

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA PESQUISA DE HEMOPARASITAS REVISÃO DE LITERATURA

Luiz Eduardo Ristow
Denise Oliveira Jácome
TECSA Laboratórios
ristow@tecsa.com.br

DIAGNOSTIC METHODS FOR RESEARCH OF HAEMOPARASITES – a review

Resumo: Os hemoparasitas, parasitas intracelulares obrigatórios, são responsáveis por causar uma série de doenças em cães, a nível mundial. No Brasil, as que mais se destacam são a babesiose, a erliquiose e a hemobartonelose. Um dos maiores problemas no controle dessas doenças é o seu diagnóstico pela identificação do agente etiológico. A pesquisa de hemoparasitas no esfregaço sanguíneo é um método subjetivo e de baixa sensibilidade, já que depende da experiência técnica de quem a faz, de uma alta parasitemia, de um intervalo de tempo que pode ser longo, entre outros fatores. Entretanto, já estão disponíveis técnicas sorológicas como a imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, dot-blot-elisa, western immunoblotting e técnicas de biologia molecular como o PCR que têm demonstrado uma melhor eficiência no diagnóstico das hemoparasitoses, permitindo um tratamento bem sucedido pela precocidade no diagnóstico.

Unitermos: Diagnóstico, babesia, erliquia, hemobartonela, cães.

Abstract: The haemoparasites, obligate intracellular parasites are responsible for a lot of diseases in dogs in the world. In Brazil, the most important are babesiosis, erlichiosis and haemobartonellosis. The biggest problem to control these diseases is the identification of the etiologic agent. The detection of infected erythrocytes in blood smears is a subjective method and have low sensitivity, because it depends of the experience of the technician, high parasitemia, a long time of search, etc. However, there are serologic technics available, like the indirect fluorescent antibody test (IFA), ELISA, dot-blot-elisa, Western immunoblotting and PCR (polymerase chain reaction) that have been demonstrated a best efficiency at the diagnostic of haemoparasite diseases, for a successful treatment by a precocity diagnostic.

Key-words: Diagnostic, babesia, ehrlichia, haemobartonella, dogs.

As técnicas de identificação das hemoparasitoses vêm aumentando significativamente nos últimos anos, devido ao maior conhecimento sobre as doenças causadas por elas, à maior expansão geográfica de sua ocorrência e à melhoria das técnicas de diagnóstico. Como na maioria dos casos os animais acometidos por hemoparasitas apresentam sintomas inespecíficos, o diagnóstico através do exame clínico torna-se limitado. Desta forma, testes diagnósticos de alta sensibilidade e especificidade, de fácil e

rápido manuseio e de baixo custo, tornam-se essenciais para melhorar a eficiência da identificação de animais portadores, já que a pesquisa desses parasitas no esfregaço sanguíneo é demorada e de baixa sensibilidade. No presente artigo vamos abordar uma revisão das principais doenças causadas por hemoparasitas em cães no Brasil e as metodologias mais adequadas para o seu diagnóstico.

BABESIOSE CANINA

A babesiose canina é uma doença de importância

mundial. A babesia é um parasita intraeritrocitário de formato piriforme, pertencente à classe *Sporozoa*, ordem *Piroplasmida* e família *Babesiida* e está distribuída desde o sudeste europeu, África, Ásia até o continente americano. Seus vetores são o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (encontrado no Brasil), *Dermacentur reticulatus* e *Haemaphysalis leachi*. Há 73 espécies de babesias identificadas, sendo que a *Babesia canis* é conhecida por infectar naturalmente o cão⁷.

Os sinais clínicos são em geral inespecíficos, com presença de anorexia, anemia, febre, letargia e até anemia hemolítica, icterícia, esplenomegalia e vômito na fase aguda. No hemograma observa-se anemia, trombocitopenia, leucocitose, com aumento da contagem de linfócitos e eosinófilos. Na bioquímica acha-se uma hiperbilirrubinemia como reflexo da destruição dos eritrócitos e colestase intrahepática. Na urinálise podem ser vistos bilirrubinúria, hemoglobinúria, proteinúria e cilindros granulados ⁷.

A babesiose canina requer um diagnóstico precoce e uma técnica diagnóstica com boa sensibilidade, especificidade, acurácia e valores preditivos positivos e negativos ⁴.

O método mais usual para confirmar a suspeita de uma babesiose aguda é a detecção de eritrócitos infectados em todo o esfregaço sanguíneo, mas a percentagem de células infectadas pode ser bastante variável. A presença de organismos piriformes, entre (2,4µm x 5,0µm) de largura, em pares, são indicativos de parasitemia por *Babesia canis*. O esfregaço sanguíneo fixado na coloração de May-Grünwald-Giemsa é um método simples e barato e tem alta especificidade, no

entanto, estudos de infecções experimentais têm mostrado que a parasitemia não é constante e baixos números de eritrócitos infectados podem requerer uma avaliação microscópica extensa. Esfregaços obtidos do sangue capilar (ponta da orelha e ponta da cauda) têm uma maior percentagem de células infectadas, mas uma amostra recente e boas técnicas de esfregaço não são sempre possíveis em um procedimento clínico. Ocasionalmente se visualiza no esfregaço sanguíneo a babesia dentro de neutrófilos, o que é o resultado da fagocitose neutrofílica do organismo ^{6,8}.

Em um estudo, desenvolveu-se uma técnica de separação de babesias, onde eritrócitos infectados foram concentrados em um gradiente descontínuo de Percoll para otimizar o diagnóstico pelo exame microscópico. Este estudo demonstrou que o isolamento eritrocitário pelo Percoll é uma técnica precisa, com alta especificidade, sensibilidade (94%), acurácia (96%) e valores preditivos negativos (90%). Este método também produz uma alta percentagem de células infectadas (> 132 e > 34 x mais concentrado que a visualização central e periférica do esfregaço sanguíneo, respectivamente), tornando-

se extremamente útil no diagnóstico da babesiose canina, especialmente naqueles casos onde a parasitemia é baixa e o exame do esfregaço sanguíneo é demorado. Ele também é eficiente para preservar uma suspensão concentrada de parasitas para futuras investigações, usando-se outras técnicas, como o PCR (polymerase chain reaction) ⁴.

Os métodos sorológicos têm se mostrado eficientes em detectar parasitemias ocultas e infecções crônicas. O teste de imunofluorescência indireta (IFI) é o mais frequentemente usado, mas é caro e deve ser padronizado para a interpretação dos resultados. Alguns autores têm demonstrado uma baixa sensibilidade da imunofluorescência em filhotes ou em cães no início do curso da doença, devido a uma insuficiente resposta imunológica, se positivando apenas no estado de convalescência. Geralmente títulos acima ou iguais a 1:80 são considerados positivos. Títulos de 1:40 são sugestivos de infecção e títulos menores que 1:40 são considerados negativos. O resultado positivo de uma única amostra parece ser suficiente para o diagnóstico ^{7,8}.

O teste de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e a fixação de complemento são disponíveis, mas não muito utilizados. Técnicas sorológicas não permitem um diagnóstico precoce,

porque a resposta de produção de anticorpos não é demonstrável até 8-10 dias após a infecção parasitária⁷. O teste de “dot-blot-ELISA” tem sido desenvolvido para o diagnóstico da babesiose

canina. Ele é simples, rápido e objetivo, podendo se tornar muito útil como um teste de “screening” a campo de cães suspeitos⁷.

Agente	Classificação	Célula parasitada
<i>Babesia canis</i>	Protozoário	Hemácia
<i>Ehrlichia canis</i>	Riquétsia	Leucócito
<i>Haemobartonella canis</i>	Riquétsia	Hemácia
<i>Haemobartonella felis</i>	Riquétsia	Hemácia

ERLIQUIOSE CANINA

A erliquiose canina é uma importante doença infecciosa, cuja prevalência tem aumentado significativamente em várias regiões do Brasil. O gênero *Ehrlichia* é formado por Rickettsias gram negativas pertencentes à família Ehrlichiae e à ordem Rickettsiales, constituindo-se parasitos intracelulares obrigatórios que parasitam os leucócitos do hospedeiro, causando trombocitopenia. Várias espécies do gênero *Ehrlichia* causam infecções clínicas e subclínicas em cães, entre elas a *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia platys*, *Ehrlichia equi* e *Ehrlichia risticii*. Destas, a *Ehrlichia canis* é a maior causadora de severas infecções em cães. A *E. canis* e a *E. risticii* invadem primeiramente os leucócitos mononucleares

(predominantemente monócitos)^{8,9,10}.

A infecção por *Ehrlichia canis* frequentemente causa um dilema diagnóstico, porque os sinais clínicos são inespecíficos. Na fase aguda observa-se febre, secreção oculonasal, anorexia, depressão, perda de peso, cianose, estertores pulmonares, petéquias, etc. Os sinais clínicos desaparecem na maioria dos casos sem tratamento, dentro de uma a quatro semanas, porém o hospedeiro permanece com a infecção subclínica^{8,10}. Na hematologia observa-se uma anemia moderada, trombocitopenia com aumento do número de plaquetas imaturas circulantes e variações na contagem de leucócitos. As alterações bioquímicas na fase aguda são caracterizadas por uma hiperproteinemia (33%),

hiperglobulinemia (39%), hipoalbuminemia (43%), ALT (43%), ALP (31%) e hiperbilirrubinemia. Proteinúria e hematúria podem ser detectadas em cães com ou sem azotemia na fase crônica^{8,9,10}.

A identificação da mórula de *Ehrlichia canis* no esfregaço sanguíneo corado pelo Giemsa é demorada e não tem resultado satisfatório, já que as mórulas são encontradas transientemente e em pequeno número. A chance de se identificar um leucócito infectado pode ser aumentada pelo exame feito sobre a fina camada de papa de leucócitos ou pelo esfregaço feito do sangue periférico da ponta da orelha ou cauda. Esfregaços de amostras de biópsia e de tecidos aspirados (especialmente de nódulos linfáticos, pulmões ou baço)

têm sido usados na visualização de inclusões citoplasmáticas, e assim confirmar o diagnóstico de *E. canis*, mas estas também são técnicas diagnósticas de pouca rentabilidade^{8,9}.

A técnica da reação de imunofluorescência indireta (IFI) vem sendo largamente utilizada no diagnóstico da erliquiose desde 1972, sendo aplicável tanto para estudos de infecções experimentais, como para estudos epidemiológicos de campo. Os antígenos utilizados geralmente são procedentes do cultivo de células infectadas com *E. canis*, havendo mínima reação cruzada entre as espécies, exceto entre a *Ehrlichia canis* e a *Ehrlichia equi*. Em cães infectados experimentalmente, o período prévio para a detecção de anticorpos se inicia entre 8 a 24 dias, embora alguns cães não se apresentem soro positivos até 28 dias pós infecção, devido à variação da resposta individual de cada animal. Os soros que apresentam reação em diluição igual ou maior a 1:10 podem ser considerados positivos, porém títulos de 20 a 80 são considerados relativamente baixos. O título do soro pode variar de acordo com o estágio da infecção, o envolvimento imunológico com o agente patogênico e a raça do cão. Assim, títulos

de anticorpos de alta magnitude (ex. 1:163,840 ou mais) geralmente refletem uma infecção crônica^{2,8,9}. A persistência do título de anticorpos na IFI por períodos maiores que 6 meses após tratamento adequado, pode indicar que o agente não foi totalmente eliminado do organismo animal, havendo também a possibilidade do cão se reinfectar após cessar o tratamento. Tem-se observado um rápido decréscimo nos títulos da IFI, um pouco antes do óbito. Estes cães frequentemente têm uma severa depressão medular e são hipogamaglobulinêmicos^{8,9}.

Resultados falso-negativos podem ocorrer se o antígeno não for de boa qualidade ou se o técnico for inexperiente, e resultados falso-positivos podem ser observados se a amostra de soro estiver contaminada por bactérias⁹. Diferenças no resultado do teste de IFI podem ser achadas em diferentes laboratórios e dentro de um mesmo laboratório quando o teste é feito com o mesmo soro em dias diferentes. Um título positivo pela IFI indica somente que o animal foi exposto, entretanto um título positivo associado a uma história clínica compatível, a achados físicos e a testes laboratoriais adicionais,

ajudam substantivamente no diagnóstico clínico⁸. Para que o sorodiagnóstico seja acurado para esta doença é necessário haver uma preparação adequada dos reagentes, principalmente da cultura de células dos antígenos, aliada à habilidade de se processar o teste e interpretar os resultados em conjunção com a história clínica. Estas são uma das razões pelas quais há tanta discrepância nos resultados de testes de uma mesma amostra sorológica, entre laboratórios^{2,9}.

O Western Immunoblotting é uma técnica quase tão sensível quanto a IFI no diagnóstico da *E. canis* e tem a grande vantagem da objetividade da leitura (não sofre influência da subjetividade do operador, como ocorre na IFI). Porém, é uma técnica cara, consome tempo e necessita de uma tecnologia mais avançada que a IFI. Em um estudo, o Western immunoblotting foi capaz de identificar anticorpos anti-*E. canis* a partir do quarto dia após a infecção, apresentando uma reação máxima entre os dias 10 e 14 após a infecção².

O teste de dot-blot enzyme linked-immunoassay (dot-blot-elisa) é uma técnica sensível para a detecção de anticorpos no soro e dispensa o emprego de

equipamentos caros. A técnica utiliza antígenos purificados de cultura de células DH 82 infectadas com *E. canis* aderidos a tiras de papel de nitrocelulose. Essas tiras são incubadas com uma solução de bloqueio (leite em pó a 5%) para reduzir reações inespecíficas e podem ser congeladas a -20°C até o momento do uso. Para a execução do teste, as tiras são incubadas com o soro teste e depois com solução de conjugado anti-IgG-canino-peroxidase. Soros sabidamente positivos e negativos são empregados como controles da técnica. O dot-blot-elisa é tão sensível e específico quanto a IFI. Uma vez feita a sensibilização da nitrocelulose, ela é estável

HEMOBARTONELOSE CANINA

A *Haemobartonella canis* é o agente causador da hemobartonelose canina. Pertencente ao grupo das riquetisias, ela é um parasita eritrocitário obrigatório, que causa severas distorções na forma das hemácias. A *Haemobartonella canis* difere dos outros organismos do seu gênero por formar cadeias através da superfície da hemácia parasitada, podendo também aparecer individualmente na forma de pequenos pontos, anéis ou bastão^{5,8}.

por pelo menos um ano. Os resultados são de fácil leitura por pessoal não treinado e proporcionam um registro permanente².

Existem kits comerciais para o diagnóstico da erliquiose canina que se baseiam no princípio do dot-blot-elisa. Um desses kits é o Immunocomb[®]-BIOCAL, capaz de determinar anticorpos do tipo IgG específicos para o parasito. O teste pode ser realizado com sangue total ou soro, é de fácil execução, rápido e a leitura é direta observando-se a coloração final da reação².

A polymerase chain reaction (PCR) é uma técnica sensível e específica para a detecção de pequenas quantidades de *E. canis*, podendo ser empregada no

A maioria dos cães infectados não desenvolvem a doença clínica, por não possuírem um número suficiente de parasitas no sangue. Os animais que apresentam um constante nível de parasitemia, desenvolvem anemia rapidamente e os que apresentam episódios repetidos de parasitemia a desenvolvem de forma gradual. Na fase aguda da parasitemia observa-se no hemograma reticulocitose, policromasia, anisocitose, corpúsculos de Howell-Jolly e aumento do número de eritrócitos nucleados.

diagnóstico a partir de amostras de necrópsia e de material de biópsia. Com a utilização dessa técnica foi possível o isolamento de DNA de *E. canis* de células mononucleares de sangue e tecidos (pulmões, baço, linfonodos, rins, cérebro e olhos) de animais infectados. A principal vantagem da PCR é que permite identificar a espécie de erliquia causadora da infecção, o que nem sempre é possível com outras técnicas. Porém é uma técnica cara e para ser empregada no diagnóstico de animais suspeitos de serem portadores, deve-se aumentar a sensibilidade dos “praimers” (sequência alvo de DNA)².

O método mais usado para a demonstração da *H. canis* é a coloração do tipo Romanowsky (Giemsa, Wright, Leishaman e May-Grunwald-Giemsa). Atenção deve ser dada na preparação do esfregaço sanguíneo e na coloração, porque às vezes os parasitas são tão poucos que se torna difícil a sua detecção. Deve-se ter o cuidado de saber diferenciar a *Hemobartonella* de pontilhados basofílicos, de outros organismos, de corpúsculos de Howell-Jolly e de artefatos de técnica. A identificação do parasita deve ser feita antes de se

iniciar a terapia, já que muitos são destruídos após ela ser instalada. Não há testes sorológicos para a detecção de infecção por *H. canis*^{5,8}.

HEMOBARTONELOSE FELINA

A *Haemobartonella felis* é o agente causador da hemobartonelose felina. O método mais eficiente para identificar o parasita é a coloração do esfregaço sanguíneo pelo May-Grunwald-Giemsa, porque revela mais parasitas por

campo microscópico. O maior problema na detecção da *H. felis* é a sua parasitemia cíclica. Por isso os esfregaços sanguíneos devem ser examinados em dias consecutivos entre pelo menos 10 a 14 dias. A *H. felis* é removida dos eritrócitos por agentes quelantes, como o EDTA (ácido tetra acético etileno diamino). Assim, em amostras de sangue armazenadas com EDTA, o número de eritrócitos com *H. felis* decresce com o tempo e em alguns casos pode desaparecer em até 3

horas após o armazenamento. Desta forma os esfregaços devem ser feitos sobre sangue fresco, para evitar resultados falso-negativos^{5,8}.

Não há nenhum sinal clínico patognomônico ou achado patológico específico para a detecção da hemobartonelose canina e felina. O diagnóstico específico da infecção requer a demonstração de hemácias parasitadas⁸.

Referências Bibliográficas

- 1 - ALMOSNY, N. R. P.; MASSARD, C.L. Erliquiose felina – revisão. *Rev. Clínica Veterinária*. n.23. novembro/dezembro, p.30-32. 1999.
- 2 - ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina – revisão. *Rev. Clínica Veterinária*. n.19. março/abril, p.31-38. 1999
- 3 - BERENT, L.M.; Messick, J.B.; Cooper; S.K. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *American Journal of Veterinary Research*. n.10. v.59, p.1215-1219. 1998.
- 4 - COMAZZI, S.; PALTRINIERI, S.; MANFREDI, M.T.; AGNES, F. Diagnosis of canine babesiosis by Percoll gradient separation of parasitized erythrocytes. *Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation*. v.11, p. 102-104. 1999.
- 5 - HOSKINS, J.D. Canine *Haemobartonellosis*, canine *hepatozoonosis*, and feline *cytauxzoonosis*. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. n.1. v. 21, p. 75-91. Janeiro1991.
- 6 - KAGIWARA, M.K.; HOLZCHUH, M.P. Infecção experimental de cães por *Babesia canis*: Avaliação de leucograma durante a evolução da doença. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. n.39. v.5, p. 745-755. 1987.
- 7 - TABOADA, J.; MERCHANT, S.R.; Babesiosis of Companion Animals and Man. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. n.1. v. 21, p. 103-123. Janeiro1991.

- 8 - WOLDEHIWET, Z.; RISTIC, M. *Rickettsial and chlamydial diseases of domestic animals*, 1ed, Oxford, Pergamon Press, 1993, 427 p.
- 9 - WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Erlichial Diseases of dogs. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. n.1. v. 21, p.129-140. Janeiro1991.
- 10 – ROSEZ, K.V.; ALVES, F.R.; BLEICH, I. Erliquiose canina. *Revista Cães & Gatos*, n.96. jan/fev, p. 25-28. 2001.

MÉTODO DO GRADIENTE DE PERCOLL

Em um estudo, desenvolveu-se uma técnica de separação de babésias pelo gradiente de Percoll, onde eritrócitos infectados foram concentrados com um gradiente descontínuo de Percoll para otimizar o diagnóstico pelo exame microscópico. As amostras foram coletadas em tubos contendo ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), e após fazer o esfregaço e a coloração pelo May-Grünwald-Giemsa, a alíquota de sangue foi centrifugada a 150xg por 10 minutos. O plasma e a papa de leucócitos foram descartadas para remover a maior parte dos leucócitos e então uma alíquota de eritrócitos foi suspensa em igual volume de solução salina isotônica. A solução de Percoll (1.131 g/ml) foi diluída em duas densidades diferentes (1.085 g/ml, 1.102 g/ml) e a suspensão de eritrócitos foi colocada numa camada acima do gradiente descontínuo. Após centrifugação a 200xg, por 25 minutos, duas diferentes camadas de eritrócitos foram detectadas: 1(camada acima) no topo da densidade menor de Percoll e a outra (camada abaixo) na interface entre as duas densidades. Estas duas camadas foram lavadas com 10 ml de solução salina isotônica e o tubo centrifugado a 150 x por 10 minutos. Daí o fluido sobrenadante é descartado. A papa de eritrócitos é então fixada pelo May-Grünwald-Giemsa. A percentagem de células infectadas é avaliada pelo esfregaço de sangue na periferia e parte central da lâmina, após o isolamento do percoll ⁴.

Ambos esfregaços sanguíneos, como o isolamento das células têm altos valores de especificidade e valor preditivo positivo, mas a sensibilidade, acurácia e valores preditivos negativos foram maiores na periferia do esfregaço sanguíneo e muito maiores após o isolamento de eritrócitos infectados. A percentagem de células infectadas foram significativamente maiores nas células isoladas pelo Percoll do que nas células do centro e da periferia do esfregaço sanguíneo ⁴.