

Diagnóstico de infecções concomitantes por *Cystoisospora canis* (Nemeséri, 1959) e *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853): Relato de caso

Paulo Daniel Sant'Anna Leal | Cleide Domingues Coelho | Gilberto Flausino

Submetido em 25.08.2013

Aceito em 17.12.2013

Abstract Leal PDS, Coelho CD, Flausino G. **Diagnóstico de infecções concomitantes por *Cystoisospora canis* (Nemeséri, 1959) e *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853): Relato de caso** [Diagnostic of concomitant infections by *Cystoisospora canis* (Nemeséri, 1959) and *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853): Case report] *Coccidia* 1, 44-48. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. *Campus* Seropédica, BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil. E-mail: pauloleal@ctiveterinario.com.br

In routine clinical the diagnosis is based in attention to the development and laboratory findings where intercurrent infections have been observed frequently. In the current work is reported the clinical laboratory diagnosis of *Cystoisospora canis* (Nemeséri, 1959) associated to *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) in dog. Thereby proving the relevance of the clinical examination, the visualization of oocysts in the feces and measurement of oocysts and sporocysts in cystoisosporosis by *C. canis* and the laboratory tests and PCR with DNA sequencing to confirm the diagnosis of *Cyniclomyces guttulatus*, alerting the clinician to this new agent.

Keywords enteritis, ciniclicomocose, coccidiose, infecções concomitantes.

Resumo 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. Neste trabalho, relata-se o diagnóstico clínico laboratorial da infecção por *Cystoisospora canis* associado a *Cyniclomyces gut-*

tulatus em cão. Comprovando assim o valor do exame clínico, da visualização de oocistos nas fezes e mensuração dos oocistos esporulados, e seus respectivos esporocistos na cistoisosporose por *C. canis* e os testes laboratoriais e PCR com sequenciamento de DNA para confirmação do diagnóstico de *Cyniclomyces guttulatus*, alertando o clínico para esse novo agente etiológico.

Palavras-chave enterite, ciniclicomocose, coccidiose, infecções concomitantes.

Introdução

As diarreias, enfermidades bastante frequentes, podem variar em gravidade e duração, desde uma discreta manifestação evoluindo para graves manifestações clínicas, podendo levar ao óbito. Podem ser classificadas como agudas ou crônicas. Nas agudas a consistência é aquosa ou aquosa-mucóide, podem ser sanguinolentas nos casos graves. Os sinais se instalam rapidamente e duram alguns dias. Nas crônicas, a duração pode se prolongar por semanas ou meses ou ainda apresentar um padrão de recorrência periódica (Ettinger

PDS Leal ✉ | G Flausino

Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. BR-465 km 7, 23897-970 Seropédica, RJ, Brasil.

E-mail: pauloleal@ctiveterinario.com.br
gilflausino@ufrj.br

CD Coelho

Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária. Avenida das Américas, 3939, bloco 2, loja I. Barra da Tijuca, 22631-003 Rio de Janeiro, RJ.

E-mail: ctivet@ctiveterinario.com.br

1996, Sherding & Johnson 2008).

As doenças gastrintestinais, apesar de manifestarem-se com moderada patogenicidade, principalmente em cães jovens, compõem grande parte da casuística da clínica médica de pequenos animais, cujos sinais clínicos característicos são evidenciados através de vômitos e diarreias (Burrows et al. 1995, Sherding & Johnson 2008), onde a diarreia é a principal manifestação clínica dos intestinos delgado e grosso (Ettinger 1996). Cães com diarreia crônica podem passar por períodos alternados de melhora e agravamento da enfermidade. As diarreias podem ter etiologia tóxica, medicamentosa, parasitária, viral, bacteriana e fúngica (Ettinger 1996). Nas infecciosas, onde os agentes etiológicos envolvidos são bactérias, fungos, coccídios e vírus, as mudanças ou transgressões do regime alimentar que causam o desequilíbrio da microbiota intestinal podem ser os desencadeadores do processo (Sherding & Johnson 2008). *Cystoisospora canis* (Nemeséri, 1959) é um parasito do intestino de cães, associado a sinais intestinais de diarreia pastosa e/ou líquida (Daugochies et al. 2000, Mitchell et al. 2007, Dupont et al. 2013). Afeta frequentemente cães jovens (Mitchell et al. 2007) submetidos à aglomeração e manejo inapropriado com higiene insuficiente, o que favorece a disseminação dos oocistos que quando esporulados passam a ser infectantes (Rodrigues & Menezes 2003). Esta disseminação faz com que ocorram surtos em canis de criação ou se manifestando após a troca de ambiente pelo estresse; no entanto, em caso de reinfecção, os sinais clínicos serão mais brandos devido a provável imunidade adquirida (Houk et al. 2013).

O diagnóstico desta parasitose se faz com a observação de oocistos nas fezes, porém este se restringe ao gênero. Para se especificar é necessária à mensuração dos oocistos esporulados, além de seus respectivos esporocistos (Rocha & Lopes 1971), com a importância de poder ser usada como modelo para o estudo em humanos na fase exógena de *Cystoisospora belli* (Wenyon, 1923) (Houk & Lindsay, 2013).

Dentre as infecções fúngicas, a presença de um ascomiceto do gênero *Cyniclomyces* vem sendo assinalada em fezes de cães (Houwens & Blankenstein 2001, Gjerde et al. 2009, Dijkstra et al. 2010, Flausino et al. 2012, Fur-

tado et al. 2013), sendo alguns destes casos associados a diarreia hemorrágica (Kunifumi et al. 2009), diarreia em coelhos ou mesmo a colecistite supurativa e colangiohepatite em cães (Richle & Scholer 1961, Neel et al. 2006, Furtado et al. 2013). Em cães com diarreia crônica, foram encontradas quantidades de *Cyniclomyces guttulatus* (Robin, 1853) nas fezes, sendo que o seu diagnóstico foi baseado na identificação microscópica, no isolamento através de cultivo e no sequenciamento desta espécie (Gjerde et al. 2009; Flausino et al. 2012).

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 o diagnóstico inédito das infecções concomitantes por *C. canis* e *C. guttulatus* em cão com diarreia através de exame fecal.

Histórico

Canino do sexo masculino, com 12 meses de idade, da raça Golden Retriever do Labrador foi atendido no Centro de Terapia Intensiva e Emergência Veterinária-Clinica 24 horas, com histórico de diarreia eventual.

Amostras fecais foram coletadas em frascos estéreis e analisadas utilizando a técnica de flutuação em solução saturada de sacarose (Birgel et al. 1982). Nas fezes foram observados oocistos semelhantes ao gênero *Cystoisospora* (Figura 1a) e células leveduriformes cilíndricas, isoladas ou em pequenas cadeias com morfologia semelhante à do gênero *Cyniclomyces* (Figura 1b). Parte das amostras foi homogeneizada em solução de dicromato de potássio a 2,5% ($K_2Cr_2O_7$) e armazenadas em temperatura ambiente, para se processar a esporulação (Rocha & Lopes 1971) e mensuração dos parâmetros morfométricos para se identificar a espécie de *Cystoisospora*.

Com o objetivo de se identificar as células leveduriformes cilíndricas ocorreu a necessidade de coloração a fresco, entre lâmina e lamínula, pelo azul de algodão lactofenol de Amann (Rippon, 1974) e, desidratadas em metanol e coradas pelo Giemsa (Flausino et al. 2012, Furtado et al. 2013). Para o isolamento, o material fecal foi processado para a obtenção de colônias isoladas do material



Fig. 1. Fotomicrografias de oocistos esporulados de *Cystoisospora canis* (seta vazia) e células leveduriformes cilíndricas de *Cyniclomyces guttulatus* (seta preenchida) observados em amostras de fezes de um cão, com 12 meses de idade, da raça Golden Retriever do Labrador (400x).

fecal com características próprias (cheiro e forma). As colônias isoladas foram preparadas, entre lâmina e lamínula e suspensas em solução salina a 0,85% e coradas pelo azul de algodão lactofenol onde se observou células com morfologia semelhante à *C. guttulatus* (Flausino et al. 2012, Furtado et al. 2013).

Adicionalmente, a análise por reação em cadeia de Polimerase (PCR) e sequenciamento do DNA confirmou a presença desta espécie previamente descrita no Brasil (Flausino et al. 2012).

Os oocistos obtidos após esporulação foram medidos com ocular micrométrica Ernst

Leitz Wetzler e fotografados em microscópio Nikon E 200, sendo a morfologia compatível para *C. canis* nos 148 oocistos medidos (Rocha & Lopes 1971, Rodrigues & Menezes 2003).

Discussão

Sinais clínicos intestinais como diarreia pastosa e líquida são compatíveis com a cistoisporose, o que concorda com o presente relato (Rocha & Lopes 1971, Conboy 1998, Dauschies et al. 2000, Dupont et al. 2013). Apesar de se manifestar mais comumente com moderada patogenicidade em animais jovens, entre três e seis meses de idade, podem ocorrer em adultos, isoladamente (Mitchell et al. 2007), associados a outras etiologias (Leal et al. 2011, Dupont et al. 2013, Furtado et al. 2013) ou como diagnóstico diferencial (Flausino et al. 2013).

A ocorrência da cistoisporose pode ser exacerbada pelos efeitos imunossupressores de infecções concomitantes, inclusive com agentes zoonóticos (Hoskins 2004, Dupont et al. 2013). Em contrapartida, é importante ressaltar que *C. canis* não depende diretamente de outro agente etiológico para o desenvolvimento da doença, apenas pode ter seu desenvolvimento favorecido pela depressão imunológica (Mitchell et al. 2007).

Na cistoisporose é comum a diarreia mucóide ou sanguinolenta, não é incomum haver pneumonia secundária, por imunoincompetência, não observado neste relato provavelmente por não haver doença imunossupressora presente (Leal et al. 2011). Nos casos graves há sinais nervosos, ora com apatia ou com tremores, mioclônias e convulsões, devido às lesões entéricas que podem estimular os plexos ou permitir aumento de absorção de substâncias tóxicas intestinais (endotoxinas bacterianas e outras) ou estar associado à encefalopatia hepática por falência hepática devido a colangiohepatite (Furtado et al. 2013), o que não foi observado neste caso devido aos sinais clínicos recentes e a procura pelo serviço de saúde veterinário, não propiciando lesão hepática associada a cinielomicose.

O exame direto microscópico determinou a presença de oocistos característicos (Corrêa & Corrêa 1992). Lesões no epitélio intestinal associados com *C. canis*, com consequente

diarreia, levam a hipofagia ou anorexia (Conboy 1998), dessa forma, a diminuição da ingestão protéica bem como o comprometimento intestinal são fatores determinantes para a hipoalbuminemia e por consequência imunossupressão (Pruett 2001) o que justificaria a presença da cinicomicose, levedura que apresenta crescimento exacerbado em pacientes imunossuprimidos (Raposo et al. 1995/1996).

Infecções assintomáticas são descritas em casos com *C. canis* (Daugshies et al. 2000), embora sinais clínicos como diarreia com sangue, dores abdominais, anemia, apatia e morte podem estar associadas a cães jovens, além de alterações respiratórias e neurológicas (Conboy 1998).

Estes sinais não foram observados no presente estudo possivelmente devido a idade. Um cão adulto jovem com 12 meses de idade que provavelmente já teria adquirido outras infecções por *C. canis*, possui resposta imune adequada devido a provável imunidade adquirida em infecções anteriores pelo mesmo parasito (Houk et al. 2013). Além disso, o cão recebe alimentação balanceada e é isento de outros parasitos intestinais.

Portanto, este trabalho discorda de outros relatos, onde a cistisporose se manifesta mais comumente com moderada patogenicidade em animais jovens, entre três e seis meses de idade (Leal et al. 2011). Assim, os sinais clínicos poderiam ser explicados pela presença de *C. guttulatus* como um agravante do quadro gastrintestinal, concordando com outros relatos que descrevem este ascomiceto como responsável por gastrite, enterite e colangiohepatite (Flausino et al. 2012, Furtado et al. 2013), ou conforme experimento, a cistisporose é suficientemente patogênica para produzir doença grave no cão independente de doenças concomitantes (Mitchell et al. 2007).

As colonias de *C. guttulatus* obtidas no presente estudo foram semelhantes as já descritas no Brasil (Flausino et al. 2012). Quanto à análise por PCR foi compatível para um ascomiceto, porém ao ser analisado o seu sequenciamento este foi idêntico aos já isolados em cães no Brasil e Noruega (Gjerde et al. 2010, Flausino et al. 2012).

A presença dos sinais clínicos têm sido as principais manifestações clínicas da doença por *C. canis*, porém o presente relato chama a

atenção para a ocorrência desse novo agente etiológico *C. guttulatus*, que pode ser lesivo a mucosa gástrica e ao sistema hepatobiliar, levando a uma maior morbidade e mortalidade (Flausino et al. 2012, Furtado et al. 2013).

Referências

- Almeida RK, Vasconcelos AC, Carneiro RA, Paes PRO, Moro L. Alterações citológicas do sangue periférico e da medula óssea de cães com cinomose. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 61, 1255-1260, 2009.
- Birgel EH, Netto LP, Amaral V, Giorgi W, Panetta JC. *Meios e métodos de diagnóstico em Medicina Veterinária*. São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1977.
- Conboy G. Canine coccidiosis. *Canadian Veterinary Journal*, 39, 443-444, 1998.
- Corrêa WM, Corrêa CNM. *Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos*. Rio de Janeiro: Medsi, 1992.
- Daugshies A, Mundt HC, Letkova V. Toltrazuril treatment of cystisporosis in dogs under experimental and field conditions. *Parasitology Research*, 86, 797-799, 2000.
- Dupont S, Butaye P, Claerebout E, Theuns S, Duchateau L, Van de Maele I, Daminet S. Enteropathogens in pups from pet shops and breeding facilities. *Journal of Small Animal Practice*, 54, 475-480, 2013.
- Ettlinger SJ, Feldman EC. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. São Paulo: Manole, 1997.
- Flausino G., Leal PDS, McIntosh D, Amaral LG, Teixeira Filho WL, Flausino W & Lopes CWG. Isolation and characterization of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 in dogs in Brazil. *Current Microbiology*, 65, 542-546, 2012.
- Flausino G, Furtado TT, McIntosh D, Teixeira Filho WL. Differential diagnosis between endogenous stages of *Cyniclomyces guttulatus* (Robin) Van Der Walt and Scott, 1971 and *Eimeria caviae* Sheather, 1924 from Guinea pig *Cavia porcellus* Linnaeus. *Coccidia* 1, 21-24, 2013.
- Frenkel JK, Smith DD. Determination of the genera of cyst-forming coccidian. *Parasitology Research*, 91, 384-389, 2003.

- Furtado TT, Flausino G, Leal PD de S, Ferreira JP, McIntosh D, Flausino W, Teixeira Filho WL, Paes-de-Almeida EC, Lopes CWG. Diagnóstico de colangite associado à mucocele da vesícula biliar por *Cyniclomyces guttulatus* em cães - Relato de casos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35,1-6, 2013.
- Gjerde B, Holtet L, Sanden S, Dahlgren SS. Soppen *Cyniclomyces guttulatus* er en del av den normale ventrikkelog tarmfloraen hos kanin. Vi beskriver et tilfelle der en morfologisk identisk, men genetisk forskjellig, sopp har gitt residiverende gastroenteritt hos hund. *Norsk Veterinær Tidsskrift*, 121, 507-510, 2009.
- He P, Li J, Gong P, Huang J, Zhang X. *Cystoisospora* spp. from dogs in China and phylogenetic analysis of its 18S and ITS1 gene. *Veterinary Parasitology*, 190, 254-258, 2012.
- Hoskins JD. *Doenças Virais Caninas*. In Ettinger SJ, Feldman EC. *Tratado de Medicina Interna Veterinária*. São Paulo: Guanabara Koogan. 2004. p. 440-441.
- Houk AE, Lindsay DS. *Cystoisospora canis* (Apicomplexa: Sarcocystidae): Development of monozyotic tissue cysts in human cells, demonstration of egress of zoites from tissue cysts, and demonstration of repeat monozyotic tissue cyst formation by zoites. *Veterinary Parasitology*, 197, 455-461, 2013.
- Houk AE, O'Connor T, Pena HF, Gennari SM, Zajac AM, Lindsay DS. Experimentally Induced Clinical *Cystoisospora canis* Coccidiosis in Dogs with Prior Natural Patent *Cystoisospora ohioensis*-like or *C. canis* Infections. *Journal of Parasitology*, 99, 892-895, 2013.
- Mitchell SM, Zajac AM, Charles S, Duncan RB, Lindsay DS. *Cystoisospora canis* Nemeséri, 1959 (syn. *Isoospora canis*), infections in dogs: clinical signs, pathogenesis, and reproducible clinical disease in beagle dogs fed oocysts. *Journal of Parasitology*, 93, 345-52, 2007.
- Oliveira-Sequeira TC, Amarante AF, Ferrari TB, Nunes LC. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 103, 19-27, 2002.
- Pruett SB. Quantitative aspects of stress-induced immunomodulation. *International Immunopharmacology*, 1, 507-520, 2001.
- Raposo JB, Nobre MDO, Fernandes CG, Porto M. Candidíase cutânea em um canino. *Revista da FZVA*, 2-3, 11-17. 1995/1996.
- Rocha E, Lopes CWG. Comportamento da *Isoospora canis*, *Isoospora felis* e *Isoospora rivolta* em infecções experimentais em cães e gatos. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 1, 81-96, 1971.
- Rodrigues AN, Menezes RCAA. Infecção natural de cães por espécies do gênero *Cystoisospora* (Apicomplexa: Cystoisosporinae) em dois sistemas de criação. *Revista de Clínica Veterinária* 42, 24-30, 2003.
- Soulsby E.J.L. *Parasitologia y Enfermedades Parasitarias en los Animales Domésticos*. México: Interamericana, 1987.