

BABESLA CANIS EM CÃES DE RUA DA CIDADE DE SÃO PAULO. I. ESTUDO COMPARATIVO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

ARLETE DELL'PORTO
Professor Assistente Doutor
Instituto de Ciências
Biomédicas da USP

MAURO RODRIGUES DE OLIVEIRA
Professor Assistente Doutor
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia da UNESP
Campus de Botucatu

OMAR MIGUEL
Professor Titular
Faculdade de Saúde
Pública da USP

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* em cães de rua da Cidade de São Paulo. I. Estudo comparativo de métodos de diagnóstico. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):41-45, 1990.

RESUMO: Amostras de sangue de 106 cães de rua da Cidade de São Paulo foram examinadas para pesquisa de *Babesia canis*. As técnicas utilizadas foram a da observação direta do parasita em esfregaço sangüíneo, corado por corante de Rosenfeld, e a reação de imunofluorescência indireta (IFI). Através da primeira diagnosticou-se a infecção em 10,3% dos animais, enquanto que a sorologia revelou 42,4% de cães positivos. No teste de IFI os títulos variaram de 1:10 a 1:2560, sendo mais freqüente o de 1:40. Este último teste apresentou boa sensibilidade e alta especificidade, mostrando-se ideal para levantamentos epidemiológicos.

UNTERMOS: Babesiose, cães

INTRODUÇÃO

A babesiose canina, doença que acomete canídeos domésticos e silvestres dos cinco continentes, tem por agente causal a *Babesia canis* (Piana & Galli-Valério, 1895), protozoário parasita de eritrócitos transmitido pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1829).

Embora constituindo problema de saúde animal, pouco se sabe da real ocorrência dessa doença. O diagnóstico, realizado, em geral, com base na

sintomatologia e confirmado pelo encontro do parasita em esfregaços sangüíneos, mostra-se falho em apontar casos de infecção crônica. Estes são detectados somente com o auxílio de métodos mais sensíveis, como os sorológicos.

Com base nestes fatos os objetivos deste trabalho foram:

- determinar a ocorrência da babesiose canina em cães de rua da Cidade de São Paulo, utilizando como métodos de diagnóstico a técnica da observação direta do parasita em esfregaço sangüíneo, preparado com sangue capilar e de grandes vasos, e o teste de imunofluorescência indireta (IFI);
- comparar e avaliar, estatisticamente, os resultados obtidos com os dois métodos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 106 cães adultos, machos e fêmeas, sem raça definida, escolhidos ao acaso no Canil do Serviço de Apreensão da Prefeitura Municipal de São Paulo, em meados de 1986.

A pesquisa do parasita foi realizada em esfregaços de sangue "in natura" obtidos da borda da orelha (sangue capilar) e das veias safena ou radial (sangue de grandes vasos) dos animais do experimento, corados pelo método de Rosenfeld (ROSENFELD⁸, 1947). Sob imersão examinavam-se, preferencialmente, as bordas e cauda das preparações.

O antígeno para o teste de IFI foi obtido a partir de um cão jovem esplenectomizado e inoculado com sangue positivo para *B. canis*. Quando cerca de 4% dos eritrócitos estavam infectados, o sangue foi colhido assepticamente em solução de EDTA a 10% e lavado três vezes, em solução de Alsever, por centrifugação a 1500 rpm, durante 10 minutos. Com o concentrado de hemácias lavadas foram preparados esfregaços finos que, após secagem à temperatura ambiente, eram embrulhados individualmente em papel de seda e, em seguida, envoltos em papel de alumínio, constituindo blocos de 10 lâminas. Estes últimos foram mantidos à temperatura de -40 °C até o momento de uso, ocasião em que os blocos necessários eram retirados do congelador e deixados em temperatura ambiente por 30 minutos, para estabilização térmica.

O teste de IFI foi montado segundo técnica descrita por CAMARGO³ (1973), com pequenas modificações. Nas lâminas de antígenos eram demarcados com esmalte, nas bordas e cauda do esfregaço, sete círculos de aproximadamente um centímetro de diâmetro. No interior de cada círculo colocava-se o soro suspeito em diluições crescentes, na razão 2. Um dos círculos

destinava-se a soro comprovadamente negativo para *B. canis*. Os soros que reagiam fortemente na diluição de 1:160, eram testados em diluições maiores, até mostrarem reação totalmente negativa, quando comparados com os soros controles. A leitura das lâminas do teste foi realizada em fotomicroscópio ZEISS, provido de lâmpada de alta pressão de mercúrio (HBO-200).

O conjugado anti-cão foi preparado em coelho, de acordo com técnicas convencionais de imunização, pelo Serviço de Zoonoses da Prefeitura Municipal de São Paulo. O conjugado foi utilizado na diluição de 1:80.

Para a análise estatística foi empregado o teste de duas proporções com aproximação pela distribuição normal de probabilidades, ao nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$) segundo GOLDSTEIN⁵ (1965), para comparar os métodos empregados e verificar possíveis diferenças entre sexos.

RESULTADOS

Na Tab. 1 encontram-se os resultados dos exames de esfregaços de sangue, obtidos da borda da orelha e das veias safena ou radial. A aplicação do teste de duas proporções revelou ou não haver diferença significativa ($Z = 1,03$) entre os resultados das duas modalidades de esfregaços.

Nas mesmas tabelas constam os resultados do teste sorológico, verificando-se que dentre as 106 amostras de soro examinadas, 45 mostravam-se positivas, com títulos variando de 1:10 a 1:2560. O título observado com maior frequência foi o de 1:40. As 11 amostras de soro utilizadas como controle foram negativas em todas as diluições testadas.

Nas lâminas de antígeno para o teste de IFI, os parasitas achavam-se em maior quantidade nas bordas e extremidade das preparações, aos pares ou isolados, formando aglomerados. Algumas babesias eram encontradas isoladas nas porções centrais dos esfregaços.

Nas preparações positivas ao teste de IFI, os parasitas apresentavam um halo de fluorescência bastante intensa, de coloração verde-citrino. Nas preparações negativas, não se observou fluorescência nos parasitas ou nas hemácias, em nenhuma das diluições empregadas. Nessas preparações os parasitas dos aglomerados apresentavam-se ligeiramente avermelhados ou mesmo esverdeados, porém sem fluorescência.

O teste de duas proporções revelou diferenças significativas entre os resultados dos testes de IFI e os da técnica de esfregaços de sangue da borda da orelha ($Z = 5,39$), e das veias safena ou radial ($Z = 5,95$).

DISCUSSÃO

Esfregaços sangüíneos - Os resultados da Tab. 1 são concordes com as observações de PAINE⁷ (1934) e SCHALM et alii⁹ (1975), os quais constataram que em infecções crônicas por *B. canis*, o número de parasitas circulantes é pequeno, dificultando seu encontro. Porém, em esfregaços de sangue capilar, a probabilidade de encontro das babesias é maior, uma vez que o pequeno calibre dos vasos dificultaria a passagem das hemácias parasitadas, visto que o volume destas últimas estaria aumentado. Entretanto, PAINE⁷ (1934) não submeteu seus resultados à avaliação estatística. Embora obtendo dados concordes com as observações dos autores supra-citados, a análise estatística de nossos resultados revelou que o diagnóstico da infecção pode ser feito indiferentemente por meio de esfregaços de sangue obtido de vasos de pequeno ou grande calibre.

Por ocasião do exame dos esfregaços sangüíneos foi dada maior atenção às bordas e cauda (extremidade) das preparações, conforme recomendações de SCHALM et alii⁹ (1975) e BURR² (1982). Entretanto, algumas vezes foram encontradas hemácias parasitadas apenas nas áreas centrais dos esfregaços, confirmando as observações de CARVALHO⁴ (1939).

O percentual de positividade aos exames de esfregaços sangüíneos foi de 10,3%. Este baixo número levamos a sugerir que a maior parte dos animais examinados achava-se em estágio de infecção crônica, pois, segundo BREITSCHWERDT et alii¹ (1983) e HAGIWARA⁶ (1983), nesta fase é difícil, ou mesmo impossível, diagnosticar a parasitose por meio de esfregaços sangüíneos, mesmo repetindo-os por vários dias consecutivos.

Teste de IFI - Pela Tab. 1 observa-se que 45 dos 106 animais apresentavam-se positivos ao teste de IFI, significando que a infecção babesica ocorreu em 42,4% dos cães examinados. Tais resultados vêm ao encontro dos de BREITSCHWERDT et alii¹ (1983) que, utilizando o mesmo teste, constataram, incidência de *B. canis* acima de 50% em animais de canis de sete cidades do sul dos Estados Unidos.

Analisando a tabela observa-se maior número de positivos entre as fêmeas (57,1%) do que entre os machos (37,1%). Esta diferença, provavelmente, deve-se ao fato de fêmeas apresentarem hábitos mais sedentários, mormente no período pós-parto, quando permanecem grande parte do tempo em seus ninhos, estando mais sujeitas às infestações por carrapatos vetores da doença, aumentando, assim, a probabilidade de adquirir a infecção. Este fato poderia, também, estar relacionado a hormônios, que atuariam de maneira a ocasionar baixa na resposta imunitária do organismo hospedeiro, permitindo recrudescência da infecção babesica até então sem manifestações clínicas.

O teste de duas proporções, aplicado para comparar o método de esfregaço sangüíneo com o teste de IFI, utilizado no diagnóstico de *B. canis*, revelou haver diferença significativa entre eles. Esses resultados permitem-nos afirmar que o teste de IFI apresenta maior sensibilidade, conseguindo diagnosticar a infecção em maior número de animais.

A detecção de casos assintomáticos é importante para a clínica de pequenos animais, pois a babesiose canina, quando associada a outras infecções, pode exacerbar, ou mesmo alterar, o quadro clínico geral, dificultando o diagnóstico específico.

A constatação desses casos também se reveste de importância, principalmente no que diz respeito a cães destinados a pesquisas imunológicas, uma vez que a *Babesia* forma, com os anticorpos e o complemento, complexos circulantes que podem alterar ou mesmo falsear os resultados dessas pesquisas.

CONCLUSÕES

A ocorrência de infecção por *B. canis* em cães de rua da Cidade de São Paulo foi de 10,3%, quando determinada pelo exame de esfregaços sangüíneos, e de 42,4%, quando verificada pelo teste de IFI.

A análise estatística dos resultados obtidos nos esfregaços sangüíneos leva-nos a afirmar que estes podem ser feitos ou com sangue da borda da orelha ou das veias safena ou radial, sendo igual a probabilidade de detectar os parasitas.

A análise estatística aplicada para comparar os dois métodos de diagnóstico demonstrou que o teste de IFI apresenta maior sensibilidade e que, apesar da alta especificidade do método de esfregaço sangüíneo, este não é capaz de revelar de forma significativa a infecção babésica na fase crônica.

AGRADECIMENTOS: Ao Serviço de Apreensão da Prefeitura Municipal de São Paulo, nas pessoas do Dr. Arnaldo Villa Nova e Dra. Maria de Lourdes A.B. Reichmann.

DELL'PORTO, A.; OLIVEIRA, M.R.; MIGUEL, O. *Babesia canis* in stray dogs of São Paulo City. I. Comparative study of methods for diagnosis. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, 27(1):41-45, 1990.

SUMMARY: Blood samples from 106 stray dogs of São Paulo City were examined to detect *Babesia canis*. Rosenfeld stained blood smears and the immunofluorescent antibody test (IFAT) were the techniques used for diagnosis. The first technique showed that 10.3% of the animals were infected and the latter revealed 42.4% of seropositive dogs. Titers in the IFAT ranged from 1:10 to 1:2560, and the most frequent titer was 1:40. The IFAT demonstrated a relatively high sensibility and high specificity, revealing to be a dependable method for epidemiological surveying.

UNITERMS: *Babesia* infection in dogs

TABELA 1 — Resultados obtidos nas fêmeas e machos da espécie canina, segundo a utilização de esfregaços de sangue da borda da orelha (E_O), das veias safena ou radial (E_V) e teste de IFI. São Paulo, 1986.

Nº do Animal	E _O	E _V	Título máximo à IFI	Nº do Animal	E _O	E _V	Título máximo à IFI
1	+	-	2560	54	-	-	20
2	+	-	40	55	-	-	20
3	+	-	1280	56	-	-	320
4	-	-	40	57	-	-	40
5	-	-	1280	58	-	-	0
6	-	-	20	59	-	-	0
7	-	-	160	60	-	-	0
8	-	+	10	61	-	-	0
9	+	-	40	62	-	-	0
10	-	+	160	63	-	-	0
11	+	+	160	64	-	-	0
12	-	-	80	65	-	-	0
13	-	-	320	66	-	-	0
14	-	-	80	67	+	-	0
15	-	-	20	68	-	-	0
16	-	-	160	69	-	-	0
17	-	-	0	70	-	-	0
18	-	-	0	71	+	+	0
19	-	-	0	72	-	-	0
20	-	-	0	73	-	-	0
21	+	+	0	74	-	-	0
22	-	-	0	75	-	-	0
23	-	-	0	76	-	-	0
24	-	-	0	77	-	-	0
25	-	-	0	78	-	-	0
26	-	-	0	79	-	-	0
27	-	-	0	80	-	-	0
28	-	-	0	81	-	-	0
29	-	-	320	82	-	-	0
30	-	-	80	83	-	-	0
31	-	-	160	84	-	-	0
32	-	-	160	85	-	-	0
33	-	-	10	86	-	-	0
34	-	-	40	87	-	-	0
35	-	-	80	88	-	-	0
36	-	-	160	89	-	-	0
37	-	-	1280	90	-	-	0
38	-	-	40	91	-	-	0
39	-	-	320	92	-	-	0
40	-	-	40	93	-	-	0
41	-	-	160	94	-	-	0
42	-	-	20	95	-	-	0
43	-	-	40	96	-	-	0
44	-	-	160	97	-	-	0
45	+	-	20	98	-	-	0
46	-	-	40	99	-	-	0
47	-	-	40	100	-	-	0
48	-	-	20	101	-	-	0
49	-	-	1280	102	-	-	0
50	-	-	40	103	-	-	0
51	-	-	20	104	-	-	0
52	-	-	20	105	-	-	0
53	-	-	20	106	-	-	0

+ = esfregaço positivo

- = esfregaço negativo

Obs. 1-28: fêmeas

29-106: machos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-BREITSCHWERDT, E.B.; MALONE, J.B.; MACWILLIAMS, P.; LEVY, M.G.; QUALLS, C.W.; PRUDICH, M.J. Babesiosis in the Greyhound. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 182:978-982, 1983.
- 02-BURR, E.W. Methods for diagnosis of *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* and *Haemobartonella canis*. *Indian vet. J.*, 59:984-987, 1982.
- 03-CAMARGO, M.E. *Introdução às técnicas de imunofluorescência*. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, 1973.
- 04-CARVALHO, G.S.T. *Ação da piroplasma sobre os hematozoários no Nambiuvú*. São Paulo, 1939. (Tese de Cátedra - Faculdade de Medicina Veterinária da USP)
- 05-GOLDSTEIN, A. *Biostatistics: an introductory text*. 2.ed. New York, McMillan, 1965.
- 06-HAGIWARA, M.K. *Estudo das alterações hematológicas e da coagulação em cães esplenectomizados e infectados experimentalmente por Babesia (Starcovic, 1893) canis*. São Paulo, 1983. (Tese de Livre-docência - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP)
- 07-PAINE, R. An observation on the preparation of blood smears for the diagnosis of piroplasmiasis. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.*, 5:127, 1934.
- 08-ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue. Noções práticas sobre corantes pancromicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, 20:315-328, 1947.
- 09-SCHALM, O.W.; JAIN, N.C.; CARROL, E.J. *Veterinary hematology*. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1975. p. 453-458.

Recebido para publicação em 10/02/89

Aprovado para publicação em 10/10/89