

Guia de coleta de material para exame histopatológico de aves e suínos

Para formular um diagnóstico preciso, muitas vezes, o médico veterinário encontra dificuldade tendo somente como base o histórico observado na granja, a sintomatologia clínica e os achados da necropsia. Em muitas situações, é necessário recorrer ao suporte de certos tipos de análises para que se chegue ao diagnóstico correto de uma determinada doença.

Por sua vez, o Brasil, somado a sua grande extensão territorial, não conta com uma rede de laboratórios oficiais e privados preparados para oferecer determinados serviços diagnósticos um pouco mais sofisticados. Dentre estes, destaca-se o exame histopatológico, que é uma técnica diagnóstica muito útil, a qual permite interpretar as alterações tissulares provocadas nos quadros patológicos.

É certo afirmar que um exame histopatológico constitui-se num elemento de inestimável suporte ao veterinário de campo, quer de forma isolada ou como parte de outros métodos diagnósticos investigativos para determinadas patologias.

Este guia de coleta tem como objetivo auxiliar o médico veterinário ou técnico de campo a realizar a coleta de material de maneira adequada e segura, visando o sucesso da análise histopatológica posterior.

Principais técnicas disponíveis

Dentro do recurso da histopatologia contamos com diferentes procedimentos que auxiliam tanto no diagnóstico como na pesquisa das enfermidades, e que estão disponíveis em alguns laboratórios dependendo da complexidade destes. Dentre esses procedimentos destacam-se:

1- Técnica histológica: Consiste na observação microscópica dos tecidos em cortes finos (4-6 micras) e, posteriormente, submetidos à coloração das estruturas com tinturas de anilinas, sendo a mais usada a combinação de Hematoxilina (tinge os núcleos basicamente) e Eosina (para as estruturas citoplásmicas). Essa técnica, largamente utilizada no diagnóstico histopatológico, permite através do reconhecimento morfológico, identificar as alterações sofridas pelos tecidos frente às diferentes injúrias. É de inestimável valor quando o material é coletado no local e no momento adequado e conta com a ajuda de um histopatologista experiente.

Algumas doenças/agentes deixam marcas características nos tecidos afetados chamadas de lesões patognomônicas, e seu achado permite realizar um diagnóstico de certeza, como no caso dos corpúsculos de inclusão provocados por alguns vírus (ver tabelas); outros agentes provocam lesões muito específicas e sua presença é de grande valia para o diagnóstico. Desta forma, um exame histopatológico pode agregar a precisão e a rapidez que muitas vezes é fundamental para a tomada de decisões frente a doenças que afetam as populações animais.

2- Técnica histoquímica: Os tecidos são submetidos a reações químicas com corantes que facilitam a identificação de substâncias patológicas (amilóide, glicogênio, enzimas), agentes transmissíveis presentes nos tecidos (fungos, bactérias, clamídias, protozoários) ou células neoplásicas (linfomas, leucoses). A histoquímica auxilia na identificação destas estruturas com muita precisão e é um complemento da técnica anterior.

3- Técnica imuno-histoquímica: Esta técnica reúne as características histoquímicas com a imunologia e permite a identificação de antígenos localizados nos tecidos (bactérias e vírus especialmente) com absoluta precisão, constituindo um diagnóstico de certeza. Entre os recursos da imuno-histoquímica, contamos com a imuno-fluorescência (usa os anticorpos marcados com corante fluorescentes, e necessita de uma fonte luminosa de radiação ultravioleta no microscópio) e imuno-histoquímica propriamente dita, que se vale de um revelador enzimático para identificar a união antígeno-anticorpo dentro dos tecidos. Hoje esta técnica é muito empregada na rotina diagnóstica de vários agentes ou doenças, tais como: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Circovirus*, *Lawsonia intracellularis*, Peste Suína Clássica em suinocultura. E também em avicultura, de agentes virais como os causadores da bronquite infecciosa das galinhas, doença de Gumboro, doença de Newcastle, anemia infecciosa, influenza aviária, dentre outros.

Cuidados na coleta do material

Alguns aspectos importantes na coleta de material devem ser considerados, tais como:

- Os fragmentos de tecido devem ser coletados e fixados o mais rapidamente possível após a morte ou sacrifício. A autólise, normalmente tem seu início logo após a morte e tende a ser mais rápida em alguns órgãos, como por exemplo: sistema nervoso central, intestino e órgãos de tecidos altamente especializados.
- Deve ser evitado o uso de frascos muito pequenos, pois causam deformação no material, além da dificuldade para posterior retirada dos tecidos do mesmo. Utilizar preferencialmente frascos com boca larga.
- As incisões devem ser feitas de modo rápido, com instrumento bem afiado, evitando-se esmagar o tecido. Os tecidos devem ser cortados em fatias de no máximo 1 cm de espessura e de superfície ampla. Não enviar órgãos inteiros de animais grandes.
- Deve-se certificar que a superfície de corte compreenda porções representativas das lesões, selecionando uma parte da lesão e outra do tecido normal adjacente, evitando-se o centro e as bordas da lesão.
- Certos tecidos tendem a flutuar, tais como: pulmão e medula óssea. Desta forma, os mesmos devem ser envolvidos em gaze ou algodão.
- Quando houver suspeita de alguma doença que envolva vários sistemas, incluir amostras de vários tecidos. Devem ser colhidos, preferencialmente, órgãos de 3 a 5 animais que apresentem a mesma sintomatologia a fim de que esse número seja representativo da situação real da granja.

Conservação do material

Um cuidado muito especial deve ser tomado quanto à fixação e acondicionamento das amostras, pois se trata de um material biológico nobre e que nem sempre será possível uma nova coleta. Os principais objetivos de uma boa fixação compreendem:

- Inibir ou deter a autólise tecidual, garantindo a rápida estabilização das atividades enzimáticas.
- Tornar rijo ou endurecer o tecido e facilitar a difusibilidade das substâncias insolúveis.
- Proteger, pelo endurecimento, os tecidos moles no manuseio e procedimentos técnicos laboratoriais posteriores.
- Preservar as estruturas celulares e tissulares, possibilitando o mínimo comprometimento das células e arranjos das organelas tissulares.

- Melhorar a diferenciação óptica dos tecidos.
- Facilitar a subsequente coloração.

Para uma boa fixação é preciso tomar algumas precauções que são obrigatórias:

- O material coletado deve ser imerso rapidamente em formol 10%, que é preparado misturando uma parte de formalina (formol 37%) com nove de PBS (solução salina tamponada) ou água destilada.
- O volume ideal de formol 10% deve corresponder cerca de 10 vezes o volume da amostra obtida.
- Não fixar em formol tecidos congelados, pois o congelamento altera a estrutura celular.
- Importante: não raspar a mucosa do intestino ou da traquéia antes da fixação, isto destrói as estruturas dos tecidos!
- Uma vez colocados no formol 10% o material não deve ser congelado nem refrigerado, mantenha-o em temperatura ambiente. O formol precipita a baixa temperatura e altera a fixação.

Modo de envio do material ao laboratório

O frasco contendo o material deverá ser enviado ao laboratório em caixa de isopor ou papelão, tendo o devido cuidado para que não se movimente dentro da caixa. Um artifício muito utilizado é preencher os espaços vazios com papel a fim de garantir uma boa imobilização do frasco.

O material deve ser acompanhado de algumas informações relevantes, tais como:

- 1- Dados identificatórios: nome do proprietário, empresa, granja, endereço, telefone, data de coleta de material.
- 2- Histórico clínico completo, incluindo: espécie animal, linhagem, idade, tamanho do lote, sexo, número de animais mortos e doentes, manejos sanitário e nutricional da granja, duração e evolução dos sintomas clínicos, tratamento já prescrito.
- 3- Achados de necropsia: descrição detalhada das alterações encontradas nas necropsias realizadas, suspeita clínica e tipo de exames solicitados.

Material de coleta e característica da lesão observada conforme a enfermidade

Nas tabelas 1 e 2 estão listadas as enfermidades e o material que deve ser coletado para histopatologia em aves e suínos, respectivamente, conforme a suspeita. A localização e tipo de lesão podem auxiliar ou até definir o diagnóstico. Nessas tabelas também se encontram listadas o grau de significado das lesões microscópicas as quais podem ser suficientemente específicas (patognômicas) ou altamente significativas para determinadas etiologias.

ntemente específicas (patognômicas) ou altamente significativas para determinadas etiologias.



TABELA 1 MATERIAL DE COLETA, CARACTERÍSTICA E GRAU DE SIGNIFICAÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS CONFORME A ENFERMIDADE DAS AVES

Enfermidades Virais

Enfermidades	Material coletado para análise histopatológica	Característica das principais lesões	Grau de significado das lesões
Anemia Infecciosa	Timo, fígado, baço, bolsa e medula óssea	Depleção de órgãos linfóides. Hipoplasia celular da medula óssea	+ + +
Bouba Aviária	Lesões cutâneas e diftéricas	Inclusões no citoplasma das células da camada espinhosa do epitélio	+ + + +
Bronquite Infecciosa	Traquéia, pulmão	Traqueíte com edema e infiltrado. Bronquite	+
Doença de Gumboro	Bolsa de Fabricius, timo e baço	Depleção, necrose, infiltrados na BF, depleção no timo e baço	+ + +
Doença de Newcastle	Traquéia, pulmão, SNC, intestino, pâncreas, pró-ventrículo, tonsilas cecais	Pode se tratar de uma DNCVV onde aparece encefalite não supurada, lesões hemorrágicas no digestivo e respiratório	+ +
Doença de Marek	Órgãos com lesões	Infiltrados de linfoblastos e linfócitos nos órgãos e nervos periféricos	+ + +
Encefalomielite Aviária	SNC, moela, pâncreas, pró-ventrículo, fígado, coração	Cromatólise central de neurônios, sateletismo, gliose nodular ou difusa, vasculite e perivasculite não purulenta intensa. Hiperplasia mononuclear nos órgãos mencionados	+ + + +
Hepatite por Corpúsculo de Inclusão	Fígado	Hepatite necrótica. Inclusões intranucleares nos hepatócitos	+ + + +
Influenza Aviária	Traquéia, pulmão, SNC, intestino, pâncreas, pró-ventrículo, tonsilas cecais	Encefalite, pneumonia e enterite hemorrágica	+ +
Laringotraqueíte	Traquéia e pulmão	Laringite e traqueíte hemorrágica. Inclusões intranucleares no epitélio traqueal	+ + + +
Leucose Aviária	Órgãos com lesões	Infiltrados de células blásticas neoplásicas (Linfoblastos ou mieloblastos)	+ + + +
Pneumovirose Aviária	Traquéia e pulmão	Pneumonia difusa	+
Síndrome da Queda de Postura (EDS)	Ovário, oviduto e útero	Salpingite	-



Enfermidades Bacterianas

Enfermidades	Material coletado para análise histopatológica	Característica das principais lesões	Grau de significado das lesões
Botulismo	Intestino e inglúvio	Sem lesões macroscópicas	-
Colibacilose	Órgãos lesionados	Processos inflamatórios	-
Cólera Aviária	Pulmão, fígado, coração	Lesões de necrose nos órgãos com reação inflamatória	+ +
Enterite necrótica (C.perfringes)	Intestino (jejuno, íleo e ceco) e fígado	Necrose das vilosidades intestinais. Bastonetes na luz intestino	+ + +
Micoplasmose (M. sinoviae, M. gallinarum, M. meleagridis)	Traquéia, pulmão, sacos aéreos e articulações	Infiltrado nos órgãos respiratórios; sinovite, artrite	+ +
Salmonelose (S.gallinarum)	Fígado, baço, coração, ceco, fezes e ovário	Necrose coagulativa focal, especialmente baço, fígado e miocárdio	+ +

Outras Enfermidades

Aspergilose	Pulmão, traquéia e SNC	Granulomas com centro necrótico e presença de hifas e micélio	+ + + +
Coccidiose	Intestino	Enterite. Formas assexuadas nos enterócitos	+ + + +
Criptosporidiose	Intestino e Bolsa de Fabricius	Edema da bolsa, criptosporídios aderidos na borda livre das células epiteliais	+ + + +
Encefalomalácia	SNC	Desmielinização, espongirose na substância branca do tecido nervoso	+ +
Histomoníase	Fígado e ceco	Hepatite e tífite necrótica. Reação inflamatória. Protozoários no tecido lesado	+ + + +
Micotoxicose (aflatoxicose)	Fígado	Hepatite necrótica, degeneração celular, cariomegalia dos hepatócitos	+ +
Osteomielite	Ossos lesionados	Inflamação e necrose da medula óssea	+ +
Raquitismo	Ossos lesionados	Falta formação da substância osteoide, cartilagem. Aumento da zona de crescimento ósseo	+



TABELA 2 MATERIAL DE COLETA, CARACTERÍSTICA E GRAU DE SIGNIFICAÇÃO DAS LESÕES OBSERVADAS CONFORME A ENFERMIDADE DE SUÍNOS

Enfermidades	Material coletado para análise histopatológica	Característica das principais lesões	Grau de significado das lesões
Enfermidades Virais			
Rinite por corpúsculo de inclusão (Citomegalovírus)	Seios nasais, pulmão	Infiltrado na mucosa, células epiteliais com inclusões intranucleares	++++
Varíola suína	Pele	Hipertrofia da camada espinhosa da epiderme, inclusões no citoplasma (Corpúsculos de Borrell).	++++
Peste Suína Clássica	SNC, principalmente na cortical do cérebro médio; baço, rim	Vasculite, necrose dos capilares. Encefalite não purulenta. Infartos em órgãos.	+++
Doença de Aujeszky	SNC, principalmente cérebro anterior, cerebelo, medula espinal, gânglio de Gasser (Trigêmeo)	Meningoencefalite não supurada. Infiltração no gânglio Gasser.	+++
Doença de Teschen (polioencefalomielite)	SNC, principalmente região dos neurônios motores da medula espinal e cerebelo	Meningoencefalite não supurada	++
Encefalomiocardite	Músculo cardíaco e SNC, cérebro, especialmente em fetos abortados	Meningoencefalite. Necrose muscular	++
Gastroenterite transmissível	Jejuno e íleo	Severa atrofia das vilosidades do intestino	+++
Circovirose suína (CV2)	Pulmão, linfonodos, baço e rim	Pneumonia intersticial. Depleção linfóide em linfonodo e gânglio. Células gigantes (sinsiciais) nos linfonodo	+++



Enfermidades	Material coletado para análise histopatológica	Característica das principais lesões	Grau de significado das lesões
Enfermidades Bacterianas e Outras			
Pleuropneumonia suína	Lóbulos diafragmáticos do pulmão	Pneumonia fibrino-hemorrágica. Edema de tabique interlobular	+ +
Doença do edema	Parede do estômago, pulmão, SNC	Vasculite com hialinose da parede. Degeneração da substância branca do SNC	+ +
Coccidiose (Isosporíase)	Jejuno e íleo, porção inicial do cólon	Enterite (jejunité). Nas células epiteliais observam-se formas assexuadas (trofozoítos)	+ + +
Ileíte (Lawsonia spp.)	Intestino delgado, especialmente íleo. A forma proliferativa e hemorrágica é mais comum no jejuno	Hiperplasia das glândulas (adenomatose); enterite hemorrágica; Hiperplasia das camadas musculares do intestino	+ +
Disenteria suína	Intestino grosso	Tifite necrótica, abundantes células caliciformes e enterite mucosa	+ +
Salmonelose suína	Fígado, baço, linfonodos e pulmão.	Nódulos paratíficos nos órgãos Hepatite focal Pneumonia intersticial	+ +
Broncopneumonia micoplásmica (Mycoplasma hyopneumoniae)	Pulmão, na região de bronquíolos.	Infiltrados peribronquicos (BALT +); Infiltrados de pneumócitos e PMN nos alvéolos	+ + +

- Nenhum auxílio diagnóstico
- + Baixo auxílio diagnóstico
- ++ Moderado auxílio diagnóstico
- +++ Alto auxílio diagnóstico
- ++++ Lesão patognomônica



ERROS E ACERTOS FREQUENTES NA ARMAZENAGEM E FIXAÇÃO DO MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA

CORRETO



Frascos bem imobilizados na caixa



Volume proporcional de amostra/formol (1:10)



Frasco recomendado - boca larga



Material bem fixado (homogeneamente)

INCORRETO



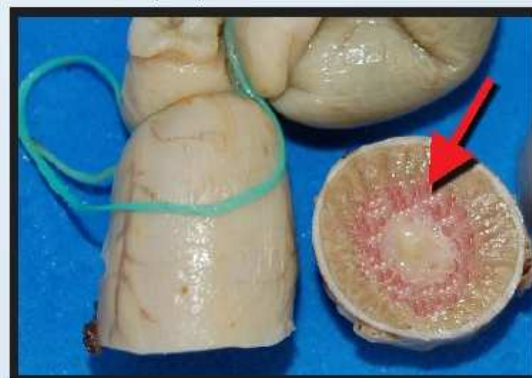
Frascos soltos na caixa



Volume desproporcional de amostra/formol



Fragmentos de órgãos mal fixados
Formol não atingiu o centro (seta)



Intestino mal fixado no centro (seta)
Não deve ser amarrado (dificulta fixação)

INCORRETO



Material completamente mal fixado



Frascos com boca muito pequena



Frasco muito pequeno
Boca estreita e amostras muito grandes



Frasco quebrado para retirar amostra



Frasco com abertura pequena
e órgãos muito grandes



Amostras muito grandes e pouca
quantidade de formol no frasco



Quantidade insuficiente de formol
Sistema nervoso deve ser retirado do crânio



Saco plástico
Embalagem inadequada e pouco formol