

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE -  
MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA

Gisele Vaz Aguirre Samoel

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Buchananella hordeovulneris*  
DE PIOTÓRAX FELINO**

Santa Maria, RS

2022

**Gisele Vaz Aguirre Samoel**

**Isolamento e caracterização de *Buchananella hordeovulneris* de piotórax felino**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção no grau de **Especialização em Medicina Veterinária- Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.**

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel  
Co-orientadora: Juliana Felipetto Cargnelutti

Santa Maria, RS

2022

**Gisele Vaz Aguirre Samoel**

**Isolamento e caracterização de *Buchananella hordeovulneris* de piotórax felino**

Monografia apresentada ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção no grau de **Especialização em Medicina Veterinária- Área de concentração em Medicina Veterinária Preventiva.**

**Aprovado em** 17 de fevereiro de 2022

---

**Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Juliana Felipetto Cargnelutti, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Sônia de Ávila Botton, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**

---

**Letícia Trevisan Gressler, Dr<sup>a</sup> (IFFar)**

Santa Maria, RS

2022

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente minha mãe, que criou sozinha três filhos e enfrentou com garra todas as adversidades que cruzaram nossos caminhos. Obrigada por sempre me apoiar e me auxiliar em toda minha jornada acadêmica.*

*Agradeço minhas professoras, Fernanda Silveira Flores Vogel e Juliana Felipetto Cargnelutti, pelos aprendizados e oportunidades durante a residência.*

*Agradeço à equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) e Laboratório de Bacteriologia (LABAC), pela estrutura e recursos disponíveis.*

*Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.*

*Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Residência Uniprofissional em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realizar o curso de especialização em uma instituição de referência.*

## RESUMO

### ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Buchananella hordeovulneris* DE PIOTÓRAX FELINO

AUTORA: Gisele Vaz Aguirre Samoel  
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel  
CO-ORIENTADORA: Juliana Felipetto Cargnelutti

A actinomicose é uma doença causada por bactérias filamentosas anaeróbicas facultativas ou capnofílicas que, na grande maioria, são habitantes comensais da mucosa orofaríngea dos animais. Essas bactérias são frequentemente subdiagnosticadas, pois apresentam colônias pequenas, de crescimento fastidioso e, geralmente, são suprimidas pelo crescimento de outras bactérias de crescimento rápido, dificultando o seu isolamento a partir de amostras clínicas. A actinomicose pode ser causada por bactérias de diversos gêneros, além de *Actinomyces*, que compartilham várias características fenotípicas e morfológicas, sendo necessária a utilização de recursos moleculares para identificação precisa desses agentes. Assim, o objetivo deste trabalho é descrever o isolamento e a caracterização de *Buchananella hordeovulneris*, antigamente denominada de *Actinomyces hordeovulneris*, associada a um caso de actinomicose torácica em um felino. Um gato, fêmea, sem raça definida, de 1 ano, foi levado ao hospital veterinário na região central do Rio Grande do Sul, Brasil, apresentando taquipneia, baixa amplitude torácica, padrão restritivo de respiração e mucosas cianóticas, dois dias após uma cirurgia de castração eletiva. Realizou-se exame de radiografia torácica onde se identificou efusão pleural e coletou-se, por toracocentese, 100 a 200 mL de fluido cavitário. Na análise citológica, o fluido foi caracterizado como exudato, apresentava-se purulento e avermelhado, continha numerosos grânulos branco-amarelados, e estruturas filamentosas e ramificadas. O fluido foi inoculado em ágar com 5% de sangue de carneiro e incubado em aerobiose e microaerobiose a 37°C. Após 72h de incubação foram observadas colônias pequenas, secas e opacas, medindo 0,5 a 1 mm de diâmetro. Os testes fenotípicos identificaram uma bactéria Gram-positiva, imóvel, de metabolismo fermentativo lento e fraca produtora de catalase, incapaz de converter triptofano em indol e hidrolisar esculina. Os açúcares glicose, lactose, manitol, rafinose sorbitol, sacarose e trealose foram utilizados, ao contrário de e arabinose, ribose e xilose. As colônias foram submetidas à caracterização molecular, através da amplificação parcial e sequenciamento da região 16S rRNA. A sequência de nucleotídeos do isolado (SB 92/21, acesso Genbank OM281739) apresentou alta identidade com *Actinomyces* spp. (98,97%; KM461981.1) isolado de amostra oral de gato. A identidade dos nucleotídeos variou de 96,81% a 99,32% com sequências de *Buchananella hordeovulneris*, aceitando 85 a 100% de cobertura. Na árvore filogenética, SB92/21 agrupou com sequências de *B. hordeovulneris*. O animal foi tratado com eritromicina (10 mg/kg) durante dez dias e houve completa resolução clínica. Embora esse microrganismo já tenha sido detectado em infecções torácicas de pequenos animais, o seu isolamento é incomum, pois amostras suspeitas necessitam de condições e tempo de incubação ideais, e sua completa identificação depende de ferramentas moleculares. Assim, esses achados indicam que *B. hordeovulneris* precisa ser incluído no diagnóstico diferencial de outros *Actinomyces* spp. e *Nocardia* spp. causadores de piotórax em gatos, e que a confirmação taxonômica de microrganismos patogênicos para animais é importante para o conhecimento da epidemiologia das doenças.

**Palavras-chave:** Actinomicoses, empiema torácico, microbiologia, bacteriologia

## ABSTRACT

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *Buchananella hordeovulneris* FROM FELINE PYOTHORAX

AUTHOR: Gisele Vaz Aguirre Samoel  
ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel  
CO- ADVISOR: Juliana Felipetto Cargnelutti

Actinomycosis is a disease caused by facultative anaerobic or capnophilic filamentous bacteria, which most part, are commensal inhabitants of the oropharyngeal mucosa of animals. These bacteria are often underdiagnosed, because they have small colonies, fastidious growth and, are generally suppressed by the growth of other fast-growing bacteria, making its isolation from clinical specimens difficult. Actinomycosis can be caused by various bacterial genera, beyond *Actinomyces*, which share several phenotypic and morphological characteristics, requiring the use of molecular tools for its precise identification. Thus, the objective of this work is to describe the isolation and characterization of *Buchananella (Actinomyces) hordeovulneris*, formerly called *Actinomyces hordeovulneris*, involved in a case of thoracic actinomycosis in a feline from southern Brazil. An 1-year-old female mixed breed cat was admitted to a veterinary hospital, in the central region of Rio Grande do Sul, Brazil, showing tachypnea, low thoracic amplitude, restrictive pattern of breathing and cyanotic mucous membranes, two days after elective castration surgery. Thoracic radiography was performed, where pleural effusion was identified and about 100–200 ml of fluid was collected by thoracocentesis. In the cytological analysis, the fluid was characterized as exudate. It was purulent and reddish, and contained large numbers of yellowish-white granules that showed branched filamentous structures. The fluid was plated on agar with 5% sheep blood and incubated in aerobiosis and microaerobiosis at 37 °C. After 72h of incubation, small dry and opaque colonies were observed, entire measuring 0.5 to 1 mm in diameter. The phenotypic tests identified a non-spore-forming, non-motile, glucose slow fermenter, weak catalase producer, cytochrome oxidase negative, unable to convert tryptophan into indole and to hydrolyze esculin. It was negative in nitrate reduction test and did not produced urease. Glucose, lactose, mannitol, raffinose, sorbitol, sucrose and trehalose were attacked, but not arabinose, ribose or xylose. The colonies were also submitted to molecular characterization, through partial amplification and sequencing of the 16S rRNA region. The nucleotide sequence from the isolate (SB 92/21, GenBank accession OM281739) showed high identity with *Actinomyces* spp. (98.97%; KM461981.1) isolated from oral samples of cat. The nucleotide identity ranged from 96.81 % to 99.32% (accepting 85 to 100% of query cover) with *Buchananella hordeovulneris* sequences. On the phylogenetic tree, SB 92/21 grouped with sequences of *B. hordeovulneris*. The affected animal was treated with erythromycin (10 mg/kg) for ten days and there was complete clinical resolution. Although this microorganism has already been detected in thoracic infections of small animals, its isolation is uncommon, as suspect samples need ideal conditions and incubation time, and its complete identification depends on molecular tools. Thus, these findings indicate that *B. hordeovulneris* need to be included as differential diagnosis of others *Actinomyces* spp. and *Nocardia* spp. causing pyothorax in cats, and taxonomic confirmation of pathogenic microorganisms for animals are important for understanding the epidemiology of diseases.

**KEYWORDS:** Actinomycosis, thoracic empyema, microbiology, bacteriology

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Table 1. Morphological and phenotypical characteristics of <i>Actinomicetes</i> recovered from feline infections.....	31
--	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Fig. 1. Morphological characteristic of *Buchananella hordeovulneris* isolate SB92/21 **A)** Microscopy of pleural fluid smear stained with Romanowsky method, showing branched filamentous structures (arrow) and leucocytes (arrow head). **B)** Mature colonies of *Buchananella hordeovulneris* on blood agar after 14 days of aerobic incubation at 37°C (20x). Granular internal structure can be observed in the colony center. **C)** Colonies of *Buchananella hordeovulneris* presenting dry and opaque colonies with circular format and spiral edges (10x). **D)** colonial celular morphology, pleomorphic and irregular rods stained by Gram (1000x).....29
- Figura 2 – Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16s rRNA partial sequence. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates. The evolutionary distances were computed using the Kimura- 2-parameter method and implemented by MEGA X. Values > 80% are shown. SB92/21 (identified with an orange circle) clustered with *B. hordeovulneris* sequences and apart of other *Actinomyces* spp. available in GenBank database.....30



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

16S rRNA	Gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico
BHI	Brain Heart Infusion broth
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
dL	Decilitro
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
g	Gramas (s)
h	horas
KOH	Hidróxido de Potássio
mL	Microlitro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogênico
PO	“Per Os” - <i>Oral administration</i> (Administração oral)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
TID	<i>Ter in die</i> (Três vezes ao dia)
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
ZN	Ziehl- Neelsen

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>13</b>
2.1 ACTINOMICETOS.....	13
2.2 ACTINOMICOSES EM PEQUENOS ANIMAIS.....	14
2.2.1 Etiologia.....	14
2.2.2 Manifestações clínicas.....	15
2.2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial.....	17
2.2.4 Prognóstico e tratamento.....	20
<b>3 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>21</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

*Buchananella hordeovulneris* é uma espécie de bactéria comensal da cavidade orofaríngea de cães e gatos que pode causar actinomicose torácica em pequenos animais (SYKES, 2012). Essa bactéria pertence ao filo *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, ordem *Actinomycetales*, família *Actinomycetaceae*, e é a única representante do gênero *Buchananella* (NOUIOUI et al., 2018).

A família *Actinomycetaceae* é composta por bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos ou hifas aéreas, sem motilidade, anaeróbicas facultativas e de metabolismo quimioheterotrófico fermentativo (SHAAL & YASSIN, 2012). Os gêneros *Boudabousia*, *Bowdenia*, *Buchananella*, *Gleimia*, *Pauljensenia*, *Schaalia* e *Winkia*, anteriormente pertencentes às espécies do gênero *Actinomyces*, foram incluídos na família *Actinomycetaceae*, mas compartilham várias características fenotípicas e morfológicas em comum, sendo necessária a utilização de recursos moleculares para identificação precisa desses agentes (NOUIOUI et al., 2018).

O gênero *Buchananella* tem como característica abrigar bactérias Gram-positivas, que contém enzima catalase fracamente positiva, que formam bacilos pleomórficos e filamentos, compartilhando essas e muitas outras características com o gênero *Actinomyces* (NOUIOUI et al., 2018; MARKEY et al., 2013). *Actinomyces* spp. podem ser visualizados em forma de bastonetes curtos ou de filamentos, isolados ou em pares, dispostos em V e Y ou paliçada (TRABULSI & ALTERTHUM, 2015). A ramificação em filamentos, geralmente é observada em amostras biológicas, enquanto que no meio de cultura é possível a visualização de formas irregulares e cocobacilares, ou bacilares (MCVEY et al., 2017).

Todos os membros da família *Actinomycetaceae* são microrganismos comensais ou patógenos do homem e outros animais (SHAAL & YASSIN, 2012), geralmente habitando o trato digestivo e genital (SYKES, 2012). O conhecimento da microbiota comensal da cavidade oral dos animais tem grande importância na veterinária, pois geralmente estão associadas a abscessos granulomatosos cutâneos e viscerais, pleurites, peritonites, artrite sépticas, mastites, abortos, endoftalmites, meningites e meningoencefalites (MARKEY, 2012; SYKES, 2013). Esses organismos normalmente são considerados patógenos oportunistas e, comumente, dependem de interferência mecânica na barreira mucosa para produzir doença (SYKES, 2013). Apesar de não serem considerados tão patogênicos, quando são inoculados nos tecidos, associados a outras bactérias, causam uma reação inflamatória piogranulomatosa, que pode se disseminar para diversos órgãos (SYKES, 2012), dificultando a capacidade de penetração de

alguns antibióticos dentro de lesões, o que pode acarretar também na falha terapêutica (CHANDLER et al., 2004).

Em pequenos animais, as regiões mais afetadas por *Actinomyces* spp. são o tecido cutâneo, subcutâneo e cavidade torácica e abdominal. Lesões no sistema nervoso central (meningite e meningoencefalites), nos olhos (ceratites e endofitalmite), e na vesícula urinária e válvulas cardíacas também são observadas, mas com menor frequência (SYKES, 2013). As bactérias estão normalmente associadas à área da orofaringe, e podem ser introduzidas nos tecidos via saliva, quando o animal lambe ou morde uma ferida, mas também podem ser disseminadas por via hematogênica e resultar em diversos tipos de lesões (BUCHANAN, 1984). Em felinos, a lesão por mordedura é a via de infecção mais comum. As rotas de infecção torácica incluem aspiração de material da orofaringe, envolvimento do mediastino por perfuração do esôfago e extensão do sítio de infecção em decorrência de proximidade anatômica abdominal ou cervicofacial (SYKES, 2012). A característica desses microrganismos de produzirem lesões granulomatosas e crônicas são comuns também a outros gêneros, como *Nocardia* e *Mycobacterium*, que devem ser considerados no diagnóstico diferencial, pois são importantes na definição do prognóstico e tratamento da doença (WHITNEY & BARRS, 2020).

O diagnóstico de actinomicose pode ser complexo, pois os sinais clínicos e lesões podem ser variados e inespecíficos, e não podem ser diferenciadas daquelas causadas por outros actinomicetos. Assim, o diagnóstico deve ser feito baseado no histórico e exame clínico detalhado, imagens ultrassonográficas e radiográficas, e na análise bacteriológica e citopatológica do exsudato da lesão (PELLE et al., 2000; RASKIN, 2016; SYKES, 2013). Para o diagnóstico laboratorial, amostras provenientes principalmente de lesões cutâneas e derrames cavitários devem receber atenção especial, pois o tempo e as condições de isolamento microbiológico devem ser direcionados para esses microrganismos. A dificuldade de isolar e identificar actinomicetos faz com que esses agentes sejam, frequentemente, subdiagnosticados na medicina veterinária (SYKES, 2012). Em muitos casos, a cultura apresenta resultados negativos, porque um longo tempo de incubação (5 a 7 dias) e um ambiente atmosférico com maior oferta de CO<sub>2</sub> são necessários para seu crescimento. Além disso, outras bactérias de crescimento rápido podem se sobrepor às colônias dos actinomicetos no meio de cultivo, dificultando a sua visualização e interferindo no seu crescimento (CHANDLER, 2004).

A diferenciação das espécies mais comuns de *Actinomyces* spp. pode ser feita com base nas características morfológicas e bioquímicas das colônias (SCHAAL, 1986). Entretanto, com a recente descrição e reclassificação de novas espécies e gêneros intimamente relacionados aos

*Actinomyces* spp., considera-se duvidosa a identificação de espécies unicamente pelo perfil bioquímico, sendo necessário o uso de ferramentas moleculares para a identificação precisa. Devido a essa complexidade, amostras clínicas são raramente identificadas até o nível de espécie (SYKES, 2012), e é possível que muitos microrganismos pertencentes aos novos gêneros ainda estejam sendo classificados como *Actinomyces*.

A descrição de *B. hordeovulneris* em amostras provenientes de lesões em pequenos animais é incomum, porém, levando em consideração de que este microrganismo é geralmente subdiagnosticado, devemos considerar esse patógeno como um possível causador e/ou intensificador de lesões pulmonares de felinos. A confirmação taxonômica de microrganismos causadores de doenças em animais é importante para que se possa conhecer a exata patogenia e epidemiologia de cada enfermidade. Além disso, a caracterização molecular desses agentes contribui para o estudo filogenético das espécies e gêneros recentemente descritos. Desta forma, o objetivo deste trabalho é descrever as características fenotípicas, morfológicas e moleculares, bem como perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *B. hordeovulneris*, antigamente denominada de *Actinomyces hordeovulneris*, isolada de piotórax em um felino no sul do Brasil.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ACTINOMICETOS

A família *Actinomycetaceae*, pertence à classe *Actinobacteria*, que compreende um grupo heterólogo de procariontes, é composta por bactérias Gram-positivas não formadoras de esporos ou hifas aéreas, sem motilidade, anaeróbicas facultativas ou capnofílicas, e de metabolismo quimioheterotrófico fermentativo. São, predominantemente, difteróides que tendem a formar filamentos nos tecidos e em alguns estágios de desenvolvimento em cultivo (Yassin, 2014). A sua morfologia celular varia de bacilos retos a levemente curvados, com ou sem torção nas extremidades, de formatos e tamanhos variáveis. Bacilos curtos e formas cocoides também podem ser visualizadas. Essa característica pode variar entre cepas das espécies, composição do meio de cultivo, pH, condições de incubação e idade da cultura.

Os membros dessa família são definidos por diversas características morfológicas e propriedades quimiotaxonômicas, como lipídeos polares, ácidos, aminoácidos de peptidoglicano e açúcares, que são utilizados para a delimitação de gêneros e espécies (YASSIN, 2014). Além das características morfológicas e quimiotaxonômicas dos actinomicetos, as características genômicas também são fundamentais para sua exata classificação.

Após revisões taxonômicas, atualmente essa família compreende os antigos gêneros *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Mobiluncus* e *Varibaculum*, e sete novos gêneros, nomeados como *Boudabousia*, *Bowdenia*, *Buchananella*, *Gleimia*, *Pauljensenia*, *Schaalia* e *Winkia* que, anteriormente eram classificados como *Actinomyces*, devido sua grande similaridade morfológica, bioquímica e filogenética com o gênero (NOUIOUI et al., 2018). Esses gêneros se diferem, principalmente, em relação à composição dos açúcares da membrana celular, das cadeias de ácidos graxos e do conteúdo de C+G do genoma (YASSIN, 2014).

De acordo com Schaal et al. (2006), *Actinomyces* spp. podem ser subdivididos filogeneticamente em dois maiores e, pelo menos, quatro *clusters* menores. O primeiro *cluster* (*cluster* central) é formado por sequências com alta significância estatística (valor de *bootstrap* 100%), contendo 15 a 17 espécies, que incluem *Actinomyces bovis*, *A. bowdenii*, *A. catuli*, *A. dentalis*, *A. denticolens*, *A. gerencseriae*, *A. graevenitzii*, *A. howellii*, *A. israelii*, *A. johnsonii*, *A. massiliensis*, *A. naeslundii*, *A. oricola*, *A. oris*, *A. radidentis*, *A. ruminicola*, *A. slackii*, *A. urogenitalis* e *A. viscosus*. Esse *cluster* é formado por espécies que compartilham 94-99% de

similaridade na sequência, sendo que algumas espécies podem exibir >98,5% de similaridade, e não podem ser identificadas de maneira confiável por comparação de sequências do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossômico (SCHAAL & YASSIN, 2012).

O segundo maior *cluster* (*cluster* central 2) contém 11 espécies, com uma significância estatística menor (valor de *bootstrap* 86%). No segundo *cluster*, algumas bactérias formam subgrupos vagamente relacionados ao grupo principal, cujas posições dos nucleotídeos 154:167 (G–U), 839:847 (A–U) e 1308:1329 (U–A) consistem em um padrão de assinatura do segmento 16S rRNA (SCHAAL, 2006). As assinaturas de nucleotídeos ajudam a diferenciar os gêneros da família *Actinomycetaceae*, principalmente porque estudos de caracterizações sobre morfologia, quimiotaxonômia e fenotípicos precisam ser realizados para diversas espécies descritas recentemente (SCHAAL & YASSIN, 2012).

As espécies, anteriormente denominadas *Actinomyces*, *Schaalia canis*, *S. cardiffensis*, *S. funkei*, *S. georgiae*, *S. hyovaginalis*, *S. meyeri*, *S. odontolytica*, *S. radingae*, *S. suimastitidis*, *S. turicensis* fazem parte desse grupo. *Boudabousia marimammalium*, *Pauljensenia hongkongensis*, *Buchananella hordeovulneris*, e *Bowdeniella nasicola*, também estão inclusos, mas formam um subgrupo mais próximo da base da árvore filogenética. Análises da sequência 16S rRNA das espécies do grupo central 2 de *Actinomyces* spp. determinaram similaridades suficientes para a formação dos novos gêneros *Boudabousia*, *Bowdenia*, *Buchananella*, *Gleimia*, *Pauljensenia*, *Schaalia* e *Winkia*. Assim, a espécie *Actinomyces hordeovulneris* foi reclassificada para o gênero *Buchananella*, em uma atual revisão taxonômica (NOUIOUI et al., 2018). As importâncias nos ciclos ecológicas de diversas novas espécies ainda não são totalmente compreendidas (SCHAAL, 2006).

## 2.2 ACTINOMICOSSES EM PEQUENOS ANIMAIS

### 2.2.1 Etiologia

A actinomicose é uma doença que cursa com lesões piogranulomatosas causadas por bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas filamentosas, que pertencem a diversos gêneros da família *Actinomycetaceae*. Na grande maioria, esses microrganismos são habitantes comensais da mucosa orofaríngea, gastrointestinal e genital, sendo considerados patógenos oportunistas (SYKES, 2013).

As espécies que são encontradas causando lesões em cães incluem *Actinomyces bowdenii*, *A. viscosus*, *A. catuli*, *A. turicensis*, *A. urogenitalis*, *Schaalia canis*, *S. hyovaginalis*, *S. odontolyticus* e *Buchananella hordeovulneris*. As espécies que são isoladas de lesões de felinos incluem *A. bowdenii*, *A. viscosus*, *Schaalia meyeri*, *S. odontolyticus* e *B. hordeovulneris* (SYKES, 2013). A espécie *B. hordeovulneris* faz parte da microflora comensal da cavidade oral de felinos (LOVE et al., 1990) e caninos, sendo descrita como possível fonte primária de auto-infecção em animais (MAD'AR et al. 2021).

Em cães, a ocorrência da doença está associada a feridas penetrantes ou corpos estranhos migratórios, sendo mais comum em animais que possuem acesso a ambientes contendo material vegetal, especialmente grama, que quando inalado ou ingerido, são contaminadas na orofaringe e podem migrar para vários locais, carreando o agente infeccioso. Em gatos, a doença está mais associada a feridas decorrentes de mordeduras ocasionadas durante brigas, e podem se manifestar como piotórax, peritonite ou celulites. Machos não-castrados, e com acesso à rua, geralmente, são os mais acometidos pela doença (SYKES, 2012). Fatores predisponentes como diabetes, uso de esteroides e co-infecção com vírus imunossupressores são relatados na medicina humana, mas necessitam ser melhor investigados na medicina veterinária (WONG et al., 2011).

### 2.2.2 Manifestações Clínicas

Em cães e gatos, a maioria das infecções por actinomicetos são desenvolvidas na forma de lesões cervicofaciais cutâneas e torácicas. Lesões intra-abdominais, retroperitoneais, oftálmicas e no sistema nervoso central também podem ocorrer (SYKES, 2012). Infecções subagudas e crônicas nos tecidos resultam na formação de tecido de granulação, fibrose extensiva e fístulas que drenam exsudatos que podem conter grânulos densos conhecidos como “grânulos de enxofre” (WHITNEY & BARRS, 2020). A extensão da lesão tecidual ocorre em decorrência das enzimas proteolíticas associadas a outras bactérias, macrófagos e neutrófilos degranulados que destroem o tecido subjacente, o que facilita a extensão da doença para tecidos saudáveis (SYKES, 2013).

As lesões cutâneas são frequentemente observadas, e caracterizam-se por abscessos cutâneos que drenam pela pele e podem infiltrar nos tecidos subjacentes (CHANDLER et al., 2004). As evoluções das lesões podem ser agudas a crônicas, ocorrendo emaciação do tecido subcutâneo, abscessos e lesões flutuantes, firmes ou maciças, que podem drenar para o exterior



ou serem ulcerativas (CHANDLER et al., 2004). O local de acometimento costuma ser a região cervicofacial, atingindo a cabeça e o pescoço, estando associadas à introdução das bactérias da cavidade oral para dentro dos tecidos adjacentes, secundárias às lesões periodontais, trauma oral, fraturas dentárias e objetos perfurantes (WHITNEY & BARRS, 2020). Lesões cutâneas em locais mais distantes da cabeça, como membros e patas, estão associadas ao ato de lambadura dos animais que carregam as bactérias na saliva até uma lesão já pré-estabelecida (SYKES, 2013).

As infecções abdominais são desenvolvidas quando há ingestão de corpo penetrante no trato gastrointestinal, resultando em massas intra-abdominais e em ascite. O envolvimento abdominal pode seguir por extensão direta da infecção a partir do tecido subcutâneo, ou por via hematógena, sendo que o fígado frequentemente está afetado, apresentando abscessos (SYKES, 2013). Em felinos, a espécie *B. hordeovulneris* está associada a lesões inflamatórias e crônicas (pseudotumor) no estômago e outros órgãos abdominais, que podem ser confundidas com tumores, pois no exame ultrassonográfico somente é possível determinar a existência de uma massa de baixa ecogenicidade no tecido, sendo necessária a realização de biópsia e cultivo microbiológico para o diagnóstico definitivo (PIETRA et al., 2015; SHARMAN et al., 2009).

As infecções pulmonares podem ser limitadas ao parênquima pulmonar ou podem estar associados a outras estruturas, como o mediastino, pleura, pericárdio e parede torácica. Geralmente são desenvolvidas por aspiração de material da orofaringe ou inalação de material vegetal, que se torna contaminado pelas bactérias comensais da nasofaringe, carregando o agente até a cavidade torácica. Algumas doenças pulmonares preexistentes, como neoplasias, podem facilitar a infecção em decorrência das alterações respiratórias. As rotas alternativas de infecção pulmonar podem ocorrer com o envolvimento do mediastino por perfuração esofágica ou por extensão/comunicação direta de lesões cervicofaciais ou abdominais (SYKES, 2012, 2013).

A actinomicose torácica geralmente cursa com pneumonia, linfadenopatia, massas intra ou extrapulmonares e/ou piotórax (WHITNEY & BARRS, 2020). O piotórax é caracterizado pelo acúmulo de fluido purulento e/ou séptico no espaço pleural, no qual os mecanismos de infecção incluem a via linfática ou hematógena a partir de um sítio distante (sepsis), extensão de uma infecção a partir de uma estrutura adjacente (broncopneumonia, ruptura esofágica) ou por inoculação direta (trauma penetrante, corpo estranho, toracocentese ou cirurgia torácica) (BARRS et al., 2005). Em felinos, normalmente é resultado da contaminação do espaço pleural com a flora da orofaringe (KIRPENSTEIJN & FINGLAND, 1992). As lesões podem ser

limitadas ao parênquima pulmonar ou pode envolver outras estruturas torácicas como o mediastino, pleura, pericárdio e parede torácica (SYKES, 2013).

Os gatos apresentam sinais clínicos discretos e inespecíficos que, quando reportados, incluem dispneia ou taquipneia, sinais de depressão, letargia, fraqueza, palidez ou cianose das mucosas (BARRS et al., 2005). No exame físico são evidenciadas anormalidades na ausculta pulmonar, sons abafados na região ventral, com estertores na região dorsal e sons cardíacos diminuídos ou inaudíveis (SIMÕES & KANAYAMA, 2015). Em cães, a espécie *B. hordeovulneris* foi associada à actinomicose torácica, sendo isolada de casos crônicos de lesões granulomatosas de pneumonia e endocardites que cursaram com a causa de óbito desses animais (PELLE et al., 2000). Apesar de ser uma bactéria comensal da cavidade oral de pequenos animais, esse patógeno pode estar relacionado a lesões graves e crônicas.

### **2.2.3 Diagnóstico clínico e laboratorial**

O diagnóstico da actinomicose pulmonar deve ser baseado no histórico detalhado dos sinais clínicos, em exames clínicos, radiografias torácicas, análises bacteriológicas e histopatológicas do fluido torácico (PELLE et al., 2000). Quando há presença de efusão pleural, nas imagens radiográficas podem ser visualizadas fissuras lineares interlobulares, arredondamento das margens pulmonares, bordas pulmonares afastadas da parede torácica, perda da definição da silhueta cardíaca e alargamento do espaço mediastinal. A ultrassonografia, quando necessária, deve ser realizada após a maior parte do fluido ser drenada, pois ele pode agir como “janela acústica”, dificultando a visualização de estruturas torácicas (CHANDLER et al., 2004). Em casos crônicos de actinomicose podem haver formações de massas fibrosas que são frequentemente confundidas com lesões neoplásicas (SYKES, 2012).

A toracocentese é necessária para coleta e avaliação da efusão pleural. É um procedimento pelo qual se realiza a punção do tórax com o objetivo de drenar o líquido, quando há suspeita de efusão pleural (ROZANSKI, 2016). Na avaliação visual do líquido é possível observar características importantes, como cor, cheiro, turbidez e a presença/ausência de partículas. A análise citológica da efusão pleural permite a identificação do tipo celular presente na amostra, e pode indicar a presença de patógenos bacterianos ou fúngicos (CHANDLER et al., 2004). A avaliação de proteína total, contagem celular e citologia, permitem a classificação do líquido pleural em transudato e exsudato séptico ou asséptico (ALLEMAN, 2003).

Os transudatos são efusões com baixa celularidade, baixa concentração de proteínas (< 2,5 g/dL) e predomínio de células mononucleares. O exsudato é formado em processos inflamatórios, quando há liberação de substâncias ativas que aumentam a permeabilidade vascular e o número de células, podendo estar relacionado a agentes infecciosos (sépticos) ou não (assépticos). Apresentam como característica alta concentração de proteínas (>3,0 g/dL), densidade >1.020 e alta contagem de células (>7000 células/mL), das quais há predomínio de neutrófilos degenerados, macrófagos e células endoteliais reativas (ALLEMAN, 2003).

No exsudato séptico também podem ser observados organismos intracelulares fagocitados ou extracelulares, como bactérias, fungos ou parasitas (ALLEMAN, 2003). O exsudato proveniente de amostras de animais com nocardiose ou actinomicose pulmonar podem conter “grânulos de enxofre” visíveis macroscopicamente, que microscopicamente, é formado por longos filamentos aglomerados com células inflamatórias (RASKIN, 2016). As formas filamentosas e ramificadas, no geral, podem estar presentes em diversos gêneros de fungos e bactérias. Os filamentos fúngicos costumam apresentar >2 µm, enquanto as formas bacterianas dos gêneros *Actinomyces*, *Nocardia*, *Mycobacterium* e *Fusobacterium* normalmente apresentam <1 µm em diâmetro, porém o diagnóstico só pode ser confirmado a partir do isolamento e caracterização laboratorial (MARKEY et al., 2013). Em casos de amostras indicativas dessas infecções bacterianas, é necessário realizar o cultivo para o isolamento e identificação, e o laboratório deve ser alertado sobre a suspeita clínica, devido ao longo tempo de incubação necessário para o isolamento de actinomicetos (RASKIN, 2016; SYKES, 2013).

No diagnóstico laboratorial de actinomicose, o exsudato da lesão deve ser observado quanto à presença de grânulos de “enxofre”, pois esse tipo de formação granular ocorre em algumas amostras originadas de infecções por espécies de *Actinomyces* spp., mas não são considerados exclusivos, pois também ocorrem em casos de infecções por *Nocardia* spp. (KIRPENSTEIJN & FINGLAND, 1992). Os grânulos também devem ser observados sobre microscopia óptica, com adição de KOH 10%, pois no seu interior estarão presentes estruturas filamentosas ramificadas Gram-positivas, filamentos curtos ou formas pleomórficas difteroidais (MARKEY et al., 2013). A coloração de Ziehl-Neelsen também pode ser utilizada para auxiliar na identificação, uma vez que *Actinomyces* spp. são ácido-resistentes (DAVENPORT et al., 1974) e *Nocardia* spp. são parcialmente ácido-resistentes (MARINO & JAGGY, 1993).

A maioria dos casos de piotórax em felinos envolvem infecções polimicrobianas, de bactérias aeróbicas com anaeróbicas facultativas ou obrigatórias, que são comensais da

orofaringe de felinos. A diversidade bacteriana isolada desse tipo de amostra também é similar a encontrada em casos de abscessos subcutâneos causados por mordeduras (LOVE 1979, 1982). As bactérias frequentemente envolvidas no piotorax em felinos incluem *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Actinomyces* spp., *Eubacterium* spp., *Propionibacterium* spp., *Prevotella* spp., *Filifactor villosus*, *Porphyromonas* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus* spp. e microrganismos entéricos (WALKER et al., 2000).

Os casos de piotórax em felinos relacionados a actinomicetos variam de 7% a 15% entre as bactérias isoladas (LOVE et al., 1982; WALKER et al., 2000). Acredita-se que muitos casos da doença sejam subdiagnosticados, pois como as infecções geralmente são associadas e complicadas por outras bactérias, as culturas tendem a apresentar o crescimento de outras bactérias, muitas vezes de crescimento rápido, que podem se sobrepor às colônias de *Actinomyces* spp. (SYKES, 2012). As espécies de *Actinomyces* crescem em ágar acrescido de 5% de sangue ovino, a 37°C, e a maioria das espécies são consideradas anaeróbicas facultativas ou capnofílicas, ou seja, necessitam de dióxido de carbono para seu crescimento máximo (MARKEY, 2012). As colônias apresentam características variadas de acordo com cada espécie. Normalmente, apresentam crescimento após 48 horas de incubação, surgindo no ágar como pequenos pontos brancos que se desenvolvem e amadurecem com o passar dos dias, necessitando de 5 a 7 dias de incubação para completa maturação. Algumas espécies podem apresentar discreta coloração quando incubadas em anaerobiose, e outras podem demorar até 14 dias para as características morfológicas das colônias serem completamente visualizadas. Por isso, é recomendado observar as placas de amostras suspeitas e sem crescimento de colônias durante 2 a 4 semanas até a definição de um laudo negativo.

As colônias de *B. hordeovulneris* crescem em ágar sangue após 72 horas de incubação, com tamanho em média de 2 mm de diâmetro. Elas são brancas, com formato de “dente molar”, semelhante às colônias de *A. israeli*, e aderem firmemente ao ágar. Nos primeiros dias de incubação não são hemolíticas, mas após sete dias uma fraca zona de hemólise pode ser observada. Algumas outras características são mais específicas dessa espécie, como a presença de catalase fracamente positiva e a formação de filamentos em meio fluido BHI acrescido de 10 a 20% de soro fetal bovino (MARKEY, 2012; SCHAAL & YASSIN, 2012).

Alguns testes bioquímicos podem ser utilizados para direcionar a identificação das espécies, porém métodos moleculares são mais confiáveis para a correta determinação (SCHAAL, 2012). A análise da sequência do gene que codifica a subunidade 16S do RNA

ribossômico é a região alvo de preferência para diferenciar os gêneros da família *Actinomycetaceae* de acordo com assinaturas de nucleotídeos (SCHAAL & YASSIN, 2012).

#### **2.2.4 Prognóstico e tratamento**

O prognóstico de animais com actinomicose é, geralmente, favorável quando são tratados em tempo hábil. Entretanto, em casos em que o processo crônico esteja previamente estabelecido, o prognóstico pode ser desfavorável e a doença fatal (WHITNEY & BARRS, 2020). Animais que apresentem apenas efusão pleural possuem prognóstico e tratamento diferente daqueles que apresentam a formação de granulomas, fibrose extensa ou sinais de cronicidade da doença (WALKER, 2000).

O tratamento da actinomicose pulmonar pode ser difícil, ineficaz ou pode haver a recorrência da infecção após curtos períodos de terapia antibiótica. A penicilina é o antibiótico de primeira escolha devido a ampla sensibilidade reportada, porém, outros antimicrobianos, como clindamicina, doxiciclina, cloranfenicol e ceftriaxona podem ser utilizados com alta eficácia, enquanto antimicrobianos como cefalexina, metronidazol e aminoglicosídeos devem ser evitados, pois geralmente os isolados apresentam resistência intrínseca (SYKES, 2013; CHANDLER et al, 2004). O tratamento em casos de piotórax inclui a drenagem cirúrgica e uso de altas doses de antimicrobianos durante longos períodos, que podem variar de semana a meses, porém a baixa capacidade de penetração de alguns fármacos dentro de lesões granulomatosas pode causar consequentemente a falha terapêutica (CHANDLER et al, 2004).

### 3. ARTIGO CIENTÍFICO

*O manuscrito será submetido à revista “Brazilian Journal of Microbiology” no formato de short communication.*

#### **Isolation and characterization of *Buchananella hordeovulneris* from feline pyothorax**

Gisele Vaz Aguirre Samoel<sup>1,2</sup>, Alana Herbichi Pivoto<sup>1,2</sup>, Gabriela Tormes Nunes<sup>1,2</sup>, Carolina Sleutjes Machado<sup>1,3</sup>, Fagner D’ambroso Fernandes<sup>1,3</sup>, Juliana Felipetto Cargnelutti<sup>1\*</sup>,  
Fernanda Silveira Flores Vogel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup>Programa de Residência em Área Profissional da Saúde – Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: jucargnelutti@gmail.com

#### **ABSTRACT**

An 1-year-old female mixed breed cat was admitted to a veterinary hospital in Southern Brazil showing tachypnea, low thoracic amplitude, restrictive pattern of breathing and cyanotic mucous membranes two days after elective castration surgery. Pleural effusion was evidenced by x-ray and about 100–200 ml of fluid was collected by thoracocentesis. The reddish purulent exudate, contained large numbers of yellowish-white granules that showed branched filamentous structures on cytological examination. The fluid was plated in/on? blood agar and incubated in aerobiosis at 37 °C. After third day of incubation, it was observed circular, dry and opaque colonies, measuring <0.5 mm diameter. Its phenotypical and molecular characteristics were compatible with *Buchananella (Actinomyces) hordeovulneris*, that is a pathogenic actinomycetes rarely detected in cats. Our findings indicate that *B. hordeovulneris* need to be included as differential diagnosis of others *Actinomyces* spp. and *Nocardia* spp. causing pyothorax in cats. Taxonomic confirmation of disease-causing microorganisms in animals is important to link the course of infection to the disease epidemiology.

---

**KEYWORDS:** Actinomycosis, thoracic empyema, microbiology, bacteriology

The genus *Actinomyces* harbors capnophilic filamentous bacteria that are commensal organisms in the human and animal mouth, digestive, and genital systems. They commonly depend of the breakdown of mucosal barriers to produce disease, as they are opportunistic pathogens [1, 2].

Actinomycosis is characterized by chronic granulomatous lesions which can be invasive into underlying tissues [3], and are commonly complicated by mixed infections with other bacteria from the oral cavity or intestinal tract. The most common regions affected by *Actinomyces* spp. are cutaneous/subcutaneous tissue, pleural and abdominal cavity, but central nervous system and ocular infections may occur [4].

*Actinomyces* spp. infections in cats and dogs are typically associated to the oropharyngeal area, cervicofacial region, thorax, abdomen and subcutaneous tissue [4]. The bacteria may be introduced via saliva when the animal licks or bites a wound, or they may spread hematogenously from necrotic focus [5]. Routes of thoracic infection include aspiration of oropharyngeal material, involvement of the mediastinum from esophageal perforation and direct extension of abdominal or cervicofacial disease [1]. Inhalation or swallowing of awns of some grasses, particularly from the genus *Hordeum*, are related with pulmonary actinomycosis in dogs from United States [5].

Diagnosis of actinomycosis may be a challenge, and it must be based on detailed anamnesis, physical examination, thoracic x-rays, bacteriological and cytological examination of the thoracic fluid. The clinical signs and lesions caused by *Actinomyces* spp. cannot be differentiated from those caused by others actinomycetes [6]. Treatment can be difficult and refractory, and the disease can recur after short time of antimicrobial therapy [1]. Furthermore, actinomycetes are difficult to isolate from lesions, and microbiological culture frequently gives negative results. Most species are facultative anaerobes, and some grow only on anaerobic culture. They can be misdiagnosed since a long-time of incubation is required (5-7 days), and may be overlooked by others fast-grow bacteria in mixed infections [3].

Differentiation between the most *Actinomyces* spp. can be made based on cultural and biochemical characteristics [7]. However, *Actinomyces* spp. are heterogeneous, and species identification using biochemical tests is uncertain. Thus, it is required molecular tools to precise identification. Due to diagnosis complexity, clinical samples are rarely identified till the specie level [1].

The most frequently actinomycetes isolated from cats include *Actinomyces viscosus*, *A. meyeri* and *A. bowdenii* [4]. Others commensal species, as *A. denticolens* and *Buchananella hordeovulneris*, have been cultured from normal feline gingiva [8], and occasionally are involved in severe disease of dogs [6]. Then, we aimed to report the clinical, microbiological and molecular findings of a cat presenting pleuropneumonia associated to *B. hordeovulneris*, formerly named *Actinomyces hordeovulneris*.

An 1-year-old female mixed breed cat was admitted to a veterinary hospital in Southern Brazil showing progressive respiratory symptoms, two days after elective castration surgery. Tachypnea, low thoracic amplitude, restrictive pattern of breathing and cyanotic mucous membranes were observed on physical examination. Its owner reported the animal had only sporadic coughing episodes during a month ago, but kept its normal activity and appetite. Immunochromatographic test for feline immunodeficiency virus (FIV) and feline leukemia virus (FeLV) resulted negative (FIV Ac/FeLV Ag, Alere™, Brazil).

Hematologic findings showed thrombocytopenia (182.000 cells/ $\mu$ L), polychromasia, platelet aggregates, neutrophilic leukocytosis with left shift (15.600 total leukocyte/ $\mu$ L and 2.028 segmented neutrophils/ $\mu$ L) and toxic neutrophils. Radiographic findings included bilateral retraction of pulmonary lobar borders from the thoracic wall, accentuation of the lobar edges, interlobar fissures and interstitial to alveolar pulmonary densities with pleural effusion. It was medically managed with the placement of bilateral thoracotomy tubes and successive lavage with 10 mL/kg of sterile saline warmed to 38°C for 7 days. Antimicrobial treatment with erythromycin (10 mg/kg, PO, TID) was established for 10 days. Serial radiographic examinations were performed before and after antibacterial discontinuation to monitor for subclinical recurrence of disease.

At the installation of thoracotomy tubes, about 100–200 mL of exudate was aspirated by from the pleural cavity. The fluid was reddish and purulent, contained large numbers of yellowish-white granules, putrid odor, high protein content (4.8 g/dL) and specific gravity of 1,034, which indicated pleural infection. Cytological examination was performed using Romanowsky method (Panótico Rápido, Laborclin®) showing high cellularity composed by 94% neutrophils, mostly degenerate, 6% mononuclear cells, cocci bacteria and branched filamentous structures (Fig. 1a).

Fluid originally drained from the pleural cavity was inoculated directly into 5% sheep blood agar by aerobic and microaerobic atmosphere, and incubated for 7 days at 37°C. After 24 h of incubation, *Pasteurella* sp. colonies were observed and identified. After 48 h, it was



observed >0.5 mm pinpoint colonies on both agars (aero and microaerophilia), similar to members of *Actinomyces* genera. Gram and modified Ziehl-Neelsen (ZN) staining were performed, followed by biochemical testes (table 1).

Antimicrobial susceptibility was determined by the Kirby-Bauer disk diffusion method [10], using inoculated MHS plates and incubated 48 hours under anaerobic conditions. The isolate was susceptible to amoxicillin and clavulanic acid (30 µg), ampicillin (10 µg), azithromycin (15 µg), ciprofloxacin (5 µg), enrofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), florfenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), penicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), moderately susceptible to sulfamethoxazole + trimethoprim (25 µg), tobramycin (10 µg), streptomycin (10 µg) and resistant to amikacin (30 µg), metronidazole (50 µg) and neomycin (30 µg).

DNA from colonies was extracted using DNAzol® reagent (Invitrogen, Life Technologies, Brazil) according to manufacture instructions. A fragment of the 16S ribosomal RNA (rRNA) region were amplified by PCR using the universal primers 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492R (5' CGGYTACCTTGTTACGACTT-3') and cycling conditions as described by Lane [11]. PCR product was sequenced by Sanger method, using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems). The consensus sequence was obtained in the Staden package [12] and compared with sequences deposited in GenBank using the Basic Local Alignment Search Tool. The sequence was then deposited in GenBank (SB 92/21 accession n°. OM281739). A phylogenetic tree based on the 16S rRNA sequences was constructed using the Neighbor-Joining method with 1,000 bootstrap replicates implemented by MEGA X [13].

The bacterial isolate was identified on the basis of colony morphology, Gram and Ziehl-Neelsen (ZN) staining characteristics, microscopic morphology, biochemical profile and molecular analysis.

The colonies of isolate SB92/21 appear as circular, dry and opaque with a translucent grayish, entire measuring in diameter 0.5–1.0 mm after 72 h at 37°C. After 14 days, mature colonies appear low convex to umbonate colonies with spiral edges and granular internal surface structure, entire measuring in diameter and 2.0–4.0 mm (Fig. 1b and 1c). These characteristics are similar to colonies of member from *Actinomyces* genus, although are not identical to any specie [14] (Table 1).

At optical microscopy (1000x), the isolate was Gram-positive pleomorphic rod (Fig. 1d), and at modified Ziehl–Neelsen it was not acid-fast. A simple differentiation can be made upon ZN examination, since *Actinomyces* spp. are not acid-fast [16] and *Nocardia* spp. may be

partially acid fast [17]. The phenotypic tests identified a non-spore-forming, non-motile, glucose slow fermenter, catalase producer and cytochrome oxidase negative, similar to *Actinomycetaceae* members [9]. The isolate was unable to convert tryptophan into indole and to hydrolyze esculin. It was negative in nitrate reduction test and did not produced urease. Glucose, lactose, mannitol, raffinose, sorbitol, sucrose and trehalose were attacked, but not arabinose, ribose or xylose. Its biochemical profile was not identical, but similar to presented by *B. hordeovulneris* previously reported in literature (Table 1).

In order to confirm the isolate genus and specie, it was performed PCR and nucleotide sequence of 16S rRNA. A comparison of the consensus sequence (1358bp) with other sequences available on GenBank database (BLASTN tool) showed that the isolate SB 92/21 had the greatest nucleotide identity with a sequence of feline oral *Actinomyces* sp. (98.97%; KM461981.1), and with *B. hordeovulneris* (96.81%; KF030211.1), formerly named *Actinomyces hordeovulneris*. Among *B. hordeovulneris* sequences, the nucleotide identity ranged from 96.8% (NR\_026225.1) to 99.32% (MT510384.1), accepting 85 to 100% of query cover. At phylogenetic tree, SB92/21 clustered with *B. hordeovulneris* sequences and apart of other *Actinomyces* spp. available in GenBank database (Fig. 2).

According to Schaal et al. [7], *Actinomyces* spp. can be subdivided into two major (core cluster 1 and 2) and at least four minor clusters. The first core cluster is formed by high statistical significance (100% bootstrap value), containing 15 or 17 species. This cluster is formed by species who share 94-99% sequence similarity, some species strains exhibit >98.5% similarity cannot be reliably identified by 16S rRNA gene sequence comparison [14]. The second major cluster (core cluster 2) contains 11 species, with a minor statistical significance (86% bootstrap value). *B. hordeovulneris* and *Bowdeniella nasicola* form an additional pair of outgroups loosely affiliated with this core cluster. An isolated phylogenetic cluster of *B. hordeovulneris* position is consequence of several deviations in the set of 16S rRNA gene sequence signatures. Nucleotides positions 154:167 (G–U), 839:847 (A–U), and 1308:1329 (U–A) consists the pattern of 16S rRNA signatures of this outgroup species [14]. SB 92/21 isolated presented the majority of these nucleotide markers, differing only in 839:847 position (A–U vs. U–U), however, another *B. hordeovulneris* (NR026225) sequence also showed this characteristic.

*B. hordeovulneris* and *Bowdeniella nasicola* are closely related species sharing a similarity value of 93.8 %. There are no group-specific signature nucleotides that would support

the associations of members of this lineage. Therefore, new sequences of new taxa help to clarify the taxonomic placement and phylogenetic relationship between this species [15].

The assessment of phenotypical and biochemical findings indicated that the feline pyothorax was caused by a member of *Actinomyces* spp., molecularly compatible with *B. hordeovulneris*, which was first reported by Buchanan et al. [5] in dogs with thoracic and abdominal infections. In dogs, infection is commonly associated with the migration of a plant foreign body into the thoracic or abdominal cavity [6]. Furthermore, this specie is habitant from oral cavity, and can be isolated from canine dental plaque [18]. In cats, this specie was reported in the oral microflora of healthy animals [8], and in a gastric inflammatory lesion (pseudotumour) [19]. In the current report, a foreign body was not identified and the source of infection could not be determined, as well as the time of infection. We supposed that the stress caused by anesthesia and intubation may facilitate the pulmonary infection and bacteria colonization after the surgical procedure.

Pyothorax treatment requires prompt administration of appropriate antimicrobial agents which should be selected on the basis of identity of the causative organisms and their susceptibility profiles [20]. The exact identification of causative agent is important for correct choice of antimicrobial therapy. The successful treatment of actinomycosis depends not only on the type of clinical manifestation and its localization, but also on the composition of the concomitant microbial infection [15]. *Actinomyces* spp. are susceptible to a wide range of beta-lactam antibiotic and can be resistant to ciprofloxacin, ofloxacin and metronidazole [15]. The drug of choice for most clinical forms of actinomycosis is penicillin G, and high dose therapy for weeks to months is generally required for animals with chronic infections [20]. The relationship between species of *Actinomyces* spp. and their antibiotic susceptibility is not well-established due to difficult to compare published results of not standards antibiotic susceptibility tests [15].

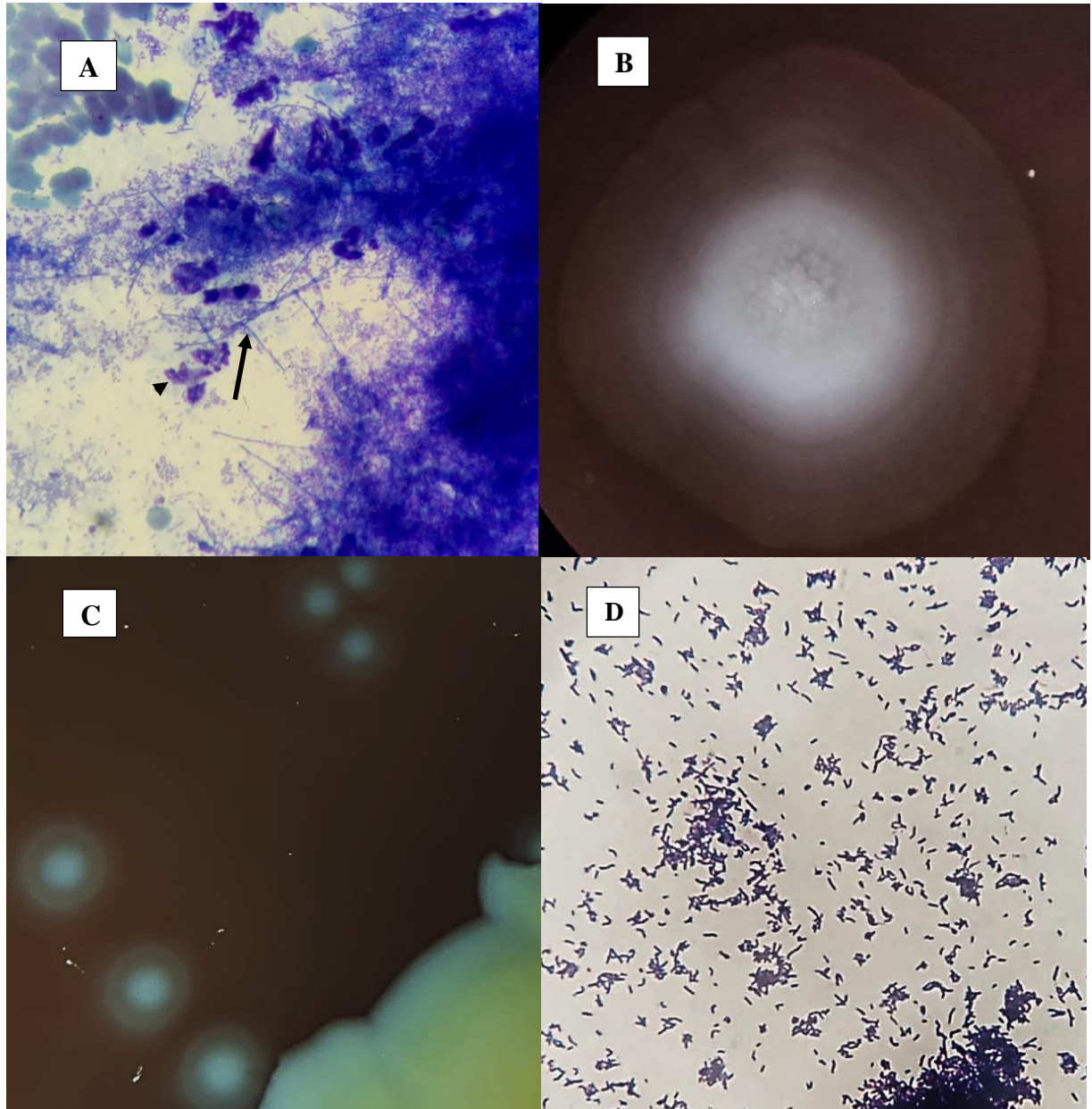
In summary, this work reports the isolation, microbiological and molecular characterization of *B. hordeovulneris* isolated from pleural fluid of a cat with pleuropneumonia. Our results showed minor differences/variations on colonies characteristics and biochemical tests compared with *B. hordeovulneris* isolates/strains that could difficult the specie identification. Molecular identification and characterization may to facilitate and increment the definitive diagnosis. These findings show that *B. hordeovulneris* can be a pathogenic actinomycetes in cats, and the need to include this microorganism as differential diagnosis of

diseases caused by others branching bacteria. Furthermore, recognition of species of the microorganism is important to link the course of infection to the disease epidemiology.

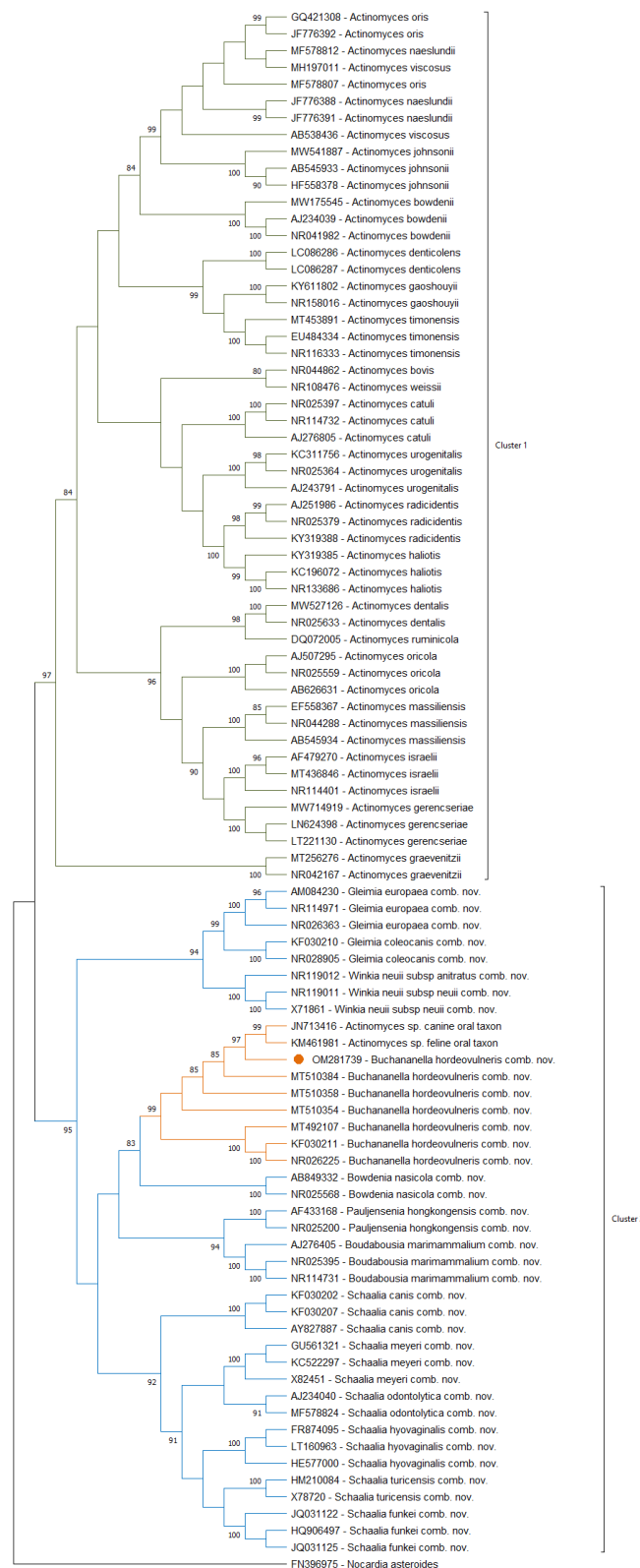
## REFERENCES

1. Sykes JE (2012) Actinomycosis and nocardiosis. In: Greene CE (ed) Infectious diseases of dog and cats, 4th edn. Elsevier, Saint Louis.
2. Trabulsi LR, Alterthum F (2015) Bactérias patogênicas: *Nocardia*, *Actinomadura* e outros *Actinomycetos* de Importância Médica. In: Microbiologia, 6th edn. Atheneu, São Paulo.
3. Chandler EA, Gaskell CJ, Gaskell RM (2004) Feline medicine and therapeutics, 3rd edn. Blackwell, London.
4. Sykes JE (2013) Actinomycosis. In: Canine and Feline Infectious diseases. Elsevier, Saint Louis.
5. Buchanan AM, Scott JL, Gerencser MA, Beaman BL, Jang S, Biberstein EL (1984) *Actinomyces hordeovulneris* sp. nov. an agent of canine actinomycosis. Int J Syst Evol Microbiol 34:439-443. <https://doi.org/10.1099/00207713-34-4-439>
6. Pelle G, Makrai L, Fodor L, Dobos-Kovács, M (2000) Actinomycosis of dogs caused by *Actinomyces hordeovulneris*. J Comp Path 123:72-76. <https://doi:10.1053/jcpa.2000.0388>
7. Schaal KP, Yassin AF, Stackebrandt E (2006) The family *Actinomycetaceae*: the genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. In The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria, 3rd edn. Springer, New York, pp. 850-905.
8. Love DN, Roman V, Collings S (1990) The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal gingival margin. Vet Microbiol 22:267-275. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(90\)90114-B](https://doi.org/10.1016/0378-1135(90)90114-B)
9. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, Maguire, D (2013) Clinical Veterinary Microbiology, 2nd edn. Elsevier, Amsterdam.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2007) Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m11>. Accessed in 20 January 2022.
11. Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (ed) Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic. Wiley, New York, pp 115-175.
12. Staden R (1996) The Staden sequence analysis package. Mol Biotechnol 5:233-241. <https://doi.org/10.1007/BF02900361>

13. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis. *Mol Biol Evol* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
14. Schaal KP, Yassin AF (2012) Genus I *Actinomyces*. In: Goodfellow M, Kampfer P, Busse HJ (ed) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn. Springer, EUA.
15. Yassin AF (2014) The Family *Actinomycetaceae*. In: Rosenberg E et al (eds) *The Prokaryotes – Actinobacteria*. Springer, Berlin, pp 22-103.
16. Davenport AA, Carter GR, Schirmer RG (1974) Canine actinomycosis due to *Actinomyces viscosus*: report of six cases. *Vet Med* 69:1444-1447.
17. Marino DJ, Jaggy A (1993) Nocardiosis: a literature review with selected case reports in two dogs. *J Vet Intern Med* 7:4-11. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.1993.tb03161.x>
18. Maďar M, Kačírová J, Maďari A, Mucha R, Styková E, Nemcová R (2021) Cultivable bacterial diversity of the canine dental plaque as a potential source of bacterial infections. *Acta Vet Brno* 90:171-178. <https://doi.org/10.2754/avb202190020171>
19. Pietra M, Zanoni RG, Peli A, Brunetti B, Linta N, Capitani O, Spinella G (2016) Gastric inflammatory pseudotumour secondary to *Actinomyces hordeovulneris* infection in a cat. *Ir Vet J* <https://doi.org/10.1186/s13620-016-0071-8>
20. Walker AL, Jang SS, Hirsh DC (2000) Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989-1998) *J Am Vet Med Assoc* 216: 359-369. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.216.359>



**Fig. 1** Morphological characteristic of *Buchananella hordeovulneris* isolate SB92/21. **A)** Microscopy of pleural fluid smear stained with Romanowsky method, showing branched filamentous structures (arrow) and leucocytes (arrow head). **B)** Mature colonies of *Buchananella hordeovulneris* on blood agar after 14 days of aerobic incubation at 37°C (20x). Granular internal structure can be observed in the colony center. **C)** Colonies of *Buchananella hordeovulneris* presenting dry and opaque colonies with circular format and spiral edges (10x). **D)** Bacteria morphology presenting pleomorphic and irregular rods stained by Gram (1000x).



**Fig. 2** Phylogenetic tree based on partial sequence of 16S rRNA region. The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replicates. The evolutionary distances were computed using the Kimura-2-parameter method and implemented by MEGA X. Values > 80% are shown. SB92/21 (identified with an orange circle) sequence clustered with *B. hordeovulneris* and apart of *Actinomyces* spp. sequences available in Genbank database.

**Table 1** Morphological and phenotypical characteristics of *Actinomicetes* recovered from feline infections.<sup>a</sup>

	<i>A. bowdenii</i>	<i>A. denticolens</i>	<i>S. meyeri</i>	<i>S. odontolytica</i>	<i>A. viscosus</i>	<i>B. hordeovulneris</i>	SB 92/21 -	<i>B. hordeovulneris</i>
Cells coccoid or coccobacillary	-	-	d	(d)	-	-	-	-
Cellular morphology (irregular rods)	-	(+)	d	+	+	+	+	+
Macrocolony size								
≤ 2mm	d	+	+	+	d	d	t <sup>1</sup>	
> 2mm	d	-	-	-	d	d	t <sup>2</sup>	
Acid production from:								
L-Arabinose	-	-	nr	nr	-	-	-	-
Cellobiose	nr	-/ (+)	-	-	-	+	nr	
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	d	d	+/ (+)	+	+	+
D-Mannitol	-	d	-	-	-	-	+	+
D-Raffinose	+	+	-	-	+/-	(+)	+	+
D-Ribose	+	+/-	+	d	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	nr	+	+
Maltose	+	+	d	d	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	d	+	nr	+	+
Trehalose	+	-	-	d	d	+	+	+
D-Xylose	-	-	+	d	-	+	-	-
Hydrolysis of esculin	+	+	-/ +	d	+	+	-	-
Urease	-	nr	d	-	nr	-	-	-
Catalase production	+	-	-	-	+	(+)	(+)	(+)
Nitrate reduction	+	+	-	+	d	-	-	-
B-Hemolysis	-	-	nr	nr	-	-	(+)	(+)

<sup>a</sup> Symbols: +, positive/ present; -, negative/ absent; (+), weakly positive; +/-, predominantly positive/ present; -/+, predominantly negative/ absent; d, strain differences; t<sup>1</sup>, colonies after 7 days; t<sup>2</sup>, colonies after 14 days; nr, not reported.

<sup>b</sup> Data based from Schaal & Yassin [14].



#### 4 CONCLUSÃO

Os actinomicetos são bactérias de difícil isolamento, com isso, a colaboração do histórico e suspeita são fundamentais para o sucesso do cultivo laboratorial. *Buchananella hordeovulneris* pode ser capaz de causar efusão pleural com características típicas de infecção por *Actinomyces* spp. e *Nocardia* spp., assim como desencadear sinais clínicos respiratórios em gatos semelhantes aos causados por essas bactérias, por isso *B. hordeovulneris* deve ser considerada no diagnóstico diferencial.

Este trabalho demonstra a importância da caracterização fenotípica, morfológica e molecular para o estudo de espécies reclassificadas recentemente, tendo em vista que podem ocorrer variações entre isolados de *B. hordeovulneris* de felinos e caninos, fornecendo assim informações que contribuem para a caracterização dessa espécie. Com isso, este trabalho contribui também para compreender a importância epidemiológica na medicina veterinária de espécies que não são frequentemente descritas e que podem estar sendo subdiagnosticadas.

## 5 REFERÊNCIAS

- ALLEMAN, A. R. Abdominal, thoracic, and pericardial effusions. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.33, p. 89-118, 2003.
- BARRS, V. R.; ALLAN, G.S.; BEATTY, J. A. et al. Feline pyothorax: a retrospective study of 27 cases in Australia. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, p. 211-222, 2005.
- BUCHANAN, A. M.; SCOTT, J. L. *Actinomyces hordeovulneris*, a canine pathogen that produces L-phase variants spontaneously with coincident calcium deposition. **American Journal of Veterinary Research**. v. 45, p. 2552-2560, 1984.
- CHANDLER, E. A.; GASKELL, C. J.; GASKELL, R. M.; **Feline medicine and therapeutics**. 3. ed. Reino Unido: Blackwell Publishing, 2004. 724 p.
- DAVENPORT, A. A.; CARTER, G. R.; SCHIRMER, R. G. Canine actinomycosis due to *Actinomyces viscosus*: report of six cases. **Veterinary Medicine: Small Animal Clinician**. v.69, p. 1444-1447, 1974.
- KIRPENSTEIJN, J.; FINGLAND, R. B. Cutaneous actinomycosis and nocardiosis in dogs: 48 cases (1980– bacteriological and histopathological examination of 1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201. p. 917–920, 1992.
- LOVE, D. N.; JONES, R. F.; BAILEY, M.; JOHNSON, R. S. Isolation and characterization of bacteria from abscesses in the subcutis of cats. **Journal of Medical Microbiology**, v. 12. p. 207-212, 1979.
- LOVE, D. N.; JONES, R. F.; BAILEY, M.; JOHNSON, R. S.; GAMBLE, N. Isolation and characterisation of bacteria from pyothorax (empyema) in cats. **Veterinary Microbiology**, v. 7, p. 455-461, 1982.
- LOVE, D. N.; ROMAN, V; COLLINGS, S. The obligate and facultatively anaerobic bacterial flora of the normal gingival margin. **Veterinary Microbiology**, v. 22, p. 267-275, 1990.
- MAD'AR, M.; KAČÍROVÁ, J.; MAĎARI, A. et al. Cultivable bacterial diversity of the canine dental plaque as a potential source of bacterial infections. **Acta Veterinaria Brno**, v. 90, p. 171-178, 2021.

MARINO, D. J.; JAGGY, A. Nocardiosis: a literature review with selected case reports in two dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 7, p. 4-11, 1993.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Amsterdam: Elsevier. 2013. 920 p.

MCVEY, D. S.; KENNEDY, M.; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

NOUIOUI, I.; LORENA C.; MARINA G. L., et al. Genome-based taxonomic classification of the phylum *Actinobacteria*. **Frontiers in microbiology**. v. 9, 2018.

PELLE, G.; MAKRAI, L.; FODOR, L. et al. Actinomycosis of dogs caused by *Actinomyces hordeovulneris*. **Journal of Comparative Pathology and Therapeutics**. v. 123, p. 72-76, 2000.

PIETRA, M.; ZANONI, R. G., PELI, A. et al. Gastric inflammatory pseudotumour secondary to *Actinomyces hordeovulneris* infection in a cat. **Irish Veterinary Journal**. v. 69, n.12, 2015.

RASKIN R. E.; MEYER D. J. **Canine and feline cytology: a color atlas and interpretation guide**. 3. ed. Canadá: Elsevier, 2016. 543 p.

ROZANSKI, E. Diseases of pleural space. In:\_\_\_\_\_ ETTINGER S.J.; FELDMAN E. C.; COTE, E. - **Textbook of Veterinary Internal Medicine** -. 8 ed. Elsevier. P. 2819-2851, 2016.

SCHAAL, K. P. Genus *Actinomyces*. In: \_\_\_\_\_. SNEATH, P. H. A.; MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. ; HOLT, J. G. (Eds.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Williams & Wilkins. Baltimore. v. 2. p. 1383-1418, 1986.

SCHAAL, K. P.; YASSIN, A. F.; STACKEBRANDT, E. The Family *Actinomycetaceae*: The Genera *Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*, *Varibaculum*, and *Mobiluncus*. **Prokaryotes**. v. 3. p. 430-537, 2006.

SCHAAL, K. P.; YASSIN, A. F. Genus I *Actinomyces*. In: \_\_\_\_\_. GOODFELLOW, M.; KAMPFER, P.; BUSSE, H. J. (ed) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed., EUA: Springer, 2012. 2105 p.

SHARMAN, M. J.; GOH, C. S., LANDE R. G. K. V. et al. Intra-abdominal actinomycetoma in a cat. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v. 11, p. 701-705, 2009.

SIMÕES, D. M.; KANAYAMA, K. K. Cavidade Pleural: manifestações clínicas e classificação dos líquidos pleurais. In: \_\_\_\_\_. JERICO, M. M.; NETO, J. P. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de Medicina Interna de Cães e Gatos**. v. 2. 1. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2015. p. 1320-1324.

SYKES, J. E. Actinomycosis and nocardiosis. In: \_\_\_\_\_. GREENE, C. E. **Infectious diseases of dog and cats**. Elsevier. 4 ed. Missouri: Elsevier, 2012. p. 484-495.

SYKES, J. E. **Canine and Feline Infectious diseases**. Missouri: Elsevier. 2013. 928 p.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM F. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015. 920 p.

WALKER, A. L; SPENCER, J. S.; HIRSCH, D. C. Bacteria associated with pyothorax of dogs and cats: 98 cases (1989-1998). **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 216. p. 359-363, 2000.

WHITNEY, J.; BARRS, V. R. Actinomycosis, Nocardiosis, and Mycobacterial Infections. In: \_\_\_\_\_. BRUYETTE, D. S. **Clinical Small Animal Internal Medicine**. v. 2. ed. 1. Nova Jersey: John Wiley & Sons. p. 977 – 984. 2020.

WONG, V. K.; TURMEZEI, T. D.; WESTON, V. C. Actinomycosis. **The British Medical Journal**, v. 343. 2011.

YASSIN, A. F. The family Actinomycetaceae In: \_\_\_\_\_. ROSENBERG E. et al. (eds.) **The Procaryotes: Actinobacteria**. p. 23-103, 2014.