



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE SANGUE
PERIFÉRICO E ESPLÊNICO PARA DIAGNÓSTICO DE
BABESIOSE EQUINA**

LÍVIA ARAÚJO DA FONSECA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE SANGUE
PERIFÉRICO E ESPLÊNICO PARA DIAGNÓSTICO DE
BABESIOSE EQUINA**

LÍVIA ARAÚJO DA FONSECA

ORIENTADORA: ROBERTA FERRO DE GODOY

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL

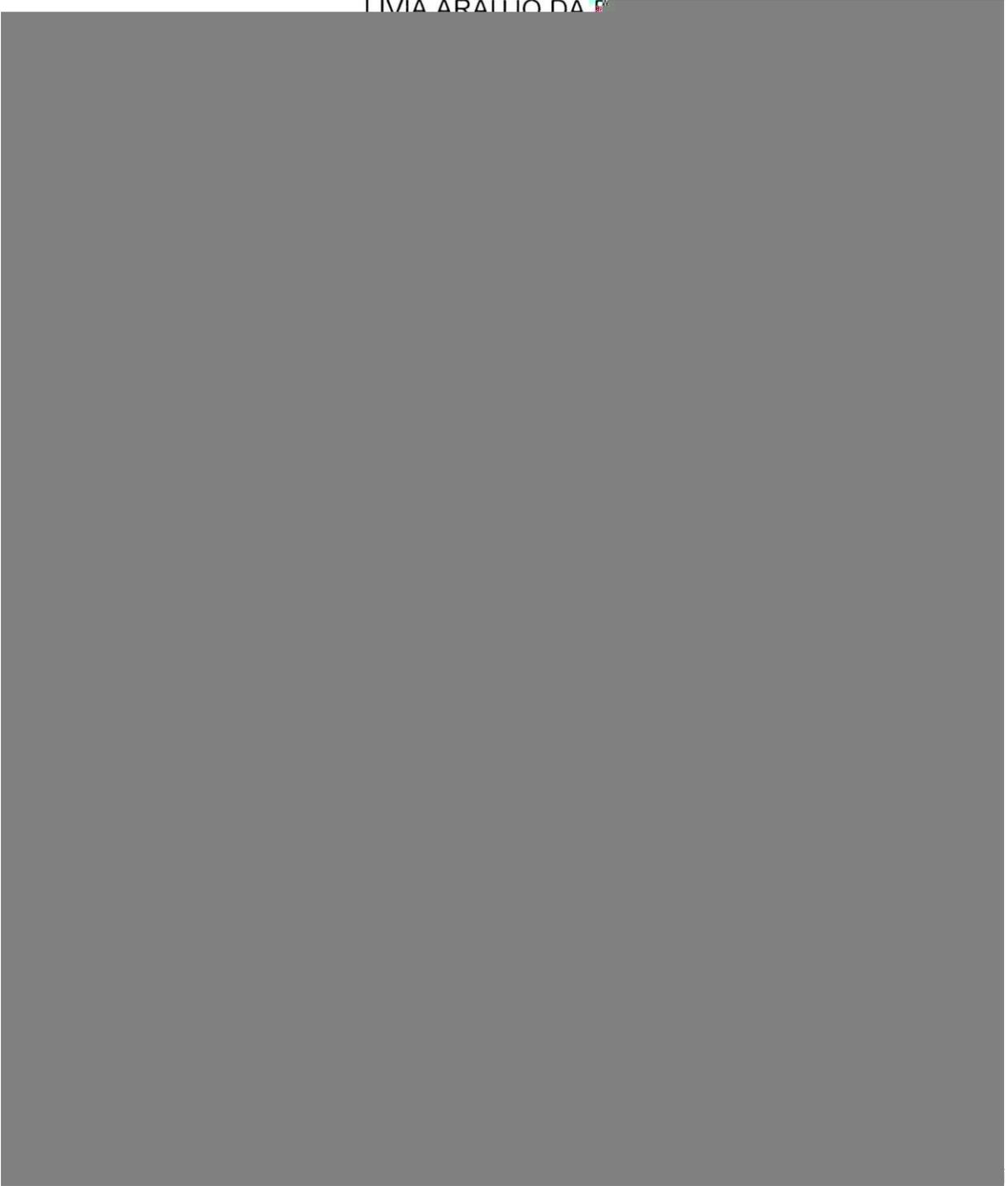
PUBLICAÇÃO: 052/2012

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO/2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DE
SANGUE PERIFÉRICO E ESPLÊNICO PARA DIAGNÓSTICO
DE BABESIOSE EQUINA**

LÍVIA ARAÚJO DA SILVA



REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FONSECA, L.A. **Reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue periférico e esplênico para diagnóstico de Babesiose Equina.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2012, 38p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo e comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

Fonseca, Livia Araújo

Reação em cadeia da polimerase (PCR) de sangue periférico e esplênico para diagnóstico de babesiose equina. / Livia Araújo da Fonseca

Orientação de Roberta Ferro de Godoy.
Brasília, 2012. 41p.: il.

Dissertação de mestrado (M) – Universidade de Brasília/
Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2012.

1. Babesiose Equina 2. PCR 3. Punção Esplênica
4. Equino. I. Godoy, R.F. II. Doutora

Agris / FAO

Dedico principalmente aos meus pacientes, ao meu marido, meus pais, meu irmão que muito me apoiaram e permitiram chegar até aqui.

Ao meu cavalo, a motivação de continuar.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado o dom da vida.

Aos meus pais, Aureliano e Eliane, que me educaram e apoiaram em todas as minhas decisões. Ao meu irmão pelo carinho e conselhos.

Ao meu marido, Frankson, que me ensinou a sempre lutar pelos meus objetivos. Pelo seu companheirismo e compreensão durante esses anos.

À minha orientadora Prof. Dra. Roberta Ferro de Godoy pela orientação, pela motivação e por me auxiliar em todos os obstáculos que surgiram durante este trabalho.

À Prof. Dra. Angela Patrícia por ter me cedido o laboratório e equipamentos para a realização de parte dos experimentos.

Ao Médico Veterinário Eduardo Ferreira da Fonseca pelo auxílio durante a realização dos experimentos

Ao casal, Alonso e Vanessa, por terem confiado em mim os cuidados de seus animais.

À minha amiga, Lívia, pela amizade e conselhos.

Aos comandantes do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda por terem me cedido animais para a realização do trabalho.

Aos professores e residentes do Hospital Veterinário de Grandes Animais da UnB (Hvetão) que disponibilizaram o material necessário para realização deste trabalho.

À CAPES pelo incentivo a pesquisa e apoio financeiro.

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca se tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO	1
REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
OBJETIVOS	16
REFERÊNCIAS.....	17

CAPÍTULO II

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESFREGAÇOS DE PUNÇÃO ESPLÊNICA E DE SANGUE PERIFÉRICO PARA DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE EQUINA.....	20
INTRODUÇÃO	20
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
RESULTADOS.....	22
DISCUSSÃO	23
CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27

CAPÍTULO III

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS PROVENIENTES DA PUNÇÃO ESPLÊNICA E SANGUE PERIFÉRICO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO SANGUE ESPLÊNICO E PERIFÉRICO PARA O DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE EM EQUINOS	28
INTRODUÇÃO	28
MATERIAL E MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO	36

CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS.....	39

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
----------------------------	----

ANEXOS

ANEXO I - ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS	42
ANEXO I.1 – Artigo publicado na revista ARS Veterinária (novembro/2011).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

Bpm	Batimentos por minuto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetracético
ELISA	Teste de ensaio imunoenzimático
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
IGg	Imunoglobulina G
Kg	Quilogramas
IFAT	Teste de imunofluorescência indireta
mg	Miligramas
mL	Mililitros
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PSI	Puro Sangue Inglês
TFC	Teste de fixação de complemento
µL	Microlitros
µm	Micrometros

LISTA DE QUADROS

		Página
Quadro 1	Animais utilizados na pesquisa de <i>Babesia caballi</i> e <i>Theileria equi</i> , tipo de confinamento e condições fisiológicas as quais se encontravam durante a punção esplênica e a colheita de sangue periférico proveniente da orelha, bem como o resultado do esfregaço de punção esplênica. Todos os animais foram negativos em relação ao esfregaço de sangue periférico.	23
Quadro 2	Animais utilizados na pesquisa de <i>Babesia</i> , tipo de confinamento, condições fisiológicas as quais se encontravam durante a punção esplênica e a colheita de sangue periférico proveniente da orelha.	31
Quadro 3	Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do sangue total e esplênico.	35

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Punção esplênica na região do 17 ^o espaço intercostal do antímero esquerdo.	22
Figura 2	Punção esplênica na região do 17 ^o espaço intercostal do antímero esquerdo..	33
Figura 3	Gel de agarose a 2% com DNA das amostras 1 e 2 após a eletroforese das amostras, sem terem passado pelo termociclador.	33
Figura 4	Gel de agarose a 2% com DNA das amostras 3 a 15 após a eletroforese das amostras, sem terem passado pelo termociclador.	34

RESUMO

A babesiose equina é uma doença que tem como agentes etiológicos a *Theileria equi* e a *Babesia caballi*. Essa enfermidade causa perdas diretas e indiretas. Os animais acometidos apresentam apatia, anemia hemolítica, hemoglobinúria, perda de desempenho atlético e pode levar a morte. Essa afecção provoca perdas econômicas devido à diminuição da comercialização de animais soropositivos e a restrição do trânsito dos mesmos. Após a fase aguda da doença, o animal não apresenta mais sinais clínicos, entretanto em casos de imunossupressão e estresse pode haver a reagudização da doença. O objetivo deste trabalho foi o de comparar os resultados obtidos com o uso das técnicas de esfregaço de sangue periférico, de punção esplênica e da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e de verificar uma metodologia simples e precisa para diagnóstico de babesioses em cavalos portadores subclínicos, submetidos ao esforço físico ou competições. Foram avaliados em um primeiro estudo quinze animais hípidos, sem sinais clínicos de babesiose, sem raça definida, com peso médio de 350 Kg, idade entre 6 a 13 anos, de ambos os sexos e com histórico de infestação por carrapatos. No esfregaço de sangue colhido da orelha, nenhum animal apresentou resultado positivo enquanto que na punção esplênica cinco animais foram positivos para a presença de *Babesia caballi* ou *Theileria equi*. O esfregaço da punção esplênica parece ser mais eficaz em detectar casos latentes de babesiose em equinos. No segundo estudo foi colhido o sangue do baço, da ponta de orelha e da veia jugular de quinze animais hípidos para a confecção de esfregaços sanguíneos e PCR. Foram utilizados para este experimento equinos, machos e fêmeas, de diversas raças com massa aproximada de 450 kg e idade entre oito a dezesseis anos provenientes de centros equestres. Todos os animais foram negativos no esfregaço de sangue periférico e apenas um foi positivo na punção esplênica. Os resultados da PCR do sangue periférico e esplênico apresentaram baixa concordância o que corrobora com a necessidade de se utilizar mais de uma técnica para diagnosticar animais subclínicos.

Palavras-chave: Babesiose equina, Punção Esplênica, Diagnóstico

ABSTRACT

Equine babesiosis is a disease that has as etiologic agents *Theileria equi* and *Babesia caballi*. This illness provokes direct and indirect losses. The sick animals show athletic performance fall, apathy, hemolytic anemia, hemoglobinuria and death. Babesiosis causes fall of the commercialization of seropositive animals and restricted movement of those. After acute phase, the animal stops to show clinical signs, but in situations of immunosuppression and stress the disease returns to be acute. The objective of this work was to compare the efficacy of these two techniques and to search for a simple and more precise diagnostic method for subclinical babesiosis in horses submitted to physical effort or competitions. Then, splenic puncture and peripheral blood smear were compared. In a first study, fifteen healthy horses, without clinical signs of babesiosis, median weight 350 Kg, age between six to thirteen years, both genders and with an history of tick infestation were used. Five animals were positive for *Babesia caballi* or *Theileria equi*, in splenic puncture and none in blood smear. Both methods were little invasive, safe and easy to do, but the splenic puncture smear seems to be more efficacious to detect chronic babesiosis in horses. In a second study, equines, both genders, median weighting 400 to 450 kg, aged 8 to 16 years old and from equestrian centers were used in this experiment. All animals were negatives for the presence of the etiologic agent on blood smears from the peripheral blood, only one were positive on the spleen puncture. The results of the PCR of the peripheral blood and the spleen blood had low concordance what support the necessity to use more than one technique to diagnose subclinical animals.

Keywords: Equine babesiosis, Spleen puncture, Diagnostic

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

A babesiose é uma doença intraeritrocitária de mamíferos, transmitida por carrapatos e possui como agentes etiológicos os protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria*. Essa doença tem grande importância no meio equestre, pois é uma das principais doenças parasitárias que acometem os cavalos, gera prejuízos econômicos e leva a diminuição do rendimento atlético dos equinos. A babesiose restringe a comercialização de animais e a proibição do trânsito de cavalos soropositivos em alguns países como os Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão e alguns países da Europa e da América Latina. O agente etiológico tem como vetores carrapatos das seguintes espécies: *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*. Países que possuem os vetores e que não apresentam a doença de forma endêmica controlam a entrada de possíveis animais infectados, pois estes após a fase aguda da doença se tornam portadores assintomáticos do parasita, mas apresentam anticorpos e ocasionalmente há a visualização do protozoário no sangue periférico por microscopia óptica no esfregaço em lâmina corada.

A babesiose equina causa diversos prejuízos como mortalidade, morbidade, despesas com tratamentos e restrição do mercado internacional de equinos pelo risco da introdução do parasito em áreas livres do mesmo. A distribuição geográfica da doença está relacionada à presença do vetor e este é predominante em regiões tropicais e subtropicais. Na fase aguda da babesiose o diagnóstico clínico não é conclusivo, entretanto o diagnóstico parasitológico já possui maior sensibilidade e especificidade neste período da patologia. Durante a fase crônica o diagnóstico parasitológico não é recomendado. No Brasil, a babesiose é apresentada de forma endêmica e com poucos casos da doença clínica. Equinos provenientes de regiões não endêmicas quando são levados para áreas endêmicas acabam apresentando a doença clinicamente resultando em um aumento da quantidade de mortes pela babesiose.

A doença aguda é caracterizada por anemia hemolítica, febre, icterícia, hemoglobinúria e pode levar o animal a morte. Animais infectados que sobrevivem a doença aguda se tornam portadores crônicos. Como os animais portadores representam um potencial contínuo na transmissão da doença por isso são

realizados, além dos testes sorológicos, medidas de controle que incluem quarentena e controle de carrapatos. Estes procedimentos afetam negativamente o mercado internacional de equinos e a participação em competições equestres no exterior.

A utilização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), da Punção Esplênica e do Esfregaço de Sangue Periférico neste trabalho teve como objetivo avaliar a concordância entre os resultados dos testes e verificar uma metodologia simples e precisa para diagnóstico de babesiose em equinos subclínicos.

REFERENCIAL TEÓRICO

A babesiose equina é uma das principais enfermidades dos cavalos que mais provocam perdas econômicas devido a restrições ao trânsito de animais soropositivos entre países endêmicos e países que possuem o vetor e não possuem a doença. Estados Unidos, Canadá, Austrália, Japão, alguns países da América Latina e da Europa restringem a entrada desses animais. A doença após a fase aguda torna os cavalos portadores do parasito sem que haja a manifestação clínica da enfermidade e por esse motivo se tornam os principais disseminadores da doença. A presença do parasito pode ser visualizada em animais portadores através do exame de esfregaço sanguíneo ou pela presença de anticorpos em exames sorológicos (NIZOLI, 2005). Animais portadores possuem pouca quantidade do parasito nas hemácias e o mesmo pode não ser visualizado em esfregaços sanguíneos (CAMACHO et al., 2005).

Os principais agentes etiológicos da babesiose são protozoários do gênero *Babesia* e *Theileria*. Essa doença tem como características ser intraeritrocitária e ter como vetor os carrapatos (ZAUGG, 2006).

No Brasil, a babesiose tem caráter endêmico e com poucos casos da doença clínica, entretanto animais de áreas não endêmicas quando são levados a áreas que possuem o parasito podem desenvolver a doença clínica o que resulta no aumento das mortes por essa doença (BALDANI et al., 2006). A *Theileria equi* é considerada a mais patogênica dos dois parasitos e causa o maior número de casos de hemoglobinúria e mortes. A *Babesia caballi* causa uma síndrome mais persistente caracterizada por febre e anemia (CAMACHO et al., 2005).

A babesiose possui manifestações clínicas variadas e a forma subclínica pode ocorrer, animais portadores em treinamento mais intenso podem desenvolver a forma clínica da doença. A doença é caracterizada por febre, icterícia, anemia, hepatomegalia, esplenomegalia e hemoglobinúria (CAMACHO et al., 2005).

A doença por causar prejuízos econômicos diretos e indiretos e pela capacidade de animais portadores transmitirem a doença tem exigido preocupação em conseguir diagnósticos rápidos e eficazes. O diagnóstico pode ser feito a partir dos sinais clínicos e da avaliação de alguns parâmetros do hemograma como contagem de eritrócitos, hematócritos e contagem diferencial de leucócitos. Esfregaços sanguíneos para detecção do parasito são comumente utilizados para

realização do diagnóstico, mas esse tipo de exame se mostrou insuficiente para a detecção de animais portadores pela dificuldade de encontrar o parasita na circulação. Por esse motivo podem ser utilizados a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), o Teste de Imunofluorescência Indireta, o Teste de Fixação de Complemento (TFC) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) (NIZOLI, 2005).

A taxonomia dos parasitos causadores da babesiose permanece não esclarecida, entretanto o parasito pode ser definido como pertencente ao filo *Apicomplexa*. As dificuldades aparecem na classificação quanto à ordem, família e gênero. *Babesia caballi* é classificada como uma verdadeira *Babesia*, visto que no hospedeiro vertebrado só apresenta um ciclo intraeritrocitário e o mesmo só se divide em dois merozoítos (BRÜNING, 1996). A *Theileria equi* apresenta divisão em quatro merozoítos dentro dos eritrócitos, uma parte do ciclo ocorre dentro de linfócitos antes do ciclo eritrocitário como ocorre nas espécies de *Theileria*, a transmissão pelos carrapatos é transtádial (UILEINBERG, 2006), ou seja, o carrapato infectado em uma determinada fase da vida pode transmitir a Babesiose em outra fase e não ocorre a transmissão transovariana na fêmea do carrapato (BRÜNING, 1996).

O gênero *Babesia* pertence ao filo *Apicomplexa*, classe *Sporozoasida*, ordem *Eucoccidiorida*, subordem *Piroplasmorina* e família *Babesidae*. A *Babesia equi* foi reclassificada como *Theileria equi* por possuir mais semelhanças com este gênero (KUTSCHA, 2008). O carrapato se contamina quando ingere células sanguíneas contendo gametócitos do parasito (UILENBERG, 2006). O ciclo de vida da *Babesia* spp. pode ser separada em três fases. A gamogonia inicial é uma fase sexual em que os gametas se formam e se unem dentro do intestino do carrapato infectado. Essa fase é seguida pela esporogonia, uma reprodução assexuada que ocorre na glândula salivar do carrapato. Essa fase é seguida pela merogonia, uma fase com divisão assexuada que ocorre dentro do eritrócito do equino ou no caso da *Theileria equi* que ocorre dentro dos linfócitos (KUTSCHA, 2008).

A *Theileria equi* é menor que a *Babesia caballi*, a primeira mede menos que 3 μm e a segunda é maior do que 3 μm , e possui um estágio de esquizogonia nos linfócitos do equino o que a difere das outras *Babesia* spp. O parasita desenvolve em esporozoítos dentro de cinco dias na glândula salivar do carrapato infectado, o que ocorre somente após o carrapato infectado se instalar no hospedeiro vertebrado. O parasito é transmitido pela introdução da saliva contaminada no equino. Após a transmissão o carrapato infectado perde a infecção pela *T. equi*. De

doze a catorze dias após a primeira picada, os merozoítos começam a invadir eritrócitos. Trofozoítos, formas divididas e merozoítos ocorrem no estágio intra-eritrocitário. Os merozoítos podem se apresentar aos pares dois ou quatro, na forma de cruz de malta e são vistos como parasitas piriformes dentro do eritrócito. (KUTSCHA, 2008). Esse protozoário não apresenta transmissão transovariana na fêmea do carrapato e também não há transmissão transplacentária nas éguas no final da gestação (RONCATI, 2006). A *T. equi* é considerada a mais patogênica e é responsável pelo maior número de mortes e hemoglobinúria (ZAUGG, 2006). Segundo Salim et al. (2008) a infecção por *T. equi* não pode ser totalmente eliminada com o uso de fármacos.

A *Babesia caballi* se desenvolve somente nos eritrócitos do hospedeiro vertebrado, se divide em fissão binária (NIZOLI, 2005) e é visualizada dentro das hemácias geralmente em dois merozoítos piriformes formando um ângulo agudo, podendo ser encontrado em pares. A *B. caballi* causa febre mais persistente e anemia (ZAUGG, 2006). Após a fêmea do carrapato ingerir a *B. caballi* ocorre a penetração e a multiplicação nas células epiteliais do intestino (ZAPF; SCHEIN, 1994) onde toma a forma de clava. Logo após essa fase, elas chegam a hemocele e se multiplicam nas células de Malpighi nos ovários e conseqüentemente infectam as glândulas salivares. O carrapato adulto se infecta, mas não transmite a doença. A transmissão ocorre pela infecção transovariana, ou seja, somente as gerações descendentes do carrapato fêmea infectado serão vetores da doença (RONCATI, 2006).

Os vetores dos parasitos causadores da babesiose pertencem à subordem *Ixodides* e à família *Ixodidae* e são popularmente conhecidos como carrapatos (NIZOLI, 2005) e são das seguintes espécies: *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* e são endêmicos de áreas mais tropicais e subtropicais do mundo (ALI et al., 1996). O carrapato se contamina pela ingestão de células sanguíneas que possuem o parasito, a forma contaminante são gametócitos que se diferenciam em gametas femininos e masculinos no intestino do vetor e estes se fundem e se tornam zigotos móveis (UILEMBERG, 2006).

No Brasil, o carrapato *Dermacentor nitens* é vetor da *B. caballi* e o *Rhipicephalus microplus* pode ser vetor da *T. equi* (NIZOLI et al., 2008). Pesquisas revelaram elevadas infestações de carrapatos *Anocentor nitens*, *Boophilus microplus*

e *Amblyoma canjennense* em equinos da América do Sul associados a casos de babesiose (PIOTTO, 2009).

Outra fonte de transmissão da babesiose é a inoculação de sangue contaminado e por essa razão a doença pode ser transmitida iatrogenicamente e suspeita-se que possa ocorrer a infecção pelos parasitas através de fômites e insetos hematófagos (RONCATI, 2006). A transmissão mecânica da doença não ocorre durante a inoculação de sangue contaminado por moscas ou pela absorção de sangue após a regurgitação na superfície de contato pelo inseto (ALI et al., 1996).

As éguas portadoras podem transmitir a *Theileria equi* para suas crias e isso pode resultar em abortos e babesiose neonatal, mas pesquisas sugeriram que o potro pode nascer como portador e aparentar ser saudável (ALLSOPP et al., 2007). Potros portadores podem não desenvolver a doença enquanto este estiver protegido pelos anticorpos maternos (ROBINSON, 1992).

A babesiose possui um período de incubação de cerca de oito a dez dias (PIOTTO, 2009) e a doença clínica pode ocorrer de cinco a vinte e oito dias após a colocação de animais susceptíveis em áreas endêmicas com outros equinos infectados (MORRIS, 2000). Em infecções por *B. caballi* o nível de parasitemia pode chegar a 1% de hemácias parasitadas e dificilmente o animal morre de anemia, já a *T. equi* pode alcançar 7% de hemácias parasitadas e em animais imunodeprimidos ou sem contato prévio com o parasito esse nível de parasitemia pode chegar a 80% podendo levar o animal a morte por anemia (PIOTTO, 2009).

Os principais sinais clínicos da babesiose são febre, icterícia, anemia hemolítica, apatia, anorexia, hemoglobinúria, ascite e edema nas extremidades (ROBINSON, 1992). O primeiro sinal clínico a aparecer após o período de incubação do parasito é o aumento da temperatura corporal e este é associado à presença do parasito na circulação sanguínea (RONCATI, 2006). Outros sinais como lacrimejamento, incoordenação motora, edema de pálpebra, secreção nasal mucosa e decúbito frequente também podem estar presentes (ZAUGG, 2006). Pode ocorrer aparecimento de desconforto abdominal em animais com babesiose devido ao depósito de bilirrubina nas serosas do trato gastrointestinal (THOMASSIAM, 2005). Infecções pela *Babesia caballi* geralmente não causam hemoglobinúria e a urina é de coloração amarela escura (ZAUGG, 2006). A maioria das alterações anatomopatológicas causadas pela *Babesia caballi* ocorre devido pela estase das

hemácias em capilares e pequenos vasos o que resulta na disfunção de diversos órgãos (CANOLA et al., 2007).

A doença crônica possui como principal sinal clínico uma discreta anemia que possui como causa a baixa parasitemia que mesmo assim ainda provoca queda de rendimento em animais atletas. Em geral, animais que apresentam perda de desempenho atlético são tratados com fármacos babesicidas mesmo sem o diagnóstico final (PIOTTO, 2009). A doença pode ser reagudizada através da imunossupressão seja por restrição alimentar ou uso de corticoesteróides e a anemia pode apresentar diferentes graus e os sinais clínicos podem se agravar (NOGUEIRA et al., 2005).

À necropsia, o sangue de animais afetados apresenta-se aquoso e o plasma sanguinolento. Geralmente os tecidos encontram-se edemaciados e amarelados. O baço apresenta-se aumentado, com o parênquima amolecido e com uma coloração vermelho escura. Pode haver aumento de linfonodos. O fígado pode ser encontrado hipertrofiado, com coloração castanha amarelada e a bile com coloração verde escura. Os pulmões podem estar edemaciados e a urina dentro da vesícula urinária está corada em vermelho e os rins podem apresentar pigmentos de hemoglobina. Microscopicamente há anemia hemolítica intensa, nefrose hemoglobinúrica, necrose centrolobular e paracentral do fígado, edema e líquidos excessivos nos espaços peritoneal, pericárdica e pleural. O parasita pode ser encontrado nos capilares cerebrais e na coróide óptica (JONES et al., 2000). Os vasos hepáticos geralmente contém coágulos amarelados (ZAUGG, 2006).

Animais portadores do parasito são protegidos pela contínua produção de anticorpos pelo sistema imune que fica constantemente estimulado pelos parasitos remanescentes (KNOWLES et al, 1994).

As infecções por *Theileria equi* são caracterizadas pelo desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva, sendo a patogenia da enfermidade determinada principalmente pela lise de eritrócitos durante a invasão e multiplicação do parasita. Durante a fase crônica não há muita diferença entre o hematócrito de equinos não infectados e de animais portadores de *Theileria equi*. A fase crônica da doença ocorre devido à adaptação do parasito as defesas naturais, ou seja, a capacidade do parasito escapar da resposta imune através da variação dos seus antígenos de superfícies. Quadros crônicos podem se tornar agudos em situações de stress, treinamento, imunossupressão e doenças intercorrentes (SOUZA et al., 2007). A

reagudização da doença ocorre principalmente em animais mantidos em confinamento e raramente atingem animais criados a campo. Essa reagudização é determinada pela diminuição da taxa de anticorpos e em animais confinados a baixa infestação por carrapatos impede a manutenção dos níveis de anticorpos adequados para a proteção desses animais (BOTTEON et al., 2005).

Quando equinos não portadores são infectados desenvolvem a fase aguda da doença, que cursa com febre, anemia, petéquias de mucosas, hemoglobinúria e icterícia (NIZOLI, 2005).

As hemácias parasitadas podem se romper e causar uma intensa hemólise ou podem também ser eliminadas do organismo através do sistema mononuclear fagocitário. A icterícia aparece nos tecidos devido ao depósito de bilirrubina proveniente da hemoglobina liberada na lise das hemácias parasitadas (RONCATI, 2006).

Na babesiose, o parasito invade as hemácias no estágio infectivo de esporozoíta. Quando ocorre a invasão há uma ativação do trajeto de complemento alternativo. As hemácias infectadas incorporam antígenos da *Babesia* em suas membranas celulares o que leva aos macrófagos à reconhecê-las e ao sistema mononuclear-fagocítico a recolhê-las. A resposta mediada pelas células anticorpo-dependente pode destruir esses eritrócitos infectados. Os macrófagos e linfócitos citotóxicos também podem reconhecer o complexo antígeno-anticorpo opsonizante presente nas membranas das hemácias infectadas e este fator pode ser determinante quando a quantidade de hemácias infectadas é pequena (TIZARD, 1998). As respostas imunes específicas são importantes no controle de infecções por *T. equi*, mas não se sabe como funciona o mecanismo de defesa. Sabe-se que existe uma correlação entre o grau de parasitemia e a inibição da migração de leucócitos na infecção por *T. equi*. Os anticorpos contra *T. equi* podem ser detectados por métodos sorológicos ao redor de quinze a vinte dias após o início da infecção (NIZOLI, 2005).

A variação de susceptibilidade entre animais da mesma espécie pode ser explicada através da variação das características celulares ou da produção de citocinas que são mais ou menos eficientes dependendo da linhagem a qual o animal pertença (PIOTTO, 2009).

Os agentes etiológicos da babesiose esimulam tanto a imunidade inata quanto a adquirida, mas os mecanismos da imunidade inata ainda não estão

esclarecidos. Protozoários variam enormemente suas propriedades estruturais e bioquímicas, ciclos de vida e mecanismos patogênicos e por esse motivo estimulam respostas imunes adquiridas variadas. Anticorpos geralmente controlam os níveis de parasitas extracelulares na circulação e nos fluídos teciduais e já a resposta celular é direcionada contra parasitas intracelulares (PIOTTO, 2009).

O mecanismo principal de proteção contra protozoários dentro dos macrófagos é a imunidade mediada por células, principalmente aquela que ativa os macrófagos através das citocinas derivadas das células T CD4⁴⁺ Th1, principalmente o interferon gama que estimula a atividade microbicida dos fagócitos o que estimula a destruição intracelular dos organismos fagocitados. Os anticorpos direcionados contra os antígenos de superfície podem opsonizar, imobilizar ou aglutinar os parasitos. Os anticorpos junto com o complemento e células citotóxicas podem matá-los e alguns anticorpos podem inibir a replicação dos protozoários (PIOTTO, 2009).

As proteínas de superfície intraeritrocitário das *Babesias* tem importante participação na patogênese da doença devido ao seu papel no reconhecimento, ligação e penetração nas hemácias (PIOTTO, 2009).

Os anticorpos podem ser detectados por métodos sorológicos ao redor dos quinze a vinte dias e os isotipos envolvidos são da classe IgG(a) e IgG(b) no início da fase aguda da doença e IgG(t) ao final dessa fase (PIOTTO, 2009).

O baço tem como funções a fagocitose, a atividade citopoiética, como células linfóides e macrófagos, e a formação de anticorpos específicos (CUNHA et al., 1997). A esplenectomia em animais infectados pode desencadear a doença clínica, pois o baço possui grande parte dos anticorpos contra a babesiose (TIZARD, 1998). A esplenectomia funciona como um instrumento imunossupressor e permite a multiplicação da *Babesia*, o que facilita a sua detecção em esfregaços sanguíneos e geralmente resulta em uma grave reação clínica e morte (CUNHA et al., 1997).

A babesiose equina é endêmica de áreas tropicais e subtropicais do mundo e também em algumas áreas de clima temperado (BRÜNING, 1996). Os locais de incidência da doença estão relacionados com áreas de maior concentração de carrapatos (CANOLA et al., 2007). As condições climáticas de países tropicais permitem a existência de carrapatos que são parasitas importantes na manutenção da doença (RONCATI, 2006). Em áreas endêmicas a doença pode ser muito mais prevalente do que o número de casos clínicos (CAMACHO et al., 2005). No Brasil, a

babesiose é apresentada de forma endêmica e com poucos casos da doença clínica. Equinos provenientes de regiões não endêmicas quando são levados para áreas endêmicas acabam apresentando os sinais clínicos da doença o que resulta em um aumento da quantidade de mortes pela Babesiose (BALDANI et al., 2004). O Brasil apresenta alta prevalência em animais assintomáticos (NIZOLI et al, 2008).

A América do Sul e a América Central, com exceção da região sul da Argentina e do Chile, são áreas endêmicas da doença. No Brasil, estudos demonstraram que nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e oeste do Paraná há alta prevalência da doença e através do uso do teste de Fixação de Complemento foram identificados um grande número de animais contaminados em todas as regiões testadas (RONCATI, 2006).

Os Estados Unidos, Canadá, Japão, Inglaterra e Austrália não são considerados como países endêmicos da babesiose. A África, o sul e o leste da Europa são considerados como países onde essa doença ocorre (NIZOLI, 2005).

Trabalhos feitos em diferentes estados brasileiros demonstraram que as prevalências variam de 49,2% até 100% (NIZOLI et al., 2008). Foi observado que a prevalência varia 16,67%, 16,13% e 4,78% conforme o tipo de criação, extensivo, semiconfinado e confinado respectivamente (BOTTEON et al., 2002).

Os diagnósticos diferenciais são a anemia infecciosa equina e outras enfermidades que causam anemia hemolítica como doenças imunomediadas e intoxicações por oxidantes (MORRIS, 2000).

O diagnóstico pode ser feito por métodos diretos ou indiretos. O método direto inclui o exame clínico do animal com suspeita, principalmente se este possuir um histórico de infestação por carrapatos ou viagens recentes (BRÜNING, 1996). Os métodos diretos objetivam encontrar o antígeno ou o parasito. Esse método inclui o esfregaço de sangue periférico e o esfregaço proveniente da punção esplênica (PIOTTO, 2009). Enquanto que a presença de anticorpos específicos no soro sanguíneo é considerado um meio indireto (NIZOLI, 2005). Dependendo da gravidade da doença e os sinais clínicos apresentados o diagnóstico pode ser confundido com outras enfermidades. A gravidade da doença varia de acordo com o estado imune do animal e da cepa infectante do parasito (BRÜNING, 1996).

Como a parasitemia possui curta duração e geralmente não ocorre hemólise é mais comum que o diagnóstico seja obtido a partir da sorologia (MORRIS, 2000).

Durante a fase crônica da doença há necessidade de serem feitos exames para a detecção de anticorpos específicos ou antígenos. Nenhum dos testes existentes para o diagnóstico de babesiose possui todos os requerimentos de sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade, simplicidade, custo-benefício e rapidez (BRÜNING, 1996). Métodos sorológicos de diagnóstico são geralmente restringidos pelo limite de detecção de anticorpos e pela reação cruzada (ALHASSAM et al., 2005).

Não é possível a diferenciação da infecção entre *Theileria equi* e *Babesia caballi* tendo em base somente os sinais clínicos da doença (SALIM et al., 2008).

Nos casos em que o animal apresente sinais de doença aguda e antes que os sinais de hemoglobinúria estejam presentes, podem ser feitos esfregaços de sangue periférico para a pesquisa do parasito em microscopia óptica (BRÜNING, 1996). Durante a fase latente da doença, o parasito geralmente não é visualizado nos esfregaços de sangue periférico, pois a parasitemia se torna inferior a 0,01% o que torna a sensibilidade dessa técnica muito baixa aumentando assim o número de falsos negativos (NIZOLI, 2005). O exame possui baixa sensibilidade e essa varia de 32 a 38,8% (PIOTTO, 2009).

O esfregaço sanguíneo é feito colocando-se uma pequena quantidade de sangue sobre uma lâmina, formando uma película fina. Essa lâmina deve ser corada e levada ao microscópio óptico para análise (RONCATI, 2006). Em 1962, Watkins descreveu uma técnica para o diagnóstico de babesiose utilizando um frasco com ácido etilenodiamino-tetracético (EDTA) onde é colocado o sangue coletado, e logo após este é centrifugado a 1500 a 2000 rpm, e em seguida é realizado o esfregaço sanguíneo. Depois que o esfregaço estiver pronto, a lâmina é fixada com álcool metílico e corado com Giemsa. Se através dessa técnica não houver a demonstração do parasita, faz-se um esfregaço com o sangue aquecido a 45 a 50°C por vinte minutos e colocado diretamente em água destilada, e então esta amostra é tamponada com o corante sem o uso do ácido metílico. Essa técnica permite a hemólise das hemácias e permite que os parasitas sejam visualizados fora das células (COLES, 1984).

Os esfregaços sanguíneos, corados com Giemsa, geralmente são insuficientes para a detecção e identificação de *Theileria equi* e *Babesia caballi* durante infecções mistas e quando o equino apresenta baixa parasitemia (SALIM et al., 2008). Os merozoítos da *Babesia caballi* são visualizados conectados pela parte

posterior enquanto que os merozoítos da *Theileria equi* geralmente estão ligados em forma de tétrede ou “Cruz de Malta” (OIE, 2003). A *Theileria equi* e a *Babesia caballi* são difíceis de serem demonstrados no sangue periférico de equinos, pois estão presentes em apenas 1 a 8% dos eritrócitos. A *Babesia caballi* apresenta tamanho maior que a *Theileria equi* que mede menos de 2 µm e a *B. caballi* mede de 2,5 a 4 µm (COLES, 1984).

Estudos realizados demonstraram que o esfregaço sanguíneo pode detectar cerca de 32% dos animais infectados, já técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), detectam nas mesmas amostras um maior número de animais infectados pela *Theileria equi* ou pela *Babesia caballi* (RONCATI, 2006).

A PCR tem sido utilizada na identificação de infecções causadas por *Theileria equi*. Esse método de diagnóstico utiliza duas etapas de amplificação (nested-PCR) e o gene EMA-1 da *Theileria equi* como molde. Esse teste pode detectar parasitemias iguais a 0,000006% por possuir alta sensibilidade. Pode-se conseguir um diagnóstico diferencial para *Theileria equi* e *Babesia caballi* através do uso do multiplex-PCR em uma só reação (NIZOLI, 2005). A sensibilidade da PCR tem sido maior do que os métodos de detecção microscópica (ALHASSAM et al., 2005).

Inicialmente, o DNA deve ser extraído para poder ser ampliado pela Reação em Cadeia da Polimerase. Oligonucleotídeos iniciadores específicos tanto para *Babesia caballi* e *Theileria equi* são necessários para verificar a presença de DNA dos dois parasitas. Os produtos da PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose para visualização após coloração com Brometo de Etídio e luz ultravioleta (KUTSCHA, 2008).

A PCR possui três fases: desnaturação, anelamento e extensão. Na primeira, o calor, geralmente de 94°C, é utilizado para parar todas as reações enzimáticas e desnaturar o DNA de dupla fita em uma fita simples. No pareamento, a temperatura é diminuída para que os oligonucleotídeos liguem-se aos sítios apropriados no DNA molde. Nesta segunda etapa os oligonucleotídeos iniciadores se ligam corretamente as posições no alvo molde. Na terceira e última fase, a enzima polimerase sintetiza o segmento de DNA. A temperatura utilizada na fase de extensão é de 72°C e são utilizados cerca de trinta segundos para essa reação (RONCATI, 2006).

O Teste de Fixação de Complemento (TFC) é considerado um método de referência para a detecção de anticorpos contra *Theileria equi* desde 1969, mas esse teste resulta em um grande número de falsos negativos quando a quantidade

de anticorpos é muito baixa ou quando anticorpos anticomplemento estão presentes no soro (NIZOLI, 2005). Esse teste é muito específico para infecções causadas por *Babesia caballi* (KUTSCHA, 2008).

O teste funciona através da ligação do complemento durante a reação entre o anticorpo específico e o antígeno. Um dos principais problemas desse método de diagnóstico é a produção de antígeno para este teste já que para a produção é necessário que equinos sejam esplenectomizados e infectados com o parasita. Outro problema encontrado é a reação cruzada entre antígenos de *Babesia caballi* e *Theileria equi* e por estes motivos o TFC não pode ser considerado o melhor método para o diagnóstico de Babesiose (BRÜNING, 1996).

O TFC é um teste recomendado pela Organização Internacional de Epizotias (OIE) para detectar anticorpos específicos contra as espécies de *Babesia*. Em casos inconclusivos, a OIE recomendava que fosse feito o TFC combinado com o Teste de Imunofluorescência Indireta (IFAT) (KUMAR et al., 2003). Desde o ano de 2005, a OIE decretou que o método de diagnóstico para que se tenha a permissão para transportar internacionalmente é o Teste ELISA competitivo (cELISA), pois esse se sobrepôs ao TFC (RONCATI, 2006).

O Teste de Imunofluorescência Indireta (IFAT) é utilizado quando o TFC não é conclusivo. Nesse teste, o antígeno do parasita se liga ao vidro e reage com o soro sanguíneo. Os anticorpos ligados aos antígenos podem ser visualizados sob uma luz ultra violeta após a adição de fluoresceína (BRÜNING, 1996).

Vários métodos foram descritos para a realização do teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e quase todos mostraram possuir maior sensibilidade do que o TFC no diagnóstico de babesiose equina (SALIM et al., 2008). Entretanto, estudos indicam uma reação cruzada entre *Babesia caballi* e *Theileria equi* o que indica uma baixa especificidade do teste. As reações cruzadas ocorrem entre um agente infeccioso e anticorpos para organismos diferentes que possuam antígenos semelhantes (THRUSFIELD, 2004). Para contornar esse problema foi criado um teste de ELISA competitivo (cELISA) utilizando antígeno recombinante (KNOWLES, 1992) e foram feitas pesquisas para o desenvolvimento de antígenos específicos de cada espécie (BRÜNING, 1996). O cELISA é capaz de diagnosticar infecções latentes de animais infectados experimentalmente o que não era possível com o uso do TFC. Alguns estudos também demonstraram que o teste de ELISA possui maior

sensibilidade do que o Teste de Fixação de Complemento em infecções causadas pela *Babesia caballi* (BRÜNING, 1996).

Apesar das vantagens oferecidas pelo ELISA, o custo por amostra é muito alto (KUMAR et al., 2003).

Outro método de diagnóstico utilizado é a punção esplênica. As hemácias infectadas pela *Babesia caballi* ou pela *Theileria equi* incorporam os antígenos do parasito em suas membranas o que leva os anticorpos a opsonizarem as hemácias e as retirarem pelo sistema mononuclear fagocitário. O baço possui uma importante função na hemocaterese e por esse motivo apresenta maior concentração de hemácias parasitadas. A punção esplênica é realizada por meio da colheita de sangue diretamente do órgão. O animal deve ser contido, no décimo sétimo espaço intercostal esquerdo deve ser realizado tricotomia e antisepsia com P.V.P.I. e álcool iodado. Uma agulha 30x8 deve ser introduzida em um ângulo de noventa graus com a pele. O sangue, cerca de 1 mL, é aspirado por uma seringa com 0,1 mL de ácido etilendiamino-tetracético (EDTA). Após a colheita, o sangue é utilizado para a preparação de esfregaços em lâmina. Em seguida as lâminas são coradas pelo método Panótico e analisadas ao microscópio óptico (MOREIRA et al., 2007).

A maioria dos medicamentos utilizados atualmente são eficientes para o tratamento da babesiose ocasionada pela *Babesia caballi*, entretanto são quase ineficazes contra a *Theileria equi* o que torna esta última um grande problema para a criação de equinos, pois pode causar perda de rendimento, cólicas, abortos, além de prejudicar o comércio e o transporte internacional de equinos (RONCATI, 2006). Os fármacos utilizados para o tratamento da babesiose podem produzir graus de toxicidade renal, hepática e nervosa (NIZOLI, 2005).

O dipropionato de imidocarb é um medicamento eficaz na depressão da parasitemia e pode também erradicar a infecção pela *Babesia caballi* quando administrado na dose e no tempo adequado. A dose geralmente utilizada é de 2,2 mg/Kg intramuscular, sendo uma aplicação a cada vinte e quatro horas durante dois dias (MORRIS, 2000).

Contra a *Theileria equi* o dipropionato de imidocarb também pode ser utilizado na dose de 4 mg/Kg administradas quatro vezes e com intervalos de 72 horas. Em dosagens superiores podem ocorrer efeitos colaterais e estes podem ser semelhantes aos quadros de cólica como a insuficiência na secreção de enzimas

hepáticas fundamentais a digestão (NIZOLI, 2005). O uso de imidocarb para eliminar o estado portador da *Theileria equi* foi infrutífero (ZAUGG, 2006).

O dipropionato de imidocarb é um derivado das carbanildas. Parece atuar no núcleo do parasito alterando o número e o tamanho e promove também alterações no citoplasma. A biotransformação do fármaco é feita no fígado e este princípio ativo apresenta a tendência de se depositar no rim (FERREIRA et al., 2002).

Outros medicamentos utilizados no tratamento da Babesiose são: o azul de tripan, o diminazeno e a amicarbalida. Apesar desses fármacos serem utilizados satisfatoriamente no controle da doença, estes não são eficientes na eliminação da *Theileria equi*. Em dosagens elevadas, esses fármacos podem provocar distúrbios digestivos, afetar as funções neuromotoras e o sistema renal (NIZOLI, 2005).

A amicarbalida também é um derivado das carbanildas e tem a capacidade de reduzir a parasitemia e a mortalidade. A dose recomendada para equinos é de 8,8 mg/Kg por via intramuscular durante dois dias consecutivos (FERREIRA et al., 2002).

O diminazeno é um derivado das diamidinas e interfere na glicólise aeróbica da *Babesia* e atua também interferindo na síntese do ácido desoxirribonucleico (DNA). Os principais efeitos colaterais provocados são tremores musculares, diarreia, sialorréia, diminuição da pressão sanguínea e pulso acelerado. Esse princípio ativo não provoca alterações parassimpatomiméticos e danos hepáticos. O diminazeno não é tão eficiente contra a *Babesia caballi*. A dose em equinos é de 5 mg/Kg e deve ser administrada por via intramuscular por dois dias consecutivos (FERREIRA et al., 2002).

Após o tratamento os animais ainda permanecem com o parasito latente, pois nenhum dos tratamentos são totalmente eficazes para acabar com a presença do parasito no animal (RONCATI, 2006).

OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

Comparar os resultados obtidos com o uso das técnicas de esfregaço de sangue periférico, punção esplênica e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Verificar uma metodologia simples e rápida de diagnóstico da babesiose em equinos sem sinais clínicos.

Determinar a necessidade do uso de uma ou mais técnicas para diagnosticar animais portadores subclínicos.

REFERÊNCIAS

- ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**, n. 129, p. 43-49, 2005.
- ALI, S.; SUGIMOTO, C.; ONUMA, M. Equine Piroplasmiasis. **Journal Equine Science**, v.7,n.4, p. 67-77, 1996.
- ALLSOPP, M.T.E.P.; LEWIS, B.D.; PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently health foals. **OpenUp**, 2007.
- BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; BOTTEON, P.T.L.; TAKAKURA, F.S.; MASSARD, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**. v.34, n. 5, p. 1525-1529, 2004.
- BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z.; RASO, T.F.; PINTO, A.A. Serodiagnosis of *Babesia equi* in horses submitted to exercise stress. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2006.
- BOTTEON, P.T.L., BOTTEON, R.C.C.M., LINHARES, G.F.C., MASSARD, C.L., LOSS, Z.G. Seroprevalencia de *Babesia equi* em tres diferentes sistemas de criaçaõ de equinos. Rio de Janeiro – Brasil. **Parasitologia Latinoamericana**, n.57, p. 141-145, 2002.
- BOTTEON, P.T.L.; BOTTEON, R.C.C.M.; REIS, T.P.; MASSARD, C.L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, Santa Maria, v35, n.5, p.1136-1140, set-out, 2005.
- BRÜNING, A. Equine Piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, n.152, v.2, p. 140-151, 1996.
- CAMACHO, A.T.; GUITIAN, F.J.; PALLAS, E.; GESTAL, J.J.; OLMEDA, A.S.; HABELA, M.A.; TELFORD III, S.R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and *Babesia caballi* infections in horses in Galicia, Spain. **Tropical Animal Health and Production**, n. 37, p. 293-302, Netherlands, 2005
- CANOLA, P. A., OLIVEIRA, R., BALDANI, C. D., MACHADO, R. Z. Estudo comparativo entre técnicas de DNA e realizaçaõ da Reaçãõ em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnõstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*. **ARS Veterinária**, v.23, n. 3, p. 165-171, Jaboticabal, São Paulo, 2007.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**, 3ed., Editora Manole: São Paulo, 1984, 566 p.
- CUNHA, C. W.; SILVA, S.S.; RODRIGUES, A.L.; GUERREIRO, G. Avaliaçaõ do efeito da esplenectomia em equinos portadores e livres de *Babesia* spp. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Brasil, n.6, v. 2, p. 157-160, 1997.
- FERREIRA, A.J.P.; PIZARRO, L.D.C.R.; DELL`PORTO, A. Agentes antiprotozoários. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**, 3 ed., Editora Guanbara Koogan: Rio de Janeiro, p. 502-503, 2002.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. **Patologia Veterinária**, Editora Manole: Barueri, p. 604-606, 2000.
- KNOWLES, D.P. Babesiosis. **Current Therapy in Equine Medicine 3**, W.B. Saunders Company, 1992.

- KNOWLES, D.P., KAPPMAYER, L.S., PERRYMAN, L.E. Specific immune responses are required to control parasitemia in *Babesia equi* infection. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 1909-1913, 1994.
- KUMAR, S.; KUMAR, Y.; MALHOTRA, D.V.; DHAR, S.; NICHANI, A.K. Standardisation and comparison of serial dilution and single dilution enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using different antigenic preparations of the *Babesia (Theileria) equi* parasite. **Vet Res**, n.34, p. 71-83, 2003.
- KUTSCHA, J. Effects of Specific Equine Babesiosis Treatments on Equine Oro-caecal Transit Time as measured by the Lactose C-Ureide Breath Test. (Doutorado) Faculty of Veterinary Medicine of the Ludwig-Maximilians-University Munich, 2008.
- LEAL, D. C., MADRUGA, C. R., MATOS, F. M., SOUZA, B. M. P. S., FRANKE, C. R. Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 31, v.7, p. 575-578, 2011.
- MOREIRA, M.A.B., RONCATI, N.V., CORREA, R.R., SOUZA, M.V.M. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. In: ANAIS DO SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2007.
- MORRIS, D.D. Doenças do Sistema Hemolinfático. In: **Medicina Interna Equina**, 1 ed., Editora Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p. 491, 2000.
- NIZOLI, L.Q, GÖTZE, M.M., FÉLIX, S.R., SILVA, S.S., NOGUEIRA, C.E.W. Frequency of seropositive equines for *Theileria equi* in the Southern Rio Grande do Sul State, Brazil. **Parasitologia Latinoamericana**, v.63, n. 1-2-3-4, p. 46-50, Santiago, 2008.
- NIZOLI, L. Q. Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul. 2005. 39p. (Mestrado) – Universidade Federal de Pelotas.
- NOGUEIRA, C.E.W., SILVA, S.S., NIZOLI, L.Q., RIBAS, L.M., ALBUQUERQUE, L.P.A.N. Efeito quimioprolifático do dipropionato de imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. **A Hora Veterinária**, v. 25, n. 146, 2005.
- PIOTTO, M. A. Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay). **Dissertação de Pós Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**. São Paulo, 2009.
- ROBINSON, E. N. Equine Piroplasmiasis. **Current Therapy in Equine Medicine 3**, W.B. Saunders Company, p. 499-500, 1992.
- RONCATI, N.V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica RT-PCR. 2006. 69f. (Doutorado)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SALIM, B.O.M.; HASSAM, S.M.; BAKHEIT, M.A.; ALHASSAM, A.; IGARASHI, I.; KARANIS, P.; ABDELRAHMAN, M.B. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. **Parasitol Res**, n.103, p. 1145-1150, 2008.
- SOUZA, M.V.M.; MOREIRA, M.A.B.; CORRÊA, R.R.; RONCATI, N.V. [2007]. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. **ABRAVEQ**, 2007. Disponível em: <www.abraveq.com.br/novo_2007/artigo_0009.html> Acesso em: 8/04/09
- TIZARD, I. R. Imunidade aos parasitas. **Imunologia Veterinária**. 5. Ed. São Paulo:Editora Roca, 1998. P. 326-340.

- THOMASSIAM, A. **Enfermidade dos cavalos**. 4.ed., São Paulo:Varela, 2005.
- THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, 2 ed., São Paulo: Roca, 556P., 2004.
- UILENBERG, G. *Babesia* – A historical overview. **Veterinary Parasitology**, n. 138, p. 3-10, 2006.
- ZAPF, F.; SCHEIN, E. The development of *Babesia [Theileria]equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species. **Parasitol Res**, Berlim, n. 80, p. 297-302, 1994.
- ZAUGG, J.L. Babesiose. **Medicina Interna de Grandes Animais**, 3 ed., Manole:Barueri, p. 1051-1055, 2006.

CAPÍTULO II

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESFREGAÇOS DE PUNÇÃO ESPLÊNICA E DE SANGUE PERIFÉRICO PARA DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE EQUINA

INTRODUÇÃO

A babesiose é uma doença intraeritrocitária de mamíferos, causada pelos protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria* e possui como vetores carrapatos (ZAUGG, 2006). Essa patologia possui grande importância, pois é uma das principais doenças parasitárias que acometem os cavalos gerando prejuízos econômicos e levando a diminuição do desempenho atlético dos equinos (NIZOLI, 2005). Esses fatores demonstram a importância do desenvolvimento de técnicas eficientes para o diagnóstico da babesiose. Vários estudos podem ser encontrados demonstrando que o grupo de animais com anticorpos contra a babesia considerados como portadores crônicos possuem um nível de atuação inferior ao dos animais negativos (SOUZA et al., 2007).

As hemácias infectadas pela *Babesia caballi* ou pela *Theileria equi* incorporam os antígenos do parasito em suas membranas o que leva os anticorpos a opsonizarem as hemácias e as retirarem pelo sistema mononuclear fagocitário. O baço por possuir uma importante função na hemocaterese apresenta maior concentração de hemácias parasitadas. A punção esplênica é realizada por meio da colheita de sangue diretamente do órgão (MOREIRA et al., 2007).

Nos casos em que o animal apresente sinais de doença aguda e antes que haja sinais de hemoglobinúria, podem ser feitos esfregaços de sangue periférico para a visualização do parasito em microscopia óptica (BRÜNING, 1996). O sangue periférico pode ser proveniente da veia jugular ou da veia que drena a orelha. Durante a fase latente da doença, o parasito geralmente não é visualizado nos esfregaços de sangue periférico, pois a parasitemia se torna inferior a 0,01% o que torna a sensibilidade dessa técnica muito baixa aumentando assim o número de falsos negativos (NIZOLI, 2005).

O objetivo desse trabalho foi comparar os dois métodos de diagnóstico analisando os resultados obtidos e conseqüentemente sua eficiência.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados quinze animais e sem raça definida e provenientes de carroceiros e do Setor de Apreensão da Secretaria de Agricultura e Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF). Parte desses animais era confinado em baias e alguns animais viviam soltos em piquetes. Os animais foram examinados clinicamente e nenhum dos animais apresentava aumento de temperatura nem os sinais clínicos que pudessem indicar babesiose antes e nem no momento da colheita. Todos os animais possuíam histórico de infestação por carrapato.

O sangue foi coletado com agulha 40x16 da veia que drena a face interna da orelha externa, após assepsia do local, sendo transferido para uma lâmina de microscópio e realizava-se o esfregaço sanguíneo segundo a técnica descrita por Coles (1984). Para tal foram utilizadas lâminas para microscópio óptico e uso de extensor comercial sem denteações e mais estreito que a lâmina. O esfregaço foi realizado em um local plano, com um extensor com angulação de 30 graus em relação à lâmina e logo após a colheita. Após a confecção do esfregaço as lâminas foram devidamente identificadas.

Os mesmos animais foram, imediatamente após a colheita de sangue periférico, submetidos à punção do baço e realização de esfregaços segundo a técnica descrita por Souza et al. (2007).

Para o procedimento da punção esplênica (Figura 1) foi utilizada agulha 30x8 e seringa de 10 mL contendo 0,1 mL de solução de EDTA 0,2%. O local de acesso para a punção do baço localiza-se no décimo-sétimo espaço intercostal no terço superior do antímero esquerdo. No local da punção foi realizada previamente tricotomia e assepsia com Iodo Povidona tópico e álcool iodado. A agulha foi totalmente introduzida em um ângulo de noventa graus com a pele até chegar ao baço, quando então foi realizada a aspiração do sangue esplênico. Após esse procedimento foram confeccionadas os esfregaços do mesmo modo como descrito anteriormente.

Utilizou-se corante rápido Panótico para coloração das lâminas, após as quais foram secas ao ar ambiente. As leituras, em zigue-zague, foram realizadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Após a identificação do parasito, a determinação específica foi feita de acordo com a morfologia. A *B. caballi* possui

comprimento maior que 3 μ m e seus merozoítos são encontrados em pares (NIZOLI, 2005) e a *T. equi* possui comprimento menor que 2 μ m e apresenta merozoítos em tétrades e em forma de cruz de malta (COLE, 1984).

Todos os dados foram tabulados e submetidos à cálculos simples de frequência.



Figura 1. Punção Esplênica na região do 17^o espaço intercostal do antímero esquerdo. (Arquivo pessoal – HVET-UnB).

RESULTADOS

Nas amostras obtidas pela punção esplênica, seis dos quinze animais (40%) apresentaram resultado positivo para a presença de *Theileria equi* (Figura 2) ou *Babesia caballi*, sendo que cinco animais foram positivos para *Theileria equi* e um para *Babesia caballi* (Quadro 1).

Quadro 1. Animais utilizados na pesquisa de *Babesia caballi* e *Theileria equi*, tipo de confinamento e condições fisiológicas as quais se encontravam durante a punção esplênica e a colheita de sangue periférico proveniente da orelha, bem como o resultado do esfregaço de punção esplênica. Todos os animais foram negativos em relação ao esfregaço de sangue periférico.

Animal	Presença de carrapatos	Confinamento	Mucosas	T °C	FC (BPM)	FR (MPM)	Resultado Punção Esplênica
1	Sim	Piquete	Normocoradas	37,5	36	12	Negativo
2	Não	Baia	Normocoradas	36,5	28	12	Negativo
3	Não	Baia	Normocoradas	36,8	36	12	Positivo – <i>T. equi</i>
4	Não	Baia	Normocoradas	36,4	40	12	Negativo
5	Não	Baia	Normocoradas	36,9	36	12	Negativo
6	Sim	Piquete	Normocoradas	37,3	56	20	Positivo – <i>T. equi</i>
7	Sim	Piquete	Normocoradas	37,3	44	20	Negativo
8	Sim	Baia	Normocoradas	37,7	44	10	Negativo
9	Sim	Piquete	Normocoradas	37,2	36	12	Negativo
10	Sim	Piquete	Normocoradas	38,4	32	10	Positivo – <i>T. equi</i>
11	Não	Baia	Normocoradas	37,6	40	12	Positivo – <i>B. caballi</i>
12	Não	Baia	Normocoradas	37,3	48	10	Negativo
13	Sim	Piquete	Normocoradas	37,4	40	10	Negativo
14	Sim	Piquete	Normocoradas	37,5	56	16	Positivo – <i>T. equi</i>
15	Sim	Piquete	Hipocoradas	38,1	44	12	Positivo – <i>T. equi</i>

Valores de Referência: Mucosas: normocoradas; Temperatura: 37,5-38°C ; FC: 32-44; FR: 8-16 (GÜRTLER et al. 1984).

DISCUSSÃO

A colheita de sangue esplênico se mostrou um método de fácil execução e seguro, pois os animais não precisaram ser sedados, nem anestesiados e durante o procedimento não apresentou sinais de desconforto ou dor. A punção esplênica não

se mostrou mais difícil ou onerosa do que a colheita de sangue periférico. A quantidade de sangue colhida variou entre 0,4 a 0,8 mL.

No quadro 1 estão descritos os valores referentes ao exame clínico dos animais antes da colheita, como cada animal era confinado e os resultados obtidos pela punção esplênica. A maior parte dos resultados positivos eram provenientes de animais que eram mantidos em piquetes e com presença de carrapatos.

A utilização da técnica de esfregaço sanguíneo de sangue periférico é importante para o diagnóstico de parasitoses como o *Anaplasma* e a *Babesia* em algumas espécies (COLES, 1984). O exame permite a determinação do prognóstico das infecções agudas e também obtenção de informações sobre a anemia associada e a morfologia dos eritrócitos. De preferência o esfregaço sanguíneo deve ser realizado logo após a obtenção da amostra. Segundo Brüning (1995), o parasito pode ser visualizado em sangue periférico de animais em fase aguda da doença e antes que haja hemoglobinúria. Em todas as amostras de sangue periférico colhidas o resultado foi negativo para a presença de babesias.

A *Theileria equi* e a *Babesia caballi* são difíceis de serem visibilizadas no sangue periférico de equinos, pois estão presentes em apenas 1 a 8% dos eritrócitos. A *Theileria equi* pode formar a configuração de Cruz de Malta, uma forma em tetrades. A *Babesia caballi* apresenta tamanho maior que a *Theileria equi* que mede menos de 2 μm e a *B. Caballi* mede de 2,5 a 4 μm (COLES, 1984). O exame de esfregaço de sangue periférico possui baixa sensibilidade e essa varia de 32 a 38,8% (PIOTTO, 2009). Durante a fase crônica da doença, quando o nível de parasitemia é menor ou igual a 0,01%, a sensibilidade da técnica de esfregaço sanguíneo obtido de sangue periférico diminui, aumentando assim os resultados falso-negativos. Todos os animais utilizados neste trabalho não apresentavam sinais clínicos de babesiose e não estavam em pico febril, o que pode explicar a não observação do parasito no sangue periférico destes animais. Este fato também revela uma desvantagem deste exame, pois não detecta animais na forma crônica ou latente da doença. Neste experimento pôde ser observado que a sensibilidade da técnica de esfregaço de sangue periférico é mais baixa, o que pode ser visualizado pelos resultados positivos na punção esplênica.

Segundo Moreira et al. (2007), o baço por possuir importante função na hemocaterese possui maior quantidade de hemácias parasitadas e por este motivo as chances de se encontrar o parasito em esfregaços sanguíneos provenientes de

punção esplênica aumentam mesmo em estágios crônicos da doença. Esse método por ser pouco invasivo e rápido pode ser facilmente adotado como exame diagnóstico para animais com suspeita de babesiose. Estas observações foram confirmadas no experimento em tela, pois conseguiu-se detectar a *Babesia* ou *Theileria* em animais que não apresentavam sinais clínicos. Este exame tem utilidade para detecção de casos crônicos, embora falso-negativos também possam ocorrer.

Um dos animais utilizados nesse trabalho, que foi positivo para *Theileria equi* através do método de punção esplênica, apresentou, uma semana após a colheita de sangue periférico e punção esplênica, sinais clínicos sugestivos de babesiose com picos febris e mucosas ictéricas. Esse fato demonstra a importância que pode ser atribuída ao esfregaço sanguíneo de punção esplênica, que pode detectar um animal latente ou crônico.

Embora alguns animais tenham sido detectados com parasitos no sangue esplênico eles não foram tratados, pois não era o objetivo deste trabalho e também porque não apresentavam sinais clínicos da doença e como eram provenientes de carroceiros sempre estavam em contato com o vetor do parasito e com o tratamento poderia haver a diminuição da quantidade de anticorpos contra *Babesia* ou *Theileria* e conseqüentemente reagudização da doença.

A babesiose equina apesar de não ser uma patologia que possua altos índices de mortalidade possui grande impacto no mercado internacional equino, pois gera entraves principalmente no trânsito de animais soropositivos para áreas que a doença não é endêmica como nos Estados Unidos, Canadá, Japão e alguns países da Europa. A maioria destes países possui os vetores da babesiose e a entrada de animais portadores pode levar a doença se tornar endêmica. Além de testes diagnósticos são utilizadas medidas de controle como quarentena e controle de carrapatos para a prevenção da transmissão da babesiose (NIZOLI, 2005). O Brasil é um país endêmico da doença e possui um dos maiores rebanhos de equinos do mundo, possuindo também animais zootecnicamente superiores, sendo que a exportação destes animais traz ganhos econômicos ao país. Outro problema é quando animais provenientes de regiões não endêmicas são levados a locais onde há a presença do parasito, pois esses animais podem desenvolver a doença em sua forma aguda e dependendo da gravidade podem até vir a óbito (BALDANI et al., 2004). Animais que participam de modalidades hípcas em nível internacional

também sofrem com essas barreiras e devem ser mantidos com baixa titulação de anticorpos ou livres da infecção pelo parasito.

Além de perdas econômicas, segundo Nizoli (2005), a babesiose pode gerar perda de desempenho atlético dos animais por se reagudizar em situações em que as taxas de anticorpos diminuem como em situações de estresse. O estudo da doença e o avanço das técnicas diagnósticas permite a diminuição dos danos que a babesiose pode ocasionar em animais atletas e também minimizar o número de animais que são submetidos a tratamento sem que a presença do parasito ter sido confirmada. Segundo Botteon et al. (2005), por via de regra, animais com queda de performance tem sido submetidos a tratamento contra babesiose mesmo sem o diagnóstico final. Sendo assim, as técnicas diagnósticas são de suma importância principalmente para a detecção rápida do parasito e para um tratamento efetivo.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que as duas técnicas são de fácil execução e de baixo custo, permitindo que sejam realizadas em condições de campo e permitindo que animais portadores sejam identificados com rapidez. Apesar da punção esplênica ter obtido uma taxa de detecção maior que o esfregaço sanguíneo de sangue periférico neste experimento, não se pode provar que a primeira técnica é melhor que a segunda, mas abre-se um espaço para que novas metodologias possam ser empregadas para a comprovação ou não da maior sensibilidade da técnica de punção esplênica para o diagnóstico de babesiose em equinos em relação ao uso do sangue periférico.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, C. D., MACHADO, R. Z., BOTTEON, P.T.L., TAKAKURA, F.S., MASSARD, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**, v.34, n. 5, p. 1525-1529, 2004.
- BOTTEON, P. T. L., BOTTEON, R. C. C. M., REIS, T. P., MASSARD, C. L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v.152, n.2, p. 140-151, 1996.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**, 3ed. São Paulo:Editora Manole, 1984, p. 566.
- GÜRTLER, H.; KETZ, A; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara, 1984, p. 612.
- MOREIRA, M.A.B., RONCATI, N.V., CORRÊA, R.R., SOUZA, M.V.M. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2007, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte [2007] (CD-ROM).
- NIZOLI, L. Q. **Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 39p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal). Universidade Federal de Pelotas.
- PIOTTO, M. A. **Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Club de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**. São Paulo, 2009, 63p. Dissertação de Pós Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- SOUZA, M.V.M.; MOREIRA, M.A.B.; CORRÊA, R.R.; RONCATI, N.V. [2007]. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. **ABRAVEQ**, 2007. Disponível em: <www.abraveq.com.br/novo_2007/artigo_0009.html> Acesso em: 8/04/09.
- TIZARD, I. R. Imunidade aos parasitas. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 5. ed. São Paulo:Editora Roca, 1998, p. 326-340.
- ZAUGG, J.L. Babesiose. In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**, 3 ed. Barueri:Barueri, 2006, p. 1051-1055.

CAPÍTULO III

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESFREGAÇOS SANGUÍNEOS PROVENIENTES DA PUNÇÃO ESPLÊNICA E SANGUE PERIFÉRICO E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) DO SANGUE ESPLÊNICO E PERIFÉRICO PARA O DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE EM EQUINOS

INTRODUÇÃO

A babesiose equina está presente em áreas que abrigam 90% da população de equinos, é uma doença de caráter cosmopolita e possui como vetores carrapatos (CANOLA et al., 2007). Os protozoários, *Babesia caballi* e *Theileria equi*, que são os agentes etiológicos dessa doença possuem um ciclo de vida que envolve estágios de desenvolvimento sexuais e assexuais dentro dos eritrócitos de vertebrados e nos tecidos dos carrapatos (ALHASSAN et al., 2005). A doença após a fase aguda assume uma fase subclínica e então uma fase crônica e o animal passa a ser carreador do parasito podendo este levar a doença para áreas livres da doença e que possuam carrapatos (BASHIRUDDIN et al., 1999).

A babesiose traz consequências graves a saúde dos animais como perda de desempenho atlético, cólicas, abortamentos, anemia e a morte do equino. Outra consequência é a perda econômica devido ao custo do tratamento, alta morbidade e restrições comerciais de animais positivos. Medidas como a quarentena e a proibição de animais positivos em áreas livres enfatizam a importância do desenvolvimento de testes de diagnóstico eficientes (RONCATI, 2006).

Além da transmissão através de carrapatos, o parasito pode ser transmitido pela transmissão transplacentária entre a égua portadora e o potro (ALLSOPP et al., 2007).

O diagnóstico da Babesiose conta com diferentes testes sorológicos como o Ensaio Imunoenzimático (ELISA) e o Teste de Imunofluorescência Indireto. Outras formas de diagnóstico são a identificação do parasito pelo exame microscópico ou métodos moleculares como a Reação em Cadeia da Polimerase (Single Round PCR, Multiplex PCR ou Real Time PCR) (PITEL et al., 2010). Os testes de Fixação de Complemento (TFC) e o Teste de Imunofluorescência Indireto foram utilizados por muitos anos, mas possuem baixa sensibilidade para diagnosticar infecções

latentes (ASGARALI et al., 2007).

Pitel et al. (2010) demonstraram a presença de pelo menos um dos parasitos causadores da Babesiose na medula óssea através da PCR e esfregaço sanguíneo do sangue da medula óssea. Esse trabalho corroborou com outros estudos que demonstraram a presença dos agentes etiológicos em diferentes tecidos do equino.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido utilizada na identificação de infecções causadas por *Theileria equi*. Esse teste pode detectar parasitemias iguais a 0,000006% por possuir alta sensibilidade. Através do uso da multiplex PCR pode-se conseguir um diagnóstico diferencial para *Theileria equi* e *Babesia caballi* em uma única reação (NIZOLI, 2005). A sensibilidade da PCR tem sido maior do que os métodos de detecção microscópica (ALHASSAM et al., 2005). A PCR é sensível o suficiente para detectar o DNA do parasito em 2,5 µL de sangue com parasitemia de 0,000001% (SALIM et al., 2008).

A pesquisa de protozoários por microscopia óptica é a técnica mais utilizada na rotina por ser fácil de ser realizada e por possuir baixo custo. Em caso de animais portadores dificilmente os parasitos são encontrados, pois apesar de possuir alta especificidade o exame possui baixa sensibilidade e esta varia entre 32 a 38,8% (PIOTTO, 2009). A pesquisa de hematozoários através da punção esplênica é realizada por meio da colheita de sangue diretamente do órgão e realização de esfregaço sanguíneo e possui maior chance de um resultado ser positivo, pois a função do baço de hemocaterese possibilita uma maior chance de se encontrar hemácias parasitadas no esfregaço (MOREIRA et al., 2007). Durante a fase latente da doença, a parasitemia se torna inferior a 0,01% o que torna a sensibilidade dessa técnica se torna muito baixa aumentando assim o número de falsos negativos (NIZOLI, 2005). Inúmeros testes de PCR foram desenvolvidos para o diagnóstico de babesiose equina, os testes de multiplex PCR e a PCR convencional possuem a vantagem de serem mais rápidas, mas a *nested*-PCR é a mais sensível (LEAL et al., 2011).

Comparações entre situações epidemiológicas endêmicas apresentam um grau de subjetividade, pois dependem da transmissão do parasito, das espécies e populações de carrapatos, das condições climáticas e do método de manejo e confinamento dos animais (LEAL et al., 2011).

Os objetivos deste trabalho foram comparar as técnicas de PCR de sangue periférico e esplênico e esfregaço de sangue periférico e esplênico para diagnosticar

animais sem sinais clínicos de babesiose, submetidos ao esforço físico e confinados. Determinando assim, a necessidade do uso de uma ou mais técnicas para o diagnóstico desta afecção e verificar ainda uma metodologia simples e precisa.

MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Universidade de Brasília sob protocolo de número 48458/2010. Foram utilizados quinze equinos atletas, adultos, hípidos, de diferentes raças (Brasileiro de Hipismo, Puro Sangue Inglês, Árabe, Puro Sangue Lusitano e mestiços dessas raças), provenientes da Sociedade Hípica de Brasília, Hospital Veterinário da Universidade de Brasília, haras e do 1º Regimento de Cavalaria de Guarda. As idades variaram entre 8 a 16 anos e com massas de 400 a 450 quilos. Os animais foram submetidos a exame físico e hemograma para a verificação de seu estado de higidez. Foram escolhidos animais sem sinais clínicos de babesiose e pequenas alterações no hemograma foram consideradas normais.

Foram realizados o exame clínico e o hemograma de todos os animais antes da colheita do material para a realização dos testes de diagnóstico para babesiose equina e estes dados estão descritos na Tabela 2.

Quadro 2. Animais utilizados na pesquisa de *Babesia*, tipo de confinamento e condições fisiológicas as quais se encontravam durante a punção esplênica e a colheita de sangue periférico proveniente da orelha. Brasília-DF, 2011.

Animal	Presença de carrapato	Confinamento	Mucosas	T °C	FC (BPM)	FR (MPM)	Hemograma
1	Não	Baia	Normocoradas	37,5	36	12	Sem alterações
2	Não	Baia	Normocoradas	36,2	28	12	Sem alterações
3	Não	Baia	Normocoradas	36,8	28	8	Sem alterações
4	Não	Baia	Normocoradas	37,1	52	12	Sem alterações
5	Não	Baia	Normocoradas	36,7	36	12	Sem alterações
6	Não	Baia	Normocoradas	37,0	44	12	Sem alterações
7	Não	Baia	Normocoradas	36,7	44	10	Sem alterações
8	Não	Baia	Normocoradas	37,5	44	10	Sem alterações
9	Não	Baia	Normocoradas	36,8	36	12	Sem alterações
10	Não	Baia	Normocoradas	37,1	36	8	Sem alterações
11	Não	Baia	Normocoradas	36,8	28	12	Sem alterações
12	Não	Baia	Normocoradas	37,3	38	16	Sem alterações
13	Não	Baia	Normocoradas	37,0	36	10	Sem alterações
14	Não	Baia	Normocoradas	36,0	32	12	Sem alterações
15	Não	Baia	Normocoradas	37,3	36	12	Sem alterações

Valores de Referência: Mucosas: normocoradas; Temperatura: 37,5-38°C ; FC: 32-44; FR: 8-16 (GÜRTLER et al., 1984).

O sangue capilar foi colhido com agulha 40x16 da ponta da orelha, após assepsia do local e depois transferido para uma lâmina de microscópio para a realização do esfregaço sanguíneo. Para o esfregaço foram utilizadas lâminas para microscópio óptico limpas e uso de extensor comercial sem denteações e mais estreito que a lâmina. O esfregaço foi feito em um local plano, com um extensor com angulação de trinta graus em relação à lâmina e logo após a colheita. Após a confecção do esfregaço as lâminas foram devidamente identificadas e coradas pelo método Panótico. Em cada substância do corante as lâminas foram deixadas imersas por um período de dez a vinte segundos.

O sangue da veia jugular aproximadamente 5 mL, após assepsia com álcool iodado, foi colhido com uso de *Vacutainer*® e uso de tubos com EDTA. Após a colheita foi separado e congelado cerca de 1 mL do sangue para a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). O sangue total foi armazenado em tubos de ependorf e congelado em seguida.

Para a punção esplênica foi utilizado agulha 30x8 e seringa de 10 mL contendo cerca de 0,1 mL da solução de EDTA 5%. O local de acesso para a punção do baço se localiza no décimo sétimo espaço intercostal no antímero esquerdo (Figura 1). Não foi feita palpação retal e também não foi utilizado ultrassom para localizar o baço, pois a metodologia utilizada foi a mesma de Souza et al.,(2007). No local foi realizada tricotomia e assepsia com PVPI e álcool iodado previamente a introdução da agulha em um ângulo de noventa graus com a pele até chegar ao baço. A quantidade de sangue colhida variou entre 0,4 a 1 mL. Após esse procedimento foram confeccionados os esfregaços com auxílio de uma lâmina extensora e em seguida os mesmos foram corados pelo método Panótico. Em cada componente do corante as lâminas ficaram imersas por cerca de dez a vinte segundos. Após esse procedimento, as lâminas foram lavadas em água corrente e secas ao ar ambiente. O sangue restante foi armazenado em tubo de ependorf e congelado para a PCR.

A leitura das lâminas, provenientes de ponta de orelha e da punção esplênica, foi feita em zigue-zague através de microscópio óptico com objetiva de imersão de 100x.

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada no Laboratório Vetpat em Campinas – SP, segundo o protocolo de Alhassam et al. (2005). Os *primers* utilizados no exame multiplex PCR foram Cab-R, Equi-R e BEC-UF2. As sequências

são: Bec-UF2 TCGAAGACGATCAGATACCCGTCG, Equi-R
TGCCTTAAACTTCCTTGCGAT e Cab-R 50-CTCGTTCATGATTTAGAATTGCT-30.
O tamanho das bandas produzidas (Figuras 3 e 4) em reações positivas são 540 bp
para *Babesia caballi* e 392 bp para *Theileria equi* (Alhassam et al., 2005). O ciclo
utilizado para a multiplex PCR foi 96°C por 10 minutos, 96°C por 1 minuto, 60,5°C
por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, sendo esses três últimos ciclos repetidos 40 vezes
e 72°C por 10 minutos.



Figura 2. Punção Esplênica na região do 17º espaço intercostal do antímero esquerdo. (Arquivo pessoal, HVET-UnB)

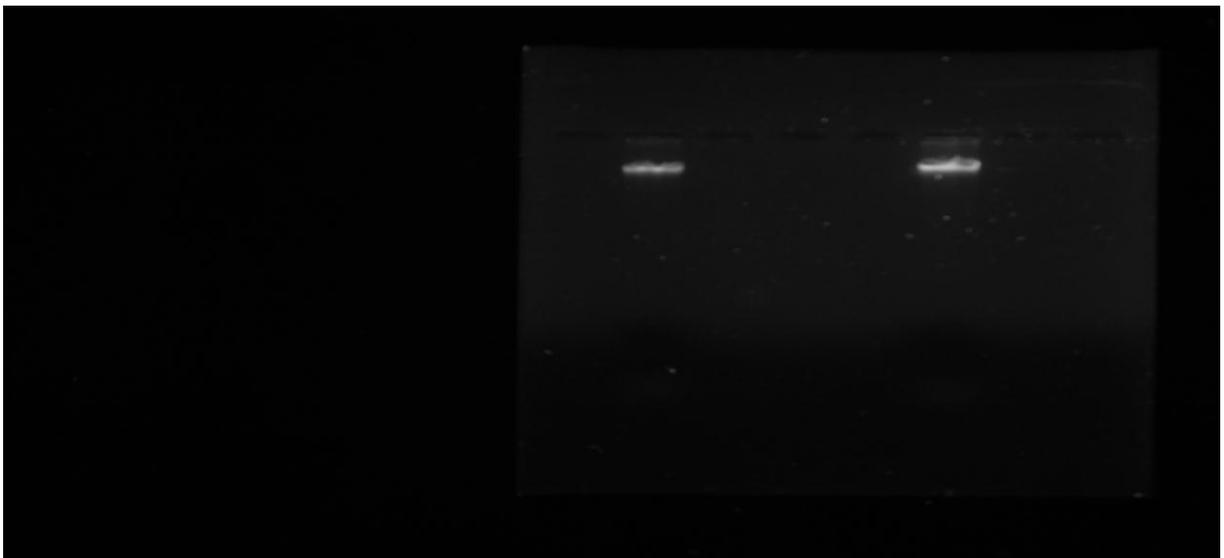


Figura 3. Gel de agarose a 2% com DNA das amostras 1 e 2 após a eletroforese das amostras sem terem passado pelo termociclador (Arquivo pessoal, Laboratório de Microbiologia de Alimentos-FAV-UnB)

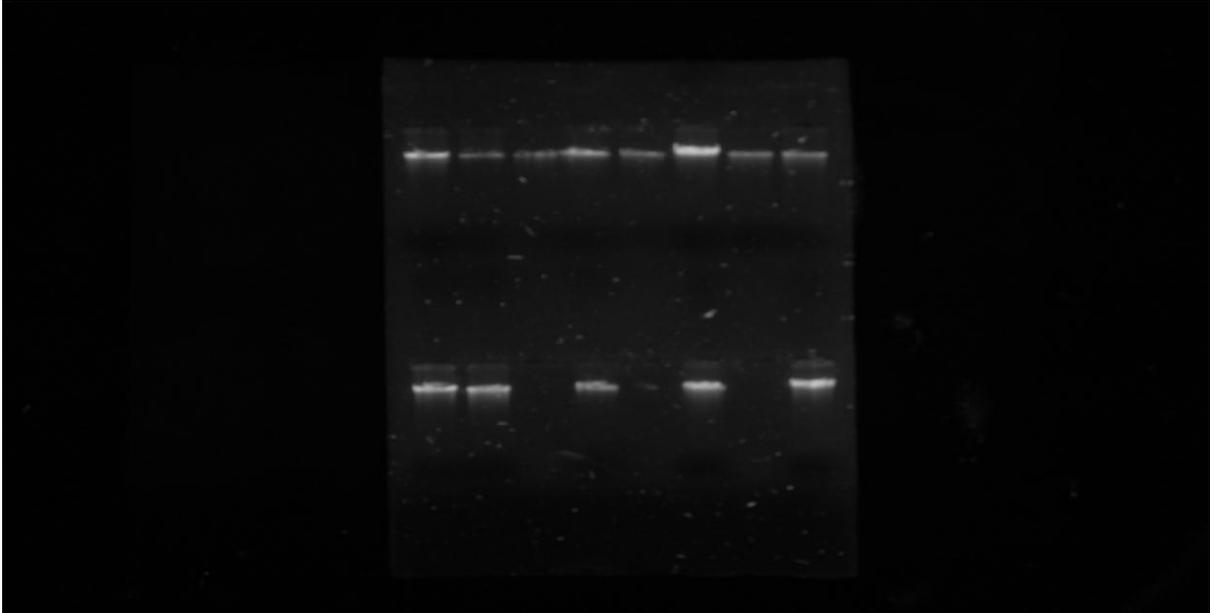


Figura 4. Gel de agarose a 2% com DNA das amostras 3 a 15 após a eletroforese das amostras sem terem passado pelo termociclador (Arquivo pessoal, Laboratório de Microbiologia de Alimentos-FAV-UnB)

Os resultados foram submetidos à Estatística Kappa para analisar a concordância entre os testes de diagnóstico de PCR e esfregaços sanguíneos. A concordância entre os testes é evidência de validade e se não houver a concordância os testes não são confiáveis (THRUSFIELD, 2004).

RESULTADOS

Em todas as amostras realizadas os esfregaços sanguíneos provenientes do sangue periférico (ponta de orelha) os resultados foram negativos para a presença de ambos os parasitos. O esfregaço sanguíneo da punção esplênica do animal 9 foi positiva para *Babesia caballi* e todos os outros animais foram negativos nesse mesmo exame. Nas Reações em Cadeia da Polimerase os resultados estão descritos na Quadro 3.

Quadro 3. Resultados da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) do sangue total e esplênico. Brasília-DF, 2011.

Amostra	T. equi Sangue Total	B. caballi Sangue Total	T. equi Punção de Baço	B. caballi Punção de Baço
1	+	+	-	-
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	-	-	+	+
5	-	+	+	+
6	+	+	-	-
7	-	-	+	+
8	-	-	+	+
9	-	-	-	-
10	+	+	+	-
11	-	-	-	-
12	+	+	+	+
13	+	-	+	-
14	-	-	+	+
15	+	+	-	-

Os animais 1, 6 e 15 foram positivos para *Theileria equi* e *Babesia caballi* na PCR do sangue total, entretanto não foram positivos no teste de PCR do sangue proveniente da punção esplênica. Os animais 2, 3 e 12 foram positivos para os dois parasitos nas duas PCRs. Os animais 4, 7, 8 e 14 foram positivos para os dois agentes somente no teste de PCR do sangue do baço. O animal 5 foi positivo para *Babesia caballi* na PCR de sangue total e positivo para os dois parasitos na PCR do sangue do baço. Os animais 9 e 11 foram negativos nas duas PCRs para os dois agentes. O animal 10 foi positivo para os dois agentes etiológicos na PCR de sangue total e positivo somente para *Theileria equi* na PCR do sangue do baço. O animal 13 foi positivo somente para *Theileria equi* nas duas PCRs.

Na multiplex PCR de sangue total 53,33% dos equinos foram positivos para *Theileria equi* e 53,33% foram positivos para *Babesia caballi*, já quando a multiplex PCR foi realizada utilizando sangue proveniente da Punção Esplênica 66,66% dos animais foram positivos para *Theileria equi* e 53,33% para *Babesia caballi*.

DISCUSSÃO

Para Fonseca et al., 2011, a punção esplênica se mostrou de fácil execução, entretanto neste o mesmo procedimento se mostrou difícil de realização, pois houve a tentativa de colheita do sangue proveniente do baço em vinte e cinco animais e em somente quinze foi possível a colheita. Os animais que não foram colhidos foram descartados do experimento. A explicação provável para essa impossibilidade é o peso corpóreo dos animais, sendo o peso médio dos animais de Fonseca et al., 2011, 350 Kg e neste o peso em média era de 425Kg.

A parasitemia se torna inferior a 0,01% quando a doença entra na fase latente o que diminui a sensibilidade da técnica diagnóstica feita com esfregaços sanguíneos e isso aumenta o número de falso negativos (NIZOLI, 2005). Os resultados negativos dos esfregaços sanguíneos realizados neste trabalho podem ser explicados por essa diminuição da sensibilidade visto que os animais utilizados não tinham sinais clínicos da doença e alguns foram positivos na PCR do sangue de baço e do sangue total. O animal número 9 foi negativo para os dois parasitos em ambas as PCR e positivo no esfregaço sanguíneo da punção esplênica para *Babesia caballi*. O baço é o maior local de resposta para antígenos presentes no sangue e pelo motivo das hemácias incorporarem os antígenos da *Babesia caballi* e *Theileria equi* em suas membranas e serem retiradas pelo sistema mononuclear fagocítico que elas se concentram mais no baço (SOUZA et al., 2007), porém, segundo Roncati (2006) o parasito pode ser facilmente confundido com artefatos de técnica e a técnica de PCR pode detectar uma maior porcentagem de animais positivos para os dois parasitos. Entretanto, portadores crônicos têm apresentado resultados falso-negativos em testes de PCR devido à baixa taxa de parasitas circulantes de forma que não haja DNA do parasito na amostra colhida (RONCATI, 2006) e isso pode explicar os resultados diferentes entre os testes de PCR de sangue total e de sangue proveniente do baço. Os animais utilizados nesse experimento eram mantidos em sistema de confinamento e por esse motivo não

apresentavam infestação por carrapatos e este fato impede o contato com o parasito diminuindo assim as taxas de anticorpos o que favorece o desenvolvimento da doença (BOTTEON et al., 2005). Devido a estes fatores, a realização de mais de um teste de diagnóstico é mais aconselhável ao se testar animais confinados e que possam ser portadores subclínicos.

Segundo Alhassam et al. (2005), o teste multiplex PCR pode detectar os parasitos a nível de 0,18 e 0,018 células de *Babesia caballi* e *Theileria equi* respectivamente. Em infecções mistas o limite de detecção diminui ligeiramente para 1,8 e 0,18 células de *Babesia caballi* e *Theileria equi* respectivamente.

Os resultados foram submetidos à Estatística Kappa que é a única possibilidade de avaliar a concordância entre testes diferentes sem assumir que algum deles é melhor. A concordância entre os testes significa que possuem validade e quando não há concordância sugere que algum ou os dois testes não são confiáveis. Quando o Kappa tem valor igual a um significa que há concordância completa. Se este valor for igual a 0 a concordância é igual por casualidade e resultados negativos significam concordância menor do que a casual (THRUSFIELD, 2004). O valor de Kappa quando foi avaliado os dois testes de PCR obteve valor -0,089 para *Theileria equi* e -0,072 para *Babesia caballi*. Avaliando os testes de PCR do sangue do baço e o resultado do esfregaço da punção esplênica para *Babesia caballi* o valor de Kappa é -0,141. Os testes de PCR de sangue total e o esfregaço da punção esplênica para *Babesia caballi* quando comparados de acordo com a estatística Kappa apresenta valor igual a -0,134. Estes valores indicam que algum ou os dois testes não foram confiáveis. Quanto a concordância os esfregaços sanguíneos de sangue periférico e da punção esplênica (para *Theileria equi*) com as PCR do sangue total e da punção esplênica possuem valores igual a zero o que indica uma concordância pobre. A baixa concordância entre os resultados dos testes corrobora com a dificuldade de se diagnosticar um animal portador subclínico e com a necessidade de se utilizar mais de um teste de diagnóstico.

CONCLUSÃO

Os resultados desse estudo mostra a necessidade de encontrar técnicas mais eficientes e confiáveis para o diagnóstico de babesiose, visto a baixa concordância. Entretanto os animais utilizados para este trabalho não possuíam sinais clínicos e os

animais positivos podem ser considerados como portadores possuindo nível de parasitemia baixa o que corrobora com a metodologia empregada.

Os resultados também reforçam a necessidade de se utilizar vários testes na tentativa de detectar se um animal é positivo ou não, pois falsos negativos podem ocorrer com uma alta taxa de prevalência.

REFERÊNCIAS

- ALHASSAN, A., PUMIDONMING, W., OKAMURA, M., HIRATA, H., BATTSETSEG, B., FUJISAKI, K., YOKOYAMA, N., IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. **Veterinary Parasitology**, n. 129, p. 43-49, 2005.
- ALLSOPP, M.T.E.P., LEWIS, B.D., PENZHORN, B.L. Molecular evidence for transplacental transmission of *Theileria equi* from carrier mares to their apparently health foals. **OpenUp**, 2007.
- ASGARALI, Z., COOMBS, D.K., MOHAMMED, F., CAMPBELL, M.D., CAESAR, E. A serological study of *Babesia caballi* and *Theileria equi* in Thoroughbreds in Trinidad. **Veterinary Parasitology**, n. 144, p. 167-171, 2007.
- BASHIRUDDIN, J. B., CAMMÀ, C., REBÊLO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. **Veterinary Parasitology**, n. 84, p. 75-83, 1999.
- BOTTEON, P. T. L., BOTTEON, R. C. C. M., REIS, T. P., MASSARD, C. L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.
- CANOLA, P. A., OLIVEIRA, R., BALDANI, C. D., MACHADO, R. Z. Estudo comparativo entre técnicas de DNA e realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para o diagnóstico de *Theileria equi* e *Babesia caballi*. **ARS Veterinária**, Vol. 23, n. 3, p. 165-171, Jaboticabal, São Paulo, 2007.
- FONSECA, L. A., NETO, A. R. T., FONSECA, E. F., SILVA, A. M. G. B., LIMA, E. M. M., GODOY, R. F. Estudo comparativo entre esfregaços de punção esplênica e de sangue periférico para diagnóstico de babesiose equina. **ARS Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 211-215, Jaboticabal, São Paulo, 2011.
- LEAL, D. C., MADRUGA, C. R., MATOS, F. M., SOUZA, B. M. P. S., FRANKE, C. R. Evaluation of PCR and multiplex PCR in relation to nested PCR for diagnosing *Theileria equi*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 31(7), p. 575-578, 2011.
- MOREIRA, M.A.B., RONCATI, N.V., CORRÊA, R.R., SOUZA, M.V.M. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2007, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte [2007] (CD-ROM).
- NIZOLI, L. Q. **Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2005. 39p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Universidade Federal de Pelotas.
- PIOTTO, M. A. **Determinação da infecção por *Theileria equi* e *Babesia caballi* em equinos alojados no Jockey Clube de São Paulo por meio da técnica de C-ELISA (Competitive Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**. São Paulo, 2009, 63p. Dissertação de Pós Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- PITEL, P.H., SCRIVE, T., LÉON, A., RICHARD, E., FORTIER, G. Molecular detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* in the bone marrow of asymptomatic horses. **Veterinary Parasitology**, n. 170, p. 182-184, 2010.
- RONCATI, N.V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica de RT-PCR. São Paulo, 2006.

- SALIM, B.O.M.; HASSAM, S.M.; BAKHEIT, M.A.; ALHASSAM, A.; IGARASHI, I.; KARANIS, P.; ABDELRAHMAN, M.B. Diagnosis of Babesia caballi and Theileria equi infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. **Parasitol Res**, n.103, p. 1145-1150, 2008.
- SOUZA, M.V.M.; MOREIRA, M.A.B.; CORRÊA, R.R.; RONCATI, N.V. [2007]. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. **ABRAVEQ**, 2007. Disponível em: <www.abraveq.com.br/novo_2007/artigo_0009.html> Acesso em: 8/04/09.
- THRUSFIELD, M. **Epidemiologia Veterinária**, 2 ed., São Paulo: Roca, 556 pgs, 2004.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o presente estudo, foi demonstrada entre os exames utilizados a necessidade de se encontrar um método eficiente e simples de diagnóstico de babesiose em equinos portadores assintomáticos, visto que os resultados dos testes de PCR de sangue periférico e esplênico, esfregaço de sangue periférico e punção esplênica tiveram baixa concordância. Pode-se concluir a necessidade do uso de mais de um dos testes citados para avaliar o animal como sendo positivo ou negativo para o parasito. A baixa parasitemia em animais portadores pode explicar a diferença dos resultados obtidos. Em animais com maior escore corporal a técnica de punção esplênica foi prejudicada, pois a agulha utilizada não chegava até o baço. Essa dificuldade poderia ter sido confirmada com o uso de ultrassonografia e palpação retal os quais não foram utilizados nesse estudo, pois havia o interesse de se comprovar a facilidade e simplicidade da realização da técnica.

ANEXO I - ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTAS

ANEXO I.1 – Artigo aceito na Revista ARS Veterinária (Novembro/2011)

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE ESFREGAÇOS DE PUNÇÃO ESPLÊNICA E DE SANGUE PERIFÉRICO PARA DIAGNÓSTICO DE BABESIOSE EQUINA

(COMPARATIVE STUDY OF SMEARS OF SPLEEN AND PERIPHERAL BLOOD FOR DIAGNOSIS OF BABESIOSIS IN HORSES)

L. A. FONSECA¹, A. R. TEIXEIRA NETO², E. F. FONSECA³, A. M. G. B. SILVA⁴, E. M. M. LIMA², R. F. GODOY^{2*}

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi o de comparar os resultados obtidos com o uso das técnicas de esfregaço de sangue periférico e de punção esplênica e de verificar uma metodologia simples e precisa para diagnóstico de babesioses em cavalos portadores subclínicos, submetidos ao esforço físico ou competições. Quinze equinos hípidos, sem sinais clínicos de babesiose, com peso médio de 350 Kg, idade entre 6 a 13 anos, de ambos os sexos e com histórico de infestação por carrapatos, foram utilizados. No esfregaço de sangue colhido da orelha, nenhum animal apresentou resultado positivo enquanto que na punção esplênica cinco animais foram positivos para a presença de *Babesia caballi* ou *Theileria equi*. Os

¹ Mestranda do Programa de Pós Graduação em Saúde Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

² Professor Adjunto da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), Hospital Veterinário de Grandes Animais, Galpão 04, Granja do Torto, Brasília, DF, 70636-200, Brasil. *Autor para correspondência: robertagodoy@unb.br

³ Tenente-Veterinário do Primeiro Regimento de Cavalaria de Guarda, Setor Militar Complementar s/nº 1º Regimento de Cavalaria de Guardas, Brasília, DF.

⁴ Residente do Hospital Veterinário de Grandes Animais, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF.

dois métodos são de fácil realização, seguros e pouco invasivos, porém o esfregaço da punção esplênica parece ser mais eficaz em detectar casos latentes de babesiose em equinos.

Palavras-chave: Babesiose. Diagnóstico. Esfregaço de sangue periférico. Punção de baço.

SUMMARY

The objective of this work was to compare the efficacy of these two techniques and to search for a simple and more precise diagnostic method for subclinical babesiosis in horses submitted to physical effort or competitions. Then, splenic puncture and periferic blood smear were compared. Fifteen healthy horses, without clinical signs of babesiosis, median weight 350 Kg, age between six to thirteen years, both genders and with an history of tick infestation were used. Five animals were positive for *Babesia caballi* or *Theileria equi*, in splenic puncture and none in blood smear. Both methods were little invasive, safe and easy to do, but the splenic puncture smear seems to be more efficace to detect cronic babesioses in horses.

Key words: Babesiosis. Diagnosis. Periferic blood smear. Spleen puncture.

INTRODUÇÃO

A Babesiose ou Piroplasmose é uma doença intraeritrocitária de mamíferos, transmitida por carrapatos e causada pelos protozoários dos gêneros *Babesia* e *Theileria* (ZAUGG, 2002). Sua ocorrência tem grande importância no meio equestre, pois é uma das principais doenças parasitárias que acometem os cavalos (NIZOLI, 2005). Animais com anticorpos contra a *Babesia*, considerados portadores crônicos, tem um nível de desempenho inferior ao dos animais negativos (SOUZA et al., 2007). Apesar da gravidade da doença aguda, há uma grande importância em se diagnosticar os animais com a doença subclínica, pois estes portadores crônicos do

parasito, além de serem reservatórios, apresentam reagudizações decorrentes da queda da taxa de anticorpos o que leva a prejuízos econômicos gerados pela diminuição do desempenho, inapetência e perda de peso (BOTTEON et al., 2005). Esses fatores demonstram a importância do desenvolvimento de técnicas simples e eficientes para o diagnóstico desta doença.

Quando ocorre a invasão do organismo pelo parasito há uma ativação do trajeto de complemento alternativo. As hemácias infectadas, pela *Babesia caballi* ou pela *Theileria equi*, incorporam os antígenos do parasito em suas membranas celulares o que leva os anticorpos a removê-las através do sistema mononuclear-fagocitário (TIZARD, 1998).

Nos casos em que o animal apresenta sinais de doença aguda, e antes que haja sinais de hemoglobinúria, podem ser feitos esfregaços de sangue periférico para a visualização do parasito em microscopia óptica (BRÜNING, 1996). O sangue periférico pode ser proveniente da veia jugular ou da veia que irriga a orelha. Durante a fase latente da doença, o parasito geralmente não é visualizado nos esfregaços de sangue periférico, pois a parasitemia é inferior a 0,01% tornando a sensibilidade dessa técnica muito baixa aumentando assim o número de resultados falso negativos (NIZOLI, 2005).

O baço, por possuir uma importante função na hemocaterese, apresenta maior concentração de hemácias parasitadas, justificando o uso da punção esplênica para o diagnóstico, sendo realizada por meio da colheita de sangue diretamente do órgão e posterior confecção de esfregaço (MOREIRA et al., 2007).

O objetivo desse trabalho foi o de comparar as técnicas de esfregaço de sangue proveniente de punção esplênica e o esfregaço de sangue periférico, como

métodos diagnóstico simples para babesiose em equinos sem sintomatologia clínica da doença, analisando os resultados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi colhido sangue da veia auricular interna e realizou-se punção esplênica de 15 equinos com peso médio de 350 Kg, idade entre 6 a 13 anos e de ambos os sexos. Os animais não tinham raça definida e eram todos provenientes de carroceiros e do Setor de Apreensão da Secretaria de Agricultura e Pecuária e Abastecimento do Distrito Federal (SEAPA-DF). Parte desses animais era confinado em baias e alguns animais viviam soltos em piquetes. Os animais foram examinados clinicamente e nenhum dos animais apresentava aumento de temperatura nem os sinais clínicos que pudessem indicar babesiose antes e nem no momento da colheita. Todos os animais possuíam histórico de infestação por carrapatos.

O sangue foi coletado com agulha 40x16 da veia que irriga a face interna da aurícula, após assepsia do local, sendo transferido para uma lâmina de microscópio e realizava-se o esfregaço sanguíneo segundo a técnica descrita por Coles (1984). Para tal foram utilizadas lâminas para microscópio óptico e uso de extensor comercial sem denteações e mais estreito que a lâmina. O esfregaço foi realizado em um local plano, com um extensor com angulação de 30 graus em relação à lâmina e logo após a colheita. Após a confecção do esfregaço as lâminas foram devidamente identificadas.

Os mesmos animais foram, imediatamente após a colheita de sangue periférico, submetidos à punção do baço e realização de esfregaços segundo a técnica descrita por Souza et al. (2007).

Para o procedimento da punção esplênica (Figura 1) foi utilizada agulha 30x8 e seringa de 10 mL contendo solução de EDTA 0,2%. O local de acesso para a punção do baço localiza-se no décimo-sétimo espaço intercostal no antímero esquerdo. No local da punção foi realizada previamente tricotomia e assepsia com Iodo Povidona tópico e álcool iodado. A agulha foi totalmente introduzida em um ângulo de noventa graus com a pele até chegar ao baço, quando então foi realizada a aspiração do sangue esplênico. Após esse procedimento foram confeccionadas os esfregaços do mesmo modo como descrito anteriormente.

Utilizou-se corante rápido Panótico para coloração das lâminas, após as quais foram secas ao ar ambiente. As leituras, em zigue-zague, foram realizadas no microscópio óptico com objetiva de imersão (100x). Após a identificação do parasito, a determinação específica foi feita de acordo com a morfologia. A *B. caballi* possui comprimento maior que 3µm e seus merozoítos são encontrados em pares (NIZOLI, 2005) e a *T. equi* possui comprimento menor que 2µm e apresenta merozoítos em tétrades e em forma de cruz de malta (COLE, 1984).

Todos os dados foram tabulados e submetidos à cálculos simples de frequência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A colheita de sangue esplênico se mostrou um método de fácil execução e seguro, pois os animais não precisaram ser anestesiados, nem sedados e durante o procedimento não apresentam sinais de desconforto ou dor. A punção esplênica não se mostrou mais difícil ou onerosa do que a colheita de sangue periférico. A quantidade de sangue colhida variou entre 0,4 a 0,8 mL.

No quadro 1 estão descritos os valores referentes ao exame clínico dos animais antes da colheita, como cada animal era confinado e os resultados obtidos pela punção esplênica. A maior parte dos resultados positivos eram provenientes de animais que eram mantidos em piquetes e com presença de carrapatos.

A utilização da técnica de esfregaço sanguíneo de sangue periférico é importante para o diagnóstico de parasitoses como o *Anaplasma* e a *Babesia* em algumas espécies (COLES, 1984). O exame permite a determinação do prognóstico das infecções agudas e também obtenção de informações sobre a anemia associada e a morfologia dos eritrócitos. De preferência o esfregaço sanguíneo deve ser realizado logo após a obtenção da amostra. Segundo Brüning (1995), o parasito pode ser visualizado em sangue periférico de animais em fase aguda da doença e antes que haja hemoglobinúria. Em todas as amostras de sangue periférico colhidas o resultado foi negativo para a presença de babesias.

A *Theileria equi* e a *Babesia caballi* são difíceis de serem visibilizadas no sangue periférico de equinos, pois estão presentes em apenas 1 a 8% dos eritrócitos. A *Theileria equi* pode formar a configuração de Cruz de Malta, uma forma em tétrades. A *Babesia caballi* apresenta tamanho maior que a *Theileria equi* que mede menos de 2 μm e a *B. Caballi* mede de 2,5 a 4 μm (COLES, 1984). Durante a fase crônica da doença, quando o nível de parasitemia é menor ou igual a 0,01%, a sensibilidade da técnica de esfregaço sanguíneo obtido de sangue periférico diminui, aumentando assim os resultados falso-negativos. Todos os animais utilizados neste trabalho não apresentavam sinais clínicos de babesiose e não estavam em pico febril, o que pode explicar a não observação do parasito no sangue periférico destes animais. Este fato também revela uma desvantagem deste exame, pois não detecta animais na forma crônica ou latente da doença. Neste experimento pôde ser

observado que a sensibilidade da técnica de esfregaço de sangue periférico é mais baixa, o que pode ser visualizado pelos resultados positivos na punção esplênica.

Nas amostras obtidas pela punção esplênica, cinco dos quinze animais (33,3%) apresentaram resultado positivo para a presença de *Theileria equi* (Figura 2) ou *Babesia caballi*, sendo que quatro animais foram positivos para *Theileria equi* e um para *Babesia caballi* (Quadro 1).

Segundo Moreira et al. (2007), o baço por possuir importante função na hemocaterese possui maior quantidade de hemácias parasitadas e por este motivo as chances de se encontrar o parasito em esfregaços sanguíneos provenientes de punção esplênica aumentam mesmo em estágios crônicos da doença. Esse método por ser pouco invasivo e rápido pode ser facilmente adotado como exame diagnóstico para animais com suspeita de babesiose. Estas observações foram confirmadas no experimento em tela, pois conseguiu-se detectar a *Babesia* ou *Theileria* em animais que não apresentavam sinais clínicos. Este exame tem utilidade para detecção de casos crônicos, embora falso-negativos também possam ocorrer.

Um dos animais utilizados nesse trabalho, que foi positivo para *Theileria equi* através do método de punção esplênica, apresentou, uma semana após a colheita de sangue periférico e punção esplênica, sinais clínicos sugestivos de babesiose com picos febris e mucosas ictéricas. Esse fato demonstra a importância que pode ser atribuída ao esfregaço sanguíneo de punção esplênica, que pode detectar um animal latente ou crônico.

Embora alguns animais tenham sido detectados com parasitos no sangue esplênico eles não foram tratados, pois não era o objetivo deste trabalho e também porque não apresentavam sinais clínicos da doença e como eram provenientes de carroceiros sempre estavam em contato com o vetor do parasito e com o tratamento

poderia haver a diminuição da quantidade de anticorpos contra *Babesia* ou *Theileria* e conseqüentemente reagudização da doença.

A babesiose equina apesar de não ser uma patologia que possua altos índices de mortalidade possui grande impacto no mercado internacional equino, pois gera entraves principalmente no trânsito de animais soropositivos para áreas que a doença não é endêmica como nos Estados Unidos, Canadá, Japão e alguns países da Europa. A maioria destes países possui os vetores da babesiose e a entrada de animais portadores pode levar a doença se tornar endêmica. Além de testes diagnósticos são utilizadas medidas de controle como quarentena e controle de carrapatos para a prevenção da transmissão da babesiose (NIZOLI, 2005). O Brasil é um país endêmico da doença e possui um dos maiores rebanhos de equinos do mundo, possuindo também animais zootecnicamente superiores, sendo que a exportação destes animais traz ganhos econômicos ao país. Outro problema é quando animais provenientes de regiões não endêmicas são levados a locais onde há a presença do parasito, pois esses animais podem desenvolver a doença em sua forma aguda e dependendo da gravidade podem até vir a óbito (BALDANI et al., 2004). Animais que participam de modalidades hípicas em nível internacional também sofrem com essas barreiras e devem ser mantidos com baixa titulação de anticorpos ou livres da infecção pelo parasito.

Além de perdas econômicas, segundo Nizoli (2005), a babesiose pode gerar perda de desempenho atlético dos animais por se reagudizar em situações em que as taxas de anticorpos diminuem como em situações de *stress*. O estudo da doença e o avanço das técnicas diagnósticas permite a diminuição dos danos que a babesiose pode ocasionar em animais atletas e também minimizar o número de animais que são submetidos a tratamento sem que a presença do parasito ter sido confirmada. Segundo Botteon et al. (2005), por via de regra, animais com queda de

performance tem sido submetidos a tratamento contra babesiose mesmo sem o diagnóstico final.

As técnicas diagnósticas são de suma importância principalmente para a detecção rápida do parasito e para um tratamento efetivo.

Concluiu-se que as duas técnicas são de fácil execução e de baixo custo, permitindo que sejam realizadas em condições de campo e permitindo que animais portadores sejam identificados com rapidez. Apesar da punção esplênica ter obtido uma taxa de detecção maior que o esfregaço sanguíneo de sangue periférico neste experimento, não se pode provar que a primeira técnica é melhor que a segunda, pois o número de animais utilizados nesse trabalho não é tão significativo, mas abre-se um espaço para que pesquisas maiores possam ser realizadas para a comprovação ou não da maior sensibilidade da técnica de punção esplênica para o diagnóstico de babesiose em equinos em relação ao uso do sangue periférico.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, C. D., MACHADO, R. Z., BOTTEON, P.T.L., TAKAKURA, F.S., MASSARD, C.L. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against *Babesia equi* in horses. **Ciência Rural**, v.34, n. 5, p. 1525-1529, 2004.
- BOTTEON, P. T. L., BOTTEON, R. C. C. M., REIS, T. P., MASSARD, C. L. Babesiose em cavalos atletas portadores. **Ciência Rural**, v. 35, n. 5, p. 1136-1140, 2005.
- BRÜNING, A. Equine piroplasmiasis: an update on diagnosis, treatment and prevention. **British Veterinary Journal**, v.152, n.2, p. 140-151, 1996.
- COLES, E.H. **Patologia Clínica Veterinária**, 3ed. São Paulo:Editora Manole, 1984, p. 566.
- GÜRTLER, H.; KETZ, A; SCHRÖDER, L.; SEIDEL, H. **Fisiologia Veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro:Editora Guanabara, 1984, p. 612.
- MOREIRA, M.A.B., ROCANTI, N.V., CORRÊA, R.R., SOUZA, M.V.M. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DO CAVALO ATLETA, 2007, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte [2007] (CD-ROM).
- NIZOLI, L. Q. **Alterações hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por *Babesia equi*, na região sul do Rio Grande do Sul**. Pelotas:

- Universidade Federal de Pelotas, 2005. 39p. Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)- Universidade Federal de Pelotas, 2005.
- SOUZA, M.V.M.; MOREIRA, M.A.B.; CORRÊA, R.R.; ROCANTI, N.V. [2007]. Diagnóstico de babesiose equina por punção esplênica. **ABRAVEQ**, 2007. Disponível em: <www.abraveq.com.br/novo_2007/artigo_0009.html> Acesso em: 8/04/09.
- TIZARD, I. R. Imunidade aos parasitas. In: TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 5. ed. São Paulo:Editora Roca, 1998, p. 326-340.
- ZAUGG, J.L. Babesiose. In: SMITH, B. P. **Medicina Interna de Grandes Animais**, 3 ed. Barueri:Barueri, 2006, p. 1051-1055.

Quadro 1. Animais utilizados na pesquisa de *Babesia*, tipo de confinamento e condições fisiológicas as quais se encontravam durante a punção esplênica e a colheita de sangue periférico proveniente da orelha, bem como o resultado do esfregaço de punção esplênica. Todos animais foram negativos em relação ao esfregaço de sangue periférico.

Animal	Presença de carrapatos	Confinamento	Mucosas	T °C	FC (BPM)	FR (MPM)	Resultado Punção Esplênica
1	Sim	Piquete	Normocoradas	37,5	36	12	Negativo
2	Não	Baia	Normocoradas	36,5	28	12	Negativo
3	Não	Baia	Normocoradas	36,8	36	12	Positivo – <i>T. equi</i>
4	Não	Baia	Normocoradas	36,4	40	12	Negativo
5	Não	Baia	Normocoradas	36,9	36	12	Negativo
6	Sim	Piquete	Normocoradas	37,3	56	20	Positivo – <i>T. equi</i>
7	Sim	Piquete	Normocoradas	37,3	44	20	Negativo
8	Sim	Baia	Normocoradas	37,7	44	10	Negativo
9	Sim	Piquete	Normocoradas	37,2	36	12	Negativo
10	Sim	Piquete	Normocoradas	38,4	32	10	Positivo – <i>T. equi</i>
11	Não	Baia	Normocoradas	37,6	40	12	Positivo – <i>B. caballi</i>
12	Não	Baia	Normocoradas	37,3	48	10	Negativo
13	Sim	Piquete	Normocoradas	37,4	40	10	Negativo
14	Sim	Piquete	Normocoradas	37,5	56	16	Positivo – <i>T. equi</i>
15	Sim	Piquete	Hipocoradas	38,1	44	12	Positivo – <i>T. equi</i>

Valores de Referência: Mucosas: normocoradas; Temperatura: 37,5-38°C ; FC: 32-44; FR: 8-16 (GÜRTLER et al. 1984).

Figuras



Fig. 1. Procedimento da punção esplênica. A agulha 25x30 é introduzida em um ângulo de noventa graus no décimo sétimo espaço intercostal.

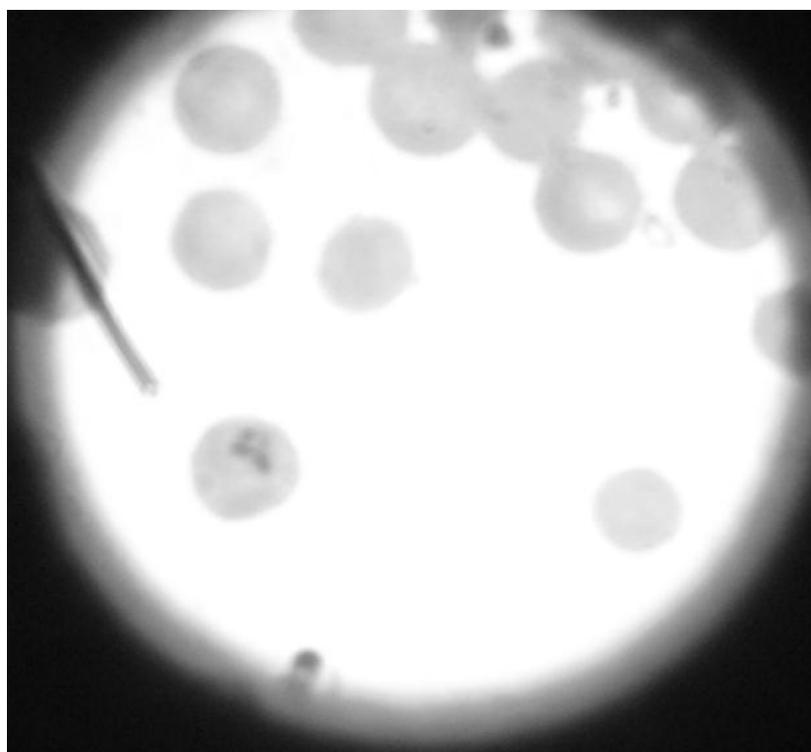


Fig. 2. Esfregaço sanguíneo de punção esplênica do animal 3, mostrando a ocorrência de *Theileria equi* dentro de uma hemácia (seta).

