

# DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES CONCOMITANTES POR *Neospora caninum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia* spp. EM CANINO ADULTO DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER - RELATO DE CASO\*

Paulo Daniel Sant'Anna Leal<sup>1+</sup>, Walter Flausino<sup>2</sup> & Carlos Wilson Gomes Lopes<sup>3</sup>

**ABSTRACT.** Leal P.D.S, Flausino W. & Lopes C.W.G. [Diagnosis of concomitant infections due to *Neospora caninum*, *Babesia canis* and *Ehrlichia* spp. in adult canine Golden Retriever breed - Case report]. Diagnóstico de infecções concomitantes por *Neospora caninum*, *Babesia canis* e *Ehrlichia* spp. em canino adulto da raça Golden Retriever - Relato de caso. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 34(1):47-51, 2012. Curso de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. E-mail: pauloleal@ctiveterinario.com.br

Clinically the dogs, to make an effective treatment for morbid condition diagnosis is crucial and this goal is achieved with the observation of the evolution and laboratory findings which intercurrent infections have been observed frequently. We report a case of clinical laboratory diagnosis in *Babesia canis* infection, *Ehrlichia* spp. associated with serological response to *Neospora caninum* in dogs. Thus proving the value of clinical examination, visualization of parasitic inclusions in leukocytes and erythrocytes in the serological diagnosis, thus demonstrating the need for greater attention to the diagnosis of multiple infections by different parasites.

**KEY-WORDS.** Haemoparasitosis, anemia, Coccidia, concomitant infections.

**RESUMO.** Na rotina clínica de cães, para se efetuar um tratamento eficaz da condição mórbida o diagnóstico é fundamental e este objetivo é alcançado com a observação da evolução e em achados laboratoriais onde as infecções intercorrentes têm sido observadas com frequência. Relata-se um caso de diagnóstico clínico laboratorial na infecção por *Babesia canis*, *Ehrlichia* spp. associado a resposta sorológica para *Neospora caninum* em cães. Comprovando assim, o valor do exame clínico, da visualização de inclusões parasitárias em leucócitos e hemácias, no diagnóstico sorológico, demonstrando desta maneira, a necessidade de maior atenção para o diagnóstico de múltiplas infecções por agentes parasitários distintos.

**PALAVRAS-CHAVE.** Hemoparasitoses, anemia, coccídios, infecções concomitantes.

## INTRODUÇÃO

A Erlichiose canina tem como agente etiológico uma bactéria do gênero *Ehrlichia*, que parasita leucócitos e plaquetas, enquanto a Babesiose, tem como agentes etiológicos protozoários intracelulares do gênero *Babesia* (Almosny & Massard 2002). Ambas as doenças são transmitidas de cão a cão pela picada do carrapato marrom do cão, *Rhipicephalus sanguineus* (Ettinger & Feldman 1997, Birchard 2003), o qual pode transmitir esses organismos por mais de cinco meses após o ingurgitamento com sangue infectado (Ettinger & Feldman

\*Recebido em 11 de março de 2011.

Aceito para publicação em 21 de dezembro de 2011.

<sup>1</sup> Médico-veterinário, *M.Med.Vet.* Curso de Pós-Graduação de Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000, Brasil. \*Autor para correspondência: E-mail: pauloleal@ctiveterinario.com.br

<sup>2</sup> Biólogo, *PhD.* Departamento em Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, RJ 23890-000. E-mail: flausino@ufrj.br - bolsista CNPq.

<sup>3</sup> Médico-veterinário, *PhD, LD.* DPA, IV, UFRRJ, BR 465 km 7, Seropédica, 23890-000, RJ. E-mail: lopescwg@ufrj.br - bolsista CNPq.

1997). Possuem características clínicas variáveis e inespecíficas, podendo o hospedeiro apresentar infecções de leves à severas e vir a óbito (Miranda et al. 2011) que, geralmente se caracteriza por redução dos elementos figurados do sangue (Birchard 2003, Moraes et al. 2004, Oriá et al. 2004, Miranda et al. 2011). Achados de mórulas em leucócitos confirmam o diagnóstico de Erlichiose canina através da visualização destas estruturas citoplasmáticas, sendo uma técnica importante de diagnóstico, assim como a visualização de *B. canis* em hemácias (Harikrishnan et al. 2005, Miranda et al. 2011), porém nas infecções crônicas ou de baixa parasitemia o diagnóstico citológico de sangue periférico não é em todo confiável (Moreira et al. 2005), sendo indicado para esses casos aspirados de medula óssea (Moreira et al. 2005), em ocorrências da não visualização dos parasitos em estiraços de sangue, o diagnóstico sorológico não deve ser descartado (Tenório et al. 2007, Nakaghi et al. 2008, Miranda et al. 2011), assim como nas fases, subclínica e crônica da doença, utilizando-se como apoio o nPCR para o diagnóstico na fase aguda e, especialmente, para a identificação da espécie envolvida (Nakaghi et al. 2008).

*Neospora caninum*, tem como hospedeiro definitivo canídeos (McAllister et al. 1998, Dubey 2003), porém a doença causada por este agente etiológico é assinalada como de importância econômica, com distribuição cosmopolita (Dubey et al 2007). Observa-se principalmente em cães e bovinos, ocasionalmente pode ser encontrados em coiotes, ovinos, caprinos, equinos, gatos, cervídeos e bubalinos, onde o aborto e a encefalomielite, são mais frequentes, porém, pode ser encontrado em vários órgãos (Dubey & Lindsay 1996, Dubey 2003, Furuta 2008). Anticorpos contra *Neospora* têm sido descritos em raposas, camelos e felinos. Nos cães ocorrem transtornos neuromusculares como encefalomielite e miosite, assim como hepatopatias (Dubey & Lindsay 1996), ou não apresentar manifestações clínicas, porém com lesões significativas em vários órgãos (Furuta 2008), e se infectam pela ingestão de cistos nos alimentos cárneos ou pela ingestão de oocistos esporulados (McAllister et al. 1998, Buxton et al. 2002). O cão representa a única fonte significativa de infecção no processo de disseminação da forma sexuada de *N. caninum*, assumindo um importante papel na cadeia natural do agente (McAllister et al. 1998). O diagnóstico desta parasitose se faz com base no histórico, sinais clínicos e encontro de oocistos nas fe-

zes dos cães (McAllister et al. 1998), pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), ensaio imunoenzimática (ELISA), teste de aglutinação direta, detecção de DNA de *N. caninum* pelo *Real-time PCR* e imunohistoquímica contribuem para o diagnóstico (Furuta 2008). Apesar de animais soropositivos não desenvolverem manifestação clínica, estes podem ter lesões nos pulmões, baço, fígado e linfonodos (Furuta 2008), além disso, as doenças que produzem imunossupressão podem permitir a manifestação do parasito (Greca et al. 2010).

Na rotina clínica o diagnóstico é fundamentado, com atenção para a evolução e em achados laboratoriais, onde as infecções intercorrentes têm sido observadas com frequência. O presente trabalho assinala a importância do diagnóstico clínico e laboratorial nas infecções por espécies do gênero *Erhlichia* associado a infecção por *B. canis* e *N. caninum*, comprovando assim, o valor da visualização destes agentes etiológicos em hemácias e leucócitos (Miranda et al. 2011) e a sorologia no diagnóstico de *N. caninum* (Furuta 2008, Moraes et al. 2008, Greca et al. 2010).

## HISTÓRICO

Um cão, da raça Golden Retriever, não castrado, com sete anos de idade, com atendimento médico veterinário de rotina, utilizando profilaxia de ectoparasitas<sup>a</sup> a cada 15 dias e coleira<sup>b</sup> própria para a repelência do vetor da Leishmaniose, foi atendido no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária, com histórico de apatia e anorexia, sem desidratação, palpação abdominal acusando dor moderada e sugerindo aumento esplênico e hepático, temperatura retal de 40,2°C, mucosas levemente hipocoradas. A suspeita clínica, apesar dos bons tratamentos e a utilização de ectoparasiticidas, foi de hematozoários e neosporose, visto que havia histórico de cão do mesmo habitat com histórico da doença.

Foi coletada amostra de sangue da veia jugular direita, com uma seringa de 10 mL, com agulha 25 x 7 mm, onde 3 mL foram acondicionados em tubo de ensaio pediátrico com anticoagulante (EDTA), e 7 mL em tubo de ensaio pediátrico sem anticoagulante. Com o material da própria seringa foram realizados dois estiraços sanguíneos em lâminas de vidro. As amostras foram processadas no próprio local, com a utilização de aparelho automático (Ms4-

<sup>a</sup>Frontline Plus® Merial Saúde Animal.

<sup>b</sup>Coleira Scalibor® Intervet/Schering-Plough Animal Health.

-Vet-Melet Schloesing Laboratoires coulter), Refratômetro Portátil e Microcentrifuga (E3500108 MICROSPIN CDR), para hemograma completo (leucograma, eritrograma, plaquetometria, proteína total) e concentrado de leucócitos e plaquetas (capa leucocitária) em dois estiraços em lâminas de vidro. As amostras sem anticoagulante foram centrifugadas em centrífuga (Mod. 208N, Excelsa Baby, marca Fanem Ltda.) a 350 G por 10 minutos, para separação do soro, e utilizando pipeta automática de 32µl, para alaninaminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), bilirrubina total (BT), fosfatase alcalina (FAL), uréia (UR), creatinina (CR) e Gamaglutamil transferase (GGT) em aparelho de fotometria de reflectância in vitro Reflotron® Plus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Baden-Württemberg)

Os resultados encontrados nos exames hematológicos foram: anemia (VG=31%) normocítica normocrômica arregenerativa, leucocitose com monocitose e neutrofilia, desvio nuclear de neutrófilos a esquerda discreto regenerativo, eosinopenia e trombocitopenia, proteína plasmática próximo ao limite máximo (7,42g/dL), com albumina 2.8 g/dL e globulinas 4.62 g/dL e parâmetros bioquímicos. Posteriormente após sete dias, em nova avaliação, notaram-se decréscimos desses valores (4,7g/dL), com albumina 2,90 g/dL e globulinas 1,80 g/dL e também dos parâmetros bioquímicos (Tabela 1).

A contagem específica dos leucócitos e observações pertinentes foi após coloração do estiraço sanguíneo utilizando coloração hematológica estabelecida por Romanowsky (Panótico Rápido LB). Na citoscopia do estiraço de concentrado de leucócitos e plaquetas, foi visualizada a presença de mórulas de *Ehrlichia* spp. em monócitos (Figura 1a); em quanto no estiraço sanguíneo, foi visualizado merozoítos de *B. canis* parasitando hemácias com coloração idêntica ao do estiraço sanguíneo (Figuras 1b,c).

Tabela 1. Resultados laboratoriais de um cão adulto da raça Golden Retriever com infecção simultânea.

Parâmetros	Valores em mg/dL			Referência <sup>a</sup>
	Avaliações		Referência <sup>a</sup>	
	Antes do tratamento	Após tratamento		
ALT (TGP)	956	606	C <89	
AST (TGO)	380	54,1	C <43	
Bilirrubina Total	1,9	0,67	C <0,5	
Fosfatase Alcalina	2290	286	C <164	
Uréia	26,6	24,7	C <54	
Creatinina	0,74	0,58	C <1,8	
Gama GT	195	153	C <20	

<sup>a</sup> Roche Diagnostics GmbH, Mannheim-Baden-Württemberg, RFA.

Teste sorológico imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos para *N. caninum* (Enzyme Linked Immunosorbent Assay/ELISA) foi utilizado, com o resultado positivo (1/100).

O tratamento específico para os parasitos foi com base na utilização de antibiótico de ação intracelular, doxiciclina na dose de 5mg/kg a cada 12 horas, administração oral, durante 21 dias, associado ao imidocarb na dose de 5mg/kg em aplicação subcutânea, com repetição da dose após 15 dias (Neer

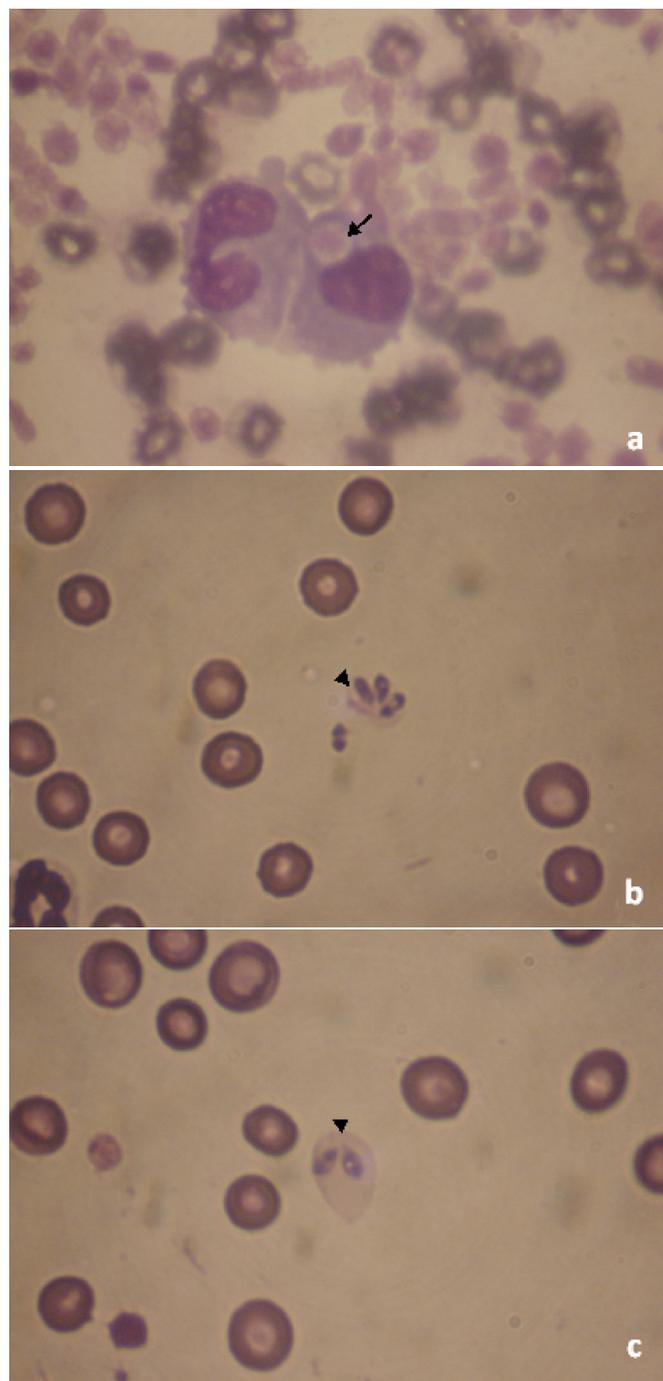


Figura 1. Mórula de *Ehrlichia* spp. em leucocito (→) (a), merozoítos de *Babesia canis* (▶) em hemácia, dois pares (b) e um par (c). Panótico, obj. 100X.

et al. 2002, Moraes et al. 2004, Sousa et al. 2004), após conclusão do tratamento dos hemoparasitos, se utilizou a associação de Sulfametoxazol 50 mg/kg, associado com trimetoprim 10 mg/kg, SID, VO, por 15 dias consecutivos (Moretti et al. 2006).

## DISCUSSÃO

A erliquiose, babesiose e neosporose, são de manifestações clínicas diversas, com apresentação multissistêmicas (Neer et al. 2002, Furuta 2008). Possivelmente 3,44% dos cães portadores de erliquiose também estão parasitados por outros hemoparasitas (Moreira et al. 2003, Mendonça et al. 2005), sendo que a coinfeção é capaz de agravar a condição clínica, devido a ação patogênica dos parasitos (Harikrishnan 2005). Erliquiose e babesiose são doenças que assumem importância clínica, com positividade de 13,89% e 1,47% em esfregaço periférico, respectivamente (Albernaz et al. 2007, Miranda et al. 2008), já a neosporose é pouco comum em cães oriundos de áreas urbanas no Brasil (Guimarães et al. 2009), porém é cosmopolita. (Dubey et al. 2007) e sua manifestação clínica é tipicamente neurológica, porém apresenta adenopatias, esplenomegalia, hepatomegalia e lesões de vias aéreas (Furuta 2008), que se assemelha a erliquiose e a babesiose.

Existe aumento da probabilidade de ocorrência de hemorragias na co-infecção entre erliquiose e babesiose (Tenório et al. 2007), no entanto, esta condição não foi observada. Uma diminuição significativa de quadros hemorrágicos em casos de erliquiose vem sendo notada no Estado do Rio de Janeiro, possivelmente em decorrência da adaptação parasito-hospedeiro ou da cepa infectante (Almosny & Massard 2002).

As principais alterações hematológicas encontradas foram trombocitopenia, anemia normocítica e/ou normocrômica e o desvio nuclear de neutrófilos à esquerda leve e eosinopenia absoluta (Albernaz et al. 2007, Fabisiak 2010), leucocitose (Nakaghi et al. 2008) ou por ação de outra infecção concomitante, linfopenia relativa e monocitose absoluta também foi encontrado (Tenório et al. 2007, Miranda et al. 2011). O número de leucócitos comumente varia durante a fase aguda, podendo diminuir em decorrência da indução ao sequestro destes por mecanismos imunológicos (Moreira et al., 2003) ou por resposta ao tratamento, como no caso observado. O número de monócitos pode variar consideravelmente, sendo a monocitose um achado frequente e indi-

cativo da possibilidade de erliquiose, mesmo antes da observação de mórulas, como encontrado neste caso (Harikrishnan et al. 2005).

Os aspectos bioquímicos da infecção causada por *Ehrlichia* spp. e *B. canis* incluem inicialmente hiperproteinemia com hipergamaglobulinemia e posterior hipoalbuminemia (Santarém et al. 2008) conforme os resultados encontrados neste caso. As elevação das atividades de aspartatoaminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FAL) e alaninaminotransferase (ALT) (Almosny 1998), elevação dos níveis séricos de bilirrubina sem icterícia (Almosny 1998), são comuns entre os achados em animais parasitados, este aumento nos valores das enzimas ALT, FAL e GGT, provavelmente ocorreram por esplenomegalia e hepatomegalia (Nakaghi et al. 2008) causada em decorrência da ehrlichiose, babesiose e neosporose (Harikrishnan et al. 2005, Furuta 2008), devido à lesões hepáticas (Almosny 2002; Furuta 2008), por ação patogênica de um ou mais agentes envolvidos neste relato (Harikrishnan et al., 2005; Furuta 2008). A atividade de FAL também pode ter seu valor aumentado devido a estresse sistêmico causado por outras enfermidades (Almosny 1998). Portanto os achados laboratoriais, assim como o histórico e o exame clínico apenas sugerem o diagnóstico, porém a visualização dos parasitos, ou a demonstração dos seus anticorpos, confirmam o diagnóstico.

## REVISÃO DE LITERATURA

- Albernaz A.P., Miranda F.J.B., Melo Jr A.O., Machado J.A. & Fajardo H.V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. *Cienc. Anim. Bras.*, 8:799-806, 2007.
- Almosny N.R.P. & Massard C.L. Erliquiose em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonose, p.13-56. In: Almosny N.R.P. (Ed.), *Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses*. Editora LF Livros de Veterinária Ltda, Rio de Janeiro, 2002.
- Birchard S.J. & Sherding R.G. *Clínica de Pequenos Animais (Manual Saunders)*. Editora Roca, São Paulo, 2003. p.1793.
- Buxton D., McAllister M.M. & Dubey J.P. The comparative pathogenesis of neosporosis Review. *Trends Parasitol.*, 18:546-52. 2002.
- Dubey J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J. Parasitol.*, 41:1-16. 2003.
- Dubey J.P. & Lindsay D.S. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Vet. Parasitol.*, 67:1-59, 1996.
- Dubey J.P., Schares G. & Ortega-Mora L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum* Review. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:323-67. 2007.
- Ettinger S.J. & Feldman E.C. *Medicina interna veterinária*. p.546-564. 4ª ed. Manole, São Paulo, 1997.

- Fabisiak M., Sapieryński R. & Kluciński W. Analysis of haematological abnormalities observed in dogs infected by a large *Babesia*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 54:167-170, 2010.
- Furuta P.I. *Infecção experimental em cães com ovos embrionados de galinha (Gallus gallus domesticus) infectados com taquizoítas de Neospora caninum*. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Unesp, Jaboticabal. 2008. 82p. (Disponível em: <[http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102072P9/2008/furuta\\_pi\\_dr\\_jabo.pdf](http://www.athena.biblioteca.unesp.br/exlibris/bd/bja/33004102072P9/2008/furuta_pi_dr_jabo.pdf)>.)
- Greca H. Silva A.V. & Langoni H. Associação entre a presença de anticorpos anti-*Leishmania* sp. e anti-*Neospora caninum* em cães de Bauru, SP. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62:224-227, 2010.
- Guimarães A.M., Rocha C.M.B.M., Oliveira T.M.F.S., Rosado I.R., Morais L.G. & Santos R.R.D. Fatores associados à soropositividade para *Babesia*, *Toxoplasma*, *Neospora* e *Leishmania* em cães atendidos em nove clínicas veterinárias do município de Lavras, MG. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 18 (supl. 1):49-53, 2009.
- Harikrishnan T.J.N. & Pazhanivel J.C. Concomitant *Babesia gibsoni* and *Ehrlichia canis* infection in a dog. *Veterinarski. Arch.*, 75:513-520, 2005.
- Hemphill A. The host - Parasite relationship in neosporosis. *Adv. Parasitol.*, 43:49-104, 1999.
- McAllister M.M., Dubey J.P., Lindsay D.S., Jolley W.R., Wills R.A. & McGuire A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.*, 28:1473-1478, 1998.
- Mendonça C.S., Mundim A.V., Costa A.S. & Moro T.V. Erliquiose canina: Alterações hematológicas em cães naturalmente infectados. *Biosci. J.*, 21:167-174, 2005.
- Miranda F.J.B., Albernaz A.P., Melo Jr A.O., Machado J.A. & Fajardo H.V. Frequência de cães infectados por *Babesia* spp. Campos dos Goytacazes, RJ. *Cienc. Ani. Bras.*, 9:238-241, 2008.
- Miranda F.J.B., Albernaz A.P., Viestel M.A.D., Melo Jr A.O., Machado J.A., Alves R.B.M. & Carvalho C.B. Infecção simultânea por *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* e vírus da cinomose canina. *J. Bras. Cienc. Anim.*, 3:238-246, 2011.
- Morais H.A., Hoskins J., Almosny N.R.P. & Labarthe N.V. Diretrizes gerais para diagnóstico e manejo de cães infectados por *Ehrlichia* spp. *Clin. Vet.*, 9:28-30, 2004.
- Moraes C.C.G., Megid J., Pituco E.M., Okuda L.H., Del Fava C., De Stefano E. & Crocci A.J. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em cães da Microrregião da serra de Botucatu, estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 17:1-6, 2008.
- Moreira S.M., Bastos C.V., Araújo R.B., Santos M. & Passos L.M.F. Retrospective study (1998-2001) on canine ehrlichiosis in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 55:141-147, 2003.
- Moreira S.M., Machado R.Z. & Passos L.F. Detection of *Ehrlichia canis* in bone marrow aspirates of experimentally infected dogs. *Cienc. Rur.*, 35:958-960, 2005.
- Moretti L.A., Da Silva A.V., Ribeiro M.G., Paes A.C. & Langoni H. *Toxoplasma gondii* genotyping in a dog co-infected with distemper virus and ehrlichiosis rickettsia. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 48:359-363, 2006.
- Nakaghi A.C.H., Machado R.Z., Costa M.T., André M.R. & Baldani C.D. Canine ehrlichiosis: clinical, hematological, serological and molecular aspects. *Cienc. Rur.*, 38:766-770, 2008
- Neer T.M., Breitschwerdt E.B., Greene R.T. & Lappin M.R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the Infectious Disease Study Group of the ACVIM. *J. Vet. Intern. Med.*, 16:309-315, 2002.
- Oriá A.P., Pereira P.M. & Laus J.L. Uveitis in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Cienc. Rur.*, 34:1289-1295, 2004.
- Santarém V.A., José M.D. & Laposy C.B. Alterações bioquímicas em cães citopênicos e não citopênicos com ehrliquiose. *Semina: Cienc. Agri.*, 29:845-852, 2008.
- Sousa M.G., Higa A.C., Gerardi D.G., Tinucci-Costa M. & Machado R.Z. Tratamento da erliquiose canina de ocorrência natural com doxiciclina, precedida ou não pelo dipropionato de imidocarb. *Rev. Cienc. Agrovet.*, 3:126-130, 2004.
- Tenório A.P.M., Almeida E.L., Alves L.C., Brito F.L.C., Santos J.P. & Coelho M.C.O.C. *Ehrlichia* sp. em mielócito de cão. *Med. Vet.*, 1:62-65, 2007.