

Uso da técnica de punção-biópsia para o diagnóstico histopatológico da fasciolose ovina

Puncture-biopsy technique for histopathological diagnostic in ovine fascioliasis

Paulo Oldemar SCHERER¹; Edwin Alberto PILE;² Nicolau Maués da SERRA-FREIRE³; Guido Vidal SCHÄFFER⁴

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Edwin Alberto Pile Maure
Departamento de Biologia
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365
21045-900 - Rio de Janeiro - RJ
e-mail: pilem@LatinMail.com

1-Faculdade de Veterinária da
Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro - RJ

2-Departamento de Biologia do
Instituto Oswaldo Cruz, Rio de
Janeiro-RJ

3-Departamento de Entomologia
do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de
Janeiro-RJ

4-Departamento de Helmintologia
do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de
Janeiro-RJ

RESUMO

Objetivando avaliar a eficiência da técnica de punção hepática no diagnóstico da fasciolose ovina, quer aguda, subaguda ou crônica, em regiões endêmicas, esta foi experimentada em dois grupos de animais. O grupo 1, constando de 65 deles, posteriormente sacrificados, e o grupo 2, envolvendo 12 ovinos previamente selecionados ao acaso, de um rebanho original de 250, ambos oriundos do Município de Santa Vitória do Palmar, RS. Os resultados, em ambos os grupos, corroboraram os achados dos exames coprológicos; e, em algumas amostras em que estes resultaram negativos, a positividade foi confirmada através da técnica da punção-biópsia. Demonstra-se, assim, ser esse um excelente instrumento no diagnóstico da *F. hepatica*, nas três fases, principalmente quando acompanhados de informações quanto à epidemiologia da doença na região.

UNITERMOS: *Fasciola hepatica*; Fasciolíase; Diagnóstico; Ovinos.

INTRODUÇÃO

A fasciolose hepática hoje está amplamente distribuída, e sua presença é considerada um fator limitante à criação de bovinos e ovinos em vários países do mundo. As limitações impostas pela enfermidade estão relacionadas a prejuízos econômicos que incluem: mortalidade de animais, sobretudo ovinos jovens, perda por condenação de fígados em matadouros, além da diminuição da fertilidade dos rebanhos. Eventualmente, a fasciolose também pode afetar o homem, como tem sido citado por diversos autores^{1,7}.

No Brasil, os métodos de diagnóstico do problema provocado por *F. hepatica* em animais vivos estão principalmente restritos a exames coproscópicos. Este fato deve-se à não-existência de estudos que avaliem a resistência de hospedeiros vertebrados naturais ou modelos de laboratório. Deste modo, assinala-se o método mais seguro de diagnóstico da fascioliasis crônica: a recuperação de ovos nas fezes¹⁹. Para a efetivação desse diagnóstico, foram desenvolvidas diferentes técnicas de sedimentação^{9,14,21,26,27}, entretanto, os ovos só são encontrados nas fezes em torno de 90 a 120 dias após ingestão da metacercária, na fase crônica da doença,

quando os parasitos atingem os canais biliares.

Nas fases aguda e subaguda da doença não são detectados ovos nas fezes, porém neste período já houve a instalação da lesão hepática conforme Anderson *et al.* citado por Berne⁴. Nestas fases, o diagnóstico efetivo só poderá ser fornecido pelos achados de necropsia com a presença das formas imaturas no parênquima hepático⁸.

Com base nestes dados e avaliando-se a possibilidade, já assinalada por alguns autores^{20,22}, de expansão da doença para novas áreas, decidiu-se desenvolver uma nova técnica que auxilie o diagnóstico do problema independentemente da fase.

MATERIAL E MÉTODO

Animais e grupos

Grupo I

Foram utilizados 65 ovinos com idade compreendida entre seis e oito meses, oriundos de distritos de Santa Vitória do Palmar (SVP) - RS, os quais, após punção hepática, foram abatidos no Setor de Carnes da Cooperativa de Ovinos e Lã de SVP - CQVILÃ. Alíquotas de fezes foram coletadas e

processadas pela técnica de quatro tamises sucessivos¹⁴, no Laboratório de Morfofisiologia e Patogenia de Carrapatos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, convênio UFRRJ - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)/Sanidade Animal (LMPC/SA). Os fígados foram examinados pelo Serviço de Inspeção Veterinária do Município.

Grupo II

De um rebanho de aproximadamente 250 cabeças de ovinos oriundos de SVP, foram selecionados ao acaso 12 animais adultos. Punções-biópsias do fígado e coleta de fezes diretamente da ampola retal foram realizadas. As fezes foram acondicionadas sob refrigeração em sacos plásticos de 30 x 15 x 0,15 cm, previamente identificados. Os exames de fezes foram realizados seguindo-se a metodologia empregada no grupo I.

Punções-biópsias

O ponto de punção para a biópsia hepática foi demarcado no décimo espaço intercostal do antímero lateral direito, em uma região determinada por linhas imaginárias traçadas caudocranialmente, do coxal à extremidade distal e proximal da escápula.

A primeira linha com a origem na tuberosidade coxal foi demarcada paralelamente aos processos transversos das vértebras lombotorácicas.

A segunda linha, oblíqua à primeira em ângulo aproximado de 20 graus, foi marcada no intercruzamento das linhas sobre a tuberosidade coxal.

A terceira linha traçada dentro do décimo espaço intercostal era perpendicular à primeira e concorrente à segunda linha. No seu ponto mediano, foram efetuadas as punções-biópsias.

Equipamento para punção-biópsia

Agulha de Silverman de 115-20 mm para biópsia, composta de uma câmara externa, um canhão Luer-lock e de outra câmara interna bifurcada e biselada.

Contenção

Não foi utilizado qualquer anestésico. A contenção mecânica do animal foi manual e sem a utilização de qualquer equipamento.

Procedimento

A agulha era introduzida com o canhão Luer-lock no local predeterminado e previamente demarcado pelos dedos do operador, que orientava a penetração oblíqua da agulha no sentido craniocaudal através da pele, do músculo cutâneo, dos músculos levantadores das costelas, dos músculos intercostais externo e interno, da pleura, do músculo do diafragma e do peritônio até o fígado em sua porção parietal, perfurando a cápsula hepática até o parênquima. Então, substituía-se o canhão pela câmara interna, a qual era introduzida um centímetro e meio a mais dentro do fígado com movimentos giratórios no sentido horário. Concluída esta operação, retirava-se o equipamento e removia-se o conteúdo da câmara interna para o tubo de ensaio, contendo 5 ml de solução de formol a 10% v.v., identificado com o número do ovino. A solução de formol a 10% v.v. era substituída três vezes no período de 24 horas após a realização da técnica.

Histologia

O material foi processado conforme as técnicas histológicas de rotina³. A coloração foi realizada com Hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de Masson¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No grupo I, três punções constituíram erro de técnica, 21 foram positivas e 33 foram consideradas suspeitas. Dezenove fígados desses animais foram condenados pelo serviço de inspeção municipal devido às lesões macroscópicas e dois foram liberados para o consumo. Os 19 animais também apresentavam-se positivos para a ovoscopia (Tab. 1). Oito não apresentaram nenhum tipo de lesão.

No grupo II, sete animais tiveram resultados

Tabela 1

Resultado dos exames de 65 animais por punção-biópsia hepática e exame coproparasitológico para o diagnóstico da *Fasciola hepatica*, coletados, no período de janeiro a março de 1995, no Matadouro de Santa Vitória do Palmar - RS.

	Punção-biópsia		Ovoscopia	
	Nº de animais	%	Nº de animais	%
Positivos	21	32,30	19	29,23
Suspeitos	33	50,76	0	0
Negativos*	11	12,30	46	70,77

* Três animais (4,74%) constituíram erro de técnica.

Tabela 2

Resultado dos exames de 12 animais coletados no campo, no período de janeiro a março de 1995, por punção-biópsia e exame coproparasitário para o diagnóstico da fasciolose hepática em Santa Vitória do Palmar - RS.

	Punção-biópsia		Ovoscopia	
	Nº de animais	%	Nº de animais	%
Positivos	7	58,34	7	58,33
Suspeitos	1	8,33	0	0
Negativos*	4	33,33	5	41,67

* Constituíram erro de técnica.

coprológicos positivos para ovos de *F. hepatica* e cinco tiveram resultados negativos. Quatro animais negativos apresentaram erro de técnica na punção-biópsia. Um animal foi considerado suspeito. Os sete coprológicamente positivos também apresentaram-se positivos para a punção-biópsia hepática (Tab. 2).

Do total de 77 punções-biópsias realizadas no fígado dos ovinos, obteve-se sucesso da técnica proposta em 70 amostras, e sete consistiram em erro de técnica: três com fragmento de pulmão e quatro com fragmentos de músculo estriado. Cinquenta e cinco punções continham espaço porta bem definido e 15 não o apresentavam.

As lesões histopatológicas encontradas nas punções-biópsias apresentaram: septação parenquimatosa (29 áreas), dutos biliares proliferados (26 áreas), fibroses portais (29 áreas), intumescimento celular (21 áreas) e infiltrado inflamatório (48 áreas).

As 25 punções-biópsias consideradas positivas apresentavam infiltrado linfocitário mononuclear, fibrose portal, intumescência celular e septação parenquimatosa, corroborando os achados histopatológicos de trabalhos experimentais realizados com *F. hepatica*²³.

As 33 punções que apresentavam uma ou mais alterações (infiltrado inflamatório e/ou intumescência celular), que não fossem proliferação de dutos biliares, fibrose portal ou septação fibrosa do parênquima hepático, foram consideradas suspeitas.

Os oito animais considerados negativos foram aqueles que não apresentaram nenhum tipo de lesão.

Embora as intoxicações por *Senecio*^{2,5,12,13,18,24,25}, *Cestrum laevigatum*¹⁰, *Phitomyces chartarum*¹¹, aflatoxinas^{15,16} e envenamento por *Crotalaria*⁶ apresentem as mesmas lesões descritas para a *F. hepatica* na fase crônica, estas não apresentam lesões do epitélio dos grandes dutos e são acompanhadas de megalocitose proeminente. No caso de *Phitomyces chartarum*, em que a megalocitose é leve, observa-se biliestase no capilar e no hepatócito¹¹.

O grande valor diagnóstico dos exames histopatológicos e a correlação entre os exames realizados e a epidemiologia da doença, que deve existir, são novamente constatados. É com base nesta constatação que consideramos os exames histológicos das punções-biópsias, quando confrontados com exames coproparasitários, de maior resolução no diagnóstico do problema.

SUMMARY

In order to evaluate the efficacy of puncture-biopsy technique on the diagnostic of acute, sub-acute or chronic fasciolosis in sheep raised in epidemiological region, an investigation involving two groups of animals was carried out. Group 1 was made up by 65 sheep, which were later slaughterhouse, and Group 2 was made up by 12 animals, which were randomly selected from a single flock from the same area. From the sheep belonging to the Group 1, besides the biopsies, they were sampled faeces and all the livers were evaluated at slaughterhouse. Yet the animals that made up Group 2, besides biopsied, were sampled aiming *F. hepatica* ova detection under coprologic test. The biopsy's material was histologically processed and stained by H.E. and Masson methods. All the animals that were positive for *F. hepatica* under coprologic test, as well as some that were negative, were positives to puncture-biopsy methodology. This technique proved to be an excellent toll for the diagnostic of *F. hepatica* infection, either acute, sub-acute or chronic. This method was also considered to be more sensitive than faecal single test, mostly in areas which parasite prevalence is known.

UNITERMS: *Fasciola hepatica*; Fascioliasis; Diagnosis; Ovine.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ALCAINO, H.; APT, W. Algunos antecedentes sobre la fascioliasis animal y humana. *Monografía. Médico Veterinaria*, 11:14-29, v.11, p.14-29, 1989.
- 2- BARROS, C.S.L.; METZDORF, L.L.; PEIXOTO, P.V. Ocorrência de surtos de intoxicação por *Senecio* sp. (Compositae) em bovinos no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.7, n.4, p.101-7, 1987.
- 3- BEHMER, O.A.; DE TOLOSA, E.M.C.; DE FREITAS NETO, A.G. *Manual de técnicas para histologia normal e patológica*. São Paulo, Edart. 257p. 1976.
- 4- BERNE, M.E.A. *Identificação e purificação de antígenos somáticos de formas adultas de Fasciola hepatica através de anticorpos monoclonais: ensaios de imunoproteção e imunodiagnóstico*. Belo Horizonte, 1994. 168p. Tese. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG.
- 5- BETTY, R.M.; MARKSON, L.M. Liver biopsy in the diagnosis of regwort (*Senecio jacobea*) poisoning in a herd of cattle. *Veterinary Record*, v.66, n.28, p.398-400. 1954.
- 6- BLOOD, D.C.; HANDERSON, J.A. *Clínica veterinária*. 7.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1989. 1263p.
- 7- BORAY, J.C. Fasciolosis in sheep. In: *Refresher Course for Veterinarians*. Sydney, 1981. The Univ. of Sidney, *Proceedings*, 58. 1981.
- 8- BORAY, J.C. Fascioliasis. In: *Handbook Series in Zoonoses*. p.71-8, 1982.
- 9- DENIS, W.R.; SIDNEY, W.M.; SWANSON, L.R. A new laboratory and field diagnostic test for fluke ova in feces. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.124, p.47-50, 1954.
- 10- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; CANELLA, C.F.C. Intoxicação por *Cestrum levigatum* Schelecht, a causa de mortandades em bovinos no Estado do Rio de Janeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, p.165-93, 1969.
- 11- DÖBEREINER, J.; TOKARNIA, C.H.; MONTEIRO, M.C.C.; DA CRUZ, L.C.H.; CARVALHO, E.G.; FRIMO, A.T. Intoxicação de bovinos e ovinos em pasto *Brachiaria decumbens* contaminados por *Phitomyces chartarum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira Serviço Veterinário*, v.11, p.87-94, 1976.
- 12- DRIEMAYER, D.; BARROS, C.S.L.; PILATI, C. Seneciose em Bovinos. *Hora Veterinária*. v.10, n.59, p.23-34, 1991.
- 13- FOWLLER, M.E. Pyrrolizidine alkaloid poisoning in calves. *Journal American Veterinary Medical Association*, v.152, n.8, p.1131-7, 1968.
- 14- GIRÃO, E.S.; UENO, H. Técnica de quatro tamises para diagnóstico coprológico quantitativo da fasciolose dos ruminantes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.20, p.905-12, 1985.
- 15- HILL, K.R. Comment on the histological appearances in serial liver biopsies and postmortem specimens. *Veterinary Record*, v.75, n.19, p.493-5, 1963.
- 16- LOOSMOREM, R.M.; MARKSON, L.M. Poisoning of cattle by Brazilian groundnut meal. *Veterinary Record*, v.73, p.813-4, 1961.
- 17- MALLORY, F.B. *Pathological technique*. W.B. Sanders Company. Philadelphia and London. 1938.
- 18- MÉNDEZ, M.C.; CORRÊA, F.R.; SCHILD, A.L.; MARTZ, W. Intoxicação experimental por cinco espécies de *Senecio* em bovinos e aves. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.10, n.3-4, p.63-9, 1990.
- 19- NUERNBERG, S. *Estudos experimentais com Lymnaea cubensis Pfeifer, 1839 (Mollusca, Gastropoda, Basomatophora, Lymnaeidae) com hospedeiro intermediário da Fasciola hepatica L., 1758 (Trematoda, Fasciolidae) no Estado do Rio de Janeiro*. Rio de Janeiro, 1978. 59p. Tese. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Parasitologia. UFRRJ.
- 20- SCHERER, P.O.; ABIDU, M.; SANTOS, C.S.; SILVA, P.B.; BORDIN, E.; SERRA-FREIRE, N.M. Ocorrência e prevalência da *Fasciola hepatica* na Região dos Lagos, Estado do Rio de Janeiro. *Parasitologia. al Dia*. v.19, n.102, p.69-71, 1995.
- 21- SCOTT, J.M.; GOLL, P.H. The epidemiology and abthelmintic control of ovine fascioliasis in the Ethiopian Central Highlands. *Brazilian Veterinary Journal*, v.133, p.273-80. 1977.
- 22- SERRA-FREIRE, N.M.; NUERNBERG, S. Registro de fasciolose hepática em equino de Santa Catarina, Brasil. *Revista Semina*, v.13, n.1., p.41-3, 1992.
- 23- THORPE, E.; FORD, E.J.H. Serum enzyme and hepatic changes in sheep infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Pathology*, v.97, 1969.
- 24- TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Compositae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.4, n.2, p.39-65, 1984.
- 25- TOKARNIA, C.H.; GAYA, A.; PEIXOTO, P.V.; STOLF, L.; CONSORTE, L.B.; DÖBEREINER, J. Intoxicação experimental por *Senecio desiderabilis* (Compositae) em bovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.10, n.1-2, p.35-42, 1990.
- 26- UENO, H.; GONÇALVES, P.C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 2.ed., Tóquio: Japan International Cooperation Agency, 1988. 166p.
- 27- WATANABE, S.; NAGAYAMA, F.; IWATA, K. Simple detection technique for *Fasciola hepatica* ova. *Journal of Japanese Veterinary Medical Association*, v.6, p.176-7, 1953.

Recebido para publicação: 18/04/1997
Aprovado para publicação: 05/04/1999