

## DIAGNÓSTICO DE HEMOPARASITOSE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE DISTENSÃO DE GOTA DE COÁGULO SANGUÍNEO<sup>1</sup>

### DIAGNOSIS OF HEMOPARASITOSIS THROUGH THE SPREAD-SMEAR TECHNIQUE USING A DROP OF BLOOD CLOT

Neusa Saltiel STOBBE<sup>2</sup>; Eunice Leonora CHAPLIN<sup>3</sup>; Maria das Graças de Souza PAIVA<sup>2</sup>; Nilton Rogério Santos SILVA<sup>3</sup>;  
Flávio A. Pacheco ARAÚJO<sup>3</sup>; Elinor FORTES<sup>4</sup>

#### RESUMO

O desempenho da técnica de distensão de Gota de Coágulo de sangue, entre as colorações de Giemsa diluído e puro, é avaliado em relação à possibilidade de observação dos elementos figurados e da presença de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale*. Utilizou-se um bovino, com 6 meses de idade inoculado com os agentes da Tristeza Parasitária, como doador das amostras de sangue. A técnica permitiu a observação dos eritrócitos, leucócitos e dos hemoparasitas.

UNITERMOS: *Babesia*; *Anaplasma marginale*; Diagnóstico; Técnicas; Bovinos

#### INTRODUÇÃO

As distensões finas vêm sendo utilizadas nos exames de sangue, em análises clínicas e em diagnósticos de hemoparasitoses, desde o início do século até os dias de hoje<sup>5, 11, 14, 25</sup>. Após a colheita do sangue, pode ocorrer hemólise pela agitação da amostra, altas temperaturas e substâncias que diminuam a tensão superficial<sup>4</sup> sendo que a distensão deve ser confeccionada em uma a duas horas após a colheita, para que se mantenham as condições ideais de exame<sup>11</sup>. Em amostras velhas de sangue, os eritrócitos podem apresentar artefatos de técnica e muitos leucócitos podem mostrar-se degenerados<sup>8, 11</sup>. A ocorrência de anisocitose leve a moderada é considerada fisiológica em bovinos<sup>11, 13</sup>.

Uma das doenças de bovinos, responsáveis por elevadas perdas econômicas, é a Tristeza Parasitária<sup>16, 20</sup> sendo que os primeiros sinais clínicos de babesiose ocorrem entre o 8º e 16º dias após a inoculação dos agentes pelo Vektor<sup>17</sup>. Os corpúsculos iniciais de *Anaplasma marginale* podem aparecer na circulação a partir do 5º dia da inoculação, porém os marginais tem apresentação máxima próxima ao 20º dia perdurando por duas semanas<sup>21</sup>.

O diagnóstico pode ser realizado por testes sorológicos, porém, poucos laboratórios nos países tropicais estão preparados para sua utilização<sup>17, 20</sup>. Para o diagnóstico pós-morte pode-se utilizar esfregaços de órgãos para pesquisa dos agentes que mantém suas características morfológicas inalteradas por alguns dias<sup>1, 2, 7, 9, 10, 12, 15, 26</sup>.

Baseando-se nos resultados obtidos em esfregaços de órgãos e devido ao limite de tempo de confecção das distensões finas de sangue CHAPLIN et al.<sup>3</sup> (1987) desenvolveram a técnica de esfregaço de fragmento de coágulo de sangue. A partir dessa técnica STOBBE et al.<sup>24</sup> (1988) desenvolveram uma técnica alternativa, que utiliza uma gota de sangue obtida ao corte do coágulo.

Pesquisa semelhante foi realizada por FUJI SAKI et al.<sup>6</sup> (1989) que resgatou *Theileria sergenti* através de filtração do coágulo sanguíneo por pressão.

A coagulação do sangue ocorre em período de 30 a 60 minutos<sup>22</sup>, completando-se com a transformação do fibrinogênio em fibrina e com a separação do soro<sup>13, 19</sup>. O fibrinogênio, que pode estar em maior quantidade em processos inflamatórios agudos<sup>11</sup>, tem afinidade pela membrana eritrócítica<sup>27</sup>. Durante a formação do coágulo, leucócitos e eritrócitos parasitados, devido ao seu maior tamanho e menor peso específico, permanecem na parte mais alta, consistindo a porção lardácea do coágulo<sup>8, 11, 13, 26</sup>, com exceção de alguns leucócitos que migram para o soro devido aos seus movimentos amebóides<sup>4</sup>.

Na coloração de hemoparasitas, normalmente é utilizado o método de Giemsa<sup>10, 14, 18</sup> sendo que algumas alterações de coloração podem ser atribuídas à variação do pH da superfície da lâmina, a erros no processamento da técnica como também à degeneração de leucócitos.

O presente trabalho mostra alguns resultados obtidos com a técnica de gota de coágulo de sangue, com o objetivo de apresentar uma alternativa de técnica para exame de sangue, principalmente de hemoparasitas.

#### MATERIAL E MÉTODO

O experimento teve lugar nos laboratório e estábulo do Setor de Protozoologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Foram estabelecidos 2 grupos com a técnica de distensão de gota de coágulo de sangue, um com coloração pelo método de Giemsa diluído<sup>14, 18</sup> e outro pelo método de Giemsa puro.

Um bovino esplenectomizado, de origem européia, com aproximadamente 6 meses de idade, negativo para *Babesia bovis*

1-Trabalho apresentado como um dos requisitos para o grau de mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul, financiado pela UFRS.

2-Mestranda em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul; bolsista do CNPq; Caixa Postal 2172, Porto Alegre-RS, Brasil.

3-Professor - Faculdade de Medicina Veterinária da Univ. Federal do Rio Grande do Sul.

4-Professor - Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

pelo teste de imunofluorescência indireta, e negativo para todos os agentes em distensões de lâmina, foi inoculado com sangue de outro bovino, comprovadamente portador dos agentes da Tristeza Parasitária e então usado como doador das amostras de sangue.

As amostras de sangue foram colhidas, sem anticoagulante, nos dias 8, 10, 12, 22, 24, 26 após a inoculação, mantidas em temperatura ambiente e em repouso por uma hora, para ocorrer a coagulação, após o que, foram refrigeradas até seu processamento. Foram confeccionadas 4 lâminas de cada amostra de coágulo, num total de 24, pela técnica de distensão de gota obtida a partir do coágulo de sangue descrita a seguir:

- retirar o coágulo do soro;
- secar a superfície externa do coágulo em papel absorvente;
- cortar o coágulo transversalmente próximo da zona lardácea;
- raspar levemente a superfície seccionada com a borda de uma lâmina capturando assim uma gota;
- distender a gota conforme a técnica de distensão fina de sangue;
- secar imediatamente.

Das 4 lâminas de cada amostra, 2 foram coradas pelo método de Giemsa diluído e 2 pelo método de Giemsa puro. Todas as amostras foram processadas no mesmo dia da colheita, com exceção da amostra do dia 26 que foi processada 24 horas após.

A observação da apresentação dos eritrócitos e leucócitos foi feita de acordo com STOBBE<sup>23</sup> (1990) e a determinação das parasitemias por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* conforme recomendação do INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA<sup>10</sup> (1985), com objetiva de imersão num total de 1000 vezes de aumento.

## RESULTADOS

A observação da qualidade de confecção de lâminas (Tab. 1, 2 e 3) apresentou os seguintes resultados:

- a visualização foi boa em todas as lâminas com presença de poucos depósitos de corante em 2/3 das lâminas (Tab. 1);
- cerca de 2/3 das lâminas apresentaram menos de 50% dos eritrócitos deformados (Tab. 2);
- a anisocitose foi leve a moderada durante o período experimental (Tab. 2);
- a coloração dos eritrócitos foi predominantemente vermelho tijolo com o corante puro e rosa com o diluído (Tab. 2);
- a maioria das lâminas apresentou boa distribuição dos eritrócitos somente nas extremidades e número médio de eritrócitos por campo maior que 500 (Tab. 2);
- o grupo do corante diluído revelou maior quantidade de leucócitos, corando-os melhor do que os do puro (Tab. 3).

A observação do número de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* e *Anaplasma marginale* nas lâminas de esfregaço de coágulo apresentou os seguintes resultados:

- o número de *Babesia bovis* foi maior no 8º dia nas lâminas de esfregaço do grupo GIEMSA DILUÍDO, porém seu maior número foi detectado no 24º dia no grupo GIEMSA PURO;

- o maior número registrado de *Babesia bigemina* foi nas lâminas de ambos os grupos no 12º dia, sendo que o agente não foi visualizado nos 8º, 10º, 24º e 26º dias.

- o maior número detectado de *Anaplasma marginale* foi nas lâminas de esfregaço do grupo GIEMSA DILUÍDO no 26º dia, estando presente nos 22º e 24º dias. As lâminas de esfregaço do coágulo do grupo GIEMSA PURO apresentaram o agente apenas no 24º dia.

## DISCUSSÃO

A boa visualização apresentada por todas as lâminas indica que a técnica de distensão de gota de coágulo manteve condições satisfatórias para o exame de sangue. As porcentagens de deformação encontradas nos eritrócitos (Tab. 2) e leucócitos (Tab. 3) podem estar relacionadas com o tempo decorrido entre a colheita e a confecção das lâminas<sup>11</sup>, sendo que é comum encontrar-se muitos leucócitos degenerados em distensões finas de sangue<sup>8</sup>.

A ausência do soro na gota utilizada<sup>13</sup> e a aglutinação dos eritrócitos determinada pelo fibrinogênio, principalmente nos processos inflamatórios agudos<sup>11,26</sup> dificultariam a separação destas células, determinando um número médio por campo bastante elevado na maioria das lâminas, com uma boa distribuição principalmente nas bordas da distensão (Tab. 2).

O tempo de atuação do corante provavelmente determinou a coloração mais intensa dos eritrócitos (Tab. 2) e dos leucócitos (Tab. 3), sendo que a melhor coloração do esfregaço pode ter permitido a detecção da maior quantidade de agentes no grupo diluído.

Nenhum destes fatores, no entanto, parece ter interferido na observação da anisocitose, nos grupos de coloração, que se manteve dentro da normalidade para bovinos<sup>11,13</sup>.

As diferenças encontradas entre os 2 grupos na quantificação de *Babesia bovis* e o seu maior registro ocorrido no 24º dia e não entre o 8º e 16º dias citado por MAHONEY<sup>17</sup> (1977), podem ser atribuídos ao local do coágulo utilizado e à possível retenção de eritrócitos parasitados na rede de fibrina<sup>8,11</sup>, apesar de que estes eritrócitos podem ser extraídos com alguma pressão<sup>6</sup>. Esses fatores também podem estar relacionados com a quantificação obtida de *Babesia bigemina*.

As diferenças encontradas na quantificação de *Anaplasma marginale* parecem estar relacionadas com os locais do coágulo destinados a cada grupo e ao tempo de atuação do corante, onde o grupo diluído apresentou elevados percentuais da riquetsia, quando comparado com o grupo puro.

## CONCLUSÕES

- a técnica de distensão de gota de coágulo permitiu a observação dos elementos figurados no exame de esfregaço de sangue;
- a técnica pode ser utilizada no diagnóstico laboratorial de *Babesia spp* e *Anaplasma marginale*.
- a coloração com Giemsa diluído apresentou melhor desempenho que o puro na visualização dos elementos figurados e na quantificação de *Anaplasma marginale*.

TABELA 1

Observação dos esfregaços obtidos a partir do coágulo segundo a visualização geral e presença de resíduos de corante e sua distribuição nos grupos (em número de lâmina). Porto Alegre.

Aspectos observados	GIEMSA PURO	GIEMSA DILUÍDO
a. Visualização geral		
- impossível	0	0
- difícil	0	0
- razoável	0	0
b. Resíduos de corante		
- raro	1	1
- pouco	8	8
- bastante	2	3
- muito	1	0

TABELA 2

Observação dos eritrócitos quanto à apresentação e distribuição nos esfregaços de coágulo (em número de lâminas). Porto Alegre.

Aspectos observados	GIEMSA PURO	GIEMSA DILUÍDO
a. Conformação dos eritrócitos		
- menos de 25% deformados	3	5
- 26-50% deformados	4	3
- 51-75% deformados	5	4
- mais de 76% deformados	0	0
b. Anisocitose		
- leve	6	6
- moderada	6	6
- acentuada	0	0
c. Coloração		
- vermelho tijolo	10	2
- rosa claro	2	6
- rosa escuro	0	4
- azulada	0	0
d. Distribuição		
- irregular	0	0
- muito juntos	2	0
- boa nas extremidades	6	8
- boa em toda lâmina	4	4
e. Número médio/campo		
- 200/350	1	2
- 351/500	3	2
- 501/650	4	3
- mais de 650	4	5

TABELA 3

Observação dos leucócitos quanto à apresentação e distribuição nos esfregaços de coágulo (em número de lâminas). Porto Alegre.

Aspectos observados	GIEMSA PURO	GIEMSA DILUÍDO
a. Quantidade de leucócitos	+	
- raros	2	2
- poucos	4	4
- bastante	2	7
- muitos	0	1
b. Conformação	+	
- menos de 25% deformados	4	2
- 26-50% deformados	2	6
- 51-75% deformados	0	1
- mais de 76% deformados	2	3
c. Coloração		
- não corados	4	0
- fracamente corados	6	0
- só núcleo corado	0	3
- bem corados	2	9

+ Foi impossível analisar a conformação e quantidade de leucócitos em quatro lâminas de esfregaço de coágulo do grupo GIEMSA PURO.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e ao técnico Agnelo Ribeiro somos gratos por todos os auxílios prestados.

## SUMMARY

The spread-smear technique using a drop of blood clot and stained by diluted and undiluted Giemsa stain was evaluated for the search of blood cell types and recognition of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* hemoparasites. The blood clot samples were taken from a 6 month-old calf experimentally inoculated with the blood from a Cattle Tick Fever carrier. The Technique was suitable for the observation of different blood cells and for the recognition of the hemoparasites.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01-CALLOW, L. L.; JOHNSTON, L. A. Y. *Babesia* spp. in the brains of clinically normal cattle and their detection by a brain smear technique. *Aust. vet. J.*, v. 39, p. 25-31, 1963.
- 02-CALLOW, L. L.; MCGAVIN, M. D. Cerebral babesiosis due to *Babesia argentina*. *Aust. vet. J.*, v. 39, p. 15-21, 1963.
- 03-CHAPLIN, E. L.; STOBBE, N. S.; ARAÚJO, F. A. P.; SILVA, N. R. S. Diagnóstico laboratorial de hemocitose através de esfregaço de sangue coagulado (Nota Prévia). *Arq. Fac. Vet. Univ. Fed. R. G. Sul*, v. 15/16, p. 65, 1987/88.
- 04-DUKES, H.H. *Fisiologia de los animales domesticos*. 3.ed. Madrid, Aguilar, 1969. p. 17-62.
- 05-FONSECA, A.; BRAGA, A. *Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos*. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 1924.
- 06-FUJI SAKI, K.; KAMIO, T.; NAKAMURA, Y.; SHIMURA, K.; TAKAMASHI, Y.; KAWAZU, S.; SHIMIZU, S.; MINAMI, T.; ITO, S. *Theileria sergenti*: a simple method for isolation of isolation of piroplasma from erythrocytes. *Jap. J. vet. Sci.*, v. 51, p. 457-9, 1989.
- 07-HADANI, A.; HAAN, L.; GONZALEZ DE RIOS, L.; GUGLIELMONE, A. A.; BERMUDEZ, A.; MANGOLD, A. The detection of babesiosis in bovines by the indirect immunofluorescent antibody test compared to the prevalence of *B. bovis* in cerebral smears. *Brit. vet. J.*, v. 139, p. 1208-12, 1983.
- 08-HAM, A. W. *Histologia*. 7.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977. p. 756.
- 09-HOYTE, H.M.D. Differential diagnosis of *Babesia argentina* and *Babesia bigemina* infections in cattle using thin blood smears and brain smears. *Aust. vet. J.*, v.47, p. 248-50, 1971.
- 10-INTSTUTUTO INTERAMERICANO DE COOPERACIÓN PARA LA AGRICULTURA. *Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina*. San José, p. 79, f. 12, 1985.
- 11-JAIN, N.C. *Schalm's veterinary hematology*. 4. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1986. p.1221.
- 12-KESSLER, R. H.; MADRUGA, C. R.; SCHENK, M. A. M.; RIBEIRO, O. C. Babesiose cerebral por *Babesia bovis* (Babés 1888, Starcovic 1893) em bezerras no Estado de Mato Grosso do Sul. *Pesq. Agropec. bras.*, v.18, p. 931-5, 1983.
- 13-KOLB, E. *Fisiologia veterinária*. 2.ed. Zaragoza, Acriba, 1976. p. 420-82.
- 14-LANGERON, M. *Précis de microscopie*. 6.ed. Paris, Masson et cte., 1942. p. 736-64.

- 15-LEEFLANG, P. Diagnosis of *Babesia argentinna* infections in cattle using brain smears. *Aust. vet. J.*, v.48, p.72, 1972.
- 16-McCOSKER, P. J. The global importance of babesiosis. In: RI STIC, M.; KREIER, J. P. *Babesiosis*. New York, Academic Press, 1981. p. 1-24.
- 17-MAHONEY, D. F. *Babesia* in domestic animals. In: KREIER, J.P. *Parasitic protozoa*. New York, Academic Press, 1977.v.4, p. 1-52.
- 18-PINTO, C. *Zooparasitos de interesse médico e veterinário*. Rio de Janeiro, Pimenta de Mello, 1938. p. 316.
- 19-REGOECZI, E.; BRAIN, M. C. Organ distribution of fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Brit. J. Haemat.*, v.17, p. 73-81, 1969.
- 20-RI STIC, M.; LEVY, M. G. A new era of research toward solution of bovine babesiosis. In: RI STIC, M.; KREIER, J. P. *Babesiosis*. New York, Academic Press, 1981. p. 509-43.
- 21-RI STIC, M.; WATRACH, A.M. Anaplasmosis. V. Studies and hypothesis concerning the cycle of development of the causative agent. *Amer. J. vet. Res.*, v.24, p. 267-77, 1963.
- 22-SCHOTTELIUS, B. A.; SCHOTTELIUS, D. D. *Textbook of physiology*. 7.ed. Saint Louis, Mosby co., 1973. p. 214-40.
- 23-STOBBE, N.S. *Coágulo de sangue no diagnóstico de hematozoários, desenvolvimento e comparação entre técnicas*. Porto Alegre, 1990. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio Grande do Sul.
- 24-STOBBE, N.S.; CHAPLIN, E.L.; PAIVA, M.G.S.; ARAÚJO, F.A.P.; SILVA, N.R.S. Diagnóstico laboratorial de hemocitozoários através da distensão de gota de coágulo de sangue (Nota Prévia). In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 10., Porto Alegre, 1988. *Anais. Porto Alegre, SOVERGS*, 1988. p. 61.
- 25-VARELA, M. E. *Lecciones de hematología*. 5.ed. Buenos Aires, El Ateneo, 1942.p. 382.
- 26-VILENBERG, G. Diagnosis of *Babesia argentinna* infection in cattle using brain smears. *Aust. vet. J.*, v.48, p. 534, 1972.
- 27-WRIGHT, I. G. Biochemical characteristics of *Babesia* and physicochemical reactions in the host. In. : RI STIC, M.; KREIER, J.P. *Babesiosis*. New York, Academic Press, 1981. p. 171-205.

Recebido para publicação em 19/08/91  
Aprovado para publicação em 08/07/92