

**Colheita e envio de amostras
para diagnóstico morfológico diferencial
de BSE e outras encefalopatias bovinas**

**Material complementar das aulas teóricas e
práticas do “Curso de Treinamento em Méto-
dos de Diagnóstico e Controle da Brucelose e
Tuberculose e Noções em Encefalopatias Es-
pongiformes Transmissíveis”**

Pedro R. Werner, MMV, PhD

Curitiba, 2007

Sumário

	Página
Introdução.....	3
Localização e natureza das lesões.....	3
Necessidade da colheita de amostras do SNC para diagnóstico diferencial de Raiva, BSE e outras Encefalopatias em ruminantes.....	2
Colheita de amostras do SNC para diagnóstico de encefalopatias – Material e métodos.....	3
A necropsia.....	3
Amostras do SNC que serão colhidas.....	3
Remoção do encéfalo.....	3
Remoção dos gânglios nervosos, hipófise e rede carotídea.....	5
Separação dos componentes encefálicos (colheita de amostras seletivas para histopatologia e virologia).....	6
Sumário das amostras colhidas.....	7
Acondicionamento das amostras.....	8
Amostras destinadas ao exame histopatológico.....	8
Amostras destinadas a exames microbiológicos.....	8
Destino das amostras.....	8

Colheita e envio de amostras para diagnóstico morfológico diferencial de BSE e outras encefalopatias bovinas

“Curso de Treinamento em Métodos de Diagnóstico e Controle da Brucelose e Tuberculose e Noções em Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis”

Pedro R. Werner – João Ari G. Hill – Sérgio J. M. Bronze – Uriel C. Andrade

Este documento é uma adaptação do material fornecido pelo M.A.P.A. e seu objetivo é ser utilizado como material auxiliar de consulta para os médicos veterinários que freqüentam os referidos cursos ministrados na Universidade Tuiuti do Paraná.

Introdução

O exame físico e a análise do quadro clínico do paciente permitem apenas o **diagnóstico presuntivo** da BSE (“bovine spongiform encephalopathy”). O diagnóstico **definitivo** só é possível após a morte do animal pelo exame histopatológico do seu encéfalo ou pela microscopia eletrônica e por métodos imunoquímicos (imunohistoquímica, Western-Blotting, Elisa e bioensaio em camundongo). Quaisquer que sejam os métodos utilizados, a remoção do encéfalo e a colheita de amostras a serem enviadas ao laboratório devem seguir o padrão recomendado pela OIE (Organização Internacional da Saúde Animal), que o que será abordado neste documento.

Os fragmentos de tecido colhidos e enviados para exame são chamados de “amostras”. Muitos profissionais referem-se a elas, coletivamente, como “material”.

Localização e natureza das lesões

As lesões que permitem o diagnóstico da BSE localizam-se quase que exclusivamente no numa região particular do TRONCO ENCEFÁLICO, a medula oblonga, mais especificamente no óbex (Figura 01).

As lesões características da BSE são muito discretas e consistem de vacuolação da substância própria do SNC (neuropilo) e do corpo de neurônios, o que dá ao tecido nervoso um aspecto esponjoso quando observado ao microscópio, daí o nome da lesão (Figura 02)

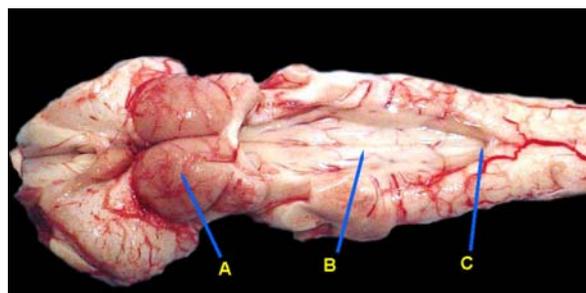


Figura 01 – Tronco encefálico de bovino (separado do cerebelo e hemisférios cerebrais). A – Colículos; B – assoalho do quarto ventrículo; C – óbex (região triangular disposta sob o ângulo formado pela união das duas bordas laterais do quarto ventrículo)

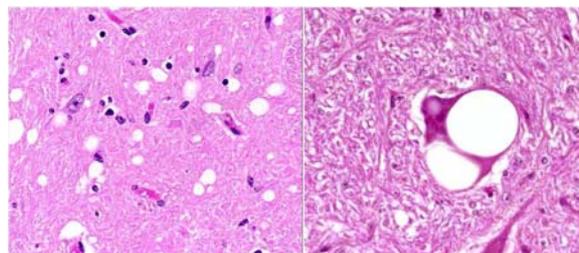


Figura 02 – Corte histológico do encéfalo bovino com BSE. Note, à esquerda, o aspecto vacuolar (esponjoso) do neuropilo e, à direita, um neurônio contendo dois grandes vacúolos que deformam o corpo celular.

Bovinos com paresia espástica (sem BSE) ocasionalmente apresentam vacúolos em neurônios dos colículos rostrais. Esses neurônios são importantes na motilidade dos membros. O achado dessa alteração somente nesse lugar não constitui diagnóstico positivo para BSE,

A BSE também pode ser diagnosticada pela microscopia eletrônica, mas esta técnica é por demais cara e especializada para ser utilizada rotineiramente.

Métodos imunoquímicos também podem ser empregados para o diagnóstico da BSE. Nesta técnica utilizam-se anticorpos monoclonais anti-proteína priônica que se conju-

gam aos príons presentes na amostra positiva. Os conjugados ag/ac são evidenciados por um método especial de coloração (Figura 03). A imunohistoquímica é muito precisa e pode ser utilizada até em tecidos autolizados. Mas, devido ao custo e dificuldades operacionais, só é empregada em casos especiais, sendo a técnica oficial da OIE.

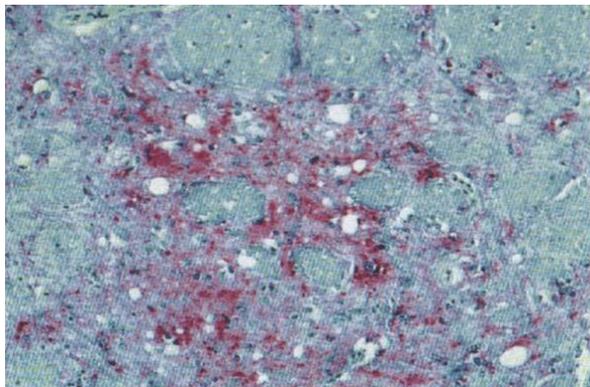


Figura 03 – Caso positivo para BSE. Fotomicrografia de corte histológico de encéfalo submetido à técnica de imunohistoquímica. Além dos vacúolos no tecido, esta técnica evidencia os conjugados anticorpo/antígeno (prion) corados pela f (avermelhado)

Necessidade da colheita de amostras do SNC para diagnóstico diferencial de Raiva, BSE e outras Encefalopatias em ruminantes

A partir da década de 1970 houve um aumento significativo dos casos positivos para raiva em ruminantes. Por isso, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) editou a Portaria 126 de 18/-3/76 *Normas Técnicas para controle da Raiva em Herbívoros* estabelecendo a obrigatoriedade do exame para raiva no SNC de todos os animais com sinais clínicos neurológicos. Contudo, como houve também aumento do número de casos negativos para raiva, houve necessidade de diagnósticos diferenciais para outras encefalopatias no material encaminhado para histopatologia. Como eram realizados exames microbiológicos além do histopatológico, no material enviado, desenvolveu-se uma técnica para envio do material ao laboratório: metade do encéfalo era enviada em formol (para histopatologia) e metade era enviada sob refrigeração (para microbiologia, principalmente virologia).

Contudo, com o surgimento da BSE em 1986, uma nova doença teve que ser incor-

porada ao rol de diagnósticos diferenciais de encefalopatias. Em 1996 o Brasil destacou-se como importante exportador de carne bovina e a Comunidade Européia passou a exigir comprovação da negatividade para BSE do rebanho brasileiro. Em consequência, o MAPA editou a Instrução Normativa 18 de 15/02/2002 estabelecendo que amostras do tronco encefálico de ruminantes com risco potencial para BSE devem ser encaminhadas para exame histopatológico. Os animais considerados com risco potencial para BSE são aqueles que apresentem os seguintes quadros clínicos e sejam negativos para Raiva:

- Ruminantes com sinais clínicos de distúrbios nervosos ou comportamentais de evolução igual ou superior a 15 dias,
- Ruminantes em decúbito sem causa determinada.
- Ruminantes com doenças depauperantes

Além dessas medidas, consideradas como de vigilância passiva, estabeleceu-se um sistema de vigilância ativa para BSE que exige o envio de amostras do SNC incluindo o tronco encefálico completo para exame histopatológico nos seguintes casos:

1- **Em matadouros-frigoríficos que abatem para exportação** – Amostras de bovinos com idade superior a 30 meses e de ovinos e caprinos com mais de 12 meses, e que sejam oriundos de exploração leiteira ou de sistemas intensivos ou semi-intensivos de criação para corte

2- **Em todo matadouro frigorífico** – Amostras de todos os bovinos, ovinos ou caprinos destinados ao abate de emergência (mediata e imediata)

3- **No campo** – Amostras de todo ruminante importado de países onde foi registrada a ocorrência de BSE ou daqueles países considerados de risco dessa doença que, quando não mais destinado à finalidade reprodutiva e, por exigência da mesma portaria, for sacrificado e destruído.

Como a Instrução Normativa 18 do MAPA determinava a necessidade da remessa do

tronco encefálico completo, os métodos tradicionais de colheita e envio de amostras do SNC tornaram-se inadequados, exigindo uma nova padronização.

Colheita de amostras do SNC para diagnóstico de encefalopatias – Material e métodos

Durante os procedimentos, é indispensável a utilização de equipamento de proteção individual (EPI): roupa adequada (macacão), botas e avental impermeáveis, luvas de látex, máscara e óculos de proteção. O material para necropsia é o material padrão para realização necropsias a campo, isto é: facas de qualidade, chaira e pedra de afiar, tesouras, pinças de dissecação com dentes e uma machadinha. Esta poderia ser substituída por uma serra de açougueiro, mas é importante ter-se familiaridade com o uso da machadinha.

O material para acondicionamento e remessa das amostras ao laboratório é o seguinte:

- 1- Frascos de boca larga com capacidade de um litro.
- 2- Formol
- 3- Sacos plásticos
- 4- Etiquetas
- 5- Gelo em frascos plásticos lacrados ou sacos plásticos contendo gel
- 6- Caixa isotérmica (“Isopor”)

A necropsia

A necropsia deve ser executada o mais imediatamente possível após a morte para evitar autólise post-mortem dos tecidos. Isto porque o diagnóstico é morfológico e a autólise altera as características morfológicas do tecido dificultando e até impedindo um diagnóstico preciso.

Um outro cuidado é que a necropsia daqueles casos com manifestação clínica de envolvimento do SNC deve ser feita somente após a morte natural do paciente. Contudo, naqueles casos que o abate do animal é absolutamente necessário, deve-se esperar o máximo possível até sacrificar o animal devido à possibilidade de diagnósticos falso-

negativos. Isto acontece porque a manifestação dos sinais neurológicos geralmente é relativamente mais severa do que a intensidade das lesões que os provocaram. Muitos dos sinais neurológicos severos devem-se ao edema cerebral que ocorre precocemente e antes que as lesões características que permitiriam o diagnóstico da doença primária tenham se instalado plenamente.

Mesmo que o caso clínico seja neurológico, a necropsia deve ser executada em sua plenitude, não se limitando ao exame do SNC. Em muitos casos as manifestações neurológicas são secundárias a doenças em outros sistemas que não o SNC, como a encefalopatia hepática ou intoxicação por amônia, por exemplo. Assim, deve-se colher e enviar amostras para outros exames complementares além do histopatológico.

Amostras do SNC que serão colhidas

Serão enviados para exame histopatológico ou virológico fragmentos (amostras) de:

1. Cérebro
2. Cerebelo
3. Tronco encefálico
4. Gânglios do III, IV e V nervos cranianos.
5. Hipófise e rede admirável carotídea

O exame e remoção do SNC indiscutivelmente é a parte mais difícil da necropsia por exigir técnicas e materiais especializados além de certa experiência do profissional.

Remoção do encéfalo

1- Desarticulação da cabeça – A cabeça deve ser separada do pescoço na articulação atlanto-occipital. A pele e tecidos moles são cortados a partir da região ventral do pescoço com a faca colocada imediatamente posterior aos ramos verticais da mandíbula. Cortam-se todas as estruturas cervicais até que se atinja a face ventral da articulação atlanto-occipital. A seguir corta-se a cápsula articular, ligamentos e a medula espinal (Figura 04). A manobra é facilitada com a extensão forçada da articulação combinada com tração anterior da cabeça. A tração pode ser feita com uma corda e uma “formiga” colocada nas narinas do animal. Com o corte dos tendões, músculos cervicais dorsais e

da pele a cabeça é separada do corpo (Figura 05)



Figura 04 – Desarticulação da articulação atlanto-occipital. A cápsula articular e ligamentos já foram seccionados expondo o canal vertebral. A medula espinhal também já foi seccionada. Essa manobra é facilitada pela extensão da articulação e tração da cabeça em direção anterior (seta)



Figura 5 – A cabeça foi separada do corpo do animal. As setas indicam os côndilos do occipital, entre os quais aparece o forame magno.

2- Remoção da pele, exposição e abertura do crânio – Corta-se e se remove a pele sobre o crânio e, caso se deseje, cortam-se os cornos do animal antes de abrir a caixa craniana. Alguns profissionais, contudo, preferem deixar os cornos intactos para utilizá-los como ponto de apoio para segurar ou manusear a cabeça. A seguir, utilizando-se a machadinha ou uma serra, fazem-se três cortes nos ossos cranianos: o primeiro transversal e a 3 cm posteriormente às órbitas; os dois últimos unindo a face dorso-lateral do forame magno ao primeiro corte (Figura 05). É necessário que os cortes sejam profundos e que penetrem a caixa craniana.

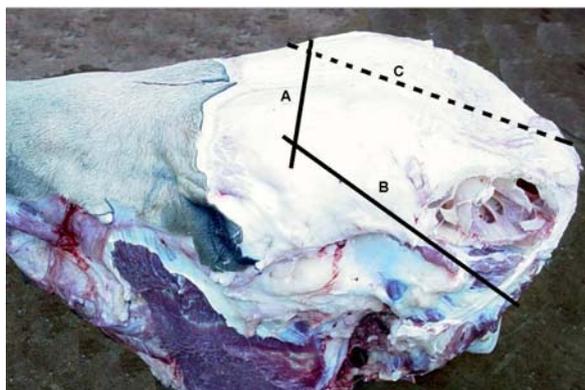


Figura 06 – Corta-se e se remove a pele sobre o crânio e seccionam-se os ossos cranianos: o primeiro corte (A) é feito transversalmente a 3,0 cm posteriormente à órbita; os dois últimos (B e C) unem a face dorso-lateral do forame magno ao primeiro corte.

3- Remoção da calota craniana – Uma vez prontos os cortes, a área delimitada pelos cortes pode ser movimentada. Com auxílio de um instrumento forte (NÃO use os dedos – pode ferir-se!) eleve e remova a calota craniana expondo o encéfalo coberto pela dura-máter, que deverá ser removida para exposição e remoção do encéfalo (Figuras 07 e 08).



Figura 07 – Após a remoção da calota craniana expõe-se o encéfalo ainda revestido pela dura-máter. Para expor e remover os hemisférios cerebrais e o cerebelo é necessário cortar e rebater a dura-máter.

4- A remoção da dura-máter é dificultada por duas estruturas que a prendem firmemente ao crânio: a foice e a tenda do cerebelo. A foice é uma invaginação da dura-máter que penetra profundamente entre os hemisférios cerebrais e a tenda do cerebelo localiza-se entre o cerebelo e os hemisférios cerebrais. Trata-se de estruturas fibrosas e muito resistentes (em animais velhos pode conter tecido ósseo) e sua remoção deve ser feita com tesoura. Só então o encéfalo estará completamente exposto e poderá ser removido (Figura 08)



Figura 08 – Após o corte da foixe e da tenda do cerebelo, a dura-máter foi rebatida lateralmente expondo o encéfalo. Somente agora o encéfalo é passível de ser removido.

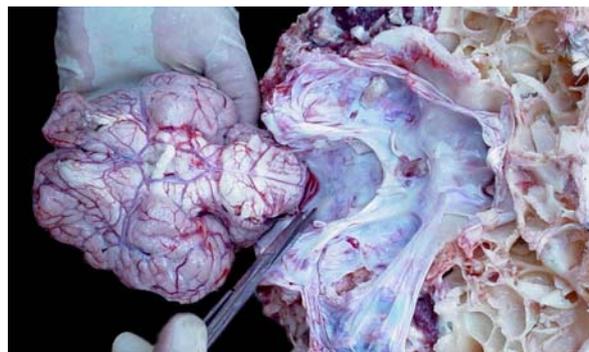


Figura 10 – Os últimos pares de nervos cranianos são seccionados ...

5- Remoção do encéfalo – Uma vez “desvestido” da dura-máter o encéfalo é facilmente removido do crânio. Para isso a cabeça é apoiada sobre os côndilos do occipital para que o encéfalo “caia” posteriormente e os hemisférios cerebrais são empurrados em direção caudal pelos dedos inseridos entre a porção rostral do cérebro e o bulbo olfatório (Figura 09 A). Elevando-se o cérebro vê-se o nervo óptico (segundo par de nervos cranianos) que é seccionado na altura do quiasma óptico (figura 09 B)

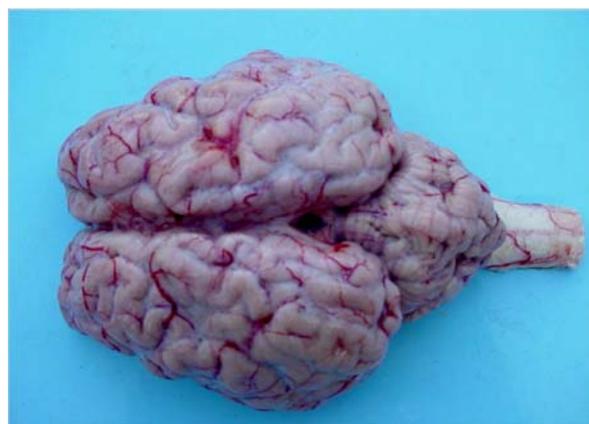


Figura 11- ... e o encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) pode ser removido intacto.

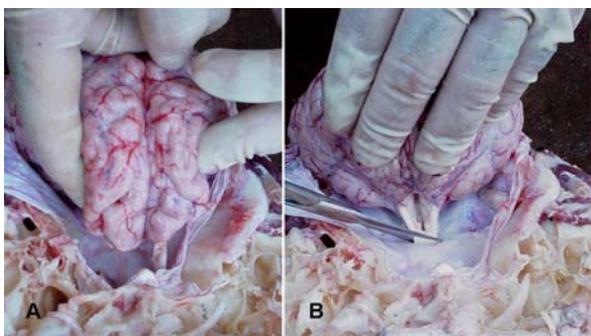


Figura 09 – Para remoção do encéfalo da caixa craniana ele é empurrado com os dedos em direção caudal (A) rompendo-se o bulbo olfatório, parcialmente evidente na fotografia (A). A seguir os hemisférios cerebrais são elevados e os nervos ópticos são seccionados na altura do quiasma óptico (B)

Os demais pares de nervos cranianos são seccionados e o encéfalo se solta do crânio podendo, então ser removido (Figura 10 e 11)

Remoção dos gânglios nervosos, hipófise e rede carotídea

Para este passo é necessário examinar o assoalho da caixa craniana buscando pelos pares nervosos e hipófise (Figura 12). Uma vez identificadas estas estruturas faz-se sua remoção.

Cortando-se a dura-máter logo abaixo do quiasma e lateralmente às raízes dos III, IV e V nervos cranianos pode-se dissecar e remover a hipófise, a rede admirável carotídea (“rete mirabilis”) e os gânglios nervosos utilizando a dura-máter como ponto de apoio da pinça de dissecação.

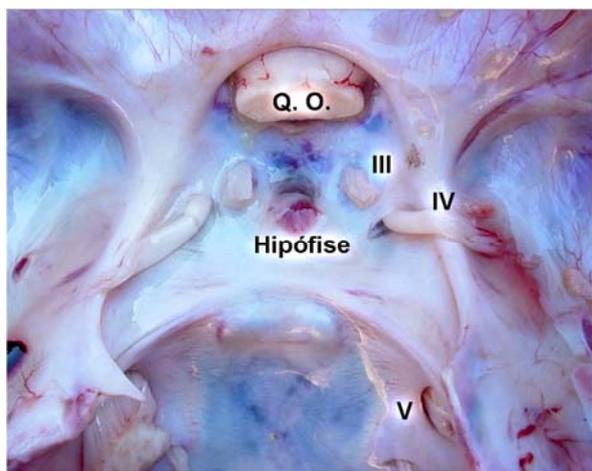


Figura 12 – Assoalho da caixa craniana. No centro da imagem, logo abaixo do quiasma óptico (Q.O.) está a hipófise. Ao lado estão as raízes dos III, IV e V nervos cranianos.

Esse conjunto de estruturas depois de dissecado está representado na Figura 13. Alguns profissionais preferem remover o gânglio do V nervo (trigêmeo) separadamente.

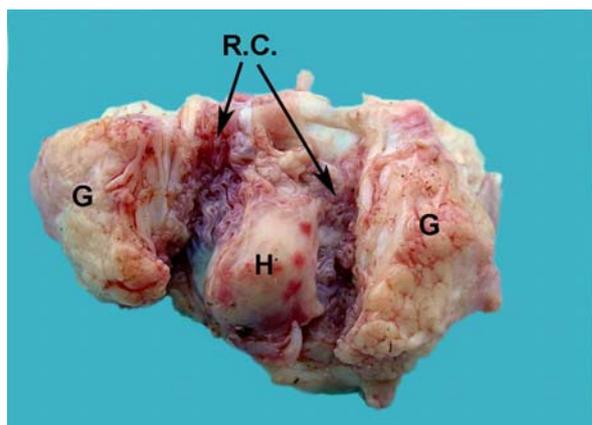


Figura 13 – Vista ventral da peça removida do assoalho da caixa craniana. Ao centro está a hipófise (H); lateralmente a rede carotídea (R.C. – “rete mirabilis”) e os gânglios dos III e IV nervos cranianos. Este fragmento deve ser colocado em Formol a 10%

Esta é a primeira amostra a ser colhida, devendo ser colocada em Formol a 10%. O exame histopatológico dessas estruturas é fundamental para o diagnóstico de algumas viroses, além da raiva, como a doença de Aujeszki, a febre catarral maligna e infecções por herpesvírus.

Separação dos componentes encefálicos (colheita de amostras seletivas para histopatologia e virologia)

Depois de removido da caixa craniana o encefalo é colocado sobre a mesa com a face ventral para cima e devem-se efetuar dois cortes profundos e oblíquos na extremidade rostral do tronco encefálico até atingir os ventrículos laterais. Puxando-se o tronco encefálico em direção caudal, o tronco encefálico juntamente com o cerebelo separa-se dos hemisférios cerebrais (Figura 14)

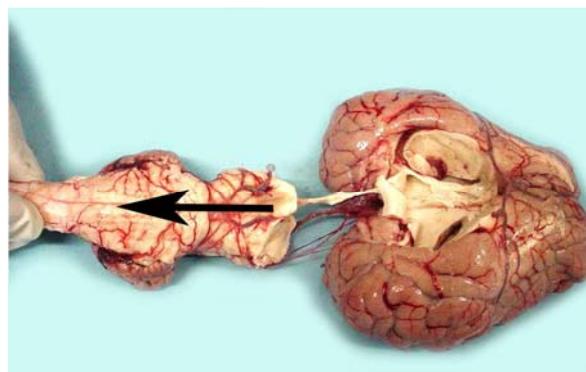


Figura 14 – Depois de efetuados os cortes na região rostral do tronco encefálico, puxando-se em direção caudal (seta) o tronco e o cerebelo separam-se facilmente dos hemisférios cerebrais.

Em seguida o cerebelo é separado do tronco encefálico cortando-se ambos os pedúnculos cerebelares (Figura 15) Ao se cortar os pedúnculos expõem-se o vérmis do cerebelo e o quarto ventrículo (Figura 16).

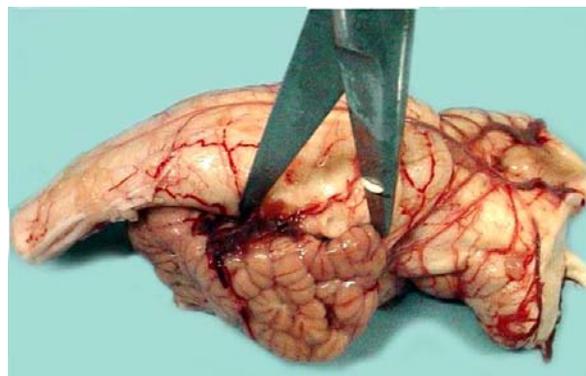


Figura 15 - Os pedúnculos cerebelares esquerdo e direito são cortados ...

Ao final dessa etapa obtêm-se três porções: (a) o tronco encefálico; (b) o cerebelo e (c) os hemisférios cerebrais.

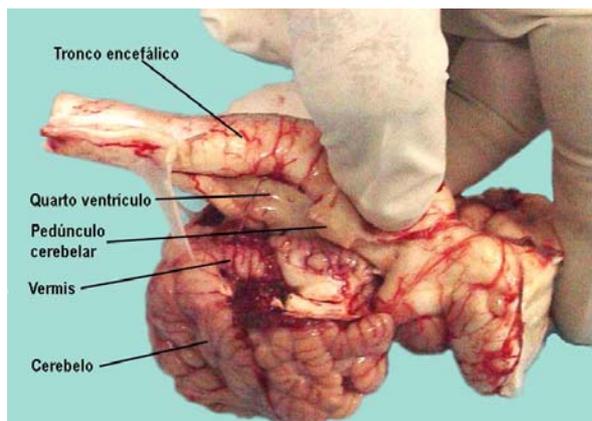


Figura 16- ... separando-se o cerebelo do tronco encefálico e expondo-se o quarto ventrículo e o vérmis do cerebelo

O tronco encefálico deve ser colocado inteiro em Formol a 10%.

O cerebelo sofre duas incisões paralelas ao vérmis (Figura 17), resultando em três fragmentos.

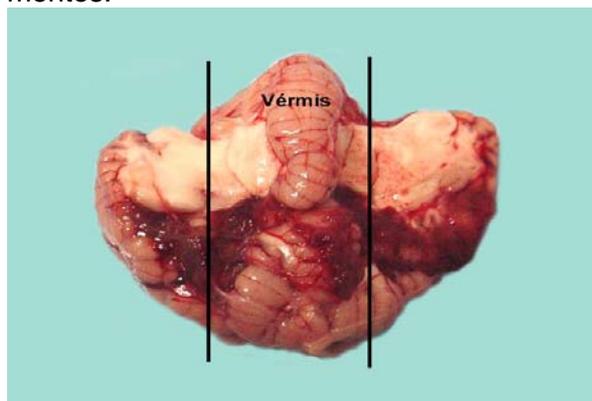


Figura 17 – O cerebelo, agora separado do tronco encefálico, sobre duas incisões paralelas ao vérmis resultando em três fragmentos.

O fragmento mediano do cerebelo contendo o vérmis é colocado em Formol a 10% e os dois fragmentos laterais são colocados sob refrigeração.

Os hemisférios cerebrais são separados e de um deles (qualquer um deles) serão obtidas as amostras a serem enviadas para exame. Para isso serão colhidas duas fatias com 1,0 cm de espessura, uma da metade rostral e uma da metade caudal do hemisfério (Figura 18). Estas duas fatias serão colocadas em Formol a 10%. Os três fragmentos restantes serão colocados sob refrigeração.

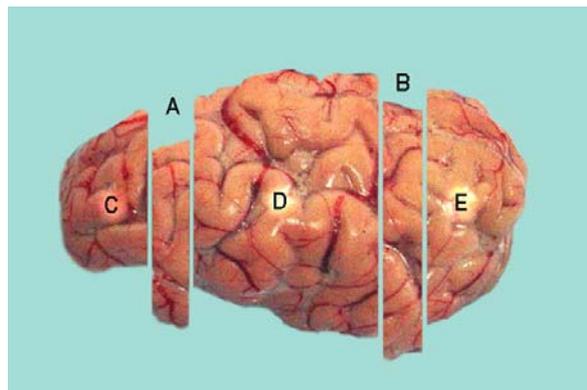


Figura 18 – De uma das metades do cérebro colhem-se duas fatias com 1,0 cm de espessura, sendo uma (A) da porção rostral e a outra (B) da porção caudal do hemisfério. Estas duas fatias são colocadas em formol. O três fragmentos restantes (C, D e E) são colocados em gelo.

O outro hemisfério cerebral é submetido a exame macroscópico de rotina. Para isso ele é cortado em fatias finas, de 0,5 a 1,0 cm de espessura em busca de alterações macroscópicas, como abscessos, neoplasias, trauma etc. (Figura 19). Caso sejam encontradas alterações, a fatia correspondente é colocada no frasco de formol juntamente com as demais amostras. É imprescindível que isto seja registrado no formulário oficial para requisição de exames que acompanhará as amostras ao laboratório.



Figura 19 – O exame macroscópico da metade restante do cérebro é feito cortando-o em fatias finas, que são examinadas uma a uma.

Sumário das amostras colhidas

Em resumo, as seguintes amostras serão colocadas no frasco contendo Formol a 10%:

1. Hipófise, rede carotídea e gânglios dos III e IV nervos cranianos.
2. Gânglio do V nervo craniano (se já não foi incluído com o fragmento anterior).
3. Tronco encefálico completo

4. Fragmento do cerebelo contendo o vérmis.
5. Duas fatias de um dos hemisférios cerebrais.
6. Eventuais lesões encontradas.

Estas amostras serão colocadas sob refrigeração:

1. Três fragmentos de um dos hemisférios cerebrais.
2. Dois fragmentos do cerebelo.

Acondicionamento das amostras

Amostras destinadas ao exame histopatológico

Estas são colocadas num frasco com Formol a 10%.

Formol, ou formalina, é a solução aquosa do aldeído fórmico (HCHO) a 40%. A finalidade do formol é preservar as características morfológicas da amostra do momento em que foram colhidas até o exame histológico. Utiliza-se em solução a 10%, isto é: dissolve-se 100 ml de formol (HCHO a 40%) em 900 ml de água de torneira ou mineral (atenção: água comum, não destilada!).

Para garantir boa fixação do material, deve-se empregar no mínimo 10 partes de solução de formol para cada parte de tecido imerso nela.

Frascos: recomendam-se frascos de boca larga porque os tecidos imersos no fixador endurecem depois de fixados e sua remoção do frasco torna-se difícil se foram utilizados frascos de boca estreita.

Os frascos devem estar perfeitamente identificados. Uma forma muito prática e segura de identificar estas amostras é colocar no interior do frasco, junto com as amostras, uma etiqueta de papel escrita a lápis.

Amostras destinadas a exames microbiológicos

Estas amostras devem ser enviadas sob refrigeração. Para isto devem ser acondicionados em duplos sacos plásticos, com a eti-

queta de identificação escrita a lápis e colocada entre o primeiro e o segundo saco. Os sacos com as amostras devem ser colocados na embalagem isotérmica com o frasco plástico de gelo ou gel congelado. Recomenda-se este método para evitar a água do degelo que poderia penetrar nas embalagens danificando as amostras.

As amostras em formol devem ser enviadas em separado das amostras refrigeradas.

Destino das amostras

1- Todas as amostras colhidas, tanto as refrigeradas quanto as fixadas em Formol, devem ser enviadas a um laboratório oficial ou privado credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – para diagnóstico da Raiva de Herbívoros. No Paraná é o Laboratório Marcos Enrietti (CDME) da Secretaria de Estado da Agricultura, em Curitiba.

2- Neste laboratório, as amostras sob refrigeração serão submetidas à técnica de Imunofluorescência Direta (ID) ou à Prova Biológica (inoculação em camundongos) para diagnóstico de Raiva.

3- Durante este processo as amostras fixadas em Formol são estocadas aguardando o resultado do exame para Raiva. Caso o exame resulte positivo para Raiva, essas amostras serão descartadas.

4- Caso o resultado seja negativo para Raiva, as amostras fixadas em Formol são remetidas a um Laboratório de Histopatologia credenciado pelo MAPA para o diagnóstico de BSE e outras encefalopatias em bovinos (existem cinco no Brasil). Este laboratório é o responsável pelo diagnóstico da encefalopatia que vitimou o paciente, seja ela BSE ou não.

5- Em caso de dúvida, o laboratório credenciado enviará as amostras para o Laboratório de Referência Nacional, na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) – RS.