

# AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ESPLENECTOMIA EM EQUÍNOS PORTADORES E LIVRES DE *BABESIA* SPP

CUNHA, C.W.<sup>1</sup>; SILVA, S.S.<sup>1</sup>; RODRIGUES, A.L.<sup>2</sup> & GUERREIRO, G.<sup>2</sup>

(1) Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil. (2) Faculdade de Veterinária, Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brasil.

**SUMÁRIO:** O presente trabalho foi realizado com os objetivos de: a) comprovar a agudização de infecções latentes de *Babesia* spp. em equinos portadores crônicos, após esplenectomia e, b) obter equinos esplenectomizados, livres de *Babesia* spp. para produção de antígenos para imunodiagnóstico. Foram esplenectomizados oito equinos, utilizando-se uma técnica de laparoscopia, realizada sob condições de campo. A técnica cirúrgica utilizada mostrou-se segura, sem a ocorrência de transtornos pós operatórios. Dentre os animais esplenectomizados, três eram portadores assintomáticos de *Babesia* spp e desenvolveram parasitemia e sintomatologia clínica de 1 a 9 dias após a esplenectomia; os demais eram livres de *Babesia* spp e não desenvolveram doença clínica após a esplenectomia, mantendo-se negativos por exame direto. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que a esplenectomia, nas condições em que foi realizada, é viável e apropriada para obtenção de equinos imunodeprimidos, capazes de reproduzir alta parasitemia em curto período de incubação.

**PALAVRAS - CHAVE:** Babesiose Equina, *Babesia equi*, *Babesia caballi*, esplenectomia.

## INTRODUÇÃO

A esplenectomia como instrumento imunossupressor é reconhecido há muitos anos e considerado de alta valia em estudos envolvendo reprodução "in vivo" de *Babesia* spp. uma vez que favorece a multiplicação parasitos, facilitando sua detecção em esfregaços sangüíneos (DENNING & BROCKLESBY, 1965; RIGG *et alii*, 1987). O baço, como órgão linfóide secundário, tem como principais funções a fagocitose, a atividade citopoiética, incluindo a produção de células linfóides e macrófagos, e a formação de anticorpos específicos (TALIAFERRO, 1956), assim como é responsável também pela remoção de eritrócitos anormais da circulação. Desta forma, a alteração reticuloendotelial provocada pela ausência do baço determina um grande aumento na suscetibilidade às infecções por hemoprotozoários, agravando a severidade da doença e incrementando a reprodução dos parasitos (DENNING & BROCKLESBY, 1965).

Várias técnicas de esplenectomia têm sido descritas para equinos, sendo que algumas incluem remoção ou deslocamento de costelas (DENNING & BROCKLESBY, 1965; ROBERTS & GROENENDIK, 1978; BREJOV & CASTAGNINO,

1979; RIGG *et alii*, 1987). Estas técnicas, ainda que exequíveis em equinos, freqüentemente resultam em pneumotórax ou osteomielites, com prolongamento do pós-operatório (BREJOV & CASTAGNINO, 1979). Por outro lado, técnicas de laparoesplenectomia têm sido desenvolvidas para equinos (RODRIGUES *et alii*, 1992) com resultados satisfatórios, a exemplo do que é utilizado em bovinos.

De acordo com DENNING & BROCKLESBY, 1965; UILEMBERG, 1969, a remoção do baço durante uma fase crônica pode resultar em agudização da parasitemia, levando a vários graus da enfermidade, enquanto que a realização de esplenectomia antes de uma infecção por *Babesia* spp via de regra resulta em uma severa reação clínica e morte. Em qualquer das circunstâncias, a produção de altas parasitemias, com um número relativamente grande de células infectadas, é de grande valia na produção de antígenos para uso em técnicas sorológicas.

Tendo em viata estas considerações, o presente trabalho foi desenvolvido com os objetivos de: a) comprovar o desenvolvimento de parasitemia patente de *Babesia* spp pós-esplenectomia em animais negativos ao exame direto, porém expostos ao parasito e; b) obter equinos esplenectomizados, livres de *Babesia* spp, para a produção de antígenos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Animais experimentais:** Oito eqüinos machos, sem raça definida e com idade entre 6 e 36 meses de idade foram submetidos à esplenectomia. Quatro destes animais, eram naturais do município de Pelotas, RS, considerado como zona endêmica à *Babesia* spp. Dois destes, identificados como E2 e E4, foram criados sob condições de campo, expostos naturalmente à infecção por *Babesia* spp, enquanto que os outros dois, identificados como E5 e E6, foram desmamados e mantidos em poteiros livres de carrapatos a partir do 15º dia de vida. Os demais, identificados como E7, E8, E9 e E10, eram naturais do município de Santa Vitória do Palmar, RS, considerado tradicionalmente como não endêmico à *Babesia* spp (OLIVÉ LEITE, 1988). O eqüino E10 havia sido inoculado com sangue parasitado por *Babesia* spp, obtido a partir de um caso clínico de babesiose eqüina a campo e criopreservado em nitrogênio líquido, sem ter, no entanto, desenvolvido parasitemia detectável em esfregaço sanguíneo até o momento da esplenectomia, realizada 39 dias após a inoculação (DAI).

Os animais foram trazidos para a Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, local onde foi desenvolvido o experimento, e mantidos sob condição de isolamento em piquetes livres de carrapatos, alimentados com ração balanceada e forrageiras e com disponibilidade de água à vontade. Periodicamente foi realizado controle de verminose e, quinzenalmente, aplicado carrapaticida a base de piretróides, por pulverização ou "pour on".

Antes da esplenectomia, todos os animais apresentavam-se clinicamente sadios e, não foram detectadas *Babesia* spp por exame direto em esfregaços sanguíneos corados por Giemsa.

**Exames clínico e laboratorial:** Regularmente foi realizado exame clínico, onde eram avaliados a temperatura retal, frequência cardíaca e respiratória e coloração de mucosas, e colheita de sangue para avaliação de hematócrito e parasitemia. A tomada da temperatura foi feita durante três minutos, entre oito e dez horas da manhã. Temperaturas entre 37,5 e 38,5°C foram consideradas normais (DE WAAL et al., 1987). Para realização dos exames sanguíneos, amostras de sangue foram coletadas da veia jugular em tubos Vacutainer, contendo EDTA (ácido tetra-acético etileno diamino) como anticoagulante, e processadas num período de no máximo duas horas. A avaliação do hematócrito foi feita em microcentrífuga a 3.000×g durante cinco minutos, sendo os valores entre 32 e 53% considerados normais (SCHALM & CARLSON, 1982). A pesquisa de hematozoários foi feita em esfregaços sanguíneos delgados corados com Giemsa e Laranja de Acridina (KAWAMOTO & BILLINGSLEY, 1992). A coloração com Laranja de Acridina foi utilizada na avaliação de períodos pré-patentes, enquanto que a coloração com Giemsa utilizada na contagem de parasitemias. A estimativa das parasitemias envolveu a contagem das hemácias parasitadas em aproximadamente 5.000 células.

**Esplenectomia:** No pré-operatório os animais foram submetidos a jejum de 24 horas, tricotomia e desinfecção do flanco esquerdo. Como pré-anestésico foi utilizado o cloridrato de detomidina® na dose de 0,1mg/kg por via endovenosa. Posteriormente foi feita anestesia infiltrativa no local da incisão com lidocaína a 2% em um volume de aproximadamente 60 ml, dependendo do tamanho do animal.

Durante a cirurgia os eqüinos foram mantidos em decúbito lateral direito, com os membros anteriores estendidos para frente e os posteriores para trás, com a finalidade de contenção e aumento da área cirúrgica.

A incisão da pele foi praticada com amplitude de aproximadamente 20 centímetros, no sentido póstero-inferior a partir da borda caudal da 18ª costela, a cerca de cinco centímetros acima da junção costochondral. A tela subcutânea foi também incisa, os músculos oblíquo externo do abdômem e oblíquo interno do abdômem tiveram suas fibras afastadas e a fáscia transversa e o peritônio seccionados. Aberta a cavidade peritoneal, foi realizada dilatação dos ligamentos frenicoesplênicos e renoesplênicos. A partir do hilo do baço foi feita uma ligadura, com categut n°1, tomando os vasos e nervos esplênicos. Foi colocada uma pinça próximo ao baço e feita secção entre esta e a ligadura. Na medida em que o baço era exteriorizado pelo seu ápice, foram feitas ligaduras duplas dos vasos gástricos breves, os quais foram seccionados juntamente com o nervo gastroesplênico. Removido o baço, foi realizada sutura em massa, com pontos em "X" e categut n°2, dos músculos abdominais, fáscia transversa e peritônio. A síntese da pele foi feita com pontos "Recurrente de Wolf" utilizando-se fio de algodão n° 000.

**Procedimentos pós-cirúrgico:** No pós-operatório os animais foram submetidos a antibioticoterapia, com Ampicilina sódica na dosagem de 10mg/kg com intervalo de 12 horas, por via intramuscular, durante 10 dias.

Diariamente foi realizada limpeza, com água oxigenada 10%, e curativo da ferida cirúrgica, com solução de nitrofurazona a 0,02%, açúcar (RAISER & BADKE, 1987) e pomada repelente. Os pontos de pele foram retirados em torno do 10º dia após a cirurgia, dependendo do processo de cicatrização.

Após a cirurgia, os exames clínicos e laboratoriais foram realizados diariamente. Nos animais que não desenvolveram parasitemia até o 15º dia após a esplenectomia (DAE), estes exames passaram a ser realizados duas vezes por semana.

Os animais com infecção clínica aguda grave foram tratados com três aplicações de diaceturato de diaminazeno na dose de 6,0mg/kg com intervalo de 24 horas, por via intramuscular, além de medicação de suporte (PHIPPS, 1996), com soro glicosado, vitamina B12 e ferro, e transfusões sanguíneas. O momento do tratamento foi eleito de acordo com as condições clínicas apresentadas pelos animais, mesmo com parasitemia em ascensão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica cirúrgica utilizada neste trabalho demonstrou segurança para esplenectomia em equinos sob condições campo, sem ocorrência de transtornos no pós-operatório. Resultados semelhantes foram obtidos por BREJOV & CASTAGNINO (1979), porém o procedimento cirúrgico aqui relatado, apresenta a vantagem de evitar o deslocamento de costelas, uma vez que através de laparotomia, os vasos esplênicos são ligados no interior da cavidade abdominal diminuindo o traumatismo no animal. A medicação pré-anestésica utilizada nas esplenectomias manteve os animais num estado de analgesia adequado ao desenvolvimento da cirurgia. Os sinais de sedação permaneceram por um período de aproximadamente 90 minutos.

A esplenectomia permitiu o desenvolvimento de parasitemia de *Babesia* spp em cinco equinos, tanto por reagudização de infecção crônica como através de inoculação experimental. Após a remoção do baço, os dois equinos naturalmente infectados por *Babesia* spp (E2 e E4) e o equino experimentalmente inoculado antes da cirurgia (E10), apresentaram sintomatologia clínica de babesiose equina, como febre, mucosas anêmicas e ictericas, edema de membros, hemoglobinúria e deficiência respiratória.

A Tabela 1 apresenta o desenvolvimento de parasitemia após a esplenectomia nos equinos E2, E4 e E10. Nos equinos E2 e E4, os parasitos foram detectados em esfregaços sangüíneos no primeiro DAE, com pico de parasitemia no oitavo DAE. A parasitemia máxima foi de 45,2% no E2 e de 25,7% no E4, com uma queda total no hematócrito de 73% (de 33 para 9%) e 40% (de 32 para 13%), respectivamente, em relação ao original. O equino E10 apresentou parasitemia nove DAE, atingindo o pico de 16% no 15º DAE. Várias formas do parasito em "Cruz de Malta" foram observadas a partir do segundo dia de parasitemia nos três animais. KUTTLER *et alii* (1986) e DE WAAL *et al.* (1988) descreveram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, no que se refere à utilidade da esplenectomia na obtenção de altas parasitemias.

Em relação ao período de aparecimento dos parasitos na circulação, detectáveis em esfregaços sangüíneos, notou-se variação em número de dias, com positividade desde um até nove dias após esplenectomia. Segundo SCHEIN (1987), o período de incubação da *B. equi* após infecções experimentais é de 5 a 15 dias, dependendo do inóculo. KUTTLER *et alii* (1986), demonstraram um período pré-patente médio de  $30 \pm 9$  dias em nove equinos intactos inoculados experimentalmente com *B. equi*. Da mesma forma, IBANEZ *et alii* (1974) obteve um período de incubação de 28 dias em um equino com baço in situ após um inóculo de  $10^{11}$  eritrócitos parasitados por *B. equi*. Por outro lado, HOLBROOK *et al.* (1972), citados por IBANEZ *et al.* (1974), em experimentos com equinos esplenectomizados, ao inocular  $10^6$  eritrócitos parasitados obtiveram infecções com um período de incubação de três a seis dias, enquanto que com um inóculo de  $10^8$ , o período de incubação

Tabela 1 - Desenvolvimento da parasitemia em equinos portadores de *Babesia* spp, após a esplenectomia.

Nº	Início Parasit.	Pico de Parasit.	Hematócrito		Início do Tratamento	Eliminação do Parasito EM DAT
			(0)	MIN.		
E2	(1)	45,2%(8)	33%	9%(8)	(8)	(6)
E4	(1)	25,7%(8)	32%	13%(9)	(8)	(6)
E10	(9)	16% (14)	34%	11%(19)	(17)	(6)

diminuiu para 16 a 40 horas. Desta forma, tanto KUTTLER *et alii* (1986) quanto IBANEZ *et alii* (1974) concordam em afirmar que em animais esplenectomizados a infecção apresentase de forma mais severa e com um período de incubação menor. Assim sendo, no presente trabalho, o curto período entre a inoculação e a detecção dos parasitos em esfregaços sangüíneos provavelmente justifique-se fato de tratar-se de animais esplenectomizados, assim como as variações ocorridas no número de dias, possivelmente devam-se aos diferentes inóculos e prováveis diferenças na virulência dos isolados de *Babesia* spp.

A identificação direta dos parasitos em esfregaços sangüíneos através da coloração com Laranja de Acridina (KAWAMOTO & BILLINGSLEY, 1992) foi, de uma maneira geral, mais fácil e rápida do que com Giemsa, mesmo durante parasitemias baixas, inferiores a 0.01%. Resultados semelhantes foram obtidos por KAWAMOTO (1991(a,b)) e KAWAMOTO & BILLINGSLEY (1992) trabalhando com diagnóstico de *Plasmodium* spp e por KAWAMOTO *et alii* (1992) demonstrando a aplicação da técnica para diagnóstico de *Babesia* spp sob condições de campo. Assim sendo, a coloração com Laranja de Acridina pode constituir-se num valioso instrumento no exame direto para pesquisa de parasitos, podendo ser utilizado como uma forma fácil e rápida de diagnosticar a babesiose equina.

Os animais com infecção aguda foram tratados entre o sétimo e o oitavo dia após o aparecimento dos parasitos. A parasitemia começou a cair após a segunda aplicação do medicamento, não sendo mais detectados parasitos em esfregaços sangüíneos em torno do sexto dia após o início do tratamento. MALHOTRA *et alii* (1979) com a mesma dosagem do medicamento também obtiveram recuperação clínica dos animais. Por outro lado, BHOOP SINGH *et alii* (1980) obtiveram este resultado somente usando o dobro da dose, para estes dosagens inferiores não foram eficientes. DENNING & BROCKLESBY (1965) indicou o uso de diaceturato de diaminazeno somente em casos de baixas parasitemias por *B. equi*, pois o tratamento não fora eficiente em parasitemias altas. Embora seja controversa a esterilização da *B. equi* com quimioterapia (CUNHA *et alii*, 1995, dados não publicados) os resultados obtidos neste trabalho confirmam a possibilidade de promover a recuperação clínica de animais mesmo durante altas parasitemias, utilizando diaceturato de diaminazeno na dosagem de 6mg/kg por três vezes com intervalo de 24 horas.

Os equinos provenientes de zona não endêmica à *Babesia* spp (E7, E8 e E9) e aqueles mantidos em isolamento desde o 15º dia de vida (E5 e E6) não desenvolveram qualquer sinal clínico de babesiose equina e nenhum parasito foi detectado

por exame direto em esfregaços sanguíneos, até a inoculação experimental para produção dos antígenos. O município de Santa Vitória do Palmar encontra-se em uma zona considerada como isenta de babesiose bovina (OLIVÉ LEITE, 1988). Considerando resultados obtidos neste trabalho pode-se supor que a região seja também não endêmica à babesiose equina. Desta forma, animais provenientes do município de Santa Vitória do Palmar, assim como a criação de eqüinos em isolamento desde o nascimento pode constituir-se em uma alternativa na obtenção de animais livres de *Babesia* spp.

Por fim, conclui-se que a técnica de esplenectomia utilizada é segura, viável e exequível, mesmo sob condições de campo, para obtenção de equinos imunodeprimidos, resultando em animais aptos à inoculação em curtos períodos de tempo após a intervenção cirúrgica.

## SUMMARY

This work was done with the aim of: a) showing the acuteness of latent infections of *Babesia* spp in chronic carrier horses after splenectomy, and b) to obtain splenectomized horses free of *Babesia* spp for the production of antigens for immunodiagnosis. We have splenectomized eight horses using a laparoscopy technique performed under field conditions. The surgical technique used was safe, with no post surgical complication. Among the splenectomized animals, three were asymptomatic carriers of *Babesia* spp and developed parasitemia and clinical sing 1 to 9 days after surgery; the others were free of *Babesia* spp and didn't develop clinical signs of the disease and remained negative after splenectomy as determined by direct exams. From the results obtained we conclude that the splenectomy, under field conditions, is useful to obtain immunodepressed horses that are able to produce high levels of parasitemia in a short incubation period.

KEY WORDS: equine babesiosis, *Babesi equi*, *Babesia caballi*, splenectomy.

## REFERÊNCIAS

- BHOOP SINGH; BANERJEE, D.P.; GAUTAM, O.P. (1980). Comparative Efficacy of Diminazene Diaceturate and Imidocarb Dipropionate against Infection in Donkeys. *Veterinary Parasitology*, 7: 173-179.
- BREJOV, G.D.; CASTAGNINO, O.M. (1979). Esplenectomia en caballos. *Revista Militar de Veterinaria*, 26(124): 333-339.
- CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; OSÓRIO, B.I.; DUTRA, C.L.; TARANTO, J.R.; FLORES, W.; SILVEIRA, J. (1995) Avaliação de diferentes drogas no tratamento de infecções por *B. equi*. Em preparação.
- DE WAAL, D.T.; VAN HEERDEN, J.; POTGIETER, F.T. (1987). An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Onderstepoort Journal Veterinary*, 54: 561-568.
- DE WAAL, D.T.; VAN HEERDEN, J.; VAN DEN BERG, S.S.; STEGMANN, G.F.; POTGIETER, F.T. (1988). Isolation of pure *Babesia equi* and *Babesia caballi* organisms in splenectomized horses from endemic areas in South Africa. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, 55: 33-35.
- DENNING, H.K.; BROCKLESBY, D.W. (1965). Splenectomy of horses and donkeys. *The Veterinary Record*, 77(2): 40-44.
- HOLBROOK, A.A.; FRERICHS, W.M.; ALLEN, P.C. (1972). Laboratory diagnosis of equine piroplasmiasis. *Proc. 3rd int. Conf. equine infect. Dis.*: 467-576.
- IBÁÑEZ, F.A.; BETTIONOTTI, C.M.; MORETTI, O.F.; GIMÉNEZ, R.L.; MOREIRA, R.; BARGARDI, S.; BENÍTEZ, M.C. (1974). Piroplasmose Equina: comprobación de su existencia en la Republica Argentina (Corrientes), por observación del parásito, pruebas inmunológicas y transmisión experimental. *Gaceta Veterinaria*, 36: 65-85.
- KAWAMOTO, F. (1991a). Rapid diagnosis of malaria by fluorescence microscopy with light microscope and interference filter. *The Lancet*, 337: 58-62.
- KAWAMOTO, F. (1991b). Rapid Detection of Plasmodium by a New "Thick Smears" Method using Transmission Fluorescence Microscopy: Direct Staining with Acridine Orange. *Journal Protozoology Research*, 1: 27-34.
- KAWAMOTO, F.; BILLINGSLEY, P.F. (1992). Rapid Diagnosis of Malaria by Fluorescence Microscopy. *Parasitology Today*, 8 (2): 81-83.
- KAWAMOTO, F.; SILVA, S.S.; LEBOUTE, A.P.M.; OSAKI, L.S. (1992) Um método simples e rápido da detecção a campo da *Babesia* spp utilizando sondas fluorescentes. *XI Congresso Estadual de Med. Veterinária*, Anais, Gramado/RS, Brasil.
- KUTTLER, K.L.; GIPSON, C.A.; GOFF, W.L.; JOHNSON, M.S. (1986). Experimental *Babesia equi* infection in mature horses. *American Journal of Veterinary Research*, 47(8): 1668-1670.
- MALHOTRA, D.V.; GAUTAM, O.P.; BANERJEE, D.P. (1979). A note on chemotherapeutic trials against *B. equi* infections in donkeys. *Indian Journal of Animal Science*, 49 (1): 75-77.
- ROBERTS, M.C.; GROENENDYK, S. (1978). Splenectomy in the horse. *Australian Veterinary Journal*, 54: 196-197.
- RODRIGUES, A.L.; GUERREIRO, G.; CUNHA, C.W.; SILVA, S.S.; MOREIRA, A.L.; SILVA, L.F.C. (1992). Laparoesplenectomia em eqüinos. Anais do VIII Encontro de Pesquisas Veterinárias. UFPEL, Pelotas, RS, Brasil.
- SCHALM, O.W.; CARLSON, G.P. (1982). The blood and blood-forming organs. In: *Equine Medicine and Surgery*, 3<sup>rd</sup> ed. Vol. 1: 377-414. *American Veterinary Publication*. Sta. Barbara, CA.
- SCHEIN, E. (1987). Equine Babesiosis. In: Ristic, M. *Babesiosis of Domestic Animals and Man*. Chapter 12: 197-208.
- TALIAFERRO, W.H. (1956). Function of the spleen in immunity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 5: 391-410.
- UJLEMBERG, G. (1969). Notes sur les babesioses et l'anaplasmose des bovins à Madagascar. II Influence de la splénectomie. *Revue d'Elevage et de Médecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 22: 237-248.

(Received 28 November 1995, Accepted 10 July 1997)