides* isolated from bovine milk were submitted to pasteurization conditions also with bacterial growth (Costa et al., 1996). *Nocardia serbivorans* was described to have survived to boil (Erikson, 1955).

This studie showed that the *Nocardia* genus has the behaviour of a thermoduric agent. This its represents a risk to human consumption of raw, pasteurized and boiled milk, specially for the immunosuppressed people.

References

- Brasil, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.051. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, do leite tipo B, do leite tipo C, do leite pasteurizado e do leite cru refrigerado e o regulamento técnico da coleta do leite cru refrigerado e seu transporte a granel.
- Brown-Elliott, B.A.; Brown, J.M.; Conville, P.S.; Wallace, R.J.; 2006. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews* **19**:259–282.
- Chedid, M.B.; Chedid, M.F.; Porto, N.S.; Severo, C.B. e Severo, L.C. 2007. Nocardial infections: report of 22 cases. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **49**: 239-246.
- Costa, E.O.; Ribeiro, A.R.; Ribeiro, M.G. et al. 1996. *Nocardia* sp strains isolated from clinical and subclinal bovine mastitis: evaluation of the thermic resistance on the milk pasteurization (temperature/time). In: WORLD BUIATRIC CONGRESS, 19, Edinburgh, Proceedings.: 206–207.
- Costa, E.O.; Ribeiro, A.R.; Watanabe, E.T.; Melville, P.A. 1998 – Infectious bovine mastitis caused by environmental organisms. *Zbl. Veterinarmed, B*, **45**: 65–71.
- Erikson, D. 1955. Thermoduric Properties of *Nocardia sebivorans* and other Pathogenic Aerobic Actinomycetes *J. gen. Microbiol.* **13**: 127-135
- Furlanetto, L. V.; Souza, G. O.; Figueiredo E. E. S.; Balian, S. C.; Pinheiro, S.R.; Telles, E.O.; 2009. Avaliação da fervura na ativação de patógenos em leite integral de vaca, cabra e búfala experimentalmente contaminados. *Ars Veterinaria* **25** : 63-67.

Kageyama, A.; Torikoe, N.; Yazawa, K.; Mikami, Y.; Nishimura, K. 2004 *Nocardia asiatica* sp. nov. pathogen isolated from patients with nocardiosis in Japan and clinical specimens from Thailand. *International Journal Systematic Evol Microbiology*, **54**: 123–130

Komaid, A.G.; 2001. Temperature resistant *Nocardia* biovarieties in Tucumán, Argentina. *Mycopathologia* **154**: 57–62.

Muñoz, J.; Mirelis, B.; Aragón, L. M.; Gutiérrez, N.; Sánchez, F.; Español, M.; Esparcia, O.; Gurguí, M.; Domingo, P.; Coll, P.; 2007. Clinical and microbiological features of nocardiosis 1997–2003. *Journal of Medical Microbiology* **56**: 545–550.

NMC, 2001 - Guidelines on Normal and Abnormal Raw Milk Based on SCC and Signs of Clinical Mastitis. Available at: <http://nmconline.org/docs/abnmilk.pdf>.

Ollis, G. W.; Schoonderwoerd, M.; Schipper, C.; 1991. An investigation of risk factors for nocardial mastitis in central Alberta dairy herds *Canadian Veterinary Journal* **32**: 227-231

Pier, A.C.; Enright, J.B. 1961. Oral infectivity and thermal resistance of *Nocardia* asteroids in milk. *Public Health Reports*. **76**: 889-896.

Quinn, P.J.; Carter, M.E.; Markey, B.K.; Carter, G.R. , 1994– The Actinomycetes. In: __. *Clinical Veterinary Microbiology*. London, Wolfe, 144-155.

Radostitis, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W.; Constable, P.D. 2007– Diseases of the mammary gland. In: __. *Veterinary Medicine – A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, and Goats*. 10. ed. Philadelphia, Saunders; Elsevier. 673–762.

Ribeiro, M.E.R.; Petrini, A. L.; Barbosa, R.S. ; Zanela, M.B.; Jorge Fainé Gomes, J.F.; Stumpf Jr., W.; Schramm, R. 2006. Ocorrência de mastite causada por *Nocardia spp* em rebanhos de unidades de produção de leite no sul do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Agrociência*, 12 : 471-473.

Ribeiro, M.G.; Salerno, T.; Mattos-Guaraldi, A.L.; Camello, T.C.F.; Langoni, H.; Siqueira, A.K.; Paes, A.C.; Fernandes, M.C.; Lara, G.H.B. , 2008. Nocardiosis: an overview and additional report of 28 cases in cattle and dogs. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **50**: 177-185.

Rysanek, D.; Babak, V.; Zouharova, M. Bulk tank milk somatic cell count and sources of raw milk contamination with mastitis pathogens *Veterinari Medicina*, **52**: 223–230

Santos, M.V.; Fonseca, L.F.L. 2007. Principais agentes causadores de mastite. In: __. *Estratégias para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite*. São Paulo, Manole, 24–37.

Schoonderwoerd, M.; McFadzen, L.L.; Manninen, K.I.; Ollis, G.W.; 1990 Culturing of bulk tank milk for the presence of *Nocardia spp*. *Canadian Veterinary Journal* **31**: 453-454

Tan, C.K.; Lai, C.C.; Lin, S.H.; Liao, C.H.; Chou, C.H.; Hsu H.L.; Huang, Y.T.; Hsueh, P.R. 2010 Clinical and microbiological characteristics of Nocardiosis including those caused by emerging *Nocardia* species in Taiwan, 1998–2008 *Clinical Microbiology and Infection* 16: 966-72.

Tremblay, J.; Thibert, L.; Alarie, I.; Valiquette, L.; Pépin, J. 2010 Nocardiosis in Quebec, Canada, 1988–2008 *Clinical Microbiology and Infection*, in press.

Anexo 6 – Normas para publicação da Revista **Research in Veterinary Science**.

The Official Journal of the Association for Veterinary Teaching and Research Work

Research in Veterinary Science publishes original contributions and review articles on research concerning the health and disease of animals, including studies in comparative medicine.

Types of contribution

1. Original research papers (Regular Papers);
2. Short Communications
3. Review articles

Original research papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Short Communications should not exceed 1600 words and include no more than two tables or figures. They should have an abstract but no other divisions. Typescripts should be clearly marked Short Communication.

Review articles Review articles on veterinary topics are invited for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4000 words.

Submission of manuscripts

Submission to *Research in Veterinary Science* now proceeds online via Elsevier Editorial System - <http://ees.elsevier.com/rvsc>. Authors will be guided step-by-step through uploading files directly from their computers. Authors should select a set of classifications for their papers from a given list, as well as a category designation (Original Research Paper, Short Communication, and so on). Electronic PDF proofs will be automatically generated from uploaded files, and used for subsequent

reviewing.

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System. Authors submitting hard copy papers will be asked to resubmit using Elsevier Editorial System.

Submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information.

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Acknowledgements

All contributors who do not meet the criteria for authorship as defined above should be listed in an acknowledgements section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

Conflict of interest

At the end of the text, under a subheading "Conflict of interest statement" all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding.

Role of the funding source

All sources of funding should be declared as an acknowledgement at the end of the text. Authors should declare the role of study sponsors, if any, in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; and in the decision to submit the manuscript for publication. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Language Editing: [Elsevier's Authors Home](#) provides details of some companies who can provide English language and copyediting services to authors who need assistance *before* they submit their article or *before* it is accepted for publication. Authors should contact these services directly. For more information about language editing services, please email authorsupport@elsevier.com.

Ethics

Before papers describing animal studies are accepted for publication in *Research in Veterinary Science*, the authors must satisfy the editors that the work conformed to appropriate ethical standards. Whether or not a particular piece of work is accepted for publication will be decided by the editors whose decision will be final. The authors should provide written assurances that: (i) The project underwent ethical review and was given approval by an institutional animal care and use committee or by appropriately qualified scientific and lay colleagues. (ii) The care and use of experimental animals complied with local animal welfare laws, guidelines and policies.

The editors expect authors to have adhered to the following general principles: (i) Alternative procedures that replace the use of animals should be used if possible. Where this is not possible, the animals used should be carefully selected to be the least sentient species possible and of an appropriate strain. (ii) The minimum number of animals should be used consistent with achieving the scientific objectives of the study. (iii) Pain and distress should be minimised by the use of humane endpoints, sedation, anaesthesia, analgesia and post-operative care. (iv) Access to veterinary care must be available at all times. (v) Investigators and personnel that

care for and use animals must be trained and possess relevant expertise and training that should be updated regularly. (vi) If animals have to be killed, this should be done humanely according to local euthanasia regulations, such as the Home Office guidelines in the UK or guidelines of the American Veterinary Association Panel on Euthanasia.

Title

Papers should be headed with the full title, the initials and surnames of the authors, and the name and address of the institution where the work was carried out. The full telephone number, Fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided.

Form of Papers

a) Abstract (not more than 150 words), self-contained and embodying the main conclusions. It should note the relevance to veterinary science as well as the aims and objectives of the work. Sentences such as 'the results are discussed', which merely describe the paper, are not allowed.

b) Keywords. Please supply a list of up to six keywords that describe the paper.

c) Introduction.

d) Materials and methods employed.

e) Results, as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data will rarely be permitted.

f) Discussion and conclusions.

g) Acknowledgements.

h) References.

Manuscripts should have **numbered lines**, with wide margins and **double spacing**, throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscripts, including the title page, references, tables, etc., should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if

necessary one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Abbreviation and symbols: Authors are asked to explain each scientific abbreviation at its first occurrence in their papers; for example, complement fixation test (CFT). The policy of the journal with respect to units and symbols is that SI (System International) symbols should be used.

Reference Format

Only papers closely related to the author's work should be mentioned; exhaustive lists should be avoided. References should be cited in the text thus: Brown and Smith (1985), Jones (1987a), Jones (1987b), or Smith *et al*(1988). The list of references at the end of the paper should be given in alphabetical order and should appear in the form:- Torgerson, P.R., Budke, C.M., 2003 *Echinococcosis* - an international public health challenge. *Research in Veterinary Science* **74**, 191-202. References to books and monographs should include: (1) author(s) or editor(s); (2) year of publication; (3) title; (4) edition; (5) place of publication and publisher; (6) beginning and final page numbers.

Illustrations

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, preferably in TIFF or EPS format.
2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.
3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.
4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible. Any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.
5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Each illustration should have a caption. The captions to all illustrations should be typed on a separate sheet of the manuscript.
7. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.
8. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.
9. If you submit usable colour figures, Elsevier would ensure that these figures appeared free-of-charge in colour in the electronic version of your accepted paper, regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. Colour illustrations can only be included in print if the additional cost of reproduction is contributed by the author: you would receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please note that because of technical complications which may arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version, should you not opt for colour in print), you should submit in addition usable black and white figures corresponding to all colour illustrations.
10. Advice on the preparation of illustrations can be found at the following URL: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

Preparation of supplementary data

Elsevier now accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, movies, animation sequences, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please ensure that data is provided in one of our recommended file formats. Authors should submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file.

Tables

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the

journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Each table should occupy a separate page of the manuscript. Tables should never be included in the text.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

Copyright

If excerpts from other copyrighted works are included, the Author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by Authors in these cases: contact Elsevier's Rights Department, Oxford, UK: phone (+1) 215 239 3804 or +44(0)1865 843830, fax +44(0)1865 853333, e-mail healthpermissions@elsevier.com. Requests may also be completed online via the Elsevier homepage <http://www.elsevier.com/permissions>. Material in unpublished letters and manuscripts is also protected and must not be published unless permission has been obtained.

Authors Rights

As an author you (or your employer or institution) may do the following:

- make copies (print or electronic) of the article for your own personal use, including for your own classroom teaching use

- make copies and distribute such copies (including through e-mail) of the article to research colleagues, for the personal use by such colleagues (but not commercially or systematically, e.g., via an e-mail list or list server)
- post a pre-print version of the article on Internet websites including electronic pre-print servers, and to retain indefinitely such version on such servers or sites
- post a revised personal version of the final text of the article (to reflect changes made in the peer review and editing process) on your personal or institutional website or server, with a link to the journal homepage (on elsevier.com)
- present the article at a meeting or conference and to distribute copies of the article to the delegates attending such a meeting
- for your employer, if the article is a 'work for hire', made within the scope of your employment, your employer may use all or part of the information in the article for other intra-company use (e.g., training)
- retain patent and trademark rights and rights to any processes or procedure described in the article
- include the article in full or in part in a thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially)
- use the article or any part thereof in a printed compilation of your works, such as collected writings or lecture notes (subsequent to publication of your article in the journal)
- prepare other derivative works, to extend the article into book-length form, or to otherwise re-use portions or excerpts in other works, with full acknowledgement of its original publication in the journal

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>).

Proofs

One set of page proofs in PDF format will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post). Elsevier now sends PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs. The exact system requirements are given at the Adobe site <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>. If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Author Enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/rvsc>. This also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed.

Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, be provided with a PDF file of the article via e-mail. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.