

Isolamento de *Trueperella pyogenes* em pulmão de novilha

Isolation of *Trueperella pyogenes* in heifer lung

Aislamiento de *Trueperella pyogenes* en pulmón de vaquilla

Recebido: 30/06/2023 | Revisado: 13/07/2023 | Aceitado: 14/07/2023 | Publicado: 18/07/2023

Ana Carolina Rodrigues Amadeu

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5649-5362>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: anacarolmaadeu@gmail.com

Leonardo Martins da Rocha

ORCID: <https://orcid.org/0009-0001-0466-8126>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: leonardomarocha@hotmail.com

Fabiola de Souza Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2857-8296>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: fabisouza.silva@hotmail.com

Bárbara Gatto de Mattos

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-6511-4633>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: barbgatto@outlook.com

Larissa de Abreu Albano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7854-6922>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: larissa.albano@unesp.br

Marcia Marinho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2177-6214>
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Brasil
E-mail: marcia.marinho@unesp.br

Resumo

O presente relato descreve a identificação da *Trueperella pyogenes*, uma Actinobacteria de relevância clínica e que tem sido objeto de mudanças taxonômicas nos últimos anos, associada a uma ampla variedade de condições patológicas, tais como mastite, metrite e pneumonia, podendo estar associada a pacientes imunossuprimidos e ou submetidos a condições de estresse. Entretanto, o seu caráter zoonótico ainda não está bem definido. O presente relato de caso descreve a identificação de *Trueperella pyogenes*, a partir de um fragmento pulmonar proveniente de uma novilha que veio a óbito sob suspeita de Doença Pulmonar Bovina (DPB), o fragmento foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia FMVA para a realização e identificação do agente etiológico. Após cultura em Ágar Sangue e *Mac Conkey* em microaerofilia por um período de 48 horas com monitoramento diário, observou-se o crescimento puro e exuberante de pequenas colônias que apresentavam pigmentação translúcidas, rodeadas por halo de β -hemólise, e que a microscopia evidenciou-se bacilos gram positivos do tipo "coryneformes". Após a realização dos testes bioquímicos e diferenciais concluiu-se tratar de *Trueperella pyogenes*,

Palavras-chave: *Trueperella pyogenes*; Microbiológico; *Actinomyceto*.

Abstract

The present report describes the identification of *Trueperella pyogenes*, an Actinobacteria of clinical relevance that has been subject to taxonomic changes in recent years, associated with a wide variety of pathological conditions, such as mastitis, metritis and pneumonia, which may be associated with immunosuppressed patients and/or those submitted to stressful conditions. However, its zoonotic character is still not well defined. The present case report describes the identification of *Trueperella pyogenes*, from a lung fragment from a heifer that died under suspicion of Bovine Pulmonary Disease (BPD). The fragment was sent to the FMVA Microbiology Laboratory for the realization and identification of the etiologic agent. After culture on Blood Agar and Mac Conkey in microaerophilic conditions for a period of 48 hours with daily monitoring, it was observed the pure and exuberant growth of small colonies that presented translucent pigmentation, surrounded by a halo of β -hemolysis, and that the microscopy showed gram positive bacilli of the "coryneformes" type. After carrying out the biochemical and differential tests, it was concluded that it was *Trueperella pyogenes*.

Keywords: *Trueperella pyogenes*; Microbiological; *Actinomycete*.

Resumen

El presente informe describe la identificación de *Trueperella pyogenes*, una Actinobacteria de relevancia clínica que ha estado sujeta a cambios taxonómicos en los últimos años, asociada a una amplia variedad de condiciones patológicas, como mastitis, metritis y neumonía, que pueden estar asociados a pacientes inmunodeprimidos y/o sometidos a condiciones estresantes. Sin embargo, su carácter zoonótico aún no está bien definido. A partir de un fragmento de pulmón de una vaquilla que murió bajo sospecha de Enfermedad Pulmonar Bovina (DBP). El presente reporte de caso describe la identificación de *Trueperella pyogenes*, El fragmento fue enviado al Laboratorio de Microbiología de la FMVA para la realización e identificación del agente etiológico. Luego del cultivo en Agar Sangre y Mac Conkey en condiciones microaerófilas por un período de 48 horas con monitoreo diario, se observó el crecimiento puro y exuberante de pequeñas colonias que presentaban pigmentación translúcida, rodeadas de un halo de β -hemólisis, y que al microscopio mostró bacilos gram positivos del tipo “corineformes”. Tras realizar las pruebas bioquímicas y diferenciales, se concluyó que se trataba de *Trueperella pyogenes*,

Palabras clave: *Trueperella pyogenes*; Microbiológica; Actinomycete.

1. Introdução

Trueperella pyogenes é uma Actinobacteria com um longo histórico de mudanças taxonômicas, sendo anteriormente conhecida como *Bacillus pyogenes*, *Actinomyces pyogenes*, *Corynebacterium pyogenes* e, mais recentemente, *Arcanobacterium pyogenes* Costa et al., 2019) e novamete renomeada em virtude de estudos filogenéticos (Gugelmim 2020). Em 2011, o gênero *Trueperella* foi criado em homenagem ao microbiologista alemão Hans Georg Truper, e o epíteto da espécie - *pyogenes* - está relacionado à produção de pús. *T. pyogenes* faz parte do grupo dos Actinomycetos, grupo filogeneticamente diverso de bactérias Gram-positivas, que tende a crescer lentamente e a produzir filamentos ramificados. positivo, pleomórfico, não formador de esporos, não móvel, não encapsulado, facultativamente anaeróbico, que se caracteriza por um metabolismo fermentativo e forte atividade proteolítica (Reddy, et al., 1982). Apresenta distribuição ubíqua e podendo ser encontrada na pele e nas mucosas do trato respiratório, trato gastrointestinal e órgãos urogenitais de animais (Yassin et al., 2011). É um patógeno oportunista que infecta uma um grande número de espécies animais, principalmente ruminantes e suínos (Jost & Bilington, 2005). Esporadicamente a bactéria pode infectar humanos que possuem contato próximo com animais infectados (Jootar et al., 1978; Jost & Bilington, 2005; Azamgarhi & Warren, 2020).

No caso do *T. pyogenes*, a patogenicidade é atribuída aos determinantes, que induzem a formação de abscessos, empiemas e lesões piogranulomatosas (Rzewuska, et al., 2019), bem como sua via de transmissão e pouco compreendidas (Rzewuska et al., 2019), podendo causar processos supurativos, associando-se ainda a outros agentes comensais potencialmente patogênicos, como a *Escherichia coli* (Hirsh & Zee, 2003; Bicalho et al., 2012) Brodzki et al., 2014). Permanecendo a interação entre hospedeiro e microrganismo pouco conhecida. No entanto, até o presente momento, alguns fatores de virulência na patogenicidade da infecção são reconhecidos podendo-se destacar a piolisina (PLO), uma potente toxina extracelular, com função de hemolisina com atividade citolítica em células imunes, capaz de lisar hemácias, sendo responsável pela característica de beta-hemólise exibida pela *T. Pyogenes* quando cultivada em meios contendo sangue. Essas toxinas exercem seus efeitos citolíticos através da formação de grandes poros em membranas de células eucarióticas (Jost & Bilington, 2005; Zhao et al., 2013). Fatores de adesão como proteínas de ligação à matriz extracelular como de ligação ao colágeno, ao fibrinogênio e a fibronectina e a neuraminidase que desempenham um papel na adesão às células epiteliais das superfícies mucosas do hospedeiro (Bilington et al., 2002); Ainda sintetizam diferentes exoenzimas, como serina, proteases com atividade de gelatinase, caseinase e DNAses, associando-se a grande capacidade de invadir células hospedeiras e de criar biofilme (Jost, 2005), além de codificar genes de multirresistência à diferentes agentes antimicrobianos, (Zhao et al., 2011).

Com relação aos sinais clínicos em bovinos é causa principalmente de mastite e metrite (Jost & Bilington, 2005), podendo levar a abortos esporádicos (Ribeiro et al., 2015), inclusive com lesões semelhantes à brucelose (Costa, et al., 2019), em suínos é causadora de pneumonia, endocardite, poliartrite, mastite, infecções do trato reprodutivo e septicemia (Dong et al.,

2019). Em pequenos ruminantes é comum causar formação de abscessos em diferentes tecidos, e em várias partes do corpo, incluindo medula óssea e na região interdigital do casco (Tadayon et al., 1980). Esse microrganismo geralmente está associado a distúrbios purulentos em ovinos e caprinos, principalmente envolvendo vários agentes bacterianos, levando a pneumonia, infecções do trato reprodutivo, mastite e septicemia (Urumova et al., 2009).

Em relação às aves, alguns casos de claudicação e osteomielite em perus foram relatados, porém a incidência da infecção por *T. pyogenes* nessa espécie é muito baixa (Barbour et al., 1991; Brinton et al., 1993). Em equinos foram observados raros casos de metrite, orquite, mastite, septicemia, infecção umbilical em potros, abscessos e infecção de feridas (Ribeiro et al., 2015; Rampacci et al., 2017).

Em animais selvagens de vida livre e em cativeiro, a *T. pyogenes* está associada a pneumonia, processos purulentos, abscessos podais, intracraniano, no fígado, baço, pulmões, necrose crônica e inflamação ulcerativa do prepúcio e do pênis e infecções do trato urogenital (Ribeiro et al., 2015). Os casos de infecção por *T. pyogenes* em cães e gatos são raros, possivelmente pelo fato de que esse microrganismo não pertence à microbiota normal desses animais (Rzewuska et al., 2019). Em cães a *T. pyogenes* já foi isolada em casos de infecção de feridas, abscessos, vaginite, pneumonia e encefalite (Rissetti et al., 2017). Em humanos os casos são raros e poucos elucidados (Rzeuska et al., 2018), ocorrendo principalmente em pacientes imunossuprimidos, e essas infecções geralmente são resultado de exposição ocupacional, pois a *T. pyogenes* não faz parte da flora humana normal (Jost & Bilington, 2005). A probabilidade de transmissão de animal para humano é incerta havendo a necessidade de maiores estudos, uma vez que *T. pyogenes* nunca foi demonstrado como parte da microbiota comensal de humanos, podendo-se concluir que tais infecções devem ser consideradas possivelmente de caráter zoonótico (Azamgarhi & Warren, 2005; Jost & Bilington, 2005).

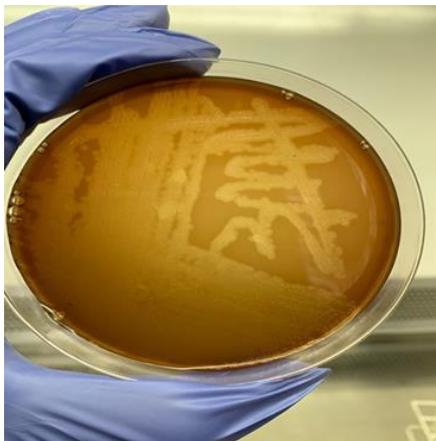
2. Metodologia

Foi encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba uma amostra refrigerada de fragmento pulmonar de novilha da raça Holandesa que veio a óbito em terço final de gestação (275 dias de gestação). O animal era proveniente de propriedade leiteira com vacas de alta lactação na cidade de Araçatuba, São Paulo e apresentava tosse, dispneia e ataxia. No presente estudo foi aplicado o método qualitativo, segundo Pereira A. S. et al. (2018), quando foram coletados dados preferencialmente descritivos à anamnese

A amostra apresentava-se em bom estado de conservação, porém hemorrágica a observação macroscópica foi semeada em placas de Petri contendo meios de cultura de Ágares Sangue acrescido de 5% de sangue desfibrinado de ovino e *Mac Conkey*, ambas incubadas em estufa bacteriológica a temperatura de 37°C em condições de aerobiose e microaerofilia por um período de 72 horas, quando foram monitoradas diariamente. Simultaneamente, realizou-se o “*imprint*” de um pequeno fragmento do parênquima pulmonar, que foi submetido às técnicas de coloração de Gram e Panótico. Em ambas as técnicas de coloração observou-se pequena quantidade de cocos, bacilos e cocobacilos gram positivos com aspecto “corineforme”. Realizou-se também pesquisa para outros agentes etiológicos como cocos gram positivos, enterebacterias e *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella* sp, afim de se fazer diagnóstico diferencial.

Após o período de 40 horas de incubação em placas ágar sangue, foi possível observar o crescimento puro e exuberante de incontáveis unidades formadoras de colônias [UFC] de tamanho diminuto e de pigmentação translúcida de até 1mm de tamanho exibindo halo de β -hemólise, compatível com as características macro morfológica de microrganismos da espécie *T. pyogenes*, conforme pode-se observar na figura 1.

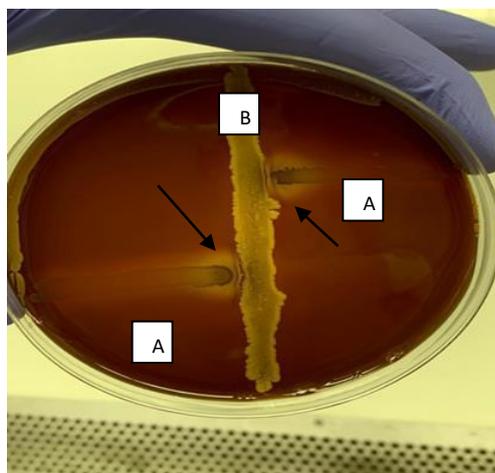
Figura 1 –Cultura em Placa de Petri contendo meio de cultura de ágar sangue apresentando crescimento de *T.pyogenes* após 48 h de incubação.



Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA-Unesp.

O esfregaço corado pela técnica de Gram mostrou cocobacilos pleomórfica com aspecto “corineforme”, lembrando letras do alfabeto chinês, exibindo características micro morfológicas a microrganismos da espécie *T. pyogenes*. Posteriormente, a amostra foi submetido aos testes bioquímicos para a espécie, conforme descritos por QUINN et al., (1994) como a síntese de enzimática da catalase, oxidase e do teste de CAMP sendo observados os resultados negativo, negativo às provas enzimáticas e positivo ao CAMP, quando se observou a um grande halo de hemólise junto ao local de confluência das hemolisinas produzidas pela *T. pyogenes* frente a *S. aureus* β hemolítico.

Figura 2 – Placa de Petri em ágar sangue mostrando o teste de CAMP positivo.



A Cultivo na horizontal de amostra de *T. Pyogenes*. B Cultivo na vettical de amostra de *S. aureus* β -hemolítico. Setas indicam halo intenso de hemólise no ponto de encontro entre dois cultivos =CAMP teste +. Fonte: Laboratório de Microbiologia FMVA-Unesp

3. Resultados e Discussão

Trueperella pyogenes tem sido estudada e relatada em vários trabalhos científicos, mostrando sua importante participação nas doenças imunossupressoras, principalmente em bovinos, podendo ser o agente causador de aborto e pneumonia (Rezaneiad et al., 2019). No presente relato, possivelmente a novilha passou por algum episódio estressante que desencadeou queda de sua imunidade, permitindo que o agente, que é comensal do trato reprodutivo, se proliferasse, desencadeando a infecção pulmonar que culminou no óbito. Nenhuma enfermidade intercorrente foi diagnosticada nos outros

exames complementares. Ressalta-se ainda a importância da realização do exame microbiológico afim de esclarecer a causa da morte. O diagnóstico incorreto do agente etiológico leva a sérios prejuízos econômicos na produção animal, pois a escolha equivocada do antimicrobiano gera resistência bacteriana e reduz a eficácia do tratamento (Rezanejad et al., 2019). Os sinais clínicos apresentados, a espécie animal afetada, o tipo e a localização das lesões podem sugerir os microrganismos envolvidos. Exsudatos, aspirados e fragmentos de tecidos são amostras de eleição para a realização dos exames (Quinn et al., 2015).

Pouco se sabe sobre a disseminação de infecções por *T. pyogenes* e sobre a transmissão do patógeno. Sugere-se que a maioria das infecções tenha caráter endógeno, pois as bactérias são um componente comum da biota da pele e membranas mucosas (Lewis, 1997). No entanto, a possibilidade de infecções exógenas também deve ser considerada, porque as bactérias podem ser transmitidas por utensílios e equipamentos de criação contaminados ou diretamente de animal para animal (Ribeiro et al., 2015; RissetI et al., 2017). As bactérias também podem invadir os tecidos através de microlesões na pele causadas por alguns artrópodes, como moscas ou carrapatos (Chirico et al., 1997; Hirsh & Zee, 2003). Afecções causadas por *T. pyogenes* em humanos incluem: pneumonia (Amejeiras et al., 2004), sepse (Levy et al., 2009), lesões purulentas e abscessos (Gahrn-Hansen & Frederiksen, 1992).

O diagnóstico diferencial para outros microrganismos é fundamental, uma vez que a doença respiratória bovina (BRD) em bovinos é um complexo multifatorial causado por vários vírus (herpesvírus bovino-1, vírus da diarreia viral bovina, vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina, vírus parainfluenza-3, vírus sincicial respiratório, etc.) e bactérias (*Pasteurella* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E. coli*, *Mycoplasma* spp., etc.). Sacco et al., 2014, sendo primordial a identificação do agente etiológico para que se estabeleça um correto tratamento frente à infecção e se adote medidas preventivas que vise o controle da enfermidade. Particularmente, em ruminantes domésticos, *P. multocida* e *M. Haemolytica* são os patógenos respiratórios mais importantes isolados de doenças respiratórias (Rice et al., 2007) que causam surtos de pneumonia em bezerros, bovinos adultos, ovinos e caprinos Ackermann & Brogden (2000). A cultura bacteriológica constituem-se em uma importante ferramenta, uma vez que permite a correta identificação do agente etiológico, através da associação entre os resultados microbiológicos, além de permitir muitas vezes o diferencial de outras outras enfermidades bacterianas. Para tanto, ressalta-se a necessidade da realização da coleta do material biológico de forma asséptica, do armazenamento e do envio do material em condições adequadas.

4. Considerações Finais

A *T. pyogenes* é uma bactéria de grande importância na medicina veterinária, pois leva a prejuízos econômicos, além de possuir potencial zoonótico. É agente comensal da pele e mucosas dos animais, não havendo vacina disponível até o presente momento, tornando sua prevenção um desafio. A detecção precoce desse microrganismo através da cultura bacteriana e a realização de antibiograma para o tratamento adequado é imprescindível para o melhor desfecho tanto para o bem-estar animal quanto para o produtor.

Referências

- Ackermann, M. R., & Brogden, K. A. (2000). Resposta do trato respiratório de ruminantes à *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Os micróbios infectam*, 2 :1079–1088.
- Amejeiras, H. et al. (2004). One case of pneumonia with *Arcanobacterium pyogenes*. *An. Med. Int.*, 21, 334–336.
- Azamgarhi, T.; & Warren, S. (2020). A case of *Trueperella pyogenes* causing prosthetic joint infection. *Journal of bone and joint infection*, 6(3), 47-50.
- Barbour, E. K. et al. (1991). Characteristics of *Actinomyces pyogenes* involved in lameness of male turkeys in north-central United States. *Avian diseases*, 35(1), 192-6.

- Bicalho, M. L. S et al. (2012). Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 125-31.
- Billington, S. J. et al. (2002). Widespread distribution of Tet W determinant among tetracycline-resistant isolates of the animal pathogen *Arcanobacterium pyogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(5), 1281-7.
- Brinton, M. K. et al. (1993). Description of osteomyelitis lesions associated with *Actinomyces pyogenes* infection in the proximal tibia of adult male turkeys. *Avian diseases*, 37(1), 259-62.
- Brodzki, P. et al. (2014). *Trueperella pyogenes* and *Escherichia coli* as an etiological factor of endometritis in cows and the susceptibility of these bacteria to selected antibiotics. *Polish journal of veterinary sciences*, 17(4), 657-64.
- Chirico, J. et al. (1997). Summer mastitis experimentally induced by *Hydrotaea irritans* exposed to bacteria. *Medical and veterinary entomology*, 11(2), 187-192.
- Costa, L. S. et al. (2019). *Trueperella pyogenes* como causa de aborto em uma vaca - relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 71(6), 1950-1954.
- Dong, W. L. et al. (2019). Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Trueperella pyogenes* isolated from pig lungs with pneumonia. *Trop Anim Health Prod*, 51, 2099–2103.
- Gahrn-Hansen & B.; Frederiksen, W. (1992). Human infections with *Actinomyces pyogenes* (*Corynebacterium pyogenes*). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 15(4), 349–354
- Gugelmin, G. A. et al. (2020). Osteomielite maxilar causada por *Trueperella pyogenes* em bovino. *Revista Agrária Acadêmica*, 3(2), 130-137.
- Gustavo Andrade Gugelmin et al., (2020). Osteomielite maxilar causada por *Trueperella pyogenes* em bovino. Bovine maxillary osteomyelitis caused by *Trueperella pyogenes*. *Revista. Agrária Acadêmica*. 3(2)
- Jootar, P. et al. (1978). *Corynebacterium pyogenes* endocarditis. Report of a case with necropsy and review of the literature. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 61(10), 596-601.
- Jost B.H. & Billington SJ *Arcanobacterium pyogenes* (2005). Patogênese molecular de um animal oportunista. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 88 :87–102. 10.1007/s10482-005-2316
- Jost, B. H. & Billington S. J. (2005). *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 88(2), 87-102.
- Levy, C. E. et al. (2009). *Arcanobacterium pyogenes* Sepsis in Farmer, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 15(7), 1131–1132.
- Lewis, G. S. (1997). Uterine Health and Disorders. *Journal of Dairy Science*, 80(5), 984-994.
- Pereira A. S. et al. (2018). Metodologia da pesquisa científica. UFSM.
- Quinn, P. J. et al. (2005) *Veterinária e Doenças infecciosas*. Artmed Editora, 74 – 78.
- Rampacci, E. et al. (2017). Umbilical infections in foals: microbiological investigation and management. *Veterinary Record*, 180(22), 543–543,
- Rezanejad, M. et al. (2019). Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Trueperella pyogenes* strains isolated from bovine mastitis and metritis. *BMC microbiology*, 19(1), 305. 27.
- Ribeiro, M. G. et al. (2015). *Trueperella pyogenes* multispecies infections in domestic animals: a retrospective study of 144 cases (2002 to 2012). *The veterinary quarterly*, 35(2), 82-7.
- Rice J.A. & Carrasco-Medina I., Hodgins D.C Shewen P.E. (2007). *Mannheimia haemolytica* e Doença Respiratória Bovina. *Anim Health Res Rev*. 8 :117–128.
- Risetti, R. M. et al. (2017). Virulence markers associated with *Trueperella pyogenes* infections in livestock and companion animals. *Letters in applied microbiology*, 65(2), 125-132,
- Rzewuska, M. et al. (2019) Pathogenicity and virulence of *Trueperella pyogenes*: a review. *International journal of molecular sciences*, 20(11), 2737.
- Sacco R. E, McGill J. L, Pillatzki A. E, Palmer M. V, & Ackermann M. R. (2014) Infecção pelo vírus sincicial respiratório em bovinos. *Veterinary Pathology*. 51 :427–436.
- Tadayon, R. A. et al. (1980). Microorganisms associated with abscesses of sheep and goats in the south of Iran. *American journal of veterinary research*, 41(5), 798-802.
- Urumova, V. et al. (2009). Investigations on the involvement of *Arcanobacterium pyogenes* in various infections in productive and companion animals and sensitivity of isolates to antibacterials. *Revue de Medecine Veterinaire*, 160, 582-585,
- Yassin, A. F. et al. (2011). Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehnen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(6), 1265-1274.

Zhao, K. et al. (2011). Detection and characterization of antibiotic-resistance genes in *Arcanobacterium pyogenes* strains from abscesses of forest musk deer. *Journal of medical microbiology*, 60(12), 1820-1826.

Zhao, K. et al. (2013). In vitro and in vivo expression of virulence genes in *Trueperella pyogenes* based on a mouse model. *Veterinary microbiology*, 163(3-4), 344-50.