

## 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. FONSECA<sup>1</sup>, A. R. TEIXEIRA NETO<sup>2</sup>, E. F. FONSECA<sup>3</sup>, A. M. G. B. SILVA<sup>4</sup>,  
E. M.M. LIMA<sup>2</sup>, R. F. GODOY<sup>2\*</sup>

### 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 hígidos, 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 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 peripheral 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 chronic babesioses in horses.

**KEY-WORDS:** Babesiosis. Diagnosis. Peripheral blood smear. Spleen puncture.

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

<sup>2</sup> 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](mailto:robertagodoy@unb.br)

<sup>3</sup> Tenente-Veterinário do Primeiro Regimento de Cavalaria de Guarda, Setor Militar Complementar s/n° 1° Regimento de Cavalaria de Guardas, Brasília, DF.

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

## 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 antúmero 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.



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

**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).

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 hemoglobínúria. Em todas as amostras de sangue periférico colhidas o resultado foi negativo para a presença de babesias.

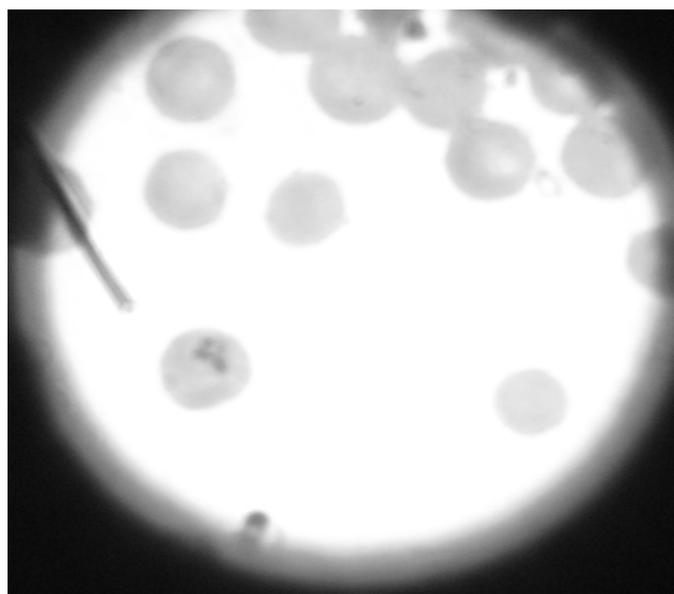
A *Theileria equi* e a *Babesia caballi* são difíceis de serem visibilizadas no sangue periférico de equinos, pois estão presentes em apenas 1 a 8% dos eritrócitos. A *Theileria equi* pode formar a configuração de Cruz de Malta, uma forma em tétrades. A *Babesia caballi* apresenta tamanho maior que a *Theileria equi* que mede menos de 2  $\mu\text{m}$  e a *B. Caballi* mede de 2,5 a 4  $\mu\text{m}$  (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.



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

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 consequentemente 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 *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](http://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.