



ESTUDO DA PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO CRÔNICA POR *THEILERIA EQUI* EM EQUINOS ATENDIDOS NO HOSPITAL ESCOLA DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ITAJUBÁ – FEPI

Igor Santos Freitas⁽¹⁾; Nydianne D'Angelis Rodrigues⁽²⁾; Lucymary Santana Lima⁽³⁾; Inaiá Roberta da Silva⁽⁴⁾; Luan Gavião Prado⁽⁵⁾

¹ Estudante de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, igor_freitasantos@outlook.com ² Estudante de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, nydianne.vet@gmail.com ³ Estudante de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, lucymarysilva@gmail.com ⁴ Estudante de Graduação em Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, inaia.roberta@outlook.com ⁵ Professor, Mestre do curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, luangprado@gmail.com

RESUMO

As piropasmoses são um grande desafio na clínica médica de equídeos, pois acomete uma grande parcela da população de animais destas espécies. São doenças causadas pelos agentes *Babesia caballi* e *Theileria equi*. A forma aguda de ambas as doenças leva a um quadro de anemia hemolítica moderada a grave. A *Theileria equi* permanece no organismo do hospedeiro durante toda a vida do mesmo após infecção inicial. Os principais fatores de risco para ocorrência desta afecção são contato prévio com carrapatos transmissores das doenças, treinamento intenso, internamentos em hospitais para tratamento das mais diversas doenças que acometem o equídeo. O diagnóstico é dado através de exame direto de esfregaço de sangue periférico. Estudos apontam a punção esplênica como um método com maior sensibilidade na detecção de animais cronicamente infectados por agentes da piropasmose equina. O presente projeto tem como objetivo realizar um levantamento da situação de infecção dos equídeos da região sul do estado de Minas Gerais através da realização de métodos diagnósticos moleculares e sorológicos. Apesar do pequeno número de animais testados pelo método de punção esplênica foi possível observar com esta pesquisa alta porcentagem de equinos portando o agente, pois outros trabalhos também demonstram altos índices de parasitemia em animais cronicamente infectados. Não foi possível observar a presença de *Theileria equi* nos esfregaços sanguíneos confeccionados de sangue total, sendo necessário a utilização de outras técnicas como PCR e/ou ELISA para encontrar o protozoário.

Palavras-chave: Equino; Hemoparasitas; *Babesia caballi*; *Theileria equi*.

INTRODUÇÃO

A Babesiose equina é uma das mais importantes doenças transmitidas por carrapatos e é endêmica em países da Europa, África, Ásia e Américas (SIGG et al., 2010; ZOBBA et al., 2008). A doença é causada por hemoprotozoários do gênero *Babesia* e *Theileria*. No equino as espécies

causadoras de babesiose são *Babesia caballi* e *Theileria equi* (HOMER et al., 2000).

A doença é caracterizada por febre, anemia, depressão, ataxia, anorexia, fraqueza, epífora, secreção nasal mucóide, edema, icterícia e



hemoglobinúria (RONCATI, 2006). Os sinais clínicos podem ser variáveis e inespecíficos (BASHIRUDDIN, CAMMÁ E REBÊLO, 1999). As alterações hematológicas mais frequentes são diminuição no número de eritrócitos, plaquetas e concentração de hemoglobina, neutropenia e linfopenia, diminuição do fibrinogênio plasmático, ferro sérico, fósforo e aumento de bilirrubina sérica (ZOBBA et al., 2008).

Infecções por *B. caballi* chegam a 1% de parasitemia, já as infecções por *T. equi* podem chegar até 7% de parasitemia, sendo consideradas mais graves, levando o animal a uma anemia grave e até ao óbito. Em casos graves de babesiose, além do tratamento convencional com drogas babesicidas os animais necessitam de tratamento suporte e suplementação dietética para que possam recuperar adequadamente (PIOTTO, 2009; CARR e HOLCOMBE, 2009).

Algumas técnicas são utilizadas para identificação do parasita, são elas, punção esplênica, exame direto, ELISA e PCR.

A técnica de punção esplênica vem sendo descrita e utilizada desde a década de 1950 em seres humanos para diagnóstico de diferentes alterações hematológicas como linfossarcoma, leucemias, policitemia vera, doença de Gaucher, entre outras (CHATERJEA et al., 1952).

Segundo MIRANDA et al. (2014) o melhor pontos para se realizar a punção em equídeos é aproximadamente 10 centímetros abaixo dos processos transversos das vértebras lombares, no 17º espaço intercostal esquerdo. O exame direto é considerado padrão ouro na rotina clínica como método de diagnóstico para hemoparasitoses. Para realização do método utiliza-se lâminas de esfregaço sanguíneo coradas pela técnica de Romanowsky modificado com o kit Panótico Rápido e são analisadas em microscópio óptico em óleo de imersão na objetiva de 1000 vezes, sendo visualizada inclusão citoplasmática de *Theileria equi* em hemácias (FREITAS 2016). Segundo GAVIÃO PRADO (2014) devida a coleta pontual foi observado baixa prevalência no exame direto.

De acordo com LEAL (2010) é uma técnica rápida, de fácil realização e possui alta especificidade, sendo possível diferenciar morfologicamente *Theileria equi* de *Babesia*

caballi, porém a principal desvantagem é a baixa sensibilidade em fases crônicas e subclínica da infecção.

O teste de ELISA promove detecção de antígeno e anticorpo a partir da imobilização de um dos reagentes em fase sólida, enquanto o outro reagente pode se ligar a uma enzima, com preservação tanto da atividade enzimática como da imunológica. O grau de pureza do antígeno e do anticorpo na fase sólida são fatores importantes, pois quaisquer alterações no material podem resultar em falso positivo ou negativo (RONCATI 2006).

Segundo LEAL (2010) o ELISA detecta IgG, imunoglobulina cujo a resposta ao antígeno é mais específica e duradoura, portanto em casos onde o animal seja portador inaparente, o título de anticorpos do tipo IgG contra piroplasmose permanece por toda a vida.

O teste é utilizado como ferramenta para a detecção de doença aguda e latente, principalmente com a utilização de antígenos recombinantes, entretanto, a despesa para a produção de antígenos recombinantes aumenta o custo do teste de piroplasmose equina (LEAL 2010).

De acordo com GAVIÃO PRADO (2014) a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é largamente empregada no diagnóstico de algumas doenças infecciosas por ser uma técnica simples, rápida e totalmente automatizada. As amostras podem ser obtidas através de fluidos corporais ou por meio de biópsia de tecidos.

A PCR é uma técnica que possui maior sensibilidade do que métodos de diagnósticos diretos como esfregaços sanguíneos. Para aumentar a sensibilidade do teste molecular, pode ser utilizado uma segunda reação que utiliza o produto da primeira reação. Essa técnica é conhecida como nested PCR (nPCR) (SILVEIRA 2012).

A partir de oligonucleotídeos, conhecidos como *primers*, a PCR sintetiza artificialmente, através de reações enzimáticas, sequência de Ácidos Desoxirribonucleicos (DNA) (GAVIÃO PRADO 2014).

De acordo com RONCATI (2006) a PCR é uma técnica para diagnóstico de *Theileria equi* por ser um exame altamente específico, entretanto, em animais que não apresentam sinais clínicos da doença, os resultados podem ser falso-negativos devido a níveis baixos da infecção, sendo necessário para estes animais outros exames, como esfregaço



sanguíneo ou o Teste de Fixação de complemento.

O objetivo do trabalho é realizar um levantamento da situação de infecção dos equídeos da região sul do estado de Minas Gerais através da realização de métodos diagnósticos moleculares e sorológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Para realização deste trabalho foram utilizados dois equinos sem raça definida, um macho e uma fêmea, foi realizado exame físico dos animais de acordo com Speirs (1997), avaliando-se o estado geral do animal, escore de condição corporal, comportamento e os índices paramétricos, temperatura retal (°C), frequência cardíaca (bpm), pulso (bpm), tempo de preenchimento capilar (segundos) e frequência respiratória (mpm). Em seguida, foram realizados os exames de mucosas (oral, nasal e ocular) e linfonodos (sub-mandibulares, parotídeos, cervical superficial e sub-ilíaco). Foram avaliados os sistemas circulatório, respiratório, digestivo, locomotor e nervoso.

A avaliação clínica e a coleta do sangue total e de sangue esplênico ocorreram nas dependências do Hospital Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI, 72 horas após a internação, pois é o tempo necessário para ocorrer parasitemia. Já as avaliações laboratoriais aconteceram nas dependências do Hospital Escola de Medicina Veterinária do Centro Universitário de Itajubá – FEPI.

A coleta de sangue esplênico foi feita após tricotomia e antisepsia cirúrgica com Iodo Povidona tópico e álcool iodado. Foi realizado a punção esplênica com agulha 30 mm X 0,8 mm e seringa estéril contendo ACD, no 17º espaço intercostal do lado esquerdo do animal. Após a punção foram confeccionados esfregaços com o sangue esplênico e corados pelo método de Romanowsky com o kit Panótico Rápido.

A coleta de sangue total foi realizada após antisepsia na região da veia jugular externa com algodão embebido em álcool 70%, a venopunção foi realizada com seringa estéril de 10 ml e agulha estéril 30 mm X 0,8 mm. O sangue foi armazenado em tubos acrescido com EDTA.

A partir do sangue do tubo contendo EDTA foram confeccionadas lâminas de esfregaço sanguíneo para análise microscópica.

RESULTADOS PARCIAIS

Apartir da avaliação microscópica dos esfregaços sanguíneos confeccionados com sangue esplênico, foi possível observar que 100% dos animais foram positivos para *Theileria equi* utilizando a técnica de punção esplênica. No entanto (FREITAS et al., 2016) cita em seu trabalho que 80% dos equinos são positivos para o agente utilizando a mesma técnica.

Durante a avaliação das lâminas confeccionadas com sangue total, notou-se que não foi possível observar protozoário no interior das hemácias.

CONCLUSÕES

Apesar do pequeno número de animais testados pelo método de punção esplênica foi possível observar com esta pesquisa alta porcentagem de equinos portando o agente, pois outros trabalhos também demonstram altos índices de parasitemia em animais cronicamente infectados.

Não foi possível observar a presença de *Theileria equi* nos esfregaços sanguíneos confeccionados de sangue total, sendo necessário a utilização de outras técnicas como PCR e/ou ELISA para encontrar o protozoário.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o Centro Universitário de Itajubá – FEPI pela bolsa FEPI, agradecemos também a Liga Acadêmica em Clínica Médica Equina – LACME.

REFERÊNCIAS

BASHIRUDDIN, J. B.; CAMMÁ, C.; REBÊLO, E. MOLECULAR DETECTION OF *Babesia equi* AND *Babesia caballi* IN HORSE BLOOD BY PCR AMPLIFICATION OF PART OF 16S R RNA GENE. **VETERINARY PARASITOLOGY**, v. 84, n. 1, p. 75-83, 1999.

CARR, E. A.; HOLCOMBE, S. J. NUTRITION OF CRITICALLY ILL HORSES. **VET CLIN EQUINE**, n. 25, p. 93-108, 2009.



CHATERJEA, J. B.; ARRAU, C. M.; DAMESHEK, W. SPLENIC PUNCTURE. **BRITISH MEDICAL JOURNAL**, p. 988-990, 1952.

FREITAS, I. S. **CHRONIC PIROPLASMOSIS DIAGNOSIS IN HEALTHY AND ADMITTED AT A TEACHING VETERINARY HOSPITAL HORSE BY SPLENIC PUNCTURE.** JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, 2016.

GAVIÃO PRADO, L. **AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL DE EQUÍDEOS SORORREAGENTES PARA *Anaplasma phagocytophilum* (RICKETTSIALES: ANAPLASMATACEAE) EM MINAS GERAIS, BRASIL.** DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL). BELO HORIZONTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2014.

HOMER, M. J.; AGUILAR-DELFIN, I.; TELFORD III, S. R. ET AL. BABESIOSIS. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 13, n. 3, p. 451-469, July, 2000.

LEAL, D. C. **AVALIAÇÃO DA PCR, PCR MULTIPLEX E NESTED PCR NO DIAGNÓSTICO DE *Theileria equi* EM EQUINOS.** DISSERTAÇÃO (MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL). SALVADOR: UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2010.

MIRANDA, A. L. S.; GAVIÃO PRADO, L.; TEIXEIRA, K. M. ET AL. IDENTIFICAÇÃO DO MELHOR PONTO PARA REALIZAÇÃO DA PUNÇÃO ESPLÊNICA EM EQUÍDEOS. **ANAIS DA XV CONFERÊNCIA ANUAL ABRAVEQ**, 2014.

PIOTTO, M. A. DETERMINAÇÃO DA INFECÇÃO POR *Theileria equi* E *Babesia caballii* EM EQUINOS ALOJADOS NO JÓQUEI CLUBE DE SÃO PAULO POR MEIO DA TÉCNICA DE C-ELISA (COMPETITIVE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY). 63P. 2009. DISSERTAÇÃO. (MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA) – FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, SÃO PAULO.

RONCATI, N. V. OCORRÊNCIA DE *Theileria equi* CONGÊNITA EM POTROS PURO SANGUE LUSITANO DO BRASIL, DIAGNOSTICADA ATRAVÉS DA TÉCNICA

DE RT-PCR. 69p. 2006. TESE. (DOCTORADO EM MEDICINA VETERINÁRIA) – FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA DE ZOOTECNIA, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, SÃO PAULO, SÃO PAULO.

SIGG, L.; GERBER, V.; GOTTSTEIN, B. ET AL. SEROPREVALENCE OF *Babesia caballii* AND *Theileria equi* IN THE SWISS HORSE POPULATION. **PARASITOLOGY INTERNATIONAL**, v. 59, p. 313-317, 2010.

SILVEIRA, J. A. G. **OCORRÊNCIA DE HEMOPARASITOS E ECTOPARASITOS EM VEADO-CATINGUEIRO (*Mazama gouazoubira* FISCHER, 1814), VEADO CAMPEIRO (*Ozotocerus bezoarticus* LINNAEUS, 1758) E CERVO-DO-PANTANAL (*Blastocerus dichotomus* ILLIGER, 1815): UTILIZAÇÃO DE MÉTODOS PARASITOLÓGICOS E MOLECULARES.** TESE (DOCTORADO EM PARASITOLOGIA). BELO HORIZONTE: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, 2012.

ZOBBA, R.; ARDU, M.; NICCOLINI, S. ET AL. CLINICAL NA LABORATORY FINDINGS IN EQUINE PIROPLASMOSIS. **JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE**, v. 28, n. 5, p. 301-308, 2008.