



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LIPASE DGGR, LIPASE DIG
E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CÃES COM BABESIOSE

Gonçalo António Carreira Henriques

Coimbra, Julho de 2015



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE LIPASE DGGR, LIPASE DIG
E PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EM CÃES COM BABESIOSE

Coimbra, Julho de 2015

Autor

Gonçalo António Carreira Henriques

Aluno do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama

Orientador - Prof. Dra. Sofia Duarte

Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama

Co-orientador – Prof. Dra. Asta Tvarijonaviute

Departamento de Medicina e Cirurgia Animal, Universidade Autónoma de Barcelona

Orientador Externo - Mestre Hugo Corte Real Vilhena

Hospital Veterinário do Baixo Vouga; Departamento de Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama

**Dissertação do Estágio Curricular dos ciclos de estudo conducentes ao Grau de Mestre
em Medicina Veterinária da EUVG**

Resumo

A babesiose canina é causada por protozoários intraeritrocitários do género *Babesia*. Uma das suas possíveis complicações é a pancreatite, igualmente reportada como complicação em cães com Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM). No entanto, é pouco estudada a relação entre os processos hemolíticos agudos (de etiologia imunomediada ou não imunomediada) e a pancreatite.

Os níveis séricos de lipase ácido éster 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGR), lipase 1,2-diglicerídeo (1,2-DiG), proteína C-reativa (CRP) e haptoglobina (Hp) foram avaliados em cães com babesiose da região centro de Portugal. A espécie mais prevalente foi *B. canis*, conforme verificado previamente na região norte do país. Os resultados obtidos, na determinação de lipase DGGR e lipase DiG, sugerem a ocorrência de pancreatite como complicação relativamente frequente da babesiose canina. Oito (21,6%) dos animais infetados apresentaram valores de lipase DGGR sugestivos de pancreatite. A CRP manifestou ser um biomarcador muito sensível de babesiose. De acordo com os resultados obtidos, deve-se suspeitar de pancreatite nos animais infetados por *Babesia* spp., principalmente na presença de hemólise moderada a grave.

Palavras-chave: anemia hemolítica, babesiose, hemólise, lipase DGGR, lipase DiG, pancreatite

Abstract

Canine babesiosis is caused by intraerythrocytic protozoa of *Babesia* spp. One of its possible complications is pancreatitis, also reported as a complication in dogs with Immunomediated Hemolytic anemia (IMHA). However, the relationship between acute hemolytic processes (whether immunomediated or not) and pancreatitis is scarcely studied.

Serum lipase 1,2-*o*-dilauryl-*rac*-glycero-3-glutaric acid ester (DGGR), lipase 1,2-diglyceride (1,2 DiG), C-reactive protein (CRP) and haptoglobin (Hp) were evaluated in dogs with babesiosis from central Portugal. The most prevalent species was *B. canis*, as previously observed in northern Portugal. The results obtained in the determination of lipase DGGR and lipase DiG suggest the occurrence of pancreatitis as a relatively common complication of canine babesiosis. Eight dogs (21,6%) out of the 37 infected animals presented serum levels of lipase DGGR compatible with pancreatitis. C-reactive protein proved to be a biomarker with high sensitivity in babesiosis. According to the results obtained, pancreatitis should be suspected in animals infected with *Babesia* spp., especially in the presence of moderate to severe hemolysis.

Keywords: babesiosis, hemolysis, hemolytic anemia, lipase DGGR, lipase DiG, pancreatitis

Agradecimentos

À Professora Doutora Sofia Duarte por ter aceitado ser minha orientadora, pela sua disponibilidade, pelo seu profissionalismo, pela partilha de conhecimentos e pelo apoio prestado no decorrer do estágio curricular e realização deste trabalho.

À Doutora Asta Tvarijonaviute, da Universidade Autónoma de Barcelona por ter aceitado ser minha orientadora e pelo apoio prestado no decorrer do estágio curricular e realização deste trabalho.

Ao Dr. Hugo Vilhena por ter aceitado ser meu orientador, pela sua disponibilidade, pela paciência, pela partilha de conhecimentos, pelo incentivo, pela sua dedicação e profissionalismo e pela ajuda prestada no decorrer do estágio e realização deste trabalho.

A toda a equipa multidisciplinar do Hospital Veterinário do Baixo Vouga, pela disponibilidade, simpatia e partilha de conhecimentos prestados durante a realização do estágio curricular.

À Professora Doutora Carla Maia pela sua disponibilidade, partilha de conhecimentos e colaboração nos diagnósticos moleculares durante o estágio no Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

Ao André Pereira pela sua disponibilidade e colaboração nos diagnósticos moleculares durante o estágio no Instituto de Higiene e Medicina e Tropical.

Ao meu amigo Ricardo Ferreira pela sua colaboração e ajuda na realização do tratamento estatístico dos dados.

À Escola Universitária Vasco da Gama pelo apoio concedido, sem o qual não teria sido possível realizar este estudo.

Ao Prof. Dr. José Cerón (Diretor) e restantes colaboradores do Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas InterLab UMU da Universidade de Múrcia, pelo apoio concedido na determinação das análises clínicas, sem o qual não teria sido possível realizar este estudo.

Ao Instituto de Higiene e Medicina Tropical, por ter permitido a realização da técnica de PCR nas suas instalações, sem o qual não teria sido possível realizar este estudo.

À minha família e amigos por todo o apoio, incentivo e amizade.

Um agradecimento muito especial para a minha esposa, a minha filha e os meus pais por estarem sempre presentes, pelo apoio, paciência, compreensão, preocupação e carinho demonstrados em todos os momentos e que permitiram concretizar este objetivo.

Índice geral

Índice de tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. Introdução.....	1
2. Materiais e métodos	2
2.1. Animais e amostras	2
2.2. Confirmação da infecção por <i>Babesia</i> spp.....	3
2.3. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise	3
2.4. Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR e Lipase DiG.....	4
2.5. Determinação da concentração sérica de CRP e Hp	4
2.6. Outros critérios.....	5
2.7. Análise Estatística.....	5
3. Resultados	5
3.1. Confirmação de infecção por <i>Babesia</i> spp.....	5
3.2. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise	6
3.3. Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR, Lipase DiG, CRP e Hp	7
3.4. Outros critérios.....	9
4. Discussão	10
4.1. Confirmação da Infecção por <i>Babesia</i> spp.....	10
4.2. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise	11
4.3 Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR e Lipase DiG.....	11
4.4. Determinação da concentração sérica de CRP e Hp	13
4.5. Outros critérios.....	14
5. Conclusão	14
6. Referências Bibliográficas	15

Índice de tabelas

Tabela 1. Caracterização do grau de anemia e grau de hemólise nos cães da amostra.....	6
Tabela 2. Valores séricos de Lipase DGGR, Lipase DiG, CRP e Hp nos animais da amostra	87
Tabela 3. Valores de Lipase DGGR, Lipase DiG, CRP e Hp em cães infetados de acordo com o grau de hemólise	8

Lista de Abreviaturas e Siglas

1,2 DiG - 1,2-diglicerideo

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AHIM – Anemia hemolítica imunomediada

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

cPLI – Lipase pancreática específica canina (do Inglês *Canine pancreatic lipase immunoreactivity*)

CRP – Proteína C-reativa (do Inglês *C- Reactive protein*)

DGGR – Ácido éster 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (do Inglês *1,2-o-dilauryl-rac-glycero-3-glutaric acid ester*)

EUVG – Escola Universitária Vasco da Gama

IHMT – Instituto de Higiene e Medicina Tropical

DP – Desvio padrão

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA – Estados Unidos da América

G-6-PDH – Glucose-6-fosfato desidrogenase

GH – Grau de hemólise

Hp – Haptoglobina

Máx – Máximo

Mín – Mínimo

MODS – Síndrome de disfunção multi-orgânica (do Inglês *Multi-organic Dysfunction Syndrome*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase (do Inglês *Polymerase Chain Reaction*)

1. Introdução

A babesiose canina é uma doença emergente, com distribuição mundial, causada por protozoários intraeritrocitários de diferentes espécies do gênero *Babesia* (Solano-Galego *et al.*, 2008; René-Martellet *et al.*, 2013). A morfologia do parasita no interior dos eritrócitos permite reconhecer duas formas, as “grandes” (3-5 μm) e “pequenas” (1-3 μm) babesias (Uilenberg *et al.*, 1989; Irwin, 2009). As espécies das “grandes” babesias que parasitam o cão são *Babesia canis*, *Babesia vogeli*, *Babesia rossi* (Solano-Gallego & Baneth 2011; Imre *et al.*, 2013; Schaarschmidt *et al.*, 2013) e *Babesia grande da Carolina do Norte* (Birkenheuer *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2010). No grupo das “pequenas” babesias encontram-se *Babesia gibsoni* (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), *Babesia conradae* (Kjemtrup *et al.*, 2006; Ayoob *et al.*, 2010) e *Babesia microti-like* (Zahler *et al.*, 2000).

No cão, a manifestação clínica da infecção por agentes de *Babesia* pode variar entre assintomática a grave ou mesmo fatal. O fator principal que determina o quadro clínico apresentado pelo animal é a virulência da espécie (Irwin, 2009; Salem & Farag, 2014). Contudo, outros fatores associados ao hospedeiro como a idade, raça, localização geográfica, resposta imunitária e existência de doenças ou infecções concomitantes também podem influenciar a apresentação clínica (Gopegui *et al.*, 2007; Schnittger *et al.*, 2012; Daste *et al.*, 2013-57).

A babesiose canina pode ser classificada como não complicada ou complicada. Na forma não complicada, os sinais clínicos são consequência direta da anemia hemolítica resultante de diversos mecanismos envolvidos na destruição de eritrócitos. Na babesiose complicada ocorre envolvimento de outros órgãos, com desenvolvimento de complicações que incluem anemia hemolítica imunomediada (AHIM), hemoconcentração, insuficiência renal aguda, disfunção cerebral, síndrome de dificuldade respiratória aguda, hepatopatia, pancreatite (Mohr *et al.*, 2000), distúrbios hemostáticos, choque, hipoglicemia (Matijatko *et al.*, 2009), disfunção cardíaca (Jacobson, 2006) e rabdomiólise (Ayoob *et al.*, 2010).

Em medicina humana, a pancreatite é considerada uma complicação da hemólise aguda com diferentes etiologias, tais como anemia hemolítica imunomediada, exposição a tóxicos, processos infecciosos, deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase, anemia hemolítica microangiopática, doença de Wilson, hipofosfatemia (Druml *et al.*, 1991), outros processos imuno-mediados (Bréchnignac *et al.*, 1996; Masoodi, 2014) e complicações hemodialíticas (Walker *et al.*, 1981; Abtahi *et al.*, 2007). Em animais de laboratório, a pancreatite está também descrita como consequência de hemólise massiva (Saruc *et al.*, 2003; Saruc *et al.*, 2007).

Em cães a pancreatite aguda tem sido descrita como uma complicação da babesiose (Mohr *et al.*, 2000; Máthé *et al.*, 2006; Matijatko *et al.*, 2009). Mecanismos como a anemia hemolítica (Watson, 2015), lesões de isquemia e reperfusão, choque hipotensivo, hemoconcentração, produção de citocinas pro-inflamatórias (Ayoob *et al.*, 2010), processos imunomediados e vasoconstrição local têm sido relacionados com o desenvolvimento de pancreatite aguda em cães com babesiose (Mohr *et al.*, 2000). A pancreatite foi também reportada como complicação em cães com AHIM, assim como o

aumento do valor sérico da lipase pancreática específica canina (cPLI), mesmo na ausência de sinais clínicos de pancreatite (Warman *et al.*, 2008 *cit.* por Watson, 2015; Neves *et al.*, 2013). No entanto, a relação entre os processos hemolíticos agudos (de etiologia imunomediada ou não imunomediada) e a pancreatite encontra-se ainda pouco documentada no cão.

Os objetivos do presente estudo consistiram na avaliação dos níveis séricos de lipase ácido éster 1,2-o-dilauril-rac-glicero-3-glutárico (DGGR), lipase 1,2-diglicerídeo (1,2-DiG), proteína C-reativa (CRP) e haptoglobina (Hp) em cães com babesiose. Foi igualmente pretendido avaliar a relação entre a presença de hemólise e AHIM em cães infetados por *Babesia* spp. com os níveis séricos de lipase DGGR, lipase DiG, CRP e Hp.

2. Materiais e métodos

2.1. Animais e amostras

Procedeu-se à análise retrospectiva dos dados clínicos dos animais incluídos no estudo referentes à identificação, história e sinais clínicos, bem como aos resultados de exames complementares de diagnóstico (realizados em função do quadro clínico e disponibilidade dos proprietários), tratamento instituído e sobrevivência.

Foram incluídos no estudo quarenta e três cães que se apresentaram à consulta em três centros de atendimento médico-veterinário dos distritos de Aveiro e Coimbra (região centro de Portugal) – Hospital Veterinário do Baixo Vouga, Hospital Veterinário Universitário de Coimbra e Policlínica Veterinária de Aveiro, entre Novembro de 2011 e Maio de 2015, com suspeita clínica de babesiose.

Amostras de sangue periférico obtidas por punção da veia cefálica ou jugular foram recolhidas em todos os animais no momento da apresentação ao centro de atendimento médico-veterinário. Aproximadamente 1 mL de sangue total foi recolhido para tubos com ácido etilodiamino tetra-acético (EDTA) e 2 mL para tubos sem anticoagulante. Os tubos sem anticoagulante foram submetidos a centrifugação (4000g, 5 min, temperatura ambiente), 10 minutos após a recolha, para separação do soro. As amostras de sangue total em EDTA e de soro foram utilizadas para a realização de exames complementares de diagnóstico de acordo com o quadro clínico apresentado pelo animal e com a disponibilidade dos proprietários. As amostras remanescentes foram armazenadas a -20°C, até posterior análise.

2.2. Confirmação da infecção por *Babesia* spp.

Foi diagnosticada babesiose, em 37 cães, com base nos sinais clínicos apresentados (febre, apatia, anorexia, palidez muco-cutânea, icterícia e hemoglobinúria) e na observação microscópica de merozoítos intra-eritrocitários de *Babesia* spp. em esfregaços sanguíneos corados com Hemacolor® (Merck Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha). A confirmação da infecção e determinação da espécie de *Babesia* infetante foi realizada, em todos os animais, através das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciação de ADN. Seis cães com anemia e com suspeita clínica de babesiose, mas com resultado negativo na técnica de PCR para infecção por *Babesia* spp. foram também incluídos no estudo.

A extração de ADN das amostras de sangue total em EDTA foi realizada no laboratório da Escola Universitária Vasco da Gama (EUVG), através de um kit comercial (E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit, Omega Bio-Tek, Norcross, GA, EUA), respeitando as instruções do fabricante.

A amplificação de ADN de *Babesia* spp. foi realizada no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), como descrito por Maia e col. (2015). A PCR foi realizada no termociclador Bio-Rad® T100 (US), com as sequências iniciadoras PIRO-A (5'-AAT ACC CAA TCC TGA CACAGG G-3') e PIRO-B (5'-TTA AAT ACG AAT GCC CCCAAC-3'). Uma amostra de ADN genómico de *Babesia* spp. foi usada como controlo positivo e água bidestilada como controlo negativo.

Os amplímeros foram separados por eletroforese em gel de agarose e enviados para sequenciação de ADN, para determinação da espécie infetante.

A sequenciação foi realizada em laboratório comercial (Stabvida®, Portugal), utilizando como indicadores de sequenciação as mesmas sequências iniciadoras utilizadas na amplificação de ADN. A análise das sequências nucleotídicas obtidas foi elaborada através da comparação pela ferramenta on-line BLAST (do Inglês *Basic Local Alignment Search Tool*), com sequências depositadas no GenBank (disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Um nível de homologia igual ou superior a 95% foi aceite como indicativo de elevado grau de confiança.

2.3. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise

O grau de anemia foi definido com base no valor do hematócrito, determinado no momento da apresentação ou após correção da desidratação. Valores de hematócrito entre 37% e 54% foram considerados normais para a espécie. Valores inferiores permitiram a classificação da anemia como ligeira (30% - 36%), moderada (20% - 29%), grave (13% - 19%) ou muito grave (< 13%) (Willard & Tvedten, 1999).

Os animais com anemia no momento do diagnóstico ou após correção da desidratação, ou com hematócrito decrescente, que apresentaram simultaneamente auto-aglutinação em solução

salina e/ou esferocitose foram considerados como tendo AHIM (Piek *et al.*, 2012). Devido a falta de informação clínica não foi possível fazer esta classificação em quatro animais infetados.

O grau de hemólise (GH) foi avaliado na totalidade das amostras (n=43), classificadas em 4 categorias: GH0 – sem hemólise, GH1 – hemólise ligeira, GH2 – hemólise moderada e GH3 – hemólise grave, de acordo com uma escala subjetiva e por comparação entre amostras.

2.4. Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR e Lipase DiG

A concentração sérica de lipase DGGR foi realizada por um método colorimétrico em que o DGGR foi usado como substrato, previamente validado em cães (Graça *et al.*, 2005). A concentração sérica de lipase DiG foi determinada por um método colorimétrico, previamente validado em cães (Walter *et al.*, 1992), em que o 1,2-diglicerideo (1,2 DiG) foi usado como substrato.

A determinação da lipase DGGR e da lipase DiG foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas InterLab UMU da Universidade de Múrcia, num analisador bioquímico (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer, Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemanha). Concentrações séricas de lipase DGGR ≤ 120 UI/L e de lipase DiG entre 20 e 200 mg/dL foram consideradas normais para a espécie.

2.5. Determinação da concentração sérica de CRP e Hp

A concentração sérica da CRP foi determinada por um método imunoturbidimétrico humano (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Co., Irlanda), previamente validado em cães (Gentilini *et al.*, 2005). A concentração sérica da Hp foi determinada por um método colorimétrico comercial (Tridelta Phase range haptoglobin kit, Tridelta Development Ltd) previamente validado em cães (Martinez-Subiela e Cerón, 2005). A determinação da CRP e Hp foi realizada no Laboratório Interdisciplinar de Análises Clínicas InterLab UMU da Universidade de Múrcia, num analisador bioquímico (Olympus AU600 Automatic Chemistry Analyzer, Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemanha).

Concentrações séricas de CRP < 12 $\mu\text{g/mL}$ e de Hp $< 3,0$ g/L foram consideradas normais para a espécie.

2.6. Outros critérios

A presença de azotemia, no momento do diagnóstico ou após correção da desidratação, foi determinada em 28 dos 37 animais infetados. Animais com valores séricos de creatinina iguais ou superiores a 1,4 mg/dL foram classificados como azotêmicos.

Foram também considerados o período de internamento, a realização de transfusão sanguínea e a taxa de sobrevivência.

2.7. Análise Estatística

Os dados obtidos dos animais que constituem a amostra foram armazenados no software Excel® 2013 (Microsoft corporation, EUA). Para a análise estatística utilizou-se o programa informático SPSS Statistics® 20.0 (IBM corporation, EUA).

As diferenças entre variáveis foram determinadas através do teste estatístico de Kruskal-Wallis. Nos casos em que foi necessário efetuar comparações múltiplas foi utilizado o teste de Mann-Whitney U. Em todos os casos, valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Confirmação de infecção por *Babesia* spp.

Dos 37 animais infetados com *Babesia* spp., 30 cães (81,1%) estavam infetados com a espécie *Babesia canis* e sete cães (18,9%) com *Babesia vogeli*.

Foi possível identificar a raça de 33 cães, sendo 22 animais (66,6%) de raça pura e 11 cães (33,3%) de raça indeterminada. A raça Podengo Português foi a mais representada, correspondendo a 12 cães (36,4%) infetados. Em relação ao género, identificaram-se 21 machos (56,8%) e 16 fêmeas (43,2%). Foi possível determinar a idade no momento do diagnóstico em 34 casos, tendo variado entre os dois meses e os 14 anos (média 3,8 anos; desvio padrão 3,4 anos).

O período de manifestação da babesiose foi possível determinar em 33 animais. A maioria dos casos foi diagnosticada durante os meses de outono (n=11; 33,3%) e inverno (n=11; 33,3%). Sete casos foram diagnosticados na primavera (21,2%) e apenas quatro nos meses de verão (12,1%).

Os seis animais não infetados por *Babesia* spp. eram todos de raça pura, sendo quatro machos e duas fêmeas, com idades compreendidas entre um e seis anos de idade (média 3,6 anos).

3.2. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise

Dados relativos ao valor do hematócrito dos animais infetados no momento da apresentação estavam disponíveis em 33 animais. Vinte seis animais (78,8%) apresentavam anemia e sete (21,2%) apresentavam valores de hematócrito normais. O valor médio do hematócrito foi de 25,5% (desvio padrão 11,2%), tendo variado entre 5% e 50%.

No grupo dos animais com AHIM (n=13), o valor médio do hematócrito foi de 19,5%, tendo variado entre 5% e 36%. Conforme apresentado na Tabela 1, seis (46,2%) destes animais apresentaram hemólise moderada ou grave. No grupo de animais infetados sem AHIM, sete dos 20 animais analisados não apresentavam anemia no momento do diagnóstico. Neste grupo o valor médio do hematócrito, no momento de apresentação, foi de 29,5%, variando entre 8% e 50%. A grande maioria destes animais (n=18; 90%) não apresentava o soro hemolisado ou apresentava hemólise ligeira.

Tabela 1. Caracterização do grau de anemia e grau de hemólise nos cães da amostra

	AHIM	Grau de Anemia					Grau de Hemólise			
		A n (%)	L n (%)	M n (%)	G n (%)	M G n (%)	0 n (%)	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)
Infetados	Presente (n=13)	0	3 (23,1)	3 (23,1)	5 (38,4)	2 (15,4)	0	7 (53,8)	3 (23,1)	3 (23,1)
	Ausente (n=20)	7 (35,0)	7 (35,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	2 (10,0)	12 (60,0)	6 (30,0)	2 (10,0)	0
	Não classificada (n=4)	nd	nd	nd	nd	nd	0	1 (25,0)	1 (25,0)	2 (50,0)
Não Infetados	Ausente (n=6)	0	3 (50,0)	3 (50,0)	0	0	5 (83,3)	0	1 (16,7)	0

AHIM – anemia hemolítica imunomediada; A - ausente; L – ligeira; M – moderada; G – grave; MG – muito grave; nd – não definido

Dos 37 animais infetados, 26 (70,3%) não apresentavam hemólise (GH0) ou apresentavam hemólise ligeira (GH1), e 11 (29,7%) animais apresentavam hemólise moderada (GH2) ou grave (GH3) (vide tabela 1).

Quando os 13 cães infetados e com AHIM são considerados, sete (53,8%) apresentavam hemólise ligeira (GH1), e seis cães (46,2%) apresentavam hemólise moderada (GH2) ou grave (GH3) (tabela 1). Dos 20 animais infetados sem AHIM, 18 (90%) não apresentavam hemólise (GH0) ou apenas hemólise ligeira (GH1), e apenas dois animais (10%) apresentavam hemólise moderada (GH2) ou grave (GH3) (*vide* tabela 1).

Todos os animais não infetados analisados apresentavam anemia, sendo que em três casos (50,0%) classificada como ligeira e em três casos (50,0%) como moderada. Nenhum dos animais apresentava AHIM. O valor médio do hematócrito foi de 27,7%, variando entre os 20 e os 36%. Apenas um dos animais apresentava o soro hemolisado (GH2) (*vide* tabela 1).

3.3. Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR, Lipase DiG, CRP e Hp

Dos 37 animais infetados, oito cães (21,6%) apresentaram valores séricos de lipase DGGR acima do intervalo de referência, seis (16,2%) dos quais apresentaram também aumento da lipase sérica DiG. A concentração de CRP estava aumentada em todos os animais infetados (100%) e a Hp aumentada em 15 cães (40,5%).

No grupo dos animais infetados com AHIM secundária a infecção por *Babesia* spp. (n=13), seis cães (46,2%) apresentaram a concentração sérica de lipase DGGR acima dos valores de referência, cinco (38,5%) dos quais também apresentaram um aumento da concentração de lipase DiG. Em seis animais (46,2%), a Hp estava aumentada.

No grupo dos animais infetados com *Babesia* spp., mas sem AHIM secundária (n=20), apenas dois animais (10%) apresentaram os valores de lipase DGGR acima do intervalo de referência e um cão (5,0%) o valor sérico de lipase DiG aumentado. Nove cães (45,0%) apresentaram um aumento da Hp.

Nenhum dos animais não infetados por *Babesia* spp. (n=6) apresentava um aumento dos níveis séricos de lipase DGGR ou lipase DiG. A CRP estava aumentada em todos os animais, e a Hp em quatro cães (66,7%).

Comparando o grupo de animais infetados com AHIM, o grupo de animais infetados sem AHIM e os animais não infetados, verificaram-se diferenças, ainda que não significativas ($p > 0,05$), no valor médio de lipase DGGR e lipase DiG (*vide* tabela 2), bem como no número de animais em que estes parâmetros estavam acima dos valores de referência.

Tabela 2. Valores séricos de lipase DGGR, lipase DiG, CRP e Hp nos animais da amostra

		Lipase DGGR (UI/L)	Lipase DiG (mg/dL)	CRP (µg/mL)	Hp (g/L)
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
		[mín-máx]	[mín-máx]	[mín-máx]	[mín-máx]
Intervalo de referência		≤120 UI/L	[20- 200 mg/dL]	<12 µg/mL	<3 g/L
	AHIM				
Infetados	Presente (n = 13)	118,9 ± 91,8 [24,7-349,9]	195,5 ± 165,8 [48,9-546,5]	107,9 ± 26,6 [73,2-164,3]	2,3 ± 2,3 [0,01-5,6]
	Ausente (n = 20)	67,5 ± 43,5 [15,1-161,0]	108,9 ± 80,0 [42,6-402,0]	107,7 ± 32,4 [12,4-135,8]	2,7 ± 2,1 [0,01-5,9]
	Não classificada (n=4)	84,8 ± 71,6 [23,2- 349,9]	149,2 ± 122,3 [48,9-546,5]	106,3 ± 29,0 [37,3-164,3]	2,4 ± 2,0 [0,01-5,62]
Não Infetados	Ausente (n = 6)	55,7 ± 11,7 [40,9-72,3]	72,5 ± 31,2 [29,4-116,3]	100,4 ± 22,8 [65,9-127,5]	4,0 ± 2,2 [0,01-6,13]

AHIM - anemia hemolítica imunomediada, DP – desvio padrão, máx – máximo, mín – mínimo

Dos 37 animais infetados, 26 (70,3%) não apresentavam hemólise (GH0) ou apresentavam hemólise ligeira (GH1), e 11 (29,7%) animais apresentavam hemólise moderada (GH2) ou grave (GH3). Dos 26 cães sem hemólise ou hemólise ligeira, três animais (11,5%) apresentavam um aumento da concentração sérica de lipase DGGR, dos quais dois cães (7,7%) apresentavam também aumento da lipase DiG. Destes, nove animais (34,6%) apresentavam aumento da Hp. Dos 11 cães com hemólise moderada ou grave, cinco (45,5%) apresentavam a lipase DGGR acima do intervalo de referência, dos quais quatro (36,4%) apresentavam também aumento da concentração sérica de lipase DiG. Destes 11 animais, sete (63,6%) apresentavam os valores séricos de Hp acima dos valores de referência (*vide* tabela 3).

Tabela 3. Valores de lipase DGGR, lipase DiG, CRP e Hp em cães infetados de acordo com o grau de hemólise

	Lipase DGGR (UI/L)	Lipase DiG (mg/dL)	CRP (µg/mL)	Hp (g/L)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
	[mín-máx]	[mín-máx]	[mín-máx]	[mín-máx]
Sem hemólise ou hemólise ligeira (n = 26)	65,6 ± 44,7 [15,3-177,3]	114,8 ± 105,3 [42,6-494,4]	103,1 ± 29,5 [12,4-135,8]	2,0 ± 2,1 [0,01-5,6]
Hemólise moderada ou grave (n = 11)	146,3 ± 85,1 [41,4-349,9]	251,3 ± 177,7 [90,5-615,4]	111,8 ± 31,6 [51,9-164,3]	3,4 ± 2,0 [0,01-5,6]

DP – desvio padrão, máx – máximo, mín - mínimo

Quando todos os animais infetados são considerados (n=37), os animais com hemólise ligeira (GH1) apresentaram valores séricos de lipase DGGR e lipase DiG significativamente inferiores em relação aos animais com hemólise moderada (GH2) ($p < 0,05$), e também em relação aos cães com hemólise grave (GH3) ($p < 0,05$). As concentrações séricas de lipase DGGR e lipase DiG foram

também significativamente ($p < 0,001$) superiores em cães com hemólise moderada ou grave (GH2 e GH3), em relação aos animais sem hemólise ou com hemólise ligeira (GH0 e GH1).

Quando os 13 cães infetados e com AHIM são considerados, sete (53,8%) apresentavam hemólise ligeira (GH1), e seis cães (46,2%) apresentavam hemólise moderada (GH2) ou grave (GH3). Dos sete animais com hemólise ligeira, apenas um (14,3%) apresentava um aumento da concentração de lipase DGGR e lipase DiG, enquanto cinco (83,3%) dos seis animais com hemólise moderada ou grave apresentavam aumento da lipase DGGR, quatro (66,7%) dos quais também aumento da lipase DiG. A Hp estava aumentada em apenas um cão (14,3%) com GH1, e em cinco (83,3%) dos cães com GH2 ou GH3.

Dos 20 animais infetados sem AHIM, 18 (90%) não apresentavam hemólise (GH0) ou apenas hemólise ligeira (GH1), e apenas dois animais (10%) apresentavam hemólise moderada (GH2). Dos 18 animais sem hemólise ou com hemólise ligeira, apenas dois (10,0%) apresentavam aumento da lipase DGGR, dos quais um (5,0%) também apresentava um aumento da lipase DiG. Nenhum dos animais com hemólise moderada apresentava aumentos de lipase DGGR ou lipase DiG. A Hp estava aumentada em oito (40%) dos animais com GH0 ou GH1, e em um dos cães com GH2.

No grupo de animais infetados com AHIM, as concentrações séricas de lipase DGGR ($p < 0,01$), lipase DiG ($p < 0,05$) e Hp ($p < 0,01$) foram significativamente superiores nos indivíduos com hemólise moderada ou grave (GH2 ou GH3) em relação aos cães com hemólise ligeira (GH1).

No grupo dos cães infetados sem AHIM não foram detetadas diferenças significativas nas concentrações de lipase DGGR, lipase DiG, CRP e Hp entre animais sem hemólise ou hemólise ligeira (GH0 e GH1) e animais com hemólise moderada (GH2).

3.4. Outros critérios

Os valores séricos de creatinina nos animais infetados incluídos no estudo variaram entre 0,2 e 5,8 mg/dL, com um valor médio de 1,1 mg/dL (desvio padrão 1,5 mg/dL). Quatro cães desenvolveram insuficiência renal aguda secundária à infeção por *Babesia* spp.

A duração média do tempo de internamento dos animais infetados da amostra foi de 3,6 dias (desvio padrão 2,7 dias), tendo variado entre um e 10 dias de internamento. Em quatro casos não foi possível recolher informação relativa ao tempo de internamento.

Dados relativos à realização de transfusão de sangue total estavam disponíveis em 33 dos 37 animais infetados, tendo 10 cães (30,3%) recebido uma transfusão sanguínea.

Dados relativos à sobrevivência dos animais infetados foram recolhidos em 33 casos. Dois animais (6,1%) morreram devido a complicações secundárias à babesiose.

No caso dos animais não infetados apenas um apresentava azotemia no momento do diagnóstico. Todos os animais foram hospitalizados, com uma duração de internamento variável entre

os três e os 10 dias (média 4,7 dias). Foi realizada transfusão sanguínea num animal e um deles não sobreviveu.

4. Discussão

4.1. Confirmação da Infeção por *Babesia* spp.

Apesar de ter sido realizado o diagnóstico inicial por observação microscópica de esfregaços sanguíneos, que é considerada uma técnica simples, acessível e útil em infeções agudas com moderada ou elevada parasitemia (Irwin, 2009; Ayoub *et al.*, 2010), procedeu-se à confirmação por PCR. Esta técnica apresenta elevada especificidade e sensibilidade, sendo particularmente vantajosa em infeções subclínicas ou perante parasitemia baixa. A sequenciação dos amplímeros resultantes permite ainda identificar a espécie do parasita por sequenciação de ADN (Kjemtrup & Conrad, 2000).

Dos 37 animais infetados por *Babesia* spp., 30 cães (81,1%) estavam infetados com a espécie *B. canis* e sete cães (18,9%) com *B. vogeli*. Em Portugal, no primeiro estudo elaborado a nível nacional com identificação molecular de *Babesia* spp., foram reportados sete casos de infeção por *B. canis* e um caso por *B. vogeli* (Cardoso *et al.*, 2008). Num estudo posterior (Cardoso *et al.*, 2010), também na região norte do país, identificou 44 casos de infeção por *B. canis* e um caso de infeção por *B. vogeli*. O maior número de casos de infeção por *B. canis*, verificada em ambos os estudos citados e também no presente estudo, poderá ser explicada pela maior patogenicidade comparativamente à espécie *B. vogeli* ou pela maior prevalência do respetivo vetor (Cardoso *et al.*, 2010). De facto, a expansão do vetor tem sido apontada como a explicação para o aumento do número de casos de infeção por *B. canis* em vários países da Europa e da sua ocorrência em áreas previamente não endémicas, conforme verificado nas últimas décadas (Kubelová *et al.*, 2011; Paulauskas *et al.*, 2014). A infeção por *B. vogeli* está também descrita em cães do sul de Portugal (René-Martellet *et al.*, 2015). A infeção por *Babesia microti-like* está também reportada no nosso país (Simões *et al.*, 2011).

Curiosamente, nos gatos, as prevalências em Portugal são inversas, estando descrito que a infeção por *B. vogeli* é mais prevalente que a infeção por *B. canis* (Vilhena *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2014).

No presente estudo verificou-se que a maioria das infeções que ocorreram nas estações de outono e inverno foram causadas por *B. canis*, enquanto as infeções por *B. vogeli* foram todas registadas na primavera e verão. Este facto poderá ser explicado pela sazonalidade dos vetores de *B. canis* e *B. vogeli*.

Babesia canis transmitida pelo vetor *Dermacentor reticulatus* apresenta patogenicidade variável (Ionita *et al.*, 2012). É caracterizada por ser a espécie mais amplamente distribuída na Europa, tendo

sido documentada em estudos de diversos países (René-Martellet *et al.*, 2013). *Babesia vogeli*, transmitida pelo vetor *Rhipicephalus sanguineus* (Ionita *et al.*, 2012), é considerada menos patogénica (Cardoso *et al.*, 2008). Apresenta uma distribuição mais vasta incluindo América (Sousa *et al.*, 2013), África (Salem & Farag 2014), Ásia (Inokuma *et al.*, 2004), Austrália (Jefferis *et al.*, 2003) e Europa (René-Martellet *et al.*, 2015).

4.2. Ocorrência de anemia, AHIM e hemólise

Independentemente da espécie do parasita, a anemia representa uma manifestação clínica transversal da babesiose, caracterizada pela ocorrência de hemólise intra e extravascular, como consequência de diversos mecanismos envolvidos na destruição de eritrócitos (Mohr *et al.*, 2000; Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth 2011), entre os quais a ação directa do parasita, cuja replicação no interior dos eritrócitos causa dano na membrana celular e consequente hemólise (Gopegui *et al.*, 2007). Contudo, o grau de parasitemia não está diretamente associado à gravidade da anemia (Irwin, 2010), o que é explicado por vias indirectas de destruição de eritrócitos, como a síntese de factores séricos hemolíticos (Gopegui *et al.*, 2007), lesão oxidativa eritrocitária, aumento da atividade eritrofagocitária dos macrófagos e reações imunomediadas (Ayoob *et al.*, 2010; Solano-Gallego & Baneth 2011). Nesta última, são produzidos anticorpos direcionados a antigénios e outros componentes da membrana de eritrócitos infetados e não infetados promovendo a AHIM (Kirtz *et al.* 2012). Considera-se que a AHIM é secundária em aproximadamente 25 % dos casos, sendo que a sazonalidade da AIMH secundária foi inclusivamente associada a épocas em que os cães estão mais expostos a parasitas, como *Babesia* spp. (Piek *et al.*, 2012; Kidd *et al.*, 2014).

Dos 33 indivíduos infetados e classificados quanto ao grau de anemia, 10 cães (30,3%) apresentaram anemia ligeira, seis (18,2%) anemia moderada, seis (18,2%) anemia grave e quatro (12,1%) anemia muito grave. Comparativamente, Kirtz e col. (2012) observaram que a maioria dos cães estudados (n=113) apresentava anemia ligeira (63,8%) a moderada (31,9%).

No presente estudo, a prevalência de AHIM nos indivíduos infetados por *Babesia* spp. foi 39,4% (n=13). Este resultado é semelhante ao obtido no estudo de Mohr e col. (2000), no qual 30% dos cães com babesiose apresentaram AHIM.

4.3 Determinação da concentração sérica de Lipase DGGR e Lipase DiG

O exame histopatológico é considerado a técnica de referência para o diagnóstico definitivo de pancreatite (Watson, 2015; Xenoulis, 2015), no entanto devido ao seu carácter invasivo, as biópsias pancreáticas não são realizadas por rotina. Em alternativa a ecografia abdominal apresenta uma

elevada sensibilidade, contudo carece de especificidade (Graça *et al.*, 2005) e está dependente da subjetividade do clínico relativamente à interpretação dos achados imagiológicos. A determinação da atividade sérica da cPLI é considerada o teste com maior sensibilidade e especificidade (Xenoulis, 2015).

A determinação da lipase DGGR é uma técnica validada em cães que apresenta elevada correlação com a cPLI, tendo a vantagem de ser um método menos dispendioso e moroso (Graça *et al.*, 2005; Kook *et al.*, 2014).

A determinação do valor sérico da lipase DiG no diagnóstico da pancreatite canina apresenta algumas limitações, uma vez que esta enzima é sintetizada no pâncreas, mas também em outros órgãos, o que compromete a sua especificidade. A sua concentração sérica pode também ser influenciada pelo comprometimento da sua eliminação renal em animais azotémicos (Ruaux, 2003).

No presente estudo, os valores acima do intervalo de referência de lipase DGGR (n=8; 21,6%) e lipase DiG sérica (em 6 dos cães com aumento da lipase DGGR; 16,2%) foram considerados como sugestivos de pancreatite nos animais infetados por *Babesia* spp. Os resultados obtidos estão de acordo com os registados em estudos anteriores, que revelaram taxas de prevalência de pancreatite em cães com babesiose entre 2,3 % e 33% (Mohr *et al.*, 2000; Máthé *et al.*, 2006; Matijatko *et al.*, 2009).

Contudo, os resultados podem ter sido condicionados por outras causas de pancreatite que não foram avaliadas no presente estudo. Adicionalmente, deve ser também considerada a hipótese de a prevalência de pancreatite ser superior à identificada no estudo, dado que existem registos de animais com pancreatite nos quais a atividade sérica das enzimas pancreáticas se encontrava dentro dos limites normais (Mohr *et al.*, 2000; Ruaux, 2003). É igualmente possível que, em alguns animais, a pancreatite se ter desenvolvido posteriormente à recolha da amostra sanguínea.

Como referido anteriormente, em humanos e em cães, a pancreatite está descrita como complicação de AHIM (Druml *et al.*, 1991; Mohr *et al.*, 2000; Neves *et al.*, 2013; Watson, 2015) e de outros processos imunomediados (Bréchnignac *et al.*, 1996; Masoodi, 2014). No presente estudo, registou-se um aumento nos valores de lipase DGGR e lipase DiG nos animais infetados com AHIM em relação aos animais sem AHIM, no entanto essas diferenças não foram estatisticamente significativas.

Em medicina humana está documentado o desenvolvimento de pancreatite como sequela de distúrbios hemolíticos agudos, principalmente na presença de hemólise massiva (Druml *et al.*, 1991). De forma similar, no presente trabalho os cães com grau de hemólise moderada a grave apresentaram valores de lipase DGGR e lipase DiG significativamente superiores aos animais sem hemólise ou com hemólise ligeira. A lipase DGGR é determinada através de um método colorimétrico, no entanto, em cães a sua concentração sérica não é significativamente influenciada pelo grau de hemólise da amostra (Graça *et al.*, 2005). Estes dados sugerem que na amostra testada, o grau de hemólise representou uma variável com influência no desenvolvimento de pancreatite enquanto complicação da babesiose canina. Em condições patológicas como a hemólise é ultrapassada a capacidade de captação celular e plasmática da hemoglobina, favorecendo o aumento da sua

concentração extracelular, que promove a sua ação enquanto proteína vasoativa, com capacidade oxidativa e citotóxica (Pérez *et al.*, 2015). Por norma, a hemopexina elimina o grupo heme, libertado pela hemoglobina, evitando os seus efeitos nocivos, contudo, perante situações de excessiva hemólise intravascular, a capacidade de ligação da hemopexina ao grupo heme é excedida. Nestas condições, o grupo heme funciona como promotor inflamatório, induzindo libertação de citocinas, recrutamento de células inflamatórias e produção de radicais de oxigénio que têm efeitos na microvasculatura pancreática promovendo a isquémia (Graça-Souza *et al.*, 2002; Saruc *et al.*, 2003; Abtahi *et al.*, 2007).

Contudo, Mhor e col. (2000) defendem que a hemólise massiva é pouco frequente em casos de babesiose canina. Resultados semelhantes foram obtidos no nosso estudo. Podemos concluir que apesar da hemólise contribuir para o processo de desencadeamento da pancreatite, não é a sua causa exclusiva, dado que são reconhecidos diversos mecanismos envolvidos na babesiose canina, com repercussões a nível sistémico e consequente afeção de vários órgãos.

4.4. Determinação da concentração sérica de CRP e Hp

Os processos inflamatórios resultam em alterações profundas das concentrações plasmáticas de proteínas de fase aguda, que estão relacionadas com a gravidade dos processos patológicos e permitem, por isso, identificar a presença e extensão dos mesmos, bem como monitorizar a resposta ao tratamento (Steel & Whitehead, 1994; Matijatko *et al.*, 2007). A CRP é considerada uma proteína de fase aguda “major”, com elevada sensibilidade em caso de infeção por babesiose, enquanto haptoglobina é considerada uma proteína de fase aguda moderada (Matijatko *et al.*, 2007).

Não se identificaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) nos valores da CRP e Hp independentemente da presença de infeção por *Babesia* spp., AHIM ou do grau de hemólise. Porém verificou-se que todos os animais apresentaram valores de CRP aumentados. Estes resultados estão em concordância com o estudo de Matijatko e col. (2007), no qual todos os cães com infeção por *B. canis* apresentavam valores séricos de CRP acima dos normais para a espécie.

A Hp é considerada um biomarcador que apresenta comportamento duplo, está elevada em processos inflamatórios e diminuída em situações de hemólise (Steel & Whitehead, 1994). No presente estudo não se observaram diminuições significativas na sua concentração nos cães com grau de hemólise superior.

4.5. Outros critérios

O presente estudo apresentou uma taxa de mortalidade baixa (6,1%; n=2), no grupo dos animais infetados.

Na Europa a taxa de mortalidade em cães infetados com *Babesia* spp. é mais elevada nos casos em que ocorrem complicações secundárias à babesiose, entre as quais pancreatite (Matijatko *et al.*, 2012), verificando-se taxas de mortalidade variáveis entre 1,5% e 20%. No presente estudo todos os animais com suspeita de pancreatite sobreviveram.

5. Conclusão

A espécie de *Babesia* mais prevalente na região centro de Portugal foi *B. canis*, conforme verificado previamente na região norte do país.

A CRP mostrou ser um biomarcador muito sensível de babesiose, estando aumentada em todos os animais infetados, no entanto inespecífico, uma vez que estava também aumentada em todos os cães não infetados analisados.

Os resultados obtidos sugerem a ocorrência de pancreatite como complicação relativamente frequente da babesiose canina. De acordo com os resultados obtidos, deve-se suspeitar de pancreatite nos animais infetados por *Babesia* spp., principalmente na presença de hemólise moderada a grave.

6. Referências Bibliográficas

- Abtahi, M., Uzan, M., and Souid, M. (2007) Hemolysis-induced acute pancreatitis secondary to kinked hemodialysis blood lines. *Hemodialysis International*. 11: 38–41.
- Ayoob, A.L., Hackner, S.G., and Prittie, J. (2010) Clinical management of canine babesiosis, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 20: 77–89.
- Birkenheuer, A.J., Neel, J., Ruslander, D., Levy, M.G., and Breitschwerdt, E.B. (2004) Detection and molecular characterization of a novel large *Babesia* species in a dog, *Veterinary Parasitology*. 124: 151–160.
- Bréchignac X., Pinède L., Laplace, *et al.* (1996) La pancréatite aigue, complication méconnue des hémolyses aigues intravasculaires?, *Rev médecine Interne*. 17: 172-173.
- Cardoso, L., Costa, Á., Tuna, J., *et al.* (2008) *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* infections in dogs from northern Portugal, *Veterinary Parasitology*. 156: 199–204.
- Cardoso, L., Yisaschar-Mekuzas, Y., Rodrigues, F.T., *et al.* (2010) Canine babesiosis in northern Portugal and molecular characterization of vector-borne co-infections, *Parasites & Vectors*. 3: 27.
- Criado-Fornelio, A., González-Del-Río, M.A., Buling-Saraña, A. and Barba-Carretero, J.C. (2003) Molecular characterization of a *Babesia gibsoni* isolate from a Spanish dog, *Veterinary Parasitology*. 117: 123–129.
- Daste, T., Lucas, M.N., and Aumann, M. (2013) Cerebral babesiosis and acute respiratory distress syndrome in a dog, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 23: 615–623.
- Druml W., Laggner A.N., Lenz K., Grimm G. and Schneeweib B. (1991) Pancreatitis in acute hemolysis, *Ann Hematology*. 63: 39-41.
- Gentilini F., Mancuni D., Dondi F., *et al.* (2005) Validation of a human immunoturbidimetric assay for measuring canine C-reactive protein. 15th ECVIM-CA Congress, Glasgow, Scotland.
- Gopegui R., Peñalba, B., Goicoa, A., Espada, Y., Fidalgo, L.E., and Espino, L. (2007) Clinico-pathological findings and coagulation disorders in 45 cases of canine babesiosis in Spain, *Veterinary Journal*. 174: 129–132.

- Graca, R., Messick, J., McCullough, S., Barger, A., and Hoffmann, W. (2005) Validation and diagnostic efficacy of a lipase assay using the substrate 1,2-o-dilauryl-rac-glycero glutaric acid-(6' methyl resorufin)-ester for the diagnosis of acute pancreatitis in dogs, *Veterinary Clinical Pathology*. 34: 39–43.
- Graça-Souza, A.V., Arruda, M. A.B., Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., and Oliveira, P.L. (2002) Neutrophil activation by heme: Implications for inflammatory processes, *Blood*. 99: 4160–4165.
- Imre, M., Farkas, R., Ilie, M.S., Imre, K., and Dărăbuș, G. (2013) Survey of babesiosis in symptomatic dogs from Romania: Occurrence of *Babesia gibsoni* associated with breed, *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 4: 500–502.
- Inokuma, H., Yoshizaki, Y., Matsumoto, K., *et al.* (2004) Molecular survey of *Babesia* infection in dogs in Okinawa, Japan, *Veterinary Parasitology*. 121: 341–346.
- Ionita, M., Mitrea, I. L., Pfister, K., Hamel, D., Buzatu, C.M., and Silaghi, C. (2012) Canine babesiosis in Romania due to *Babesia canis* and *Babesia vogeli*: A molecular approach, *Parasitology Research*. 110: 1659–1664.
- Irwin, P.J. (2009) Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control, *Parasites & Vectors*. 2 Suppl 1, S4.
- Irwin, P.J. (2010) Canine Babesiosis, *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*. 40: 1141–1156.
- Jacobson, L. S. (2006) The South African form of severe and complicated canine babesiosis: Clinical advances 1994-2004, *Veterinary Parasitology*. 138: 126–139.
- Jefferies R., Ryan U.M., Muhlnickel C.J., and Irwin P.J. (2003) Two species of canine *Babesia* in Australia: detection and characterization by PCR, *Journal Parasitology*. 89: 409–412.
- Kidd, L., Rasmussen, R., Chaplow, E., Richter, K., Hill, S., and Slusser, P.G. (2014) Seasonality of immune-mediated hemolytic anemia in dogs from southern California, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 24: 311–315.
- Kirtz, G., Leschnik, M., Hooijberg, E., Tichy, A., and Leidinger, E. (2012) In-clinic laboratory diagnosis of canine babesiosis (*Babesia canis canis*) for veterinary practitioners in Central Europe, *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere - Heimtiere*. 40: 87–94.
- Kjemtrup, A. M., and Conrad, P. A. (2000) Human babesiosis: An emerging tick-borne disease, *International Journal for Parasitology*. 30: 1323–1337.

- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., and Carreno, R.A. (2006) *Babesia conradae*, sp. Nov., a small canine *Babesia* identified in California, *Veterinary Parasitology*. 138: 103–111.
- Kook, P.H., Kohler, N., Hartnack, S., Riond, B., and Reusch, C.E. (2014) Agreement of serum spec cPL with the 1,2-o-dilauryl-rac-glycero glutaric acid-(6'-methylresorufin) ester (DGGR) lipase assay and with pancreatic ultrasonography in dogs with suspected pancreatitis, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 28: 863–870.
- Kubelová, M., Tkadlec, E., Bednář, M., Roubalová, E., and Šíroký, P. (2011) West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia, *Veterinary Parasitology*. 180: 191–196.
- Maia, C., Ramos, C., Coimbra, M., *et al.* (2014) Bacterial and protozoal agents of feline vector-borne diseases in domestic and stray cats from southern Portugal, *Parasites & Vectors*. 7: 115.
- Maia C., Almeida B., Coimbra M. (2015) Bacterial and protozoal agents of canine vector-borne diseases in the blood of domestic and stray dogs from southern Portugal, *Parasites and Vectors*, *in press*. doi:10.1186/s13071-015-0759-8.
- Martinez-Subiela S. and Cero'n J.J. (2005) Analytical validation of commercial assays for haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid in dogs, *Arch Med Vet*. 37: 61–66
- Masoodi I. (2014) The simultaneous incidence of acute pancreatitis and autoimmune hemolytic anemia : a rare duo in a patient with SLE, *German Medical Science*. 12: 1–3.
- Máthé, A., Vörös, K., Papp, L., and Reiczigel, J. (2006) Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases), *Acta Veterinaria Hungarica*. 54: 367–385.
- Matijatko, V., Kiš, I., Torti, M., *et al.* (2009) Septic shock in canine babesiosis, *Veterinary Parasitology*. 162: 263–270.
- Matijatko, V., Mrljak, V., Kiš, I., *et al.* (2007) Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*, *Veterinary Parasitology*. 144: 242–250.
- Möhr, A.J., Lobetti, R.G., and Van der Lugt, J.J. (2000) Acute pancreatitis: a newly recognised potential complication of canine babesiosis, *Journal of the South African Veterinary Association*. 71: 232–239.

- Neves J., Cangelose N., Steiner J., Suchodolski J., Warman S. and Tappin S. (2013) Serum Canine Pancreatic Lipase Immunoreactivity Concentrations in Dogs with IMHA. *In: British Small Animal Veterinary Association Congress 2013*. BSAVA, Birmingham, 4 a 7 de Abril de 2013.
- Paulauskas, A., Radzijeuskaja, J., Karvelienė, B., *et al.*, (2014) Detection and molecular characterization of canine babesiosis causative agent *Babesia canis* in the naturally infected dog in Lithuania, *Veterinary Parasitology*. 205: 702–706.
- Pérez, S., Pereda, J., Sabater, L., and Sastre, J. (2015) Pancreatic ascites hemoglobin contributes to the systemic response in acute pancreatitis, *Free Radical Biology and Medicine*. 81: 145–155.
- Piek, C. J., Teske, E., Leeuwen, M. W. v., and Day, M. J. (2012) Good agreement of conventional and gel-based direct agglutination test in immune-mediated haemolytic anaemia, *Acta Veterinaria Scandinavica*. 54: 10.
- René-Martellet, M., Chêne, J., Chabanne, L., Chalvet-Monfray, K., and Bourdoiseau, G. (2013) Clinical signs, seasonal occurrence and causative agents of canine babesiosis in France: Results of a multiregional study, *Veterinary Parasitology*. 197: 50–58.
- René-Martellet, M., Lebert, I., Chêne, J., *et al.* (2015) Diagnosis and incidence risk of clinical canine monocytic ehrlichiosis under field conditions in Southern Europe, *Parasites & Vectors*. 8: 1–10.
- Ruau, C.G. (2003) Diagnostic Approaches To Acute Pancreatitis, *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 18: 245–249.
- Salem, N.Y., and Farag, H.S. (2014) Clinical, Hematologic, and Molecular Findings in Naturally Occurring *Babesia canis vogeli* in Egyptian Dogs, *Veterinary Medicine International*. 2014, 270345.
- Saruc, M., Yuçeyar, H., Turkel, N., *et al.* (2007) The role of heme in hemolysis-induced acute pancreatitis, *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 13: 67–72.
- Saruc, M., Yuçeyar, H., Turkel, N., *et al.* (2003) An experimental model of hemolysis-induced acute pancreatitis, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 36: 879–886.
- Schaarschmidt, D., Gilli, U., Gottstein, B., *et al.* (2013) Questing *Dermacentor reticulatus* harbouring *Babesia canis* DNA associated with outbreaks of canine babesiosis in the Swiss Midlands, *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 4: 334–340.

- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., and Morrison, D.A. (2012) *Babesia*: A world emerging, *Infection, Genetics and Evolution*. 12: 1788–1809.
- Simões, P. B., Cardoso, L., Araújo, M., Yisaschar-Mekuzas, Y., and Baneth, G. (2011) Babesiosis due to the canine *Babesia microti*-like small piroplasm in dogs-first report from Portugal and possible vertical transmission, *Parasites & Vectors*. 4: 50.
- Solano-Gallego, L., and Baneth, G. (2011) Babesiosis in dogs and cats-Expanding parasitological and clinical spectra, *Veterinary Parasitology*. 181: 48–60.
- Solano-Gallego, L., Trotta, M., Carli, E., Carcy, B., Caldin, M., and Furlanello, T. (2008) *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* clinicopathological findings and DNA detection by means of PCR-RFLP in blood from Italian dogs suspected of tick-borne disease, *Veterinary Parasitology*. 157: 211–221.
- Sousa, K. C.M., André, M.R., Herrera, H.M., *et al.* (2013) Molecular and serological detection of tick-borne pathogens in dogs from an area endemic for *Leishmania infantum* in Mato Grosso do Sul, Brazil, *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 22: 525–31.
- Steel, D.M., and Whitehead, A.S. (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein, *Immunology Today*. 15: 81–88.
- Uilenberg, G., Franssen, F. F., Perié, N.M., and Spanjer, A.A. (1989) Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature, *The Veterinary Quarterly*. 11: 33–40.
- Vilhena, H., Martinez-Díaz, V.L., Cardoso, L., *et al.* (2013) Feline vector-borne pathogens in the north and centre of Portugal, *Parasites & Vectors*. 6: 99.
- Walker J.F., Cronin C. J., Donohoe J.F., Carmody M. and O'Dwyer W.F. (1981) Acute severe intravascular haemolysis: an unrecognised cause of pancreatitis, *British Medicine journal*. 282:1929.
- Walter G.L., McGraw P., Tvedten H.W. (1992) Serum lipase determination in the dog: comparison of a titrimetric method with an automated kinetic method. *Vet Clin Pathol*. 21: 23–27.
- Willard M.D. and Tvedten H. (1999) *Small Animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 4th Ed. St Louis Missouri: Saunders.
- Watson, P. (2015) Pancreatitis in dogs and cats: definitions and pathophysiology, *Journal of Small Animal Practice*. 56: 3–12.

Xenoulis, P. G. (2015) Diagnosis of pancreatitis in dogs and cats, *Journal of Small Animal Practice*. 56: 13–26.

Zahler, M., Rinder, H., Schein, E., and Gothe, R. (2000) Detection of a new pathogenic *Babesia microti-like* species in dogs, *Veterinary Parasitology*. 89: 241–248.