

**RELATO DE CASO
CLÍNICA MÉDICA DE PEQUENOS ANIMAIS**

**REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) DE LÍQUIDO
CEFALORRAQUIDIANO, UM MEIO ALTERNATIVO PARA O
DIAGNÓSTICO DE NEOSPOROSE CANINA – RELATO DE 2 CASOS**

Vanessa Yurika MURAKAMI¹

Suellen Rodrigues MAIA¹

Jeniffer Gabriela Figueroa CORIS²

Thaís de Melo Paula SEIXAS³

RESUMO

A neosporose é uma enfermidade parasitária causada pelo protozoário *Neospora caninum*, que vem sendo pesquisada em vários países, incluindo o Brasil. A enfermidade está associada a distúrbios neuromusculares em cães, além de ser uma importante causa de abortos em bovinos. Relata-se dois casos de pacientes caninos, apresentando histórico de sinais neuromusculares e encefalomielite, respectivamente, diagnosticado com Neosporose Canina através de líquido cefalorraquidiano pelo método de Reação em Cadeia em Polimerase (PCR).

Palavras-chave: Cão, *Neospora caninum*, Neurológico, PCR, Rigidez Muscular.

ABSTRACT

Neosporose is a parasitic disease caused by the protozoa *Neospora Caninum*, which has been researched in several countries, including Brazil. The illness is associated with neuromuscular disorders in dogs, besides being an important cause of abortions in bovine animals. Two cases of canine patients are reported, presenting a history of neuromuscular signals and encephalomyelitis, respectively, diagnosed with Neosporosis canine through cerebrospinal fluid by the polymerase chain Reaction method (PCR).

Keywords: Dog, *Neospora caninum*, neurological, PCR, Muscular Rigidity.

REVISÃO DE LITERATURA

A neosporose é uma doença multissistêmica de distribuição mundial, podendo acometer uma grande variedade de animais, incluindo animais silvestres (DUBEY, 1999; GONDIM et al., 2004; LEGNANI et al., 2016), causada pelo protozoário intracelular obrigatório *Neospora caninum*, pertencente ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoa*, família *Sarcocystidae*, *Sarcocystidae*, assim como os gêneros *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, *Hammondia* e *Besnoitia* (DUBEY et al., 1988; GRECA et al., 2010). Os cães domésticos (*Canis familiaris*), lobos cinzentos (*Canis lupus*), coiotes (*Canis latrans*) e dingos foram descritos como hospedeiros definitivos, e como hospedeiros

¹ Residentes de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca/SP - BRASIL

² Residente de Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca/SP - BRASIL

³ Docente da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca/SP - BRASIL

E-mail: nessa_murakami@hotmail.com

intermediários bovinos, ovinos, caprinos, suínos, equinos e felinos (BOAVENTURA et al., 2008; CHUNMEI et al., 2015; WANG et al., 2016).

O ciclo biológico do *N. caninum* é caracterizado pela fase assexuada, que se desenvolve tanto no hospedeiro definitivo como no hospedeiro intermediário, e a fase sexuada, que ocorre somente nos hospedeiros definitivos. Na fase assexuada, os taquizoítos, bradizoítos e cistos são intracelulares e localizam-se em diferentes tecidos e órgãos, como cérebro, medula espinhal, nervos, músculos cardíacos, músculos esqueléticos, fígado e músculos oculares. Os canídeos, após ingerirem cistos teciduais, eliminam oocistos não esporulados nas fezes, onde, no meio ambiente em condições adequadas se tornam esporulados (infectantes) (BARR et al., 1990; DUBEY e LINDSAY, 1996).

A neosporose é considerada uma doença frequentemente associada a distúrbios reprodutivos em bovinos, e neurológicos em cães, com caráter progressivo, manifestando-se com maior severidade em animais jovens (ANDERSON et al., 2000).

A presença de anticorpos para *N. caninum* em amostras de soro demonstra exposição ao parasita, que pode ser identificada por testes sorológicos, tais como, a Reação de Imunofluorescência Indireta – RIFI (DUBEY et al. 1988), Teste de Aglutinação para Anticorpos anti-*N. caninum*– NAT (ROMAND et al., 1998) e Teste Imunoenzimático – ELISA (DUBEY et al., 1997). A RIFI foi o primeiro teste sorológico usado para a demonstração de anticorpos e atualmente é muito utilizada para diagnóstico da infecção em cães, constituindo padrão ouro comparada a outros testes (ATKINSON et al., 2000).

O diagnóstico através da PCR tem sido muito valioso na pesquisa dessa enfermidade, pois atua na detecção do DNA do parasito nos tecidos do hospedeiro intermediário e definitivo (HILL et al., 2005, GONDIM et al., 2005), além da presença de DNA nas fezes dos mesmos, sendo considerada o exame diagnóstico mais específico de neosporose disponível (LOCATELLI-DITTRICH, 2008). A análise do líquido pode auxiliar na identificação da enfermidade, sendo a contagem de células inflamatórias indicativa de uma condição inflamatória ou infecciosa e a visualização de taquizoítos sugestiva de encefalomielite protozoária (BARBER, 1998).

RELATO DO CASO

CASO 1

Cão, fêmea, sem raça definida, 9 anos, procedente do Estado de Minas Gerais, foi atendido com histórico de dificuldade de locomoção, rigidez dos membros pélvicos, dor lombar, disfagia principalmente de líquidos, apatia, dispneia inspiratória, dificuldade de apreensão de alimentos e crostas em pina auricular há 3 meses. O paciente vivia em zona rural, semidomiciliado, cujo ambiente desenvolvia atividade agropecuária, além de ser uma área de acesso de canídeos selvagens.

Ao exame clínico o paciente apresentava-se apático e febril (39,5°C), manifestando alterações dermatológicas marcadas por dermatite ulcerativa com presença de crostas em pina auricular e dermatite nodular em dorso. Foi evidenciado durante a marcha do paciente espasticidade de membros pélvicos, porém na avaliação ortopédica dos mesmos não houve evidência de crepitação, sensibilidade dolorosa e/ou déficit neurológico, contudo em topografia lombar notou-se plegia. Amostras de sangue foram coletadas para realização de hemograma, perfil renal (ureia e creatinina), perfil hepático (fosfatase alcalina (FA), alaminaaminotransferase (ALT) e avaliação de enzima musculares aspartato aminotransferase (AST) e creaninaquinase (CK). A partir na análise laboratorial obteve-se como resultado, CK: 962,6UI/L (20 à 220UI/L espécie específica); AST: 191U/L (23 à 66U/L espécie específica), ALT: 196U/L (21 à 102U/L) e FA: 744U/L (20 a 156U/L), com os demais resultados dentro dos valores de referência para a espécie. Foram solicitadas imagens radiográficas de tórax, demonstrando padrão misto (bronquial e intersticial, sugestivo de broncopneumonia).

Diante do histórico clínico e achados laboratoriais do paciente, teve-se como suspeita clínica Polimiosite por protozoário. Foi realizado inicialmente como técnica sorológica, RIFI para *Neospora caninum*, onde obteve-se resultado negativo (não reagente). Após, foi encaminhado amostra de líquido cefalorraquidiano para a pesquisa de Toxoplasmose, Cinomose e *Neosporose* a partir do método de PCR, obtendo-se como resultado, positividade para *Neosporose*.

A presença dos sinais clínicos e o resultado do PCR permitiu o diagnóstico definitivo para *neosporose*. Instituiu-se terapia antimicrobiana com sulfametoxazol +

trimetropina (30mg/kg/BID) e Pirimetamina (0,25mg/kg/BID) por 60 dias; além disso foi preconizado administração de prednisona (0,5mg/Kg/BID) por 15 dias. O animal foi acompanhado e, durante esse mesmo período, submetido a sessões de acupuntura e fisioterapia. Houve melhora parcial do quadro, permanecendo a rigidez muscular em membros pélvicos e disfagia de líquidos.

CASO 2

Cão, macho, poodle, 5 anos, procedente do Estado de São Paulo, foi atendido com histórico de andar em círculos e ataxia há 2 dias. O paciente vivia em área suburbana, semidomiciliado, tendo contato com animais errantes, podendo assim haver contato com materiais biológicos em decomposição e água contaminada. A tutora afirmou que havia possibilidade de trauma.

Ao exame clínico o paciente apresenta-se em bom estado geral, mucosas normocoradas (rósea), temperatura retal 38.3°C, frequência cardíaca: 123 batimentos por minuto, frequência respiratória: 28 movimentos por minuto, tempo de preenchimento capilar: dois segundos e hidratação adequada.

Para melhor avaliar o paciente foi realizada a coleta de sangue por punção de veia jugular para hemograma completo, perfil renal e hepático e avaliação de proteínas. Os exames supracitados evidenciaram um aumento das células eritróides, hemoglobina e volume globular (8,6milhões/mm³, 20,9g/dl e 59%, respectivamente), e proteína total elevada (8,4g/dl). As morfologias celulares da série vermelha e da série branca estavam normais. As plaquetas estavam normais (209.000/mm³) e o número de leucócitos estava dentro da normalidade (11.000/mm³). A dosagem sérica da ureia (41mg/ dL), creatinina (1,0 mg/dL), fosfatase alcalina (67 U.I./L) e alaninoaminotransferase (ALT) (44 U.I./L) apresentavam-se normais.

Os valores de referência para os parâmetros avaliados são: eritrócitos 5.5 – 8,5 milhões/mm³, proteína total 5,4 - 8,5 g/ dL, plaquetas 180 – 400.000/mm³, leucócitos 6.000 – 18.000/mm³, ureia 15 - 65 mg/dL, creatinina 0,5 – 1,5 mg/dL, fosfatase alcalina 20 – 156 U.I./L, alaninoaminotransferase (ALT) 21 – 102 U.I./L.

No exame neurológico revelou ataxia cerebelar, que afetou mais severamente os membros pélvicos e andar em círculos. Propriocepção presente em todos os membros,

reflexos espinhais e a avaliação de nervos cranianos eram normais. Estas alterações indicam uma lesão cerebelar.

Diante dos sinais clínicos apresentados, direcionou-se a uma avaliação minuciosa para possíveis suspeitas clínicas: Otite Interna, Neosporose, Toxoplasmose e Cinomose.

Na otoscopia ambos condutos auditivos apresentavam-se limpos, sem evidência de secreções e/ou infamação e membrana timpânica íntegras. Foi realizado radiografias de crânio, em posição rostro ventral e latero lateral oblíqua sob sedação para avaliação de bulhas timpânicas bilateral, ambas se apresentaram sem alterações. O paciente foi submetido também a coleta de líquido cefalorraquidiano pela cisterna magna. A amostra coletada foi enviada para realização de PCR para Neosporose, Toxoplasmose e Cinomose, obtendo-se resultado positivo para *Neospora caninum*.

Diante aos sinais clínicos e o resultado de PCR permitiu o diagnóstico definitivo para Neosporose Canina. Foi instituída terapia com Sulfametoxazol + Trimetoprina (20mg/kg/BID) e Pirimetamina (0,25mg/kg/BID), ambas por 30 dias. O paciente retornou após 30 dias após terapia para avaliação clínica, este apresentava-se clinicamente bem e sem evidências de sinais neurológicos anteriormente relatados.

DISCUSSÃO

No relato 1 apresentado, o paciente supracitado apresentou espasticidade de membros posteriores que de acordo com Boaventura et al., (2008); Moura et al., (2011) e Reichel et al., (2007) seja, provavelmente decorrente de poliradiculoneurite e polimiosites granulomatosas causadas pelo protozoário encontrado, os autores citam que o sinal clínico observado é comumente relatado em filhotes, contudo com o relato apresentado pode-se observar que animais idosos podem demonstrar a mesma sintomatologia.

Garosi et al., (2010) afirma que os sinais neurológicos de encefalomielite podem variar dependendo da distribuição de *N. caninum* no sistema nervoso central, como também em outros órgãos, com isso observamos uma sintomatologia diferenciada de ataxia cerebelar e andar em círculos no caso 2, comparada ao caso 1.

Segundo Legnani et al., (2016) os sinais clínicos predominantes em caninos são alterações neurológicas e musculares, contudo a neosporose também pode estar

associada com quadros de pneumonia, hepatite e dermatites. De acordo com o relato 1 apresentado, o paciente demonstrou variáveis em relação as enzimas hepáticas e presença de dermatites, além de padrões radiográficos pulmonares que podem se relacionar com quadro de broncopneumonia, assim como descritas na literatura.

Nos casos em que a musculatura é envolvida, a atividade plasmática das enzimas de CK e AST, estarão elevadas; assim, a atividade da CK pode ajudar a diferenciar uma miosite de uma paresia/paralisia meramente neurológica, como assim evidenciado no caso 1 acima citado (BARBER e TREES, 1996).

O diagnóstico da neosporose canina é baseado na sorologia, sendo a RIFI a técnica mais utilizada. Os títulos variam muito, podendo se apresentar negativos mesmo em cães que estejam excretando oocistos, mas ainda assim é uma técnica de referência (BOAVENTURA et al., 2008). Contudo no presente relato 1, na análise da RIFI, obteve-se como resultado não reagente, necessitando do auxílio de outros métodos laboratoriais na continuidade da investigação diagnóstica.

De acordo com Dubey e Schares (2006) em casos de infecções recentes ou crônicas com formação de cistos, a sorologia pode ser negativa, mesmo quando o parasito está presente no hospedeiro. Portanto, métodos de diagnóstico diretos podem ser utilizados, como a imunistoquímica ou a PCR, como se pode observar nos casos acima relatados.

Legnani et al., (2016) ressalta que clinicamente, a toxoplasmose canina pode assemelhar-se a neosporose, com ambas as doenças que afetam frequentemente o sistema nervoso central e o sistema muscular. Pois *N. caninum* e *T. gondii* são parasitas intimamente relacionados estruturalmente, geneticamente e imunológico, a diferenciação entre os dois patógenos pode ser um desafio. Neste caso novas técnicas diagnósticas devem usadas para diferenciá-las. A infecção de *N. caninum* foi demonstrada para ser claramente positiva somente pelo PCR executada em amostras histológicas. Podendo-se concluir que, especialmente com reações fracas de técnicas imunofluorescência direta em conjunto com sorologia inconclusiva, a confirmação molecular deve ser tentada.

CONCLUSÃO

O caso 1 relatado confirma que o método RIFI apesar de ser considerado padrão ouro para o diagnóstico de Neosporose, pode-se apresentar negativo mesmo quando o hospedeiro estiver parasitado, com isso aumenta a importância de novos métodos diagnósticos, concluindo-se que o método de PCR através de líquido é eficaz para a confirmação diagnóstica da enfermidade em ambos os casos apresentados. Ressalta-se também uma importante avaliação clínica do paciente, devido ao parasito poder acometer qualquer área do sistema nervoso central, demonstrando assim diferentes sinais clínicos.

REFERÊNCIAS

Anderson, M.L., Andrianarivo, A.G., Conrad, P.A. 2000. Neosporosis in cattle. *Animal Reproduction Science*. 60-61:417-431.

Atkinson, R., Harper, P.A.W., Reichel, M.P. et al. 2000. Today Parasitology. 16(3):4-110.

Barr, B.C. et al. 1990. Bovine fetal encephalitis and myocarditis associated with protozoal infections. *Veterinary Pathology*. 27(5):354-361.

Barber, J. S., Trees, A.J. 1996. Clinical Aspects of 27 Cases of Neosporosis in Dogs. *Veterinary Record*. 139(18):43-439.

Barber JS. Neosporosis canina. 1998. *Waltham Focus*. 8: 25-29.

Boaventura, C.B., Oliveira, V.S.F., Melo, D.P.G. et al. 2008. Prevalência de *Neospora Caninum* em cães de Goiânia. In: *Revista de Patologia Tropical*. 37(1):15-22.

Chunmei J., Longzheng Y. et al. 2015. Evaluation of *Neospora caninum* truncated dense granule protein 2 for serodiagnosis by enzyme-linked immunosorbent assay in dogs. *Experimental Veterinary*. 157:88-91.

Dubey, J.P., Carpenter, J.L., Speer, C.A. et al. 1988. Newly Recognized Fatal Protozoan Disease of Dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 92(9):85-1269.

Dubey, J.P., Lindsay, D.S. 1996. A review of *Neospora caninum* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 67:1-59.

Dubey, J.P. Jenkins, M.C., Adams, D.S. et al. 1997. Antibody responses of cows during na outbreak of neosporosis evaluated by indirect fluorescent antibody test and diferente enzyme-linked immunosorbent assays. *The Journal of Parasitology*. 83(6):1063-1069.

Dubey, J.P. 1999. Recent advances in *Neospora* and neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 84 (3-4), 349-367.

Dubey, J.P., Schares, G. 2006. Diagnosis of Bovine Neosporosis. *Veterinary Parasitology*. 140(1-2):1-34.

Garosi, A., Dawson, J. et al. 2010. Necrotizing Cerebellitis and Cerebellar Atrophy Caused by *Neospora caninum* Infection: Magnetic Resonance Imaging and Clinicopathologic Findings in Seven Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 24:571-578.

Gondim, L.F.P., Mcallister, M.M., Pitt, W.C., Zemlicka, D.E. 2004. Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. *International Journal for Parasitology*. 34 (2):159-161.

Gondim, L.F.P., Mcallister, M.M., Gao, L. 2005. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. *Veterinary Parasitology*. 134:33-39.

Greca, H.; Silva, A.V.; Langoni, H. 2010. Associação entre a presença de Anticorpos Anti-*Leishmania* sp e Anti-*Neospora Caninum* em Cães de Bauru, SP. In: *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 62(1):224-227.

Hill, D.E., Chirukandoth, S., Dubey, J.P. 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Health Research Reviews*. 6(1):41–61.

Legnani, S.; Pantchev, N.; Forlani, A. et al. 2016. Emergence of Cutaneous Neosporosis in a Dog Receiving Immunosuppressive Therapy: Molecular Identification and Management. *Veterinary Dermatology*. 27(1): 14-49.

Locatelli-Dittrich, R., Machado, P.C.Jr., Puggle, N.F. et al., 2008. Determinação e correlação de anticorpos anti-*Neospora caninum* em bovinos e cães do Paraná, Brasil. *In: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 17(1):191-196.

Moura, A.B.; Souza, A.P.; Sartor, A.A. et al. 2011. Neospora Caninum Antibodies and Risk Factors in Dogs From Lages and Balneário Camboriú, SC. *In: Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 63(1):262-265.

Reichel, M.P., Ellis, J.T., Dubey, J.P. 2007. Neosporosis and Hammondiosis in Dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 48(6):308-312.

Romand, S., Thulliez, P., Dubey, J.P. 1998. Direct agglutination test for serologic diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Parasitology Research*. 84(1):50-53.

Wang, S., Yao, Z.; Zhang, N. et al. 2016. Serological Study of *Neospora Caninum* Infection in Dogs in Central China. *Journal Parasite*. 23(25).