



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

A LAVAGEM TRAQUEAL E A LAVAGEM BRONCOALVEOLAR COMO MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RESPIRATÓRIA EM EQUINOS

NAIR ALMEIDA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Prof. Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

VOGAIS

Prof. Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Prof. Doutor Armando Panhanha Sequeira Serrão

Prof. Doutor Luiz Claudio Nogueira Mendes

ORIENTADOR

Prof. Doutor. Luiz Claudio Nogueira
Mendes

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutora. Ana Cristina Gaspar
Nunes Lobo Vilela

2011

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

A LAVAGEM TRAQUEAL E A LAVAGEM BRONCOALVEOLAR COMO MÉTODOS DE
DIAGNÓSTICO DA DOENÇA RESPIRATÓRIA EM EQUINOS

NAIR ALMEIDA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

PRESIDENTE

Prof. Doutor José Paulo Pacheco Sales Luís

VOGAIS

Prof. Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela

Prof. Doutor Armando Panhanha Sequeira Serrão

Prof. Doutor Luiz Claudio Nogueira Mendes

ORIENTADOR

Prof. Doutor. Luiz Claudio Nogueira
Mendes

CO-ORIENTADOR

Prof. Doutora. Ana Cristina Gaspar
Nunes Lobo Vilela

2011

LISBOA

Agradecimentos

Aos meus pais e à minha irmã, pelo imenso apoio que me têm dado ao longo destes anos, por me terem possibilitado a realização do meu desejo de me tornar Médica Veterinária.

Ao meu orientador, o Professor Dr. Luiz Claudio Nogueira Mendes pelo esforço, paciência e disponibilidade que depositou no meu projecto para que este fosse levado a cabo com sucesso.

À Professora Dra. Cristina Vilela minha co-orientadora pelos conselhos e tempo dedicado no sentido de definir o local de estágio.

Ao Professor Dr. Miguel Saraiva Lima por me ter dado a oportunidade de o acompanhar em saídas de campo durante a faculdade fundamentais para o incremento do meu interesse na área de clínica de espécies pecuárias.

Ao Professor Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa por ter tornado possível o uso do endoscópio no meu projecto de dissertação.

À Professora Dra. Juliana Regina Peiró pelos conhecimentos transmitidos, pela amabilidade com que sempre me tratou.

Ao Professor Dr. Fabiano António Cadioli e ao Professor Dr. Paulo Sérgio Patto dos Santos pela disponibilidade para responder a qualquer dúvida que tivesse durante o estágio.

À Professora Dra. Márcia Marinho pela cedência do laboratório de Microbiologia, uso de equipamentos e materiais e interpretação dos resultados das culturas.

À Professora Dra. Maria Cecília Rui Luvizotto pela paciência e disponibilidade para a realização da leitura das lâminas e pelos conselhos dados no que concerne a técnicas de processamento de amostras para exame citológico.

Ao Professor Dr. Paulo César Ciarlini pela cedência do laboratório de patologia clínica e equipamentos.

À mestranda Bianca Gerardi pela ajuda prestada em todo o processo de colheita de amostras, contribuição para a qual não existe agradecimento suficiente.

Ao mestrando Breno Fernando Martins de Almeida e à técnica Laine Margareth por toda a ajuda prestada no processamento das amostras e leituras das lâminas.

À residente Janete Félix pela ajuda na identificação e interpretação das lâminas citológicas.

Aos residentes do Hospital Veterinário que acompanhei durante o estágio, os Médicos Veterinários Otávio Luiz Fidelis Júnior, Jefferson Filguiera Alcindo, Gabriel Isola Braga, Paula Silva de Toledo, Vanessa Bermejo e Sérgio Silva, pela paciência, conhecimentos que me transmitiram e pelo ritmo de trabalho que me inculcaram.

Aos estagiários Gustavo Gonzales Maurício Corrêa e Fabrício de Paula pela ajuda prestada no processo de colheita de amostras.

Resumo

Título: A lavagem traqueal e a lavagem broncoalveolar como métodos de diagnóstico da doença respiratória em equinos

A doença respiratória é uma das causas mais importantes da má *performance* atlética em cavalos de desporto em todo o mundo. Actualmente estão disponíveis um grande número de ferramentas e exames complementares que permitem uma avaliação minuciosa do aparelho respiratório. É importante para os veterinários conhecer as principais indicações, as informações passíveis de ser obtidas através do uso correcto destes meios complementares para se chegar ao diagnóstico definitivo específico. O objectivo geral deste trabalho consistiu na implementação e desenvolvimento de um protocolo para a colheita, processamento e avaliação das secreções respiratórias em equinos adequado para o funcionamento do hospital veterinário onde este trabalho foi desenvolvido. Secundariamente pretendeu-se verificar os tipos celulares obtidos na lavagem traqueal e na lavagem broncoalveolar em equinos sem história clínica e sinais de doença respiratória e, deste modo inferir sob a importância e aplicabilidade de ambas as técnicas no estudo da patologia respiratória. Com este trabalho constatámos a predominância das células globulares, células colunares ciliadas e de macrófagos alveolares na lavagem traqueal. Dois dos cinco equinos seleccionados para colheita apresentaram hiperplasia linfóide folicular diagnosticada através da endoscopia não tendo demonstrado nenhuma sintomatologia no exame físico salientando a importância da conjugação de todas os dados recolhidos durante todo o processo de diagnóstico.

Palavras-chave: Equinos, endoscopia, lavagem traqueal, lavagem broncoalveolar, citologia, bacteriologia.

Abstract

Title: The tracheal wash and bronchoalveolar lavage as methods used in the diagnosis of equine respiratory disease

The respiratory disease is one of the most important cause of poor athletic performance in race horses worldwide. Nowadays there is a large number of tools and ancillary diagnostic techniques that can be used to perform an accurate examination of the upper and lower respiratory tract. It is important for all the veterinarians to know the major indications, the information that can be obtained from them and their correct use in order to achieve a specific diagnosis. The main goal of this work was to develop and to apply a protocol for the sample collection, processing and evaluation of respiratory secretions suitable for the veterinary hospital where this work was developed. Secondly we intended to verify the cells retrieved by tracheal wash and bronchoalveolar lavage in horses without a medical history or symptoms of respiratory disease and, thus conclude on the importance and indications of these techniques in the study of respiratory disease. With this work we noted the predominance of globet cells, ciliated columnar cells and alveolar macrophages in samples obtained by tracheal wash. Two of the five horses were diagnosed with pharyngeal lymphoid hyperplasia in the endoscopic examination but they had no symptoms of respiratory disease at the physical examination, highlighting the importance of the use of all the information gathered during the diagnosing process.

Key-words: Equine, endoscopy, tracheal wash, bronchoalveolar lavage, cytology, bacteriology

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo.....	III
Abstract	IV
Índice Geral.....	V
Índice de Tabelas	VII
Índice de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas	IX
1. Estágio Curricular	1
2. Revisão Bibliográfica.....	7
2.1 Aparelho Respiratório Equino	7
2.2 Doença Respiratória Equina.....	9
2.2.1 Obstrução Aérea Recorrente e Doença Pulmonar Obstrutiva Associada à Pastagem de Verão	9
2.2.2 Doença Respiratória Inflamatória.....	11
2.2.3 Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Exercício	13
2.2.4 Pneumonia Eosinofílica.....	15
2.2.5 Pneumonia Parasitária	16
2.2.6 Neoplasia Torácica	17
2.2.7 Inalação de Fumo.....	17
2.2.8 Pneumonia Bacteriana/Pleuropneumonia.....	18
2.2.9 Pneumonia Fúngica	23
2.2.10 Pneumonia Viral	24
2.2.11 Outros Tipos de Pneumonia	26
2.3 O Diagnóstico	27
2.3.1 Anamnese	27
2.3.2 Exame Físico	29
2.3.3 Exame do Aparelho Respiratório	31
2.3.4 Exames Complementares	37
2.3.4.1 Hemograma e Bioquímica Sanguínea.....	37
2.3.4.2 Análise dos Gases Sanguíneos	38
2.3.4.3 Endoscopia	39
2.4 Colheita e Avaliação das Secreções Respiratórias.....	42
2.4.1 Lavagem Traqueal	43
2.4.2 Lavagem Broncoalveolar.....	45

2.4.3	Processamento das Amostras.....	46
2.4.4	Citologia	48
2.4.4.1	Células Epiteliais.....	49
2.4.4.2	Contagem Celular Total	51
2.4.4.3	Contagem Diferencial	52
2.4.4.4	Causas das Alterações no Exame Citológico	58
2.4.5	Exame Microbiológico	62
3.	Material e Método	70
3.1	Objectivos	70
3.2	Critérios de Inclusão	70
3.3	Grupo de Animais	70
3.4	Metodologia	71
3.4.1	Lavagem Broncoalveolar.....	72
3.4.2	Lavagem e Aspiração Transtraqueal	74
3.4.3	Citologia	75
3.4.4	Cultura Bacteriana	77
3.4.5	Teste da Catalase	78
3.4.6	Coloração de Gram.....	78
3.5	Resultados	80
3.6	Discussão e Conclusão.....	90
4.	Bibliografia	94

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Espécies animais recebidas pelo hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	3
Tabela 2 – Casos clínicos diagnosticados em equinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	4
Tabela 3 – Casos clínicos diagnosticados em bovinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	5
Tabela 4 – Casos clínicos diagnosticados em ovinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	5
Tabela 5 – Casos clínicos diagnosticados em caprinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	6
Tabela 6 – Casos clínicos diagnosticados em suínos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011	6
Tabela 7 - Agentes pró-inflamatórios que contribuem para a resposta inflamatória na obstrução aérea recorrente	10
Tabela 8 – Factores etiológicos associados à doença respiratória inflamatória nos equinos	12
Tabela 9 - Factores associados à ocorrência da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício nos equinos	15
Tabela 10 – Microorganismos isolados com maior frequência na pneumonia bacteriana nos equinos	21
Tabela 11 – Estimativa do estado de desidratação com base na prega de pele	30
Tabela 12 - Delimitação do campo de auscultação pulmonar nos equinos	34
Tabela 13 – Quadro de classificação da severidade da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício com base na observação de sangue na traqueia	41
Tabela 14 – Distribuição celular no aparelho respiratório equino	50
Tabela 15 – Contagem diferencial na citologia de amostras obtidas através da LT	54
Tabela 16 – Contagem diferencial na citologia de amostras da LBA	55
Tabela 17 – Metodologia para a identificação de microorganismos na cultura bacteriana	64
Tabela 18 – Caracterização do grupo de animais utilizados no trabalho	70
Tabela 19 – Relatório do exame físico, hematócrito e proteínas totais realizado previamente à colheita de amostras	71
Tabela 20 – Relatório do exame endoscópico realizado antes da colheita de secreções respiratórias	80
Tabela 21 – Contagem diferencial na citologia de amostras obtidas por LT em cavalos sem sinais clínicos de doença respiratória	81
Tabela 22 – Caracterização das colónias isoladas no meio de agar sangue, resultados do teste da catalase e coloração de Gram das amostras obtidas por LT	84
Tabela 23 – Caracterização das colónias isoladas no meio de agar MacConkey, resultados do teste da catalase e coloração de Gram das amostras obtidas por LT	88

Índice de Figuras

Figura 1 – Faculdade de Medicina Veterinária e hospital veterinário da Universidade de Gent	1
Figura 2 – Hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho	2
Figura 3 – Catéter para LBA	73
Figura 4 – Processo de instilação e recuperação da solução fisiológica na LBA	73
Figura 5 – Preparação asséptica do local de punção na LT	75
Figura 6 – Administração e recuperação da solução fisiológica na LT	75
Figura 7- Citocentrífuga	77
Figura 8 – Suporte e filtro citológico	77
Figura 9 – Macrófago alveolar com dois eritrócitos fagocitados na LT	81
Figura 10 – Macrófago alveolar na LT	82
Figura 11 – Células globulares e alguns eritrócitos na LT, amostra A4	82
Figura 12 – Célula colunar ciliada na LT	82
Figura 13 – Célula colunar ciliada na LT	83
Figura 14 – Três células colunares ciliadas e um macrófago alveolar na LT	83
Figura 15 – Hemólise numa placa de agar sangue de uma amostra obtida por LT	87
Figura 16 – Colónias em agar sangue de uma amostra obtida por LT	87
Figura 17 – Colónias formadas em agar sangue de uma amostra obtida por LT	87
Figura 18 – Colónias obtidas na LT em agar MacConkey	89
Figura 19 – Bacilos na coloração de Gram, placa agar MacConkey	90

Lista de Abreviaturas

EDTA – Ácido Tetraacético Etilenodiamina

α - Alfa

bpm – Batimentos por minuto

BHI – Brain heart infusion

CCT – Contagem celular total

cm – Centímetro

dL - Decilitro

DD – Diagnósticos diferenciais

DPOAPV – Doença pulmonar obstrutiva associada à pastagem de Verão

DRI – Doença respiratória inflamatória

IV - Endovenosa

FC – Frequência cardíaca

F – Frequência absoluta simples

Fr – Frequência relativa simples

FR – Frequência respiratória

γ - Gama

G - Gauge

gr – Grama

° C – Graus Celsius

Hct – Hematócrito

HPIE – Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício

Hg - Mercúrio

HVE – Herpesvírus equino

Ig – Imunoglobulinas

LBA – Lavagem broncoalveolar

LT – Lavagem transtraqueal

L - Litro

m - Metro

μ l – Microlitro

mg - Miligrama

ml - Mililitro

mm - Milímetro

mseg – Milisegundos

MI – Motilidade intestinal

mrm – Movimentos respiratórios por minuto

OAR – Obstrução aérea recorrente

% - Percentagem

PaCO₂ - Pressão parcial de dióxido de carbono

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio

PT – Proteínas totais

Kg – Quilograma

rpm – Rotações por minuto

seg – Segundo

SC – Subcutânea

BALT – Tecido linfóide associado aos
Brônquios

T – Temperatura

TRC – Tempo de Repleção Capilar

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UI – Unidades Internacionais

1. Estágio Curricular

O estágio curricular que culminou com a elaboração da presente dissertação de mestrado foi realizado em dois hospitais veterinários. Numa primeira fase, no hospital veterinário da Universidade de Gent (UGent) na Bélgica e numa segunda fase, no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) na cidade de Araçatuba no Brasil.

Figura 1 – Faculdade de Medicina Veterinária e hospital veterinário da Universidade de Gent



O estágio no hospital veterinário da Universidade de Gent foi realizado entre o mês de Outubro e o mês de Dezembro de 2010 no âmbito do programa de mobilidade Erasmus na unidade de espécies pecuárias, mais especificamente na área de medicina de equinos. Esta unidade de espécies pecuárias é responsável não só pelo cuidado de cavalos como também de bovinos, ovinos, caprinos, lamas, entre outras espécies. Anualmente são recebidos cerca de 2000 pacientes com uma taxa de atendimento de 70% de equinos, 25% de bovinos e 5% para outras espécies (<http://www.laim.ugent.be>). Neste hospital são garantidos tanto o diagnóstico como o tratamento de doenças dando especial ênfase às áreas de Pneumatologia, Gastroenterologia, Cardiologia, Neurologia, Neonatologia e Fisiologia do Desporto. Sendo um hospital universitário, o atendimento é assegurado por docentes e médicos veterinários não docentes. Na vasta equipa que conduz o hospital é fundamental a contribuição dos alunos, sobretudo os alunos em estágio curricular da própria faculdade ou outros ao abrigo de programas de mobilidade estudantil. O programa de estágio inclui a rotação pelos diferentes departamentos, tais como medicina interna (4 semanas), imagiologia (2 semanas), reprodução e obstetrícia (1 semana), patologia (1 semana), cirurgia (1 semana), ortopedia (1 semana) e internamento (2 semanas). No período de estágio foram leccionadas aulas práticas relacionadas com os princípios gerais da endoscopia, ecografia, assepsia e sutura cirúrgica, anestesia regional da porção distal dos membros, casqueamento e ressecção

intestinal. Os docentes responsáveis pelo departamento de medicina interna seleccionam casos clínicos que deverão ser apresentados e discutidos semanalmente perfazendo um total de três casos por grupo de alunos estagiários. Diariamente cabe ao estagiário realizar o exame físico (cor das mucosas, frequência cardíaca, frequência respiratória, motilidade intestinal e temperatura) de todos os pacientes internados previamente à visita e actualização das fichas clínicas levada a cabo pelos docentes e clínicos. Finda esta fase é iniciada a medicação diária, mudança de pensos e a realização de curativos sob supervisão dos clínicos responsáveis.

Figura 2 – Hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho



O estágio realizado na unidade de espécies pecuárias do hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira decorreu entre Fevereiro e Julho de 2011, no âmbito do programa Bolsa Luso Brasileira Santander Universidades. O hospital é composto por duas unidades distintas, uma dedicada à consulta e internamento de animais de companhia e outra exclusivamente direccionada para espécies pecuárias (equinos, bovinos, ovinos, caprinos e suínos). O hospital proporciona consultas especializadas nas áreas de medicina, cirurgia e anestesiologia, fisiopatologia da reprodução e obstetrícia, imagiologia e patologia clínica. A unidade de atendimento de espécies pecuárias é composta pelos docentes responsáveis pelo ensino das áreas de medicina, cirurgia e anestesiologia de espécies pecuárias e por médicos veterinários em regime de internato. O hospital recebe pacientes através da marcação prévia ou em caso de emergência. A unidade não oferece o atendimento de pacientes em regime de ambulatório. O serviço de medicina garante a recepção e a realização dos procedimentos necessários que visam o diagnóstico, tratamento e o acompanhamento dos casos. A área de cirurgia e anestesiologia está preparada para receber pacientes com cólica e para a realização de cirurgias de tecidos moles e ortopédicas, endoscopia e artroscopia. O programa de estágio inclui o cumprimento 40 horas por semana de segunda a sexta-feira e de 24 horas de estágio por mês, durante o fim-de-semana. Os estagiários apresentam como principais funções o

acompanhamento da recepção de pacientes, construção da anamnese, processo de diagnóstico e a contenção de pacientes. Diariamente, os estagiários devem acompanhar e prestar auxílio aos médicos veterinários na realização do exame físico, medicação diária e na elaboração de curativos tendo em contas as necessidades de cada paciente.

Durante o período de estágio foram recebidos e diagnosticados 88 casos clínicos. Destes, 56 casos clínicos foram relativos a equinos, 8 a bovinos, 16 a ovinos, 7 a caprinos e 1 a suíno, conforme se verifica na tabela 1.

Tabela 1 – Espécies animais recebidas pelo hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011.

Espécie	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Equinos	56	63.6
Bovinos	8	9.1
Ovinos	16	18.2
Caprinos	7	8.0
Suíno	1	1.1
Total	88	100

Os equinos atendidos pertenciam sobretudo à raça Quarto de Milha. No entanto, também foram recebidos equinos da raça Manga Larga, Crioulo, Árabe e Puro-Sangue Inglês. As raças de bovinos encaminhados para o hospital veterinário eram destinadas sobretudo à produção de carne sendo delas exemplo as raças Nelore e Brahma. Os ovinos recebidos pertenciam maioritariamente à raça Suffolk. Em menor número foram atendidos ovinos da raça Santa Inês e Dorper. Os caprinos e o suíno observados não pertenciam a uma raça definida. Os casos clínicos diagnosticados durante o período de estágio são referidos nas tabelas 2, 3, 4, 5 e 6 estando agrupados com base na espécie animal e no sistema orgânico afectado (ex. aparelho respiratório, aparelho musculoesquelético, sistema gastrointestinal, aparelho urinário, aparelho reprodutor, sistema imunitário e sistema nervoso).

Tabela 2 – Casos clínicos diagnosticados em equinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Aparelho Respiratório	3	5.4
Aparelho Musculoesquelético	7	12.5
Sistema Gastrointestinal	8	14.3
Aparelho Reprodutor	3	5.4
Sistema Nervoso	1	1.8
Pele e Anexos	18	32.1
Outros		
Tétano	4	7.1
Babesiose	6	10.7
Pitiose	6	10.7
Total	56	100

A área com um maior número de casos foi a da pele e anexos com 32% do total de equinos recebidos durante o estágio. Nesta área são contabilizados todos os pacientes trazidos ao hospital veterinário devido à presença de feridas com diferentes localizações estando muitas delas infestadas por míases. São também aqui incluídos um caso de otite, dois casos de dermatofitose, três casos de diagnóstico e extracção cirúrgica de sarcóide e dois casos de carcinoma das células escamosas. Em relação à doença respiratória foram diagnosticados três casos, um caso de obstrução aérea recorrente, um caso de broncopneumonia e um caso de linfadenite infecciosa. Foram recebidos e submetidos a tratamento médico quatro casos de cólica, três casos de perda de peso e inapetência devido a parasitismo gastrointestinal e um caso de colite ulcerativa diagnosticada *post mortem*. Foi diagnosticado e sujeito a terapêutica um caso de funiculite e foi realizada a castração de dois cavalos com criptorquidismo. Na área do aparelho musculoesquelético foram diagnosticados quatro casos de fractura (uma fractura da terceira vértebra cervical e as restantes eram fracturas de membros), um caso de osteíte podal, um caso de osteoartrite interfalangiana distal (*Ringbone*) e um caso de deformação dos ligamentos flexores numa poldra. Foi ainda diagnosticado um caso de mieloencefalite equina causada por protozoários. Sob a classificação de outros são incluídos quadro casos de tétano com desfecho fatal em três deles, quatro casos de babesiose e seis casos de pitiose.

Tabela 3 – Casos clínicos diagnosticados em bovinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Aparelho Gastrointestinal	1	12.5
Aparelho Urinário	1	12.5
Aparelho Reprodutor	2	25.0
Pele e Anexos	2	25.0
Outros		
Babesiose	1	12.5
Atrésia Anal e Fenda Palatina	1	12.5
Total	8	100

Dos oito bovinos atendidos durante o estágio, foram diagnosticados dois casos de feridas, um caso de peritonite focal diagnosticada *post mortem*, um caso de úraco persistente, um caso de necrose peniana, um caso de estenose da rima vulvar, um caso de babesiose e um caso de atrésia anal e fenda palatina num bezerro neonato.

Tabela 4 – Casos clínicos diagnosticados em ovinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Aparelho Respiratório	5	31.3
Aparelho Musculoesquelético	1	6.2
Aparelho Gastrointestinal	3	18.8
Aparelho Reprodutor	1	6.2
Pele e Anexos	6	37.5
Total	16	100

Em dezasseis ovinos observados foram diagnosticados seis casos de feridas com diferentes localizações, cinco casos de dificuldade respiratória devido à presença de parasitas pulmonares, um

caso de acidose ruminal, dois casos de perda de peso associada à parasitose gastrointestinal, um caso de cesariana urgente para remoção de dois fetos mortos e um caso de claudicação devido a inflamação unilateral da articulação carpo-metacarpal num carneiro.

Tabela 5 – Casos clínicos diagnosticados em caprinos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011.

	Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
Aparelho Gastrointestinal	6	85.7
Sistema Imunitário	1	14.3
Total	7	100

Dos sete caprinos recebidos, seis foram diagnosticados com perda de peso devido à presença de parasitose gastrointestinal e um caso de falha de transferência da imunidade passiva num cabrito devido à não ingestão de colostro.

Tabela 6 – Casos clínicos diagnosticados em suínos no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira no período de Fevereiro a Julho de 2011

	Frequência Absoluta
Aparelho Respiratório	1
Total	1

O único suíno recebido foi diagnosticado com pneumonia.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Aparelho Respiratório Equino

O aparelho respiratório tem como funções o transporte de oxigênio e a remoção de dióxido de carbono da corrente sanguínea (Robinson & Furlow, 2007). O ar chega aos pulmões através das vias respiratórias que estabelecem a comunicação entre o ambiente e os alvéolos onde as trocas gasosas ocorrem (Robinson & Furlow, 2007). Para além da função da troca gasosa, o aparelho respiratório é responsável pelo metabolismo de alguns compostos, termoregulação e funciona como um reservatório de sangue graças à extensa rede de vasos que compõem o sistema de circulação pulmonar (Marlin & Vicent, 2007). O aparelho respiratório equino está dividido em duas porções, o tracto respiratório anterior (cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe e traqueia) e o tracto respiratório posterior (brônquios principais, brônquios segmentares, bronquíolos e alvéolos pulmonares) (Gonçalves, 2004). A traqueia equina é uma estrutura tubular flexível que se encontra entre a faringe e a carina, é formada por quatro camadas (adventícia, musculocartilaginosa, submucosa e mucosa) e por 40 a 60 anéis fibrocartilagíneos incompletos (Voss & Seahorn, 2004). Ao nível da carina, a traqueia bifurca-se nos brônquios primários direito e esquerdo, a partir dos quais são formados os lobos cranial direito, lobo acessório, lobo caudal direito e lobos cranial e caudal esquerdos, respectivamente (Voss & Seahorn, 2004).

O aparelho respiratório apresenta uma superfície muito extensa estando continuamente exposto a microorganismos (inertes ou patogénicos) presentes no ar inalado ou veiculados pela circulação sanguínea (Horohov, 2004). A capacidade de entrar no aparelho respiratório e ganhar acesso aos pulmões está dependente da dimensão das partículas bem com da funcionalidade dos mecanismos de defesa respiratórios (Horohov, 2004). De um modo geral, as partículas com dimensão superior a 10 μm são retidas nas fossas nasais, enquanto as partículas com dimensão entre 2 a 10 μm são aprisionadas no epitélio respiratório ciliado (Junqueira & Carneiro, 2004). Assim, apenas as partículas com menos de 10 μm são capazes de atingir as porções mais distais das vias aéreas onde são eliminadas sem que haja necessidade de uma resposta inflamatória ou imune na ausência de doença respiratória (Junqueira & Carneiro, 2004). Os mecanismos de defesa do aparelho respiratório são complexos e incluem barreiras anatómicas, tapete mucociliar, sistema imunitário local (mucosa), tecido linfóide associado aos brônquios (BALT), macrófagos alveolares e o sistema imunitário sistémico (Christley & Rush, 2007). A alteração de qualquer um destes mecanismos predispõe ao desenvolvimento de infecção do aparelho respiratório. A defesa do aparelho

respiratório contra microorganismos patogénicos é assegurada essencialmente através de dois mecanismos presentes nas vias aéreas (tracto respiratório anterior e posterior) e no espaço alveolar (Pilette, Ouadrhiri, Godding, Vaerman & Sibille, 2001). Nas vias aéreas há predominância dos mecanismos de defesa mecânicos que incluem a deposição de microorganismos ao nível da cavidade nasal e orofaringe onde são posteriormente eliminados através da tosse, espirro e do mecanismo de *clearance* mucociliar (Pilette et al., 2001). O tapete mucociliar é um mecanismo de defesa não específico, presente na região da faringe até os bronquíolos respiratórios sendo responsável pela remoção física das partículas das vias respiratórias (Davis, 2007). Este tapete é composto por uma camada dupla de muco, células secretoras e por células ciliadas (Davis, 2007). A camada de muco é um componente importante do tapete mucociliar, na medida em que nele ocorre o aprisionamento, inibição, destruição e remoção das partículas inaladas através do mecanismo de *clearance* mucociliar (Gerber & Robinson, 2007). As partículas inaladas e os detritos presentes no tracto respiratório posterior são aprisionados na camada mais superficial do muco sendo transportadas para a faringe onde são deglutidos (Gerber & Robinson, 2007). Existem determinados factores que podem resultar na alteração do funcionamento do tapete mucociliar, tais como a doença respiratória viral, inalação de fumo, amónia, desidratação, entre outros (Rush & Mair, 2004). A replicação do vírus influenza e do herpesvírus equino e a inalação de fumo culminam com a destruição do epitélio respiratório, a regeneração completa do epitélio ocorre aproximadamente num período de 21 dias (Rush & Mair, 2004). A elevada concentração de amónia no ambiente deprime a motilidade ciliar e retarda o mecanismo de *clearance* mucociliar, a desidratação aumenta a viscosidade da camada de muco inibindo o movimento ciliar e, deste modo a eficácia deste mecanismo de defesa (Rush & Mair, 2004).

Pelo contrário, a defesa do espaço alveolar é assegurada essencialmente pela acção dos macrófagos alveolares e pelo BALT (Pilette et al., 2001). As partículas depositadas no alvéolo são fagocitadas e destruídas pelos macrófagos alveolares, uma vez tendo sido fagocitadas estas são removidas do pulmão através do transporte via tapete mucociliar para a faringe ou penetram no epitélio respiratório sendo eliminados pelo sistema linfático (Davis, 2007). A função dos macrófagos alveolares é prejudicada ou destruída pelo exercício intenso, transporte prolongado e pela infecção respiratória viral (Ainsworth & Cheetham, 2010). O BALT é composto pelos linfonodos presentes na submucosa dos brônquios segmentares e bronquíolos terminais, este é responsável pela coordenação dos mecanismos de defesa pulmonar antigénio-específico e participa na imunidade humoral e celular (Davis, 2007). Os linfócitos B presentes no BALT produzem todas as classes de imunoglobulinas (Ig), com excepção da IgM (Lunn, Breathnach & Soboll, 2007). A IgA predomina

no tracto respiratório anterior e inibe a adesão dos agentes patogénicos ao epitélio respiratório através de um mecanismo denominado exclusão imunitária, enquanto a IgG predomina no tracto respiratório posterior promovendo a opsonização e a destruição dos agentes inalados (Lunn et al., 2007). O herpesvírus equino ao replicar ao nível do BALT induz a necrose dos linfonodos e, conseqüentemente conduz a um estado de imunodepressão aumentando a susceptibilidade a infecções secundárias (Wood, Smith, Daily & Newton, 2007). Os neutrófilos e os linfócitos exercem de igual modo um papel importante na defesa do tracto respiratório posterior aquando da infecção (Ainsworth & Cheetham, 2010).

2.2 A Doença Respiratória Equina

A patologia respiratória continua a ser um grande problema na medicina equina tendo suscitado o interesse de inúmeros investigadores mundialmente (Allen & Franklin, 2007). Nos equinos atletas, a doença respiratória é a segunda causa mais importante da diminuição da *performance* desportiva, interrupção do treinamento e retirada prematura das competições sendo unicamente superada pelas alterações musculoesqueléticas (Kusano, Hobo, Ode & Ishikawa, 2008). As doenças respiratórias com envolvimento do tracto respiratório posterior mais comuns são a doença respiratória inflamatória (DRI), obstrução aérea recorrente (OAR), hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) e a pneumonia (Richard, Fortier, Lekeux & Van Erck, 2010). A infecção do tracto respiratório posterior é frequentemente de etiologia bacteriana, contudo outros agentes patogénicos também poderão estar envolvidos, nomeadamente vírus, fungos ou parasitas (Burrell, Wood, Whitwell, Chanter, Mackintosh & Mumford, 1996; Pusterla, Watson & Wilson, 2006). O quadro clínico manifestado varia de acordo com a natureza da afecção (doença infecciosa e doença não infecciosa) podendo incluir intolerância ao exercício, tosse, corrimento nasal, febre, dispneia, taquipneia, depressão, inapetência, entre outros (Newton, Wood & Chanter, 2003).

2.2.1 Obstrução Aérea Recorrente e Doença Pulmonar Obstrutiva Associada à Pastagem de Verão

Robinson (2001) define a OAR como uma doença respiratória obstrutiva caracterizada por dificuldade respiratória com remissão dos sintomas através do controlo da concentração de poeiras ou através da administração de broncodilatadores. A doença pulmonar obstrutiva associada à pastagem de verão (DPOAPV) é uma doença respiratória similar à OAR, ambas são doenças

respiratórias crónicas presentes predominantemente no cavalo adulto (> 7 anos de idade) mantidos em regime de estabulação ou na pastagem na OAR ou na DPOAPV, respectivamente (Costa, 2012). A OAR e a DPOAPV podem estar presentes no mesmo paciente, os equinos com OAR poderão desenvolver a segunda quando colocados na pastagem (Mair, 1996). O ambiente é um elemento importante na patofisiologia da OAR e da DPOAPV, contudo o mecanismo através do qual este desencadeia a resposta inflamatória no tracto respiratório posterior ainda necessita de um maior esclarecimento (Robinson, 2008; Ainsworth, 2010). Pensou-se que a OAR fosse o resultado de uma resposta inflamatória antigénio-específica (reacção de hipersensibilidade) face à inalação de poeiras orgânicas presentes no feno de má qualidade, hoje reconhece-se que esta de igual modo poderá ser causada por uma resposta inflamatória não específica a agentes pró-inflamatórios, nomeadamente ácaros, endotoxinas, bolores (*Aspergillus fumigatus*, *Faenia rectivirgula* e *Thermoactinomyces vulgaris*) entre outros (tabela 7) (Lavoie, 2007).

Tabela 7 - Agentes pró-inflamatórios que contribuem para a resposta inflamatória na obstrução aérea recorrente (adaptado de Lavoie, 2007)

Bactérias	Bolores	Gases tóxicos	Outros
Endotoxinas	Alergenos	Amónia	Ácaros da foragem
Ácido lipoteicóico	Glucanos	Sulfureto de hidrogénio	Detritos vegetais
Peptidoglicano	Proteases	Metano	Compostos inorgânicos nas poeiras
DNA bacteriano	Micotoxinas		
Proteases			

Não existem evidências que indiquem que a OAR seja um processo infeccioso, contudo a doença respiratória causada por vírus (ex. vírus influenza) aumenta a predisposição para o desenvolvimento desta condição (Lavoie, 2007). As bactérias isoladas nas secreções traqueais dos equinos afectados são o reflexo da colonização do tracto respiratório posterior devido à falha do mecanismo de *clearance* mucociliar (Ainsworth, 2010). A DPOAPV é causada pela inalação de partículas presentes na pastagem, pensa-se que as pneumotoxinas estejam na origem da inflamação e obstrução das vias respiratórias posteriores (Lavoie, 2007). Em ambos os casos, a exposição a poeiras desencadeia o influxo de neutrófilos para o tracto respiratório posterior, o processo inflamatório é acompanhado por obstrução respiratória (broncoespasmo), hipersecreção de muco e a

remodelação da parede do aparelho respiratório (Robinson, 2008). A remodelação do tecido respiratório inclui uma miríade de eventos que em conjunto contribuem para a redução do diâmetro das vias respiratórias exacerbando o quadro clínico, tais como a hipertrofia/hiperplasia do músculo liso, fibrose peribronquiolar e a hiperplasia das células epiteliais (Lavoie, 2007).

O quadro clínico varia de acordo com a fase da doença (Mazan & Tizard, 2012). Assim, no período de remissão não são observados sinais clínicos durante a fase de repouso, com exceção da intolerância ao exercício e da tosse (durante a alimentação) que podem ocorrer devido ao processo de remodelação do tecido respiratório, inflamação persistente e à hipersecreção de muco (Mazan & Tizard, 2012). No período de exacerbação, a sintomatologia não é específica podendo incluir corrimento nasal (seroso, seromucoso ou mucopurulento), tosse, intolerância ao exercício e dificuldade respiratória (Davis & Rush, 2002; Costa, 2012). A severidade e a frequência da tosse pioram com a progressão da doença passando a tosse paroxística não produtiva (Davis & Rush, 2002). Nos quadros mais graves ocorre taquipneia, dilatação das narinas, extensão do pescoço e cabeça e perda de peso (Mazan & Tizard, 2012). Os cavalos com doença respiratória crônica desenvolvem uma linha de esforço abdominal característica (*heave line*) devido à hipertrofia dos músculos abdominais externos (Mazan & Tizard, 2012).

2.2.2 Doença Respiratória Inflamatória

A DRI é uma síndrome caracterizada pela inflamação do aparelho respiratório de etiologia multifactorial que ocorre com maior frequência nos cavalos de desporto (Dixon, McGorum & Prie, 2003). A síndrome da DRI foi definida no *Workshop* Internacional relativo à Doença Respiratória Inflamatória (2002) pela presença de um ou mais dos seguintes sinais clínicos: tosse, presença de secreção traqueal, evidências citológicas de inflamação respiratória, corrimento nasal, má *performance* desportiva, tempo de recuperação prolongado após o exercício, ausência de alterações do padrão respiratório, ausência de sinais de envolvimento sistémico (ex. febre, depressão, inapetência) e a ausência de alterações no hemograma e bioquímica sanguínea (Anon, 2003). A ACVIM (*American College of Veterinary Internal Medicine*) propôs outra definição para a DRI, assim esta é caracterizada por (1) má *performance* desportiva, intolerância ao exercício ou tosse com ou sem hipersecreção de muco; (2) inflamação asséptica observada no exame citológico e (3) disfunção pulmonar baseada na presença de sinais de obstrução respiratória posterior, hipereactividade respiratória ou a alteração das trocas gasosas durante o exercício ou na fase de repouso (Couëtil et al., 2007). Esta última exclui todos os casos de doença respiratória inflamatória

com sinais de envolvimento sistémico e de esforço respiratório acentuado durante a fase de repouso (Couëtil et al., 2007). A DRI ocorre com maior frequência em animais jovens de desporto mantidos em regime de estabulação em ambientes com elevada densidade de poeiras, má ventilação, elevada concentração de endotoxinas, ácaros, bolores, entre outros alérgenos capazes de induzir a inflamação das vias respiratórias à semelhança do que se verifica na OAR (Holcombe et al., 2001; McGorum & Prie, 2003). A incidência desta doença respiratória diminui com a idade nos cavalos de desporto, o que sugere uma menor susceptibilidade devido à aquisição de resistência ou imunidade contra os principais agentes patogénicos associados à DRI (Chapman et al., 2000; Wood, Newton, Chanter & Munford, 2005b). Nos cavalos não usados com fins desportivos, a DRI é geralmente diagnosticada em cavalos mais idosos (Allen & Franklin, 2007).

A etiologia e patofisiologia da DRI ainda não estão definidas concretamente (Ainsworth & Cheetham, 2010). Alguns autores defendem a hipótese de que a DRI apresente uma etiologia multifactorial, assim a resposta inflamatória pulmonar ocorre em resposta à presença de infecção bacteriana ou viral persistentes, HPIE e à inalação de poeiras, bolores, endotoxinas e poluentes ambientais (tabela 8) (Burrell et al., 1996; Christley & Rush, 2007; Mazan, 2012). A contribuição relativa de cada um dos factores varia em diferentes grupos populacionais de acordo com a idade, alimentação, maneio e medidas preventivas, padrão de distribuição dos agentes infecciosos e a predisposição genética (Couëtil et al., 2007).

Tabela 8 – Factores etiológicos associados à doença respiratória inflamatória nos equinos (adaptado de Ghio, 2003; Christley & Rush, 2007)

Factores etiológicos

Agentes infecciosos (ex. bactérias, micoplasma e vírus)

Modalidade desportiva

Sequela da HPIE

Inalação de agentes pró-inflamatórios (ex. endotoxinas)

Gases tóxicos (ex. amónia, monóxido de carbono, ozono, dióxido de enxofre)

Infecção respiratória viral recorrente

Reacção de hipersensibilidade tipo I (bolores)

As bactérias e micoplasmas desempenham um papel importante na patogénese da DRI, os microorganismos mais frequentemente isolados são *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Actinobacillus*, *Pasteurella spp.*, *Mycoplasma felis* e *Mycoplasma equirhinis* (Chapman et al., 2000; Wood, Newton, Chanter & Munford, 2005; Christley & Rush, 2007). Os resultados obtidos na cultura bacteriana deverão ser interpretados com precaução, pois o isolamento de bactérias nem sempre está associado a infecção (Newton, Wood, Smith, Marlin & Chanter, 2003b). Neste casos, a infecção não é a causa da inflamação mas sim uma consequência podendo piorar ou prolongar o quadro da DRI (Newton et al., 2003b). Os cavalos sujeitos a um regime de treinamento com finalidade desportiva apresentam uma maior predisposição para a DRI, devido à maior deposição de partículas no tracto respiratório posterior, alteração da função dos macrófagos alveolares e/ou episódios de HPIE que contribuem para o processo inflamatório (Christley & Rush, 2007). A influência da infecção respiratória viral na etiologia e patofisiologia da DRI é ainda controversa, tendo sido realizadas diferentes pesquisas com o objectivo de verificar a associação entre a infecção pelo herpesvírus equino tipo 1 e 4 bem como o vírus influenza (Wood, Newton, Smith & Marlin, 2003). Sabe-se que a doença respiratória causada por vírus aumenta a predisposição para a DRI directamente ou indirectamente através da alteração dos mecanismos de defesa do aparelho respiratório e, deste modo conduz à maior sensibilidade deste às bactérias, poeiras, bolores, pólen, que como foi referido anteriormente têm um papel importante na génese da DRI (Allen & Franklin, 2007). O diagnóstico torna-se mais complexo em determinadas situações, pois a DRI subclínica é frequente, os sinais clínicos não são específicos e variam dependendo da idade e do grau de actividade do paciente (Burrell et al., 1996). Regra geral, os sinais clínicos são mais subtis nos cavalos mais jovens e estão ausentes durante o período de repouso (Hoffman, 2002; Allen & Franklin, 2007). A tosse durante o exercício e/ou alimentação e a má *performance* desportiva são os principais estímulos iatrotrópicos (Christley & Rush, 2007). Em muitos casos, a DRI é manifestada através da tosse crónica intermitente, intolerância e maior tempo de recuperação após o exercício podendo ocasionalmente ocorrer corrimento nasal em pequena quantidade (Mazan, 2012).

2.2.3 Hemorragia Pulmonar Induzida pelo Exercício

A HPIE ocorre na maior parte dos cavalos de corrida submetidos a exercício intenso (máxima velocidade) sendo esporadicamente observada noutras modalidades desportivas (Radostitis, Gay, Hinchcliff & Constable, 2009). A maior incidência dos episódios de HPIE está associada ao

aumento da intensidade do exercício, historial de episódios anteriores de hemorragia, tempo de treino prolongado, idade (mais comum em cavalos adultos), inflamação respiratória preexistente, arritmias cardíacas (ex. fibrilação atrial) e obstrução respiratória moderada a severa (Durando, 2012). Não há um consenso relativamente à prevalência da doença, a maior ou menor incidência está dependente do método de diagnóstico utilizado e pela frequência com que os pacientes são examinados (Durando, 2012).

A HPIE é causada pela ruptura dos capilares alveolares, passagem do sangue para o espaço intersticial e alveolar numa primeira fase e, posteriormente para os brônquios e traqueia (Hinchcliff, 2007). Os capilares presentes na porção caudodorsal são os mais afectados, sobretudo na fase inicial da HPIE, a porção ventral raramente é envolvida (Hinchcliff, 2007). A ruptura dos capilares é secundária ao aumento da pressão transmural (diferença entre a pressão capilar e a pressão alveolar) durante o exercício (Ainsworth & Cheetham, 2010). A pressão arterial pulmonar média é de 20 a 25 mmHg durante o repouso passando a uma pressão superior a 90 mmHg durante o exercício intenso devido ao aumento do *output* cardíaco (Hinchcliff, 2007). Assim, o aumento da pressão arterial pulmonar associada ao aumento da pressão atrial esquerda durante o exercício resulta em última análise no aumento da pressão capilar pulmonar (Langsetmo, Fedde, Meyer & Erickson, 2000). Associado a este facto ocorre a diminuição marcada da pressão pleural e, deste modo da pressão alveolar (Langsetmo et al., 2000). Assim, o aumento da pressão capilar pulmonar e a diminuição da pressão pleural contribuem para a maior predisposição para ruptura dos capilares pulmonares que está na génese da HPIE (Langsetmo et al., 2000). Na tabela 9 são referidos os factores que aumentam a predisposição para a HPIE.

Tabela 9 - Factores associados à ocorrência da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício nos equinos (adaptado de Hinchcliff, 2007)

Factores de risco associados à HPIE

Hipertensão nos capilares pulmonares

Propriedades reológicas do sangue (ex. viscosidade do sangue, morfologia dos eritrócitos)

Pressão intrapleural (alveolar) subatmosférica

Obstrução extrínseca ou intrínseca do aparelho respiratório (ex. hemiplegia laríngea, broncoconstrição)

DRI (infecciosa, alérgica)

Coagulopatias (ex. alteração da função das plaquetas, fragilidade do endotélio capilar)

Neovascularização brônquica

Fibrose ou alteração da complacência pulmonar

Pressão gerada durante a locomoção

Independentemente da causa, a ruptura dos capilares e posterior hemorragia para o interstício e vias respiratórias conduz à inflamação, fibrose e alteração da complacência pulmonar (Radostitis et al., 2009). A combinação da alteração da estrutura e da pressão pulmonar durante o exercício perpetuam a lesão pulmonar através da repetição dos episódios de hemorragia e de inflamação que passam a assumir um carácter crónico (Radostitis et al., 2009). Os cavalos afectados apresentam um historial de redução da *performance* atlética, presença de sangue na traqueia observado através da endoscopia e epistaxis (Durando, 2012). Na maior parte dos casos de HPIE não são detectadas alterações no exame físico ou as alterações presentes não são específicas, com excepção da epistaxis que ocorre em poucos casos (Hinchcliff, 2007). A epistaxis quando presente é de um modo geral bilateral e ocorre durante ou pouco tempo após o exercício (Hinchcliff, 2007).

2.2.4 Pneumonia Eosinofílica

A pneumonia eosinofílica é uma síndrome pouco comum no cavalo caracterizada pela infiltração do tecido intersticial pulmonar por eosinófilos (Zinkl, 2002). O termo engloba todas as doenças respiratórias associadas a um perfil eosinofílico na citologia com ou sem eosinofilia periférica, tais como a infecção (parasitária ou fúngica) ou reacções alérgicas (Mair, 2007). Os sinais clínicos

observados na pneumonia eosinofílica são comuns a outras doenças respiratórias e incluem tosse crónica, corrimento nasal purulento e dispneia (Mair, 2007).

2.2.5 Pneumonia Parasitária

A espécie envolvida e a frequência difere tendo em conta a idade do paciente (Giguère, 2010). A pneumonia parasitária é rara no cavalo adulto podendo ocorrer em explorações onde estes são mantidos em pastoreio conjunto com mulas ou burros (Giguère, 2010). O burro e cruzados são o hospedeiro natural do parasita *Dictyocaulus arnfieldi*, contudo estes raramente desenvolvem sinais clínicos de parasitose (Gruntman, 2012). Pensa-se que o fungo *Pilobolus spp.* presente na pastagem possa contribuir para a disseminação deste parasita pulmonar através de um mecanismo semelhante ao observado na transmissão de parasitas pulmonares nos ruminantes (Gruntman, 2012). A larva migra em direcção ao esporângio à medida que o fungo cresce, aquando da ruptura do esporângio esta é dispersa através de esporos fúngicos (Ainsworth & Cheetham, 2010). A transmissão ocorre através da ingestão, uma vez ingeridas as larvas migram via sistema linfático para os pulmões onde originam um quadro de pneumonia (Ainsworth & Cheetham, 2010). Os ovos resultantes da multiplicação do parasita são transportados pelo tapete mucociliar para a faringe onde são deglutidos e posteriormente eliminados nas fezes repetindo-se o ciclo de vida (Ainsworth & Cheetham, 2010). Nos poldros, a migração da larva do parasita *Parascaris equorum* é a causa mais comum de sintomatologia respiratória associada a parasitose pulmonar (Léguillette, Roy & Lavoie, 2002). Com menor frequência, o nemátode *Strongyloides westeri* bem como a migração pulmonar errática de outros parasitas como *Habronema spp.*, *Draschia megastoma* e *Strongylus spp.* de igual modo poderão causar sinais de doença respiratória (Léguillette et al., 2002). Neste último caso, a infecção conduz a um quadro geralmente subclínico ou moderado (tosse intermitente, corrimento nasal moderado) (Davis, 2007). O quadro clínico da parasitose pulmonar é muito similar ao observado na OAR, DRI e na doença respiratória infecciosa (bacteriana, viral ou fúngica) e inclui tosse crónica, dificuldade expiratória, perda de peso, corrimento nasal, intolerância ao exercício, ruído de crepitação e sibilos sobretudo na porção pulmonar caudodorsal (Davis, 2007). Nos poldros, a parasitose pulmonar pode ocorrer sob a forma de uma infecção patente na qual não são observados quaisquer sinais de doença respiratória segundo o mesmo autor.

2.2.6 Neoplasia Torácica

A neoplasia torácica é rara no cavalo, com uma percentagem de casos inferior a 1% (Wilkins, 2003). Regra geral, a neoplasia torácica é diagnosticada no cavalo adulto, com excepção do linfoma que também poderá ser diagnosticado em animais jovens (Piero & Wilkins, 2009). As neoplasias torácicas são classificadas em dois grupos, neoplasias intrapulmonares ou mediastinais que podem ser primárias ou metastáticas (Piero & Wilkins, 2009). As neoplasias intrapulmonares são geralmente do tipo metastático, sendo as neoplasias intrapulmonares primárias raras (Piero & Wilkins, 2009). O mioblastoma celular granular é o tipo mais comum de neoplasia intrapulmonar primária, tendo sido de igual modo reportados casos de adenocarcinoma e carcinoma broncogénico mas com menor frequência (Mair, 2007). As neoplasias intrapulmonares metastáticas poderão ser do tipo hemangiosarcoma, carcinoma das células escamosas, adenocarcinoma, rabiomiosarcoma, melanoma maligno, fibrosarcoma ou sarcoma não diferenciado (Zinkl, 2002). O linfoma é a neoplasia mediastinal mais comum (cerca de 50% dos casos de neoplasia torácica) ocorrendo frequentemente envolvimento sistémico nestes casos (Zinkl, 2002). De igual modo poderão ser diagnosticadas outras neoplasias metastáticas mediastinais/pleurais, nomeadamente o carcinoma das células escamosas, melanoma, fibrosarcoma e o hemangiosarcoma (Zinkl, 2002).

As manifestações clínicas estão directamente relacionadas com o tipo e a localização da neoplasia (Radostitis et al., 2009). Assim, a compressão das vias respiratórias e a presença efusão pleural causadas pela presença de neoplasias torácicas dão origem a tosse e dispneia, respectivamente (Radostitis et al., 2009). As neoplasias intrapulmonares originam intolerância ao exercício, tosse e, por vezes epistaxis (Mair, 2007). Contrariamente, as neoplasias mediastinais são muitas vezes acompanhadas pela produção de efusão pleural que está na génese de uma respiração rápida e superficial, taquicardia, perda de peso, edema peitoral e distensão das veias jugulares (Mair, 2007). A infiltração metastática do tecido ósseo pode ocasionalmente originar claudicação ou até mesmo osteopatia hipertrófica (Mair, 2007).

2.2.7 Inalação de Fumo

A inalação accidental de fumo (ex. incêndio) não é propriamente uma doença respiratória mas é uma importante causa de lesões no aparelho respiratório (Hanson, 2012). O tracto respiratório anterior é mais susceptível aos efeitos do calor, contudo o tracto respiratório posterior é de igual modo afectado pelos gases tóxicos e partículas geradas pelo fogo (Hanson, 2012). O epitélio da traqueia,

brônquios e bronquíolos poderá ser severamente danificado devido ao edema, congestão, hemorragia e necrose nas vias respiratórias (Davis & Foster, 2002). A severidade das lesões observadas depende da duração da exposição, solubilidade dos gases inalados (ex. amónia, cloreto de hidrogénio, dióxido de enxofre, nitrogénio) e do tamanho das partículas presentes no fumo (Davis & Foster, 2002). A toxicidade do monóxido de carbono, comum na inalação do fumo, não é responsável pela lesão directa das vias respiratórias mas exacerba a hipóxia tecidual ao prejudicar o transporte de oxigénio e a sua utilização no metabolismo celular (Marsh, 2009). A doença respiratória associada à inalação de fumo progride em três fases, insuficiência pulmonar aguda, edema pulmonar e broncopneumonia (Marsh, 2009). A insuficiência pulmonar aguda (fase I) ocorre nas primeiras 36 horas após a exposição sendo causada pela lesão térmica do tracto respiratório anterior (6-18 horas após exposição), toxicidade pelo monóxido de carbono (imediate) e lesão da árvore traqueobrônquica e parênquima pulmonar devido à inalação de compostos químicos (Rush & Mair, 2004). A lesão térmica do tracto respiratório anterior tem um pico entre as 18 e 24 horas após exposição podendo resultar na formação de edema ao ponto de causar obstrução do tracto respiratório anterior (estridor inspiratório) (Rush & Mair, 2004). A inflamação induzida pelos gases solúveis causa broncoconstrição, edema das mucosas das vias aéreas centrais e degradação do surfactante pulmonar (Mair, 2007). O edema pulmonar (fase II) tem início aproximadamente 24 horas após a exposição sendo o resultado da resposta inflamatória iniciada pela lesão química que se manifesta clinicamente através da taquipneia, dispneia, tosse paroxística e corrimento nasal (Rush & Mair, 2004). O aumento da permeabilidade microvascular pulmonar resulta na libertação de factores citotóxicos, vasoactivos e quimiotáxicos a partir do tecido lesado e a libertação de radicais livres de oxigénio (Rush & Mair, 2004). A broncopneumonia (fase III) pode se desenvolver 5 a 7 dias após a exposição, contudo a janela de oportunidade para o desenvolvimento de infecção bacteriana pode permanecer até 2 semanas (Rush & Mair, 2004). O factor primário predisponente é a alteração dos mecanismos de defesa pulmonar, incluindo a perda do *clearance* mucociliar, alteração da função dos macrófagos alveolares e pela ausência parcial das células que formam o epitélio respiratório (Zinkl, 2002). Os sinais clínicos associados a esta fase são a tosse, corrimento nasal e febre (Rush & Mair, 2004).

2.2.8 Pneumonia Bacteriana/Pleuropneumonia

A infecção bacteriana é comum no cavalo (Ainsworth & Cheetham, 2010). O tracto respiratório posterior é a porção estéril do aparelho respiratório, este ocasionalmente poderá conter um pequeno

número de bactérias que são consideradas contaminantes transitórios e oportunistas incapazes de originar infecção a não ser que sejam reunidas condições que aumentem a susceptibilidade do hospedeiro para a infecção (Wilkins, 2003). A história clínica inclui eventos e/ou factores predisponentes que deprimem a imunidade pulmonar, nomeadamente a infecção respiratória viral, competições recentes, transporte a longa distância, anestesia geral, sobrepopulação, manejo ambiental e nutricional inadequado (Wilkins, 2003). A infecção respiratória viral (ex. vírus influenza, herpesvírus tipo 1 e 4) está associada ao aumento da predisposição para infecções secundárias, adesão e colonização ao induzir lesão das células epiteliais; diminuição do mecanismo de *clearance* mucociliar e da translocação das bactérias depositadas no epitélio brônquico; diminuição da produção de surfactante pulmonar e o colapso das vias respiratórias devido à destruição dos pneumócitos tipo II (Hagid, 2006). O processo inflamatório é acompanhado pelo aumento da permeabilidade vascular, aumento da produção de secreção respiratória criando condições favoráveis para a sobrevivência e replicação dos microorganismos contaminantes, sobretudo para os que requerem uma menor quantidade de oxigénio disponível (bactérias anaeróbias) (Davis, 2007). O transporte prolongado continua a ser uma das causas principais de pneumonia e pleuropneumonia no cavalo, a hipótese defendida por alguns autores é a de que a posição da cabeça e a desidratação durante o transporte reduzem o mecanismo de *clearance* mucociliar contribuindo para a colonização do tracto respiratório posterior (Davis, 2007). A anestesia geral compromete o mecanismo de *clearance* mucociliar à semelhança do que foi referido para outros factores, acresce-se o facto de a compressão e a congestão vascular associadas ao posicionamento do paciente na mesa cirúrgica poderem causar isquémia e necrose regional providenciando condições adequadas para a multiplicação bacteriana (Ainsworth & Cheetham, 2010). Estão descritos outros factores que podem contribuir para o desenvolvimento de pneumonia para além das alterações nos mecanismos de defesa pulmonar, tais como a migração de bactérias e de parasitas bem como alterações laríngeas e faríngeas (Rush & Mair, 2004). A migração de bactérias por via hematogénea a partir de um foco de infecção (ex. endocardite, abscessos subsolares) pode dar origem à pneumonia metastática (Rush & Mair, 2004). A presença de parasitas pulmonares (ex. *Dictyocaulus arnfieldi*) ou a migração de ascarídeos pode danificar o tecido pulmonar, estimular a produção de muco contribuindo deste modo para o desenvolvimento de infecção bacteriana secundária (Rush & Mair, 2004). As lesões laríngeas e faríngeas aumentam a predisposição para a pneumonia através da aspiração de microorganismos que se encontram na orofaringe (Ainsworth & Cheetham, 2010). Assim, os cavalos com neuropatia primária (ex. mieloencefalite equina causada por protozoários, botulismo, infecção por *Streptococcus equi*, micose das bolsas guturais), miopatia primária da musculatura da faringe, laringe e esófago (ex.

deficiência em vitamina E e selênio, megaesófago), após cirurgia laríngea ou com obstrução esofágica apresentam uma maior predisposição para a pneumonia (Rush & Mair, 2004).

A doença respiratória, sobretudo a de etiologia infecciosa é uma das causas principais de morbidade e mortalidade nos poldros jovens (Slovis, 2008). Nos neonatos, a pneumonia bacteriana ocorre essencialmente por aspiração (de leite ou mecónio) devido a um fraco reflexo de sucção ou disfagia ou subseqüentemente a um estado de septicémia (Wilkins, 2010). Contrariamente, nos poldros jovens (1 a 8 meses) esta é geralmente causada por agentes oportunistas secundariamente a doença respiratória viral, *stress* (transporte, sobrepopulação, desmame) ou migração parasitária (Wilkins, 2010). Na doença respiratória primária, os agentes mais frequentemente reportados são vírus respiratórios, *Rhodococcus equi* e *Streptococcus equi equi* (Bar, 2006). A identificação dos agentes patogénicos primários e secundários bem como o manejo adequado (ambiental, nutricional e médico) são fundamentais, na medida em que poderão limitar as perdas económicas, custos associado ao tratamento e medidas profiláticas, diminuir as taxas de morbidade e mortalidade e o impacto negativo na *performance* desportiva na maior parte das explorações (Sellon, 2001). Pensa-se que a ocorrência de pneumonia nesta faixa etária aumenta a predisposição para o desenvolvimento da OAR e da HPIE (Sellon, 2001).

De um modo geral, quando a infecção se limita ao lúmen esta assume a designação de bronquiolite bacteriana ou doença respiratória inflamatória séptica e quando há o envolvimento do parênquima pulmonar esta é denominada pneumonia (Guiguère, 2010). A infecção do tracto respiratório posterior poderá resultar subseqüentemente na pleuropneumonia através da extensão da infecção para o espaço pleural e na formação de abscessos pulmonares (ex. feridas torácicas penetrantes) (Davis, 2007). A tabela 10 sumariza as bactérias que são isoladas com maior frequência na pneumonia bacteriana. As infecções mistas são comuns na pneumonia podendo ser devidas a um mecanismo de sinergia entre bactérias aeróbias/anaeróbias facultativas e anaeróbias (Ainsworth & Cheetham, 2010). Estes mecanismos de sinergia incluem a produção de factores de crescimento essenciais, protecção contra a fagocitose e destruição de microorganismos intracelularmente e a diminuição da concentração de oxigénio disponível segundo o mesmo autor.

Tabela 10 – Microorganismos isolados com maior frequência na pneumonia bacteriana nos equinos (Ainsworth & Cheetham, 2010; Davis, 2007; Guiguère, 2010)

Gram-positivo	Gram-negativo
<i>Streptococcus zooepidemicus</i> (β -Hemolítico), <i>Rhodococcus equi</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> (α -Hemolítico)	<i>Pasteurella</i> , <i>Actinobacillus</i> spp., <i>Escherischia coli</i> , <i>Klebesiella pneumoniae</i> e <i>Bordetella bronchiseptica</i>
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Bacteriodes fragilis</i> e <i>Fusobacterium</i> spp.

O *Rhodococcus equi* é o agente mais frequente de pneumonia crónica progressiva em poldros entre 1 a 6 meses de idade (rara a partir dos 8 meses) (Guiguère & Jacks, 2005; Wilkins, 2010). Os poldros são contaminados através da inalação de poeiras contaminadas (Hines, 2004). A ingestão da bactéria é uma via importante de exposição e de imunização, mas raramente resulta em pneumonia (Hines, 2004). O microorganismo *Rhodococcus equi* é uma bactéria ubiqüitária no solo, a sua multiplicação e disseminação é favorecida pelas temperaturas elevadas no Verão (temperatura óptima 30 °C), solos arenosos e ambientes com elevada concentração de poeiras (Barr, 2006). A doença poderá apresentar um carácter enzoótico com elevada taxa de mortalidade, esporádico ou poderá estar ausente numa dada exploração, o padrão de incidência da doença é fortemente influenciado pelas condições ambientais, manejo das explorações e pela virulência dos agentes envolvidos (Guiguère, 2010b). O estrume de poldros com pneumonia é o principal veículo de formas virulentas que contaminam o ambiente (Guiguère, 2010b). A patogenicidade está associada à capacidade deste microorganismo se replicar intracelularmente, induzir a destruição dos macrófagos e através do impedimento da fusão fagossoma-lisossoma (Wilkins, 2010). A disseminação do microorganismo *Rhodococcus equi* poderá conduzir à abcedação intestinal e mesentérica, osteomielite e, com menor frequência à panofthalmite, empiema das bolsas guturais, sinusite, pericardite e abcedação hepática e renal (Guiguère & Jacks, 2005).

O quadro inicial da pneumonia bacteriana poderá não ser evidente estando limitado à detecção da presença de exsudado traqueal, febre ou depressão (Davis, 2007). Com a evolução do quadro, os cavalos afectados poderão apresentar febre intermitente, taquipneia, tosse, corrimento nasal, intolerância ao exercício, depressão, letargia, inapetência e perda de peso (Rush & Mair, 2004). A maioria dos cavalos não demonstra dificuldade respiratória durante o repouso a não ser que a consolidação pulmonar seja extensa (Ainsworth & Cheetham, 2010). O corrimento nasal (mucopurulento a serosanguinolento) é um sinal variável (Rush & Mair, 2004). Os cavalos com pleuropneumonia podem apresentar pleurodinia, respiração rápida e superficial, expressão facial

ansiosa, movimentação relutante, entre outros (Guiguère, 2010). A severidade da dificuldade respiratória depende do volume da efusão e da extensão da consolidação pulmonar (Guiguère, 2010). Os cavalos com endotoxemia apresentam membranas mucosas hiperêmicas, tempo de repleção capilar (TRC) aumentado e taquicardia (Rush & Mair, 2004).

O microorganismo *Rhodococcus equi* induz uma infecção lenta e progressiva com um quadro clínico inicialmente agudo a subagudo (Guiguère, 2000). Os sinais de insuficiência respiratória surgem quando as lesões pulmonares atingem um ponto crítico (Rush & Mair, 2004). Na fase inicial da doença observa-se anorexia, letargia, febre, taquipneia e linfadenite supurativa (Wilkins, 2010). A tosse e o corrimento nasal bilateral são sinais clínicos variáveis (Wilkins, 2010). A auscultação torácica revela a presença de ruído de crepitação e sibilo com distribuição assimétrica e localizada, nas regiões com consolidação marcada há ausência de sons pulmonares (Barr, 2006). Quando há envolvimento abdominal, o quadro clínico inclui febre, depressão, anorexia, perda de peso, cólica, diarreia e atraso de crescimento (Rush & Mair, 2004). As lesões intestinais incluem enterocolite ulcerativa multifocal, tiflíte envolvendo as placas de Peyer e linfadenopatia supurativa ou granulomatosa dos linfonodos mesentéricos e/ou colônicos (Barr, 2006). O prognóstico para poldros com formas intestinais da bactéria é menos favorável do que na doença pulmonar por si só, porque aproximadamente 50% dos poldros com envolvimento intestinal não sobrevivem apesar da terapêutica agressiva (Barr, 2006).

A disseminação do microorganismo a partir do aparelho respiratório e/ou gastrointestinal pode originar artrite séptica e, com maior frequência osteomielite (Guiguère, 2010b). A osteomielite vertebral pode predispor à fractura de vértebras e à compressão da medula espinal resultado em sinais neurológicos (Guiguère, 2010b). Em alguns casos há formação e deposição de imunocomplexos nas articulações dando origem a um quadro de polisinovite sendo as articulações da patela e a tibiotarsal as mais comumente afectadas (Guiguère, 2000). Na polisinovite, as articulações envolvidas desenvolvem efusão moderada a marcada, a inflamação articular é manifestada clinicamente através da claudicação e de uma pequena resistência na avaliação das articulações (Guiguère, 2000). Com menor frequência, a deposição de imunocomplexos causa uveíte, anemia e trombocitopenia (Guiguère, 2000).

2.2.9 Pneumonia Fúngica

A pneumonia causada por fungos é rara nos cavalos apesar da exposição constante aos elementos fúngicos (ex. cama, alimento, ambiente) (Rush & Mair, 2004). A pneumonia fúngica primária é pouco comum, esta geralmente ocorre quando são reunidas condições que favorecem o crescimento destes organismos, tais como elevada concentração de elementos fúngicos no ambiente, infecção bacteriana primária, administração de antibióticos que interferem na composição da microflora do aparelho respiratório e a imunodepressão (ex. síndrome da imunodeficiência combinada, síndrome de Cushing) (Paxson, 2012). O isolado mais comum é *Aspergillus fumigatus*, organismo oportunista geralmente associado a um historial de doença gastrointestinal severa (ex. enterite, colite e a tiflíte) acompanhada pela lesão da mucosa intestinal e subsequente disseminação embólica de elementos fúngicos para diferentes órgãos (ex. pulmões, cérebro e rins) (Carter & Davis, 2007). Também são reportados outros casos menos frequentes de pneumonia secundária causada por *Candida*, *Fusarium* e *Emmonsia* (Paxson, 2012). Os fungos invasivos, nomeadamente *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulatum* e *Cryptococcus neoformans* não necessitam de condições predisponentes para estabelecer infecção pulmonar, mas são reportados com menor frequência do que a pneumonia por *Aspergillus spp.* (Ainsworth & Cheetham, 2010). A *Alternaria spp.* é um organismo saprófita frequentemente isolado em animais mantidos em regime de estabulação não sendo considerada um verdadeiro agente patogénico (Zinkl, 2002). A apresentação clínica é variável podendo estar ausente (Paxson, 2012). Os sinais clínicos da pneumonia fúngica incluem a taquipneia, febre, corrimento nasal, epistaxis, placas nasais ou erosões (Paxson, 2012).

O microorganismo *Pneumocystis carinii* foi recentemente classificado como um fungo unicelular eucariota, ubiqüitário e oportunista que induz pneumonia em poldros (6 a 12 semanas de idade) com imunodeficiência primária ou secundária (Long, 2012). A pneumonia causada por este fungo foi associada à síndrome de imunodeficiência combinada, administração de corticosteróides, linfopenia e à infecção por *Rhodococcus equi* (Long, 2012). A pneumonia é uma doença clinicamente relevante transmitida através de aerossóis ou por contacto directo, mas raramente é diagnosticada em poldros jovens (Zinkl, 2002). O organismo ocorre sob a forma de trofozoito (1-5 µm) e quisto (4-6 µm), o ciclo de vida ocorre no tecido intersticial pulmonar (Roberts & Janovy, 2009). O mecanismo da patogénese da infecção é complexo, o microorganismo *Pneumocystis carinii* adere às células epiteliais alveolares inibindo o crescimento e replicação celulares, induz o aumento de secreção respiratória e uma resposta inflamatória que culmina na eliminação do agente infeccioso e/ou lesão pulmonar severa nos casos mais graves (Léguillette et al., 2002). Os sinais clínicos observados são inespecíficos. Assim, o exame clínico dos poldros afectados revela a presença de

febre, letargia, perda de peso, taquipneia, tosse, cianose, presença de ruídos respiratórios adventícios, a observação de corrimento nasal é variável (Songer & Post, 2005).

2.2.10 Pneumonia Viral

Os vírus capazes de causar infecção respiratória mais frequentemente isolados são o vírus influenza, herpesvírus equino (HVE), o vírus da arterite equina (AVE) e o adenovírus equino (Nolen–Walston & Sweeney, 2009). Estes vírus são caracterizados por uma rápida disseminação e a maior parte apresenta uma distribuição mundial resultando em elevadas perdas económicas (Pusterla et al., 2006). Os equinos expostos a ambientes com elevada permutação populacional (ex. competições, exposições, hospitais veterinários), sistema de ventilação inadequado e/ou imunodeprimidos (ex. administração de corticosteróides, transporte, internamento, treinamento) são particularmente susceptíveis à infecção viral do aparelho respiratório (Seino, 2012). O vírus influenza é um dos agentes etiológicos mais importantes associados à doença respiratória equina, é pouco comum em poldros (Lamb, 2008). O vírus causa uma doença respiratória muito contagiosa, de rápida disseminação através do contacto directo com os equinos doentes (Lamb, 2008). A influenza equina geralmente é assintomática e raramente fatal (Lamb, 2008). A infecção do aparelho respiratório resulta em morte celular, erosão do epitélio, alteração do mecanismo de *clearance* mucociliar essencial para a prevenção da infecção bacteriana secundária (Wilkins, 2003). No que concerne ao HVE estão caracterizados nove serotipos, cinco dos quais (HVE-1, 2, 3, 4 e 5) são responsáveis pela infecção do cavalo doméstico, o HVE-6 e o HVE-9 estão associados à infecção em espécies selváticas (ex. zebra) e os restantes foram isolados nos asininos (Osterrieder, 2009). O grupo de HVE isolado nos cavalos domésticos está subdividido em duas subfamílias com base na sua sequência genética, em α -herpesvírus (HVE-1, 3 e 4) e γ -herpesvírus (HVE-2 e HVE-4) (Osterrieder, 2009). O HVE tipo 1 é a causa principal de aborto em éguas no último terço da gestação, mieloencefalopatia equina e doença respiratória severa, enquanto o HVE tipo 4 induz predominantemente doença respiratória sobretudo em animais jovens (Osterrieder, 2009). O HVE-5 foi recentemente associado à fibrose multinodular no cavalo adulto (Williams et al., 2007; Wong et al., 2008; Giguère, 2010) O HVE geralmente induz uma infecção auto-limitante ao nível do tracto respiratório anterior (Allen, 2002). Nos neonatos ou nos poldros imunodeprimidos, a infecção por HVE poderá causar pneumonia viral severa com infecção bacteriana secundária (Allen, 2002). A infecção do aparelho respiratório é caracterizada pela replicação do vírus no epitélio respiratório com subsequente erosão deste último (Gruntman, 2012b). A infecção dos linfonodos associados ao

aparelho respiratório possibilita a virémia e, assim a infecção do útero bem como de outros tecidos (Gruntman, 2012b). A existência de uma fase de latência (sistema linforeticular, nervo trigémio) é um factor importante na transmissão e persistência deste vírus (Rush, 2006). A reactivação do vírus é desencadeada pelo *stress* associado ao transporte, manejo, desmame, presença de outras doenças ou outros factores (Rush, 2006). A arterite viral equina é uma doença causada por um arterivírus capaz de infectar o cavalo e o burro (Brinton & Snijder, 2008). A AVE é uma doença com distribuição mundial e que raramente se manifesta clinicamente (Brinton & Snijder, 2008). Os macrófagos alveolares e as células endoteliais são as células alvo do vírus, subsequentemente há infecção dos linfonodos e disseminação do vírus através da circulação sistémica (Brinton & Snijder, 2008). A arterite induzida pela replicação do vírus nos vasos sanguíneos causa hemorragia e edema (Gruntman, 2012b). O adenovírus induz infecção aguda no tracto respiratório anterior, conjuntivite folicular, broncopneumonia e enterite primariamente em poldros Árabes afectados pela síndrome da imunodeficiência combinada (Studdert, 2003). O adenovírus multiplica-se no epitélio respiratório causando morte celular e descamação do epitélio sobretudo ao nível da árvore traqueobrônquica (Hines, 2012). A infecção viral aumenta a susceptibilidade para a infecção bacteriana secundária, pleuropneumonia, obstrução respiratória, miocardite e miosite (Hines, 2012).

Em 1994 foi isolado o primeiro henipavírus na sequência de um surto de doença respiratória aguda num estábulo em Brisbane, Austrália (Eaton & Wong, 2008). O vírus Hendra é um henipavírus capaz de causar doença respiratória aguda no cavalo e no Homem (Eaton & Wong, 2008). A elevada virulência dos henipavírus no Homem determinou que este seja considerado como um agente patogénico de nível 4 no quadro de classificação de biossegurança (Eaton & Wong, 2008).

De um modo geral, os vírus são transmitidos através de aerossóis ou de fomites contaminadas por secreções respiratórias (Seino, 2012). A infecção pelo HVE, vírus da arterite equina e pelo vírus Hendra pode ocorrer através de outros mecanismos de transmissão. O HVE poderá ser transmitido através da exposição e contacto com o feto, placenta, tecidos e fluidos abortados (Seino, 2012). Os ganhões são portadores persistentes do vírus responsável pela AVE, pelo que a transmissão deste vírus poderá ocorrer através do sémen (Gruntman, 2012b). No caso do vírus Hendra a transmissão é realizada através da contaminação ambiental por meio das secreções e excreções produzidas pelo morcego da fruta (hospedeiro reservatório), nomeadamente saliva, fezes, urina ou fluidos placentários (MacLachlan & Dubovi, 2011). O quadro clínico da pneumonia viral inclui febre bifásica, corrimento nasal (inicialmente seroso e, posteriormente mucopurulento) e tosse seca (Gruntman, 2012b). De igual modo, os equinos afectados poderão apresentar anorexia, depressão, letargia, inapetência, taquipneia e perda de peso (Gruntman, 2012b). Na infecção pelo HVE poderá

ocorrer linfadenopatia submandibular, aborto (último terço da gestação), queratite ou queratoconjuntivite persistente, neonatos debilitados e com sinais de dificuldade respiratória bem como sinais de doença neurológica (Seino, 2012). A infecção pelo adenovírus é geralmente subclínica nos poldros e no cavalo adulto (Hines, 2012). Na doença respiratória clínica, os pacientes apresentam sinais de doença respiratória aguda incluindo corrimento nasal, conjuntivite e, eventualmente broncopneumonia (Hines, 2012). Na AVE, os sinais clínicos são mais severos nos poldros e nas éguas gestantes podendo incluir conjuntivite, edema (membros e genitália), rinite, enterite, colite, necrose das artérias de menor calibre, aborto e broncopneumonia (Brinton & Snijder, 2008). A infecção causada pelo vírus Hendra apresenta uma evolução rápida, na fase final da doença os equinos demonstram sinais neurológicos (ex. ataxia, *head pressing*, decúbito) e a morte pode ocorrer num período de 36 horas (Gruntman, 2012b).

2.2.11 Outras Tipos de Pneumonia

A pneumonia broncointersticial é uma importante causa de dificuldade respiratória esporádica de etiologia desconhecida em poldros com idades compreendidas entre 1 e os 8 meses (Rush & Mair, 2004). Suspeita-se que a infecção respiratória viral, golpe de calor ($> 25^{\circ}\text{C}$), exposição a toxinas ambientais, infecção por bactérias Gram-negativo, *Pneumocystis carinii*, *Mycoplasma spp.* e a administração de eritromicina possam estar envolvidos na patogênese da pneumonia broncointersticial (Lascola, 2012). A doença evolui rapidamente se não for tratada eficazmente podendo resultar na morte súbita por insuficiência respiratória fulminante (Lascola, 2012). Nos poldros que recuperam após o episódio, as complicações observadas são variáveis podendo ser indetectáveis ou se apresentar sob a forma de intolerância ao exercício persistente (Léguillete et al., 2002). O quadro clínico apresentado é similar ao observado na pneumonia bacteriana e inclui dificuldade respiratória aguda, cianose, taquicardia, hipertemia e morte súbita por insuficiência respiratória (Léguillete et al., 2002). Adicionalmente poderão ser observados outros sinais clínicos, tais como a anorexia, depressão, tosse e o corrimento nasal segundo o mesmo autor.

Existem poucos relatos de doença respiratória clínica resultante da infecção por metacéstodes (Shapiro, 2010). Os equinos são um dos possíveis hospedeiros intermediários do parasita *Echinococcus granulosus equinus*, estes são contaminados a partir da ingestão de ovos eliminados nas fezes dos hospedeiros definitivos (cão, raposa) (Mair, 2007). A hidatidose é geralmente bem tolerada pelos cavalos podendo os quistos (hepáticos e pulmonares) ser acidentalmente encontrados

no exame *post mortem* (Payne & Carter, 2007). Os cavalos afectados podem apresentar febre intermitente, depressão, respiração rápida e superficial e edema peitoral (Payne & Carter, 2007).

2.3 O Diagnóstico

O diagnóstico precoce e a instituição de um plano terapêutico adequados são fundamentais para minimizar as alterações respiratórias e as perdas económicas associadas bem como antecipar o retorno ao trabalho (Ainsworth & Cheetham, 2010). A construção de uma anamnese ou história clínica completa e o exame físico do paciente são essenciais no processo de diagnóstico, uma vez que as informações assim obtidas permitem a identificação dos problemas, definição da lista de diagnósticos diferenciais (DD) e a selecção dos exames complementares mais indicados de acordo com a suspeita clínica (Roy & Lavoie, 2003). Os exames complementares mais usados para a avaliação do aparelho respiratório são a endoscopia, radiografia, ecografia, análise dos gases sanguíneos, citologia e cultura bacteriana de secreções respiratórias, exame fecal (pesquisa de parasitas pulmonares), testes cutâneos, exame histopatológico da mucosa respiratória e do parênquima pulmonar, entre outros (Radostitis et al., 2009). Adicionalmente dispõe-se de novas metodologias tais como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética que têm sido substancialmente mais utilizadas, sobretudo em doenças com sede no tracto respiratório anterior (Radostitis et al., 2009).

2.3.1 Anamnese

A anamnese e a identificação do paciente providenciam informações importantes no processo de diagnóstico, pois factores como o ambiente, dieta, utilização, historial médico, profilaxia (ex. vacinação e desparasitação), idade e a raça poderão determinar uma maior ou menor predisposição para a doença respiratória (McGorum & Dixon, 2007). É importante conhecer o ambiente em que o cavalo habita, na medida em que este exerce um efeito directo através da exposição a potenciais alérgenos, bactérias, fungos ou a parasitas (Wilkins, 2009). Deste modo é fundamental saber se o cavalo é mantido em regime de estabulação e/ou pastagem; se há contacto com outros animais (ex. cavalos, burros ou outros); se a exploração tem um historial de infecções endémicas; incidência da infecção por *Streptococcus equi*; maneo alimentar (ex. feno, ração, pastagem); o tipo de cama (ex. palha, serradura, aparas de madeira); tempo de permanência no estábulo; grau de higiene dos estábulos e o sistema de ventilação (Ainsworth & Cheetham, 2010). Todos estes dados são

importantes considerações para a determinação de factores de risco para a doença respiratória, tais como a OAR ou a pneumonia (McGorum, Dixon, Radostitis & Abbott, 2000).

O conhecimento do historial médico passado e actual permite concluir se há ou poderá existir alguma correlação com o quadro clínico presente (ex. infecção respiratória, trauma, *stress*, competição, transporte prolongado, animais novos na exploração, nível de exercício, utilização) (Ainsworth & Cheetham, 2010). Os vírus são microorganismos oportunistas que frequentemente precedem o desenvolvimento de pneumonias de origem bacteriana (Ainsworth & Cheetham, 2010). A infecção causada por *Streptococcus equi* origina sequelas (ex. abecedação interna, empiema das bolsas guturais, abscesso retrofaríngeo e púrpura hemorrágica) que poderão ulteriormente afectar os aparelhos cardiovascular e respiratório (Wilkins, 2009). O trauma predispõe à formação de hérnia diafragmática, pneumotórax ou lesão traqueal (Wilkins, 2009). Estando estabelecido o historial médico passado, o clínico deverá conduzir o exame no sentido de tentar recolher dados mais precisos sobre o problema (ex. evolução, efeitos, sinais, alterações na fase de repouso ou após o exercício, terapêutica e resposta) e com base nas informações obtidas estabelecer os exames complementares necessários (Mazan, 2010). O esquema vacinal é um dado importante, pela frequência da doença respiratória infecciosa, nomeadamente a influenza equina, HVE tipo 1 e 4 (McGorum et al., 2000).

A idade e a raça são dados úteis para o diagnóstico da doença respiratória devido à diferente predisposição associada a estes factores. Os defeitos congénitos (ex. desvio do septo nasal, atresia coanal, quisto subepiglótico e hipoplasia pulmonar) são tipicamente observados ao nascimento, enquanto outras condições, tais como a pneumonia bacteriana crónica (ex. *Rhodococcus equi*) poderão não ser evidentes em poldros muito jovens (Wilkins, 2009). As infecções respiratórias causadas por bactérias ou vírus são mais comuns a partir do desmame, outras condições como a DRI, pleuropneumonia ou HPIE são reportadas tendencialmente em cavalos com 2 ou mais anos de idade segundo o mesmo autor. Chapman et al. (2000) refere que a doença respiratória infecciosa não é tão comum em animais mais velhos pela aquisição de imunidade. Em contraste, a OAR ou as neoplasias torácicas são diagnosticadas primariamente em cavalos de meia-idade a idosos (McGorum et al., 2000). No que concerne à pneumonia parasitária, o parasita *Dictyocaulus arnfieldi* é mais comum no cavalo adulto, enquanto nos poldros a migração do parasita *Parascaris equorum* é a causa mais frequente de pneumonia (Gruntman, 2012). A raça do cavalo é de igual modo importante na investigação da patologia respiratória, nos poldros Árabes está documentada a síndrome da imunodeficiência combinada, de carácter hereditário caracterizada por uma deficiência

na resposta imunitária celular e humoral (Slovis, 2008). Segundo o mesmo autor, a deficiência selectiva na IgM é relativamente frequente nos cavalos Árabes e Quarto de Milha (Slovis, 2008).

2.3.2 Exame Físico

O exame físico deverá incluir a avaliação do estado geral e não apenas o exame do aparelho respiratório (Viel, 2009). Numa primeira fase, o exame de estado geral deverá ser realizado à distância procurando inferir sobre o estado mental (ex. normal, alerta, depressivo, apático), postura (estação, decúbito, lordose, cifose), modo de movimentação do paciente, condição corporal (ex. emaciado, magro, normal, obeso), aspecto do pêlo, pele e cascos (Roy & Lavoie, 2003). O clínico deverá questionar sobre o apetite, ingestão de água, micção, defecação para completar as informações obtidas anteriormente (Mayhew, 2000). Finda esta fase, o clínico deverá conduzir o exame de estado geral através da avaliação das mucosas, determinação do TRC, palpação dos linfonodos, determinação do estado de hidratação, auscultação cardíaca, auscultação do aparelho respiratório, avaliação da motilidade intestinal e determinação da temperatura rectal (Mayhew, 2000). A avaliação das mucosas (conjuntival, membrana nictitante, bucal, vulvar e prepucial) deverá ser efectuada em regiões não pigmentadas procurando inferir sobre a coloração (rosa é cor esperada), humidade, TRC (1 a 2 segundos no cavalo são) e a presença de outras alterações (ex. lesões, hemorragia, secreções) (Roy & Lavoie, 2003). Os linfonodos deverão ser avaliados bilateralmente quanto ao tamanho, forma, consistência, mobilidade, temperatura, se a sua manipulação origina dor, alteração da integridade da estrutura dos mesmos e presença de corrimento (Feitosa, 2004). No cavalo, os linfonodos mais comumente avaliados são os linfonodos submandibulares, retrofaríngeos e pré-escapulares, os linfonodos parotídeos, cervicais superficiais e os subilíacos são difíceis de palpar excepto quando hipertrofiados aquando de inflamação, infecção ou de neoplasia (Feitosa, 2004). O estado de hidratação é estimado através da determinação da elasticidade da pele (prega na região da espádua no cavalo adulto ou na pálpebra superior nos poldros), grau de enoftalmia, humidade das mucosas, temperatura das extremidades (rosto, orelhas e membros), estado mental e postura (tabela 11) (Feitosa, 2004). A estimativa do estado de desidratação com base nos sinais clínicos não é precisa devendo ser usada apenas como um indicador, já que os sinais associados variam consideravelmente em intensidade e número de paciente para paciente (Feitosa, 2004).

Tabela 11 – Estimativa do estado de desidratação com base na prega de pele (adaptado de Feitosa, 2004)

Estado de desidratação	Sinais clínicos associados
Inaparente (5%)	Elasticidade da pele inalterada ou ligeiramente aumentada; Enoftalmia ausente ou muito discreta; Estado geral normal ou ligeiramente alterado; Apetite normal; Estado alerta
Ligeiro (6-8%)	Elasticidade da pele ligeiramente aumentada (2-4 seg); Ligeira enoftalmia; Estado alerta
Moderado (8-10%)	Elasticidade da pele aumentada (6-10 seg); Enoftalmia evidente; Mucosas secas; Aumento da temperatura nas extremidades; Apatia
Grave (10-12%)	Elasticidade da pele muito aumentada (> 10 seg); Enoftalmia intensa; Extremidades frias; Mucosas secas; Decúbito lateral; Apatia intensa
Muito grave (> 12%)	Exacerbação dos sintomas referidos a cima

A auscultação cardíaca e a avaliação do pulso são componentes importantes no exame do aparelho cardiovascular. Durante a auscultação cardíaca é fundamental verificar se há alteração dos sons auscultados (ex. sopros), frequência e ritmo (Neto, 2004). A frequência cardíaca em repouso varia entre 80 a 120 bpm (batimentos por minuto) no neonato, 30 a 50 bpm nos poldros e 28 a 44 bpm no cavalo adulto (Neto, 2004). O pulso poderá ser avaliado através da palpação da artéria facial, artéria facial transversa ou da artéria digital palmar procurando-se inferir sobre a frequência, ritmo (regular ou irregular) e se há uma concordância entre o pulso arterial e a contracção cardíaca (Neto, 2004). A motilidade intestinal é determinada através da auscultação abdominal realizada na região da fossa paralombar e na porção ventral do flanco (Phillips & Dixon, 2000). A área de auscultação abdominal está dividida em 4 quadrantes, quadrante dorsal direito, quadrante ventral direito, quadrante dorsal esquerdo e quadrante ventral esquerdo que correspondem à válvula íleocecal, cólon ventral direito, intestino delgado (jejuno e íleo) e cólon ventral esquerdo, respectivamente (Phillips & Dixon, 2000). Cada quadrante deverá ser auscultado cuidadosamente e sistematicamente pelo menos durante 30 segundos procurando avaliar o carácter, intensidade e a frequência dos sons apercebidos (Mendes & Peiró, 2004). Assim, num cavalo saudável a auscultação do quadrante dorsal direito revela um ruído em “cascata” ou de “descarga” produzido pela abertura e encerramento da válvula íleocecal a cada 30 a 60 segundos, enquanto nos outros quadrantes o ruído predominante é o borborigmo (Phillips & Dixon, 2000). A intensidade e frequência dos sons

intestinais variam tendo em conta a alimentação (ex. tipo, quantidade e intervalo entre refeições) bem como a motilidade intestinal propriamente dita (Mendes & Peiró, 2004). A temperatura rectal varia de acordo com a idade, nível de exercício, temperatura ambiental e o estado geral (Pusterla et al., 2006). De um modo geral, a temperatura rectal no poldro recém-nascido é de 37.5 a 38.5 °C, no poldro até 1 mês de idade é de 38.5 a 39.5 °C e no cavalo adulto é de 37 a 38.5 °C em repouso e quando a temperatura ambiental é moderada (Pusterla et al., 2006).

2.3.3 Exame do Aparelho Respiratório

A suspeita da presença de doença respiratória determina que seja realizada a avaliação completa do aparelho respiratório com o objectivo de localizar a origem do problema e, posteriormente identificar o agente etiológico envolvido (Rush & Mair, 2004). Independentemente do ponto de partida (tracto respiratório anterior ou posterior), o exame do aparelho respiratório deverá ser sistemático. A avaliação das vias respiratórias deverá ser iniciada pela inspecção do paciente à distância com o objectivo de avaliar o tipo, ritmo, frequência e padrão respiratórios (McGorum & Dixon, 2007). No cavalo saudável, a respiração é do tipo costoabdominal, regular e sempre com a mesma profundidade (Gonçalves, 2004). A respiração maioritariamente costal ou abdominal ocorre aquando da presença de alterações abdominais (ex. dilatação gástrica, alterações diafragmáticas, dor abdominal, peritonite) e torácicas (ex. alteração dos músculos intercostais, fractura de costelas, pleurite) que prejudicam a contribuição de um dos componentes da respiração, respectivamente (Gonçalves, 2004). A frequência respiratória poderá ser determinada através da auscultação torácica ou através da observação dos movimentos costoabdominais num ambiente calmo durante a fase de repouso para que se possa fazer uma avaliação mais precisa sem que haja excitação ou medo induzidos pela contenção do paciente (McGorum & Dixon, 2007). A frequência respiratória normal de um cavalo até aos 6 meses de idade é de 20 a 40 mrm (movimentos respiratórios por minuto), nos poldros é de 10 a 25 mrm e no cavalo adulto 8 a 16 mrm na fase de repouso (Gonçalves, 2004). A frequência respiratória varia com a idade, condições ambientais (aumenta em climas quentes e húmidos), nível de exercício, *stress* e a presença de afecções com envolvimento do aparelho respiratório (Gonçalves, 2004). A variação patológica da frequência respiratória é designada taquipneia, hiperpneia, bradipneia ou apneia (Gonçalves, 2004). A taquipneia corresponde ao aumento da frequência respiratória, a respiração é rápida e superficial (ex. febre, dor ou hipóxia); a hiperpneia é caracterizada pelo aumento da profundidade e frequência respiratórias; na bradipneia ocorre a diminuição da frequência respiratória (ex. depressão do sistema nervoso central) e na

apneia não são observados movimentos respiratórios durante um determinado período de tempo (Ainsworth & Cheetham, 2010).

Quanto ao padrão, a respiração poderá ser eupneica (fisiológica) ou dispneica (dificuldade respiratória) (Gonçalves, 2004). A respiração nos equinos é bifásica, a primeira fase da inspiração e da expiração é passiva e a segunda parte é activa (Rush & Mair, 2004). A dispneia surge quando há um transporte insuficiente de oxigénio para os tecidos podendo estar associada a alterações sistémicas (ex. anemia, metahemoglobinémia, acidose metabólica, febre, doenças neuromusculares), respiratórias (tracto respiratório anterior, tracto respiratório posterior e pleura) e cardiovasculares (Rush & Mair, 2004). O tipo de dispneia respiratória (ex. inspiratória, expiratória ou mista) é um dado útil para a localização do problema, uma vez que a dispneia inspiratória está associada a alterações que conduzem à diminuição do diâmetro do lúmen no tracto respiratório anterior (ex. corpo estranho, estenose ou inflamação), enquanto a dispneia expiratória está associada à diminuição da complacência pulmonar ou à obstrução do tracto respiratório posterior (ex. enfisema pulmonar, bronquite, bronquiolite) (Gonçalves, 2004). A dispneia mista ocorre nos casos de edema pulmonar e na broncopneumonia (Gonçalves, 2004).

A avaliação do tracto respiratório anterior é conseguida pela inspecção, palpação e percussão, a necessidade do recurso a outros exames complementares é determinada de acordo com as informações obtidas. O exame do tracto respiratório anterior é composto pela avaliação da cavidade nasal, fluxo respiratório, linfonodos, veia jugular, palato mole, bolsas guturais, faringe, laringe e traqueia. No cavalo saudável, a região nasal é geralmente seca ou apresenta algumas gotas de fluido seroso (McGorum & Dixon, 2007). O formato e a simetria das narinas no cavalo poderão fornecer indicações sobre algumas doenças respiratórias, durante a fase eupneica estas apresentam um formato semilunar passando a circular com o aumento da profundidade respiratória (McGorum & Dixon, 2007). Assim, na dispneia ocorre a dilatação das narinas na inspiração, nos casos mais graves a dilatação das narinas permanece durante o período de repouso (McGorum & Dixon, 2007). A presença de paralisia determina a incapacidade para dilatar as narinas unilateralmente ou bilateralmente causando a assimetria do rosto (McGorum & Dixon, 2007). A mucosa nasal é geralmente rosada e húmida, na porção ventrolateral é possível visualizar o orifício nasolacrimal (Wilkins, 2009). A porção mais caudal da cavidade nasal só é passível de ser observada através do uso do endoscópio (Wilkins, 2009). A assimetria do fluxo respiratório poderá indicar obstrução na cavidade nasal (ex. quisto) ou na porção mais caudal (Wilkins, 2009). Na presença de corrimento nasal, este deverá ser caracterizado quanto ao tipo (unilateral ou bilateral), frequência (contínuo, intermitente, escasso, profuso), natureza (seroso, mucoso, mucopurulento, serosanguíneo,

hemorrágico) e cheiro (Viel, 2009). Na maior parte das doenças respiratórias equinas, o corrimento nasal é mucopurulento devido à hipersecreção de muco e à migração de neutrófilos em resposta ao processo inflamatório/infeccioso (Viel, 2009). A presença de epistaxis poderá estar associada à hemorragia com origem na traqueia e brônquios (ex. HPIE, abscesso pulmonar, trauma, pneumonia e corpo estranho), micose das bolsas guturais, hematoma etmoidal progressivo ou trombocitopénia (Hinchcliff, 2007). Caso a origem da hemorragia não tenha sido confirmada recomenda-se a realização de endoscopia e/ou radiografia da cabeça para avaliação dos seios paranasais (Hinchcliff, 2007). As doenças com sede nos seios paranasais com frequência originam corrimento nasal unilateral, hipertrofia dos linfonodos submandibulares e epífora (Ainsworth & Cheetham, 2010). A percussão dos seios paranasais é um método útil para concluir sobre a presença de inflamação, a palpação destes poderá revelar a presença de dor, edema e o aumento de temperatura na sinusite moderada a severa (Ainsworth & Cheetham, 2010). A palpação dos linfonodos é recomendada, na medida em que a linfadenopatia poderá estar presente em algumas doenças respiratórias. A presença de linfadenopatia submandibular ipsilateral em conjunto com a presença de corrimento nasal unilateral podem indicar a presença de lesão unilateral no tracto respiratório anterior, enquanto a linfadenopatia mandibular bilateral poderá ser causada por infecção (ex. linfadenite infecciosa equina, vírus influenza, HVE-1 e 4), doença das bolsas guturais ou sinusite (Ainsworth & Cheetham, 2010). As veias jugulares deverão ser avaliadas como o objectivo de pesquisar sinais que possam indicar tromboflebite, abecedação pulmonar secundária, evidências de administrações perivasculares acidentais que poderão ter contribuído para a obstrução do tracto respiratório anterior pelo envolvimento do nervo laríngeo recorrente ou dos ramos simpáticos do nervo vago (Wilkins, 2009). O exame do palato mole, bolsas guturais e da faringe é limitado pela sua posição anatómica, pelo que a endoscopia é o método mais indicado para a avaliação destes (Gonçalves, 2004). A disfagia faríngea (ex. por lesão dos nervos sensoriais e motores, músculos faríngeos, botulismo, raiva, micose das bolsas guturais) manifesta-se clinicamente através da presença de corrimento nasal com alimento durante ou imediatamente após a ingestão de alimento (Gonçalves, 2004). O reflexo faríngeo é avaliado através do toque da parede nasofaríngea ou do palato mole com o tubo nasogástrico ou endoscópio e verificar se há ou não deglutição (Davidson & Martin, 2003). A palpação da porção dorsocranial da laringe poderá revelar a atrofia dos músculos laríngeos caracterizada pela proeminência dos processos musculares das cartilagens aritenóides (neuropatia laríngea recorrente) ou de displasia laringo-cricofaríngea por defeito do quarto arco branquial (Davidson & Martin, 2003). Alternativamente, a função do nervo laríngeo recorrente e dos músculos faríngeos poderá ser avaliada através do teste toracolaríngeo (*slap test*), na ausência de alterações funcionais observa-se o afastamento contralateral das cartilagens da faringe no exame

endoscópico (Davidson & Martin, 2003). A inspecção da porção cervical da traqueia deverá incidir sobre a forma, posição e alterações ou cicatrizes na pele que a recobre (Wilkins, 2009). A palpação da traqueia permite detectar dor, edema local, colapso e o mau alinhamento das margens dos anéis traqueais (Wilkins, 2009).

O exame geral do tracto respiratório posterior é realizado através da auscultação e percussão torácicas (Roy & Lavoie, 2003). A auscultação e a percussão torácicas são técnicas simples que muitas vezes não são devidamente valorizadas e que podem fornecer dados importantes no concerne à localização e natureza da afecção respiratória (Roy & Lavoie, 2003).

Auscultação Pulmonar

A auscultação torácica é um dos métodos de diagnóstico que mais dados fornece sobre o funcionamento do aparelho respiratório (Gonçalves, 2004). O exame deverá ser conduzido durante a fase eupneica (de repouso) e hiperpneica (de exercício) com o dispêndio de um período de auscultação adequado para ambos os lados da cavidade torácica e para a porção distal da traqueia (Taylor, Brazil & Hillyer, 2010). Para aumentar a precisão da técnica poderá ser necessário aumentar a frequência respiratória (ex. caminhada), oclusão temporária das narinas (30 a 60 segundos) ou usar uma máscara respiratória com o objectivo de intensificar os sons respiratórios tornando mais fácil a detecção das alterações dos mesmos (Viel, 2009). A tabela 12 descreve os limites de auscultação pulmonar nos equinos.

Tabela 12 - Delimitação do campo de auscultação pulmonar nos equinos (adaptado de Wilkins, 2009)

Referência Anatômica	Espaço Intercostal
Tuberosidade coxal	17
Tuberosidade isquiática	16
Terço médio do tórax	13
Ombro	11
Olecrânio	6

A auscultação do aparelho respiratório permite avaliar os sons respiratórios fisiológicos, identificar a presença e caracterizar os sons respiratórios patológicos ou adventícios (Taylor et al., 2010). Os sons respiratórios são produzidos pelo movimento de turbulência do ar na árvore traqueobrônquica sendo denominados som bronquial ou murmúrio vesicular tendo em conta a sua origem (Wilkins, 2009). Os sons bronquiais são percebidos ao nível da traqueia, região alar e ao nível dos brônquios principais na inspiração e expiração, enquanto o murmúrio vesicular é detectado na periferia do pulmão na inspiração após a sua passagem pelos brônquios segmentares e bronquíolos (Wilkins, 2009). O som laringotraqueal é produzido pela vibração das paredes da laringe e da traqueia aquando da passagem do ar sendo auscultado ao nível da porção cervical da traqueia (Gonçalves, 2004). A qualidade e a intensidade dos sons respiratórios variam dependendo da velocidade do fluxo e da porção do campo pulmonar auscultado (Ainsworth & Cheetham, 2010). Uma vez gerados, os sons respiratórios são atenuados a um grau variável por transmissão através do parênquima pulmonar, assim os sons auscultados ao nível do tórax são mais subtis do que os auscultados ao nível da traqueia cervical (McGorum & Dixon, 2007). Num cavalo saudável, os sons respiratórios no lado direito são de um modo geral mais facilmente apercebidos que os sons no lado esquerdo, a expiração é ténue ou praticamente inaudível havendo uma variação considerável na intensidade destes mesmo em pacientes saudáveis (Sweeney, 1999). A intensidade dos sons respiratórios fisiológicos é exacerbada quando há um aumento do fluxo respiratório que acaba por conduzir a uma maior vibração das paredes das vias respiratórias (ex. taquipneia, hiperpneia, dispneia) ou quando há uma maior facilidade na transmissão dos sons (ex. pneumonia, congestão e edema pulmonar) (Ainsworth & Cheetham, 2010). Nos poldros, nos animais magros e nos de pêlo curto há uma menor atenuação dos sons respiratórios exercida pela parede torácica, pelo que o murmúrio vesicular é mais facilmente detectado (Gonçalves, 2004). A diminuição da intensidade dos sons respiratórios ocorre quando há interferência na transmissão dos sons ou quando há uma redução da velocidade do fluxo de ar devido à presença de obstrução ou à diminuição da actividade respiratória (ex. animais obesos, de pêlo comprido, com hipertrofia muscular, diminuição da complacência pulmonar, edema pulmonar, enfisema subcutâneo, pneumotórax) (Gonçalves, 2004). Em determinados casos (ex. neoplasia torácica, abscessos e na atelectasia pulmonar) poderá ocorrer a ausência completa dos sons respiratórios devido ao preenchimento dos brônquios secundários, bronquíolos e alvéolos pulmonares por líquido (Gonçalves, 2004).

Os sons respiratórios patológicos ou adventícios são classificados como ruído de crepitação (*crackles*) ou sibilo (*wheezes*) (Mazan, 2010). O ruído de crepitação ou estertor húmido é um som descontínuo, intermitente, de curta duração (< 20 mseg) e de baixa intensidade auscultado na

inspiração formado pela presença de ar nas secreções respiratórias (Mazan, 2010). A sua presença está associada à pneumonia intersticial, edema pulmonar, fibrose intersticial, OAR, insuficiência cardíaca, atelectasia e, por vezes ao enfisema subcutâneo (Wilkins, 2009). O ruído de sibilo ou estertor seco é um som contínuo de longa duração (> 250 msec) originado pela oscilação das paredes das vias aéreas antes da abertura (sibilo inspiratório) ou encerramento (sibilo expiratório) das mesmas (Mazan, 2010). Estes ruídos ocorrem na estenose das vias respiratórias por compressão (broncoespasmo) ou por obstrução intraluminal (ex. muco, hiperplasia epitelial, edema da submucosa, neoplasia, bronquite crónica) (Viel, 2009).

A alteração da ventilação alveolar e a presença de enfisema pulmonar, pneumotórax e efusão pleural conduzem a uma redução na percepção dos sons respiratórios através da diminuição da condução do som no parênquima pulmonar e da reflexão do som para a superfície pleural (impedância acústica), respectivamente (Ainsworth & Cheetham, 2010). O efeito da consolidação pulmonar na percepção dos sons na auscultação varia tendo em conta o seu grau (Giguère, 2010). Assim, a consolidação de grau moderado resulta apenas num aumento dos sons bronquiais, enquanto na consolidação severa, presença de abscessos ou de efusão pleural causam a diminuição dos sons (Giguère, 2010). É importante salientar que as informações obtidas pela auscultação torácica, por si só nem sempre são um bom indicador do grau de ventilação alveolar, pelo que deve-se recorrer a outros procedimentos para complementar os dados obtidos (Slovits, 2008).

Percussão Torácica

A percussão torácica é um método não invasivo, indolor e útil que permite a identificação de lesões superficiais no parênquima pulmonar e pleurais (Ainsworth & Cheetham, 2010). A percussão torácica está indicada quando a auscultação pulmonar demonstra a presença de uma variação regional dos sons respiratórios ou na presença de sinais indicadores de lesão pleural (Ainsworth & Cheetham, 2010). A técnica consiste em realizar pequenas pancadas repetidas sobre um dado ponto através do uso de martelo e plexímetro ou alternativamente com o uso das mãos num paciente em estação ou em decúbito lateral (Rush & Mair, 2004). Esta deverá ser realizada idealmente no pico da inspiração, já que nessa fase há um maior contraste entre os sons respiratórios fisiológicos e os sons respiratórios adventícios (Rush & Mair, 2004). Durante a percussão torácica é necessário delimitar o campo pulmonar, avaliar os sons obtidos e, na presença de alteração identificar o local de transição onde a qualidade do som varia e comparar as duas regiões (Wilkins, 2009). O tipo (ex. claro, maciço, submaciço ou timpânico) e a localização dos sons são indicadores importantes do

processo patológico envolvido (Wilkins, 2009). Deste modo, o som hiperclaro poderá sugerir enfisema pulmonar; o som maciço ou submaciço na porção ventral indica efusão pleural (causa mais comum), hérnia diafragmática ou cardiomegália, na porção dorsal indica pneumotórax e quando generalizado poderá sugerir efusão pleural severa, abscesso pulmonar ou neoplasia; o som timpânico está associado à consolidação pulmonar, atelectasia, edema e bronquiectasia (McGorum & Dixon, 2007). Como referido anteriormente, a percussão torácica é um procedimento não doloroso, pelo que a presença de dor (pleurodinia) sugere a existência de alterações na parede torácica (ex. fractura de costelas), pleura (ex. pleurite) ou no parênquima pulmonar (Taylor et al., 2010). A percussão torácica apresenta algumas limitações associadas à presença das vísceras abdominais na porção caudodorsal e do tricípode braquial na porção cranial pulmonar que dificultam a percepção dos sons e a sua interpretação (Sweeney, 1999).

2.3.4 Exames Complementares

Uma vez estabelecida a origem dos sinais clínicos poder-se-á recorrer a testes adicionais que poderão ser usados para estabelecer o diagnóstico definitivo, documentar a natureza dos problemas, providenciar informações úteis no que concerne à formulação de um plano terapêutico adequado e prognóstico (Dixon et al., 2003). Actualmente estão disponíveis inúmeros exames complementares para a avaliação do aparelho respiratório, contudo tendo em conta a natureza da presente dissertação, apenas serão descritos com maior pormenor o hemograma e bioquímica sanguínea, análise dos gases arteriais, endoscopia, colheita e avaliação das secreções respiratórias.

2.3.4.1 Hemograma e Bioquímica sanguínea

A realização do hemograma e da bioquímica sanguínea na presença de doença respiratória providencia informações úteis para diferenciação entre processos infecciosos e processos não infecciosos (Roy & Lavoie, 2003). As alterações clinicopatológicas observadas variam de acordo com a fase e a severidade da doença (Roy & Lavoie, 2003). Segundo Pusterla et al. (2006), o período entre o início dos sinais clínicos e a colheita de sangue bem como a avaliação das amostras são considerações importantes na interpretação dos resultados, pelo que na doença respiratória infecciosa a colheita de sangue deverá ser realizada preferencialmente nas primeiras 24 horas na fase febril.

Na OAR e DPOAPV, o hemograma e a concentração de fibrinogénio poderão estar inalterados ou poder-se-á observar leucocitose moderada, neutrofilia com desvio à direita e hiperfibrinogenemia moderadas (Costa, 2012). De um modo geral, a DRI não é acompanhada por envolvimento sistémico, pelo que o hemograma e a bioquímica sanguínea não apresentam alterações, excepto na inflamação eosinofílica em que poderá ocorrer eosinofilia periférica (Christley & Rush, 2007). Nas doenças respiratórias infecciosas crónicas (ex. pneumonia, linfadenite infecciosa equina) ocorre leucocitose, neutrofilia com desvio à esquerda, anemia, hiperfibrinogenemia, hiperproteinémia (por hiperglobulinémia) e o aumento da concentração das enzimas hepáticas (ex. pneumonia parasitária) (Sellon, 2001; Roy & Lavoie, 2003). Na infecção respiratória viral ocorre linfopénia na fase inicial da doença, anemia normocítica e normocrómica moderada, diminuição do número de neutrófilos e monócidos (a contagem absoluta permanece dentro dos limites de referência) e, ocasionalmente trombocitopénia (Pusterla et al., 2006). O mesmo autor refere que no final da fase aguda da doença poderá ocorrer monocitose moderada transitória e linfocitose.

2.3.4.2 Análise dos Gases Sanguíneos

A análise dos gases sanguíneos é um dos métodos empregues na investigação da função pulmonar, determinação da gravidade da insuficiência respiratória (ex. pneumonia, OAR) e avaliação da resposta à terapêutica (Wiedmeyer, 2012). A determinação da pressão arterial de oxigénio (PaO_2) e da pressão arterial de dióxido de carbono (PaCO_2) é um meio de quantificar a capacidade dos pulmões para oxigenar e remover o dióxido de carbono do sangue arterial (Clutton, 2007). A determinação do pH arterial em conjunto com a PaCO_2 são indicadores importantes da influência do aparelho respiratório no equilíbrio ácido-base (Clutton, 2007). A colheita de sangue deverá ser realizada por meio da punção arterial e as amostras deverão ser armazenadas em seringas heparinizadas até à análise propriamente dita (Roy & Lavoie, 2003). O local de colheita está dependente da idade, temperamento, tamanho do paciente bem como da experiência do clínico. Assim, no cavalo adulto as artérias que com maior frequência são puncionadas são as artérias carótida, facial, facial transversa, auricular, metatarsal dorsal, digital palmar ou braquial, enquanto nos poldros são as artérias metatarsal dorsal, braquial, digital palmar e a femoral (Clutton, 2007). O armazenamento destas amostras carece de um cuidado especial, na medida em que a exposição ao ar poderá conduzir ao aumento da PaCO_2 e à diminuição da PaO_2 (Wiedmeyer, 2012).

A alteração do mecanismo ventilação/perfusão poderá conduzir a um estado de hipoxémia ($\text{PaO}_2 < 80 \text{ mmHg}$) e/ou hipercapnia ($\text{PaCO}_2 > 45 \text{ mmHg}$) dependendo da natureza da doença e do grau de

comprometimento da função respiratória (Taylor et al., 2010). Na OAR e na DPOAPV, a análise dos gases sanguíneos revela hipoxémia, a PaCO₂ poderá estar entre os limites dos valores de referência ou ligeiramente aumentada (Mazan & Tizard, 2012). Na DRI, a análise dos gases arteriais poderá não revelar alterações quando as amostras são obtidas na fase de repouso, contudo poderão existir sinais de hipoxémia e de hipocapnia quando obtidas após exercício (Mazan, 2012). Os equinos sujeitos à inalação de fumo deverão ser monitorizados adequadamente, pelo que a análise dos gases sanguíneos é recomendada para a avaliação da função respiratória, determinação da concentração de carboxihemoglobina, identificação e para a correcção dos efeitos da toxicidade induzida pelo monóxido de carbono (Hanson, 2012). Na pneumonia, a insuficiência respiratória conduz à diminuição da PaO₂ e o aumento da PaCO₂ (Lascola, 2012).

2.3.4.3 Endoscopia

A endoscopia permite a visualização directa da maior parte do aparelho respiratório equino sendo um exame complementar essencial para o diagnóstico de muitas doenças respiratórias (Roy & Lavoie, 2003). O comprimento e o diâmetro do endoscópio poderão limitar a extensão do aparelho respiratório passível de ser avaliada, pelo que o endoscópio deverá apresentar um comprimento superior a 2 metros para permitir a observação da árvore brônquica (Roy & Lavoie, 2003). O exame endoscópico tem como principais indicações a presença de tosse, corrimento nasal, epistaxis, alteração dos ruídos respiratórios, dispneia durante o repouso e após o exercício e má *performance* desportiva (Brazil, 2010). O exame endoscópico torna possível a inspecção do aparelho respiratório, colheita de amostras de tecido (biópsia) ou de secreções respiratórias; a definição da origem dos ruídos respiratórios (ex. hemiplegia laríngea, deslocamento dorsal do palato mole, deslocamento rostral do arco palatofaríngeo, condrite aritenóide, colapso ou estenose traqueal, hiperplasia faríngea linfóide); a identificação de defeitos congénitos (ex. quistos subepiglóticos, fenda palatina ou atresia coanal); a determinação da origem da hemorragia ou corrimento nasal (ex. micose ou empiema das bolsas guturais, hematoma etmoidal, abecedação retrofaríngea e doença pulmonar crónica), bem como a extracção de corpos estranhos presentes na árvore traqueobrônquica (Ainsworth & Cheetham, 2010).

Regra geral, a endoscopia é tolerada pela maioria dos equinos exigindo o mínimo de contenção (ex. aziar) (Taylor et al., 2010). Esta deverá ser realizada preferencialmente no período de repouso sem sedar o paciente para evitar possíveis artefactos na motilidade laríngea, que dificultam a avaliação da simetria e da função das cartilagens aritenóides, entre outros efeitos (Greet, 2008). O exame

endoscópico durante o exercício permite a identificação de doenças obstrutivas dinâmicas no tracto respiratório anterior ausentes durante o repouso, nomeadamente o deslocamento dorsal intermitente do palato mole, colapso das cordas vocais, colapso das cartilagens aritenóides, colapso nasofaríngeo e o desvio axial das pregas ariepiglóticas (Taylor et al., 2010). A endoscopia do aparelho respiratório 1 a 2 horas após o exercício é um componente importante no processo de diagnóstico da DRI, pois esta permite fazer o diagnóstico primário de inflamação do tracto respiratório posterior com base na observação de muco e por facilitar a colheita de amostras de secreções respiratórias (Mazan, 2010b). Na HPIE, a endoscopia deverá ser realizada cerca de 30 a 90 minutos após o exercício, já que esta é uma doença respiratória precipitada pela actividade desportiva (Hinchcliff, 2007).

Há casos em que a sedação é necessária (ex. agressividade, tosse), pelo que o uso combinado da xilazina (0.5 mg/kg IV) ou detomidina (0.01-0.02 mg/kg IV) e do butorfanol (0.02-0.04 mg/kg) tem tido bons resultados (Wilfong & Waldrige, 2009). A instilação de lidocaína traqueal através do canal de biópsia do endoscópio (20 mL de lidocaína a 2% diluída em 40 mL de solução fisiológica isotónica ou similar) minimiza a tosse (Radostitis et al., 2009). Previamente ao exame limpar as narinas para reduzir a contaminação. Para o exame, o endoscópio deverá ser colocado numa das narinas (direita ou esquerda) em direcção ao meato nasal ventral (Woodie, 2010). Na cavidade nasal, o clínico deverá avaliar a coloração da mucosa, presença de edema, erosões, úlceras, corrimento, quistos, desvio do septo nasal, entre outras anomalias (Woodie, 2010). Quando se pretende visualizar os seios paranasais e o etmóide, o tubo endoscópico deve ser direccionado dorsalmente até se observar a abertura do seio maxilar através do qual se deverá passar o tubo endoscópico para o efeito (Byars, 2004). Para a observação da faringe fazer progredir o endoscópio até que a abertura desta seja visível, neste ponto é possível ver o palato mole, as aberturas das bolsas guturais, parte da laringe e a epiglote (excepto nos casos de deslocamento do palato mole) (Byars, 2004). A endoscopia da faringe e laringe poderá indicar sinais de neuropatia laríngea recorrente, granulomatose laríngea, condrite, deslocamento dorsal do palato mole, hipoplasia da epiglote, hiperplasia linfóide folicular, entre outras (Davidson & Martin, 2003). A hiperplasia linfóide folicular é classificada numa escala de 1 a 4, o grau 1 corresponde à presença de poucos folículos linfóides inactivos (cor branca) na porção dorsal da faringe; no grau 2 observa-se a coexistência de folículos inactivos e activos (aspecto edematoso e de cor rosada) na porção dorsal da laringe e abertura das bolsas guturais; no grau 3 são visualizados folículos linfóides activos de grandes dimensões que se estendem até ao palato mole e no grau 4 ocorre a coalescência dos folículos linfóides (Woodie, 2010). O mesmo autor refere que a inflamação associada à hiperplasia

linfóide folicular pode aumentar a susceptibilidade para o colapso da faringe ou para o deslocamento dorsal do palato mole (Woodie, 2010).

Se o palato mole impedir a visualização da epiglote deve-se estimular o reflexo da deglutição e, seguidamente passar o endoscópio para a traqueia quando se observar o afastamento completo das cartilagens aritenóides (na inspiração) (Roy & Lavoie, 2003). A porção proximal do lúmen traqueal é circular, enquanto as porções traqueais distais são achatadas dorsoventralmente (Barakzai, 2007). A traqueobroncoscopia pode revelar a presença de exsudado em quantidade variável, tecido de granulação (causado por trauma associado a punção traqueal ou entubação), ruptura, perfuração ou colapso traqueal, corpos estranhos e fornecer informações úteis para o diagnóstico da OAR, HPIE ou das neoplasias torácicas (Taylor et al., 2010). A presença de secreções respiratórias visíveis na traqueia deve-se à excessiva produção de muco comum à maior parte das doenças pulmonares (ex. OAR, DRI, pneumonia ou neoplasia) devendo a sua observação ser descrita quanto à localização (porção proximal, média, distal), quantidade e coloração (Dixon, 1997; Barakzai, 2007). Um dos critérios para o diagnóstico da HPIE é visualização de sangue na traqueia na endoscopia, contudo a ausência de sangue visível não exclui o diagnóstico (Durando, 2012). A gravidade da hemorragia é determinada com base num sistema de classificação sumarizado na tabela 13.

Tabela 13 – Quadro de classificação da severidade da hemorragia pulmonar induzida pelo exercício com base na observação de sangue na traqueia (adaptado de Hinchcliff, 2007 e Durando, 2012).

Grau	Observações
0	Ausência de sangue na faringe, laringe, traqueia e brônquios principais
1	Poucas gotículas de sangue na traqueia ou nos brônquios principais visível a partir da carina
2	Linha estreita de sangue (ocupando mais de metade do comprimento da traqueia) ou > 2 linhas de sangue curtas ocupando 1/3 da circunferência traqueal
3	Múltiplas linhas distintas de sangue ocupando 1/3 da circunferência traqueal, ausência de sangue na porção proximal do tórax
4	Múltiplas linhas coalescentes de sangue em > 90% da superfície traqueal e na porção proximal do tórax

Na OAR e DPOAPVA, a mucosa da traqueia e brônquios poderá estar hiperémica, a carina surge espessada, poderá ocorrer broncoespasmo e observa-se uma quantidade variável de secreção mucopurulenta na traqueia (Mair, 1996; Viel, 2009).

Na endoscopia poderão ser observados ocasionalmente nódulos ao nível da carina e dos brônquios principais na neoplasia intrapulmonar, contudo o diagnóstico deverá ser confirmado através da realização de biópsia (Wilkins, 2003). Na pneumonia parasitária observa-se uma quantidade elevada de secreção respiratória na traqueia e bronquíolos podendo ocorrer hiperplasia linfóide folicular moderada (Ainsworth & Cheetham, 2010).

2.4 Colheita e Análise das Secreções Respiratórias

A análise das secreções respiratórias permite o diagnóstico com uma boa sensibilidade das doenças respiratórias mais frequentes, estudo da patofisiologia do processo envolvido e o acompanhamento dos casos após terapêutica (Radostitis et al., 2009). A colheita de secreções respiratórias poderá ser realizada através da lavagem e aspiração traqueal (LT), lavagem broncoalveolar (LBA), entre outros procedimentos (Richard, Fortier, Lekeux & Van Erck, 2010). As amostras assim obtidas poderão posteriormente ser submetidas para citologia, análise bioquímica, cultura bacteriana, isolamento viral, testes moleculares e exame histopatológico (Richard et al., 2010). É importante salientar que a técnica usada e o método de colheita podem afectar de um modo significativo as contagens celulares, tipo de células obtidas bem como as contagens bacterianas, pelo que deverá haver uma padronização dos protocolos usados no que concerne ao período de colheita (ex. repouso ou após o exercício), volume e tipo de fluido instilados, manuseio e processamento das amostras (Hodgson & Hodgson, 2007).

Tendo em conta a natureza do tema desta dissertação apenas serão abordados com maior detalhe a LT e a LBA como métodos para colheita de secreções respiratórias. A LT permite recolher amostras de secreções respiratórias presentes nas grandes vias aéreas, traqueia e brônquios, enquanto a LBA recolhe amostras das vias respiratórias menores e mais distais bem como da região submetida à lavagem (Taylor et al., 2010). Van Erck (2009), Hodgson (2006) e Radostitis et al. (2009) relatam que não existe uma correlação significativa entre a citologia da LT e da LBA. Deste modo, a população celular amostrada por uma das técnicas não é representativa da outra, assim a selecção do método de colheita está dependente dos sinais clínicos, localização e natureza da afecção. A colheita de secreções do tracto respiratório posterior está indicada na presença de tosse, má

performance desportiva, presença de secreção mucopurulenta na traqueia, epistaxis pós exercício, febre de origem desconhecida e dispneia (Hodgson & Hodgson, 2007). Em caso de má *performance* ou tosse durante o exercício está recomendada a colheita de amostras através da LT e da LBA para aumentar o espectro da avaliação do aparelho respiratório (Van Erck, 2009). Quando assim é, a LT deverá ser realizada em primeiro lugar para evitar a contaminação transitória da porção distal da traqueia pela flora orofaríngea proporcionada pela LBA refere a mesma autora.

2.4.1 Lavagem Traqueal

A lavagem traqueal é uma técnica simples frequentemente usada no diagnóstico da doença respiratória, nomeadamente a pneumonia bacteriana, pleuropneumonia e febre de origem desconhecida (Ainsworth & Cheetham, 2010). A lavagem e aspiração traqueal poderão ser realizadas por punção percutânea (transtraqueal) ou via canal de trabalho do endoscópio (Schaer & Orsini, 2007). A lavagem e aspiração transtraqueal difere da lavagem traqueal, uma vez que é realizada através da punção percutânea da traqueia ao nível do terço médio cervical (Schaer & Orsini, 2007). Wilfong e Waldrige (2009) recomendam a sedação dos pacientes previamente ao procedimento através do uso da xilazina (0.5 mg/kg IV) ou da detomidina (0.01-0.02 mg/kg IV) e do butorfanol (0.02-0.04 mg/kg). Os mesmos autores referem ainda que o uso do butorfanol reduz a frequência dos episódios de tosse adicionalmente ao seu efeito sedativo. Para a LT via percutânea deve-se proceder à tricotomia e à assepsia de uma área com cerca de 10 cm² na linha média do pescoço (Schaer & Orsini, 2007). Está recomendada a anestesia do local de punção com 2 a 3 mL de lidocaína a 2% (Schaer & Orsini, 2007). A técnica consiste em localizar e estabilizar a traqueia manualmente, com a outra mão posicionar a agulha perpendicularmente à pele e puncionar a traqueia entre dois anéis traqueais (Schaer & Orsini, 2007). Após a punção, o catéter deverá ser conduzido em direção ao terço distal da traqueia onde se deverá administrar 20 a 30 mL de solução fisiológica tépida (Schaer & Orsini, 2007). Para recuperar o fluido pode-se aspirar após a instilação completa ou parcial da solução fisiológica até que se sinta tensão na aspiração com a seringa (Schaer & Orsini, 2007). Nesta fase poderá ser necessário reposicionar e/ou repetir a administração de solução fisiológica (até 100 mL) para aumentar a quantidade de fluido recuperado (Schaer & Orsini, 2007). A doença pulmonar facilita o processo de amostragem pela presença de uma quantidade variável de secreção ao nível da entrada do tórax (Radostitis et al., 2009). Após a amostragem retirar a agulha e em seguida o catéter cuidadosamente para evitar possíveis sequelas (Schaer & Orsini, 2007). A colheita de secreções por via percutânea tem como desvantagens o risco

do desenvolvimento de celulite localizada, lesão das cartilagens traqueais, enfisema (subcutâneo ou mediastínico) e a formação de abscessos com origem no local da punção (Schumacher & Holl, 2011). A inflamação/infecção local poderá ser evitada se se fizer uma incisão em alternativa à punção e pela administração subcutânea profiláctica de um antimicrobiano após a colheita (ex. gentamicina ou penicilina) (Schumacher & Holl, 2011). A crescente disponibilidade do uso do endoscópio vem substituindo gradualmente a aspiração transtraqueal por ser um método menos invasivo e por provocar menos complicações (Taylor et al., 2010). Para o efeito, o tubo endoscópico é conduzido ao longo do aparelho respiratório até ao nível do terço médio distal da traqueia onde se procede à administração de 10 a 15 mL de solução fisiológica e recuperação das secreções respiratórias através de um catéter colocado no canal de trabalho do endoscópio (Taylor et al., 2010). O uso do endoscópio possibilita inspecção da mucosa respiratória e a colheita de amostras de secreções num local específico (Taylor et al., 2010). O material obtido é submetido para exame citológico, microbiológico ou outro que seja considerado necessário. A aspiração transtraqueal tem como benefício o facto de evitar a cavidade nasal e o tracto respiratório anterior, deste modo, o risco de contaminação da amostra pela microflora nasofaríngea comensal é menor (Schumacher & Holl, 2011). Pelo contrário, o recurso ao endoscópio está associado a um maior risco de contaminação comprometendo a utilidade das amostras para cultura bacteriana (Schumacher & Holl, 2011). A contaminação das amostras obtidas através da endoscopia pode ser limitada através da desinfecção (solução de clorexidina a 2% e álcool a 70%) do tubo endoscópico entre cada exame e pelo uso de catéteres com sistema de protecção (Hodgson & Hodgson, 2007).

As contra-indicações estão associadas a doença respiratória severa (não constitui uma contra-indicação absoluta), ausência de meios para uma contenção adequada e tosse espontânea severa (Radostitis et al., 2009). Em determinados casos poderá ocorrer a retroflexão do catéter para a porção proximal da traqueia ou orofaringe durante a tosse resultando na contaminação da amostra ou na colheita inadvertida de secreções do tracto respiratório anterior (Hewson e Viel, 2002). A contaminação das amostras poderá ser confirmada na citologia com base na observação de células epiteliais escamosas que estão ausentes na porção distal da laringe (Dixon, 1997). As amostras com contagens elevadas de células escamosas apresentam um maior número de bactérias do que as amostras com contagens inferiores (Dixon, 1997). Assim foi sugerido que o número de células escamosas recuperadas possa estar associado ao número de unidades formadoras de colónias (UFC) obtidas na cultura bacteriana (Christley, Hodgson, Rose, Reid & Hodgson, 1999). O número exacto de células escamosas sugestivo de contaminação ainda não é claro, o que poderá ser explicado pelas diferentes contagens de bactérias observados em diferentes pesquisas e pela distribuição não

homogénea das células na citologia devendo estes dados ser interpretados à luz das informações veiculadas pelo exame clínico, citológico e bacteriológico refere o mesmo autor.

2.4.2 Lavagem Broncoalveolar

A LBA está indicada aquando da suspeita de doenças pulmonares difusas e/ou crónicas (ex. OAR, HPIE, DRI) (Taylor et al., 2010). É um bom método para a avaliação das alterações que ocorrem na maior parte da porção distal do aparelho respiratório podendo ser realizada por meio do uso de um broncoscópio ou através de um tubo flexível nasobronquial próprio para LBA (Hodgson & Hodgson, 2007). Estes procedimentos de colheita são tecnicamente similares, as diferenças residem no facto de que o endoscópio permite a inspecção das vias aéreas durante o procedimento e a selecção da região pulmonar alvo de amostragem (Hodgson & Hodgson, 2007). Na LBA, a sedação (xilazina ou detomidina e butorfanol) é geralmente necessária bem como a contenção adicional do paciente para aumentar a segurança do procedimento (Van Erck, 2009). Radostitis et al. (2009) referem que a co-administração de opiáceos recomendada por alguns autores para reduzir a frequência e a severidade da tosse não é tão eficaz quanto a instilação de lidocaína intratraqueal quando combinada com a detomidina. A profundidade da região pulmonar submetida a lavagem depende grandemente do comprimento e do diâmetro externo do broncoscópio usado (Hewson & Viel, 2002). De um modo geral, o uso de um endoscópio com mais de 2 m de comprimento e 10 a 13 mm de diâmetro garante a amostragem da quarta à sexta geração de brônquios (Hewson & Viel, 2002). De acordo com Schaer e Orsini (2007) para a colheita de amostras das secreções broncoalveolares, o endoscópio ou tubo nasobronquial deverão ser colocados ao nível da carina e direccionados para um dos brônquios principais (direito ou esquerdo) até que se obtenha alguma resistência. Uma vez tendo-se posicionado o endoscópio ou o tubo nasotraqueal administrar lentamente 100 mL de solução fisiológica tépida e recuperar o fluido instilado (Schaer & Orsini, 2007). O processo de recuperação deverá ser realizado com especial precaução para evitar a formação de uma pressão negativa excessiva que poderá resultar no colapso das vias respiratórias, hemorragia e na diminuição do fluido recuperado (Hodgson & Hodgson, 2007). Van Erck (2009) sugere que caso se suspeite de pneumonia por aspiração a LBA deverá ser realizada na região pulmonar ventral, enquanto que na doença inflamatória crónica ou HPIE a região submetida a amostragem deverá ser a caudodorsal. Com base nas amostras é possível observar e quantificar as populações celulares, fazer cultura para pesquisa de microorganismos (bactérias, fungos), pesquisa de imunoglobulinas e análise do surfactante pulmonar (Pusterla et al., 2006). No entanto, nem todos

os autores concordam com a sua aplicabilidade para cultura bacteriana pelo risco de contaminação das amostras ao passarem pelo tracto respiratório anterior (Schaer & Orsini, 2007; Wilfong & Waldrige, 2009). A principal desvantagem da LBA em relação à LT reside no facto de que esta permite a avaliação de uma região limitada do parênquima pulmonar havendo o risco de não serem detectadas alterações focais (Ainsworth & Cheetham, 2010).

A LBA apresenta poucas contra-indicações sendo a doença respiratória severa uma delas (Barakzai, 2007). A mesma autora refere que as complicações associadas são raras e transitórias, podendo incluir hiperémia moderada, hemorragia, pirexia e neutrofilia média observada alguns dias após o procedimento. Radostitis et al. (2009) relatam ainda que poderá ocorrer a alteração na função fagocitária dos macrófagos pulmonares, alteração da natureza da microflora durante vários dias após a amostragem bem como pneumonia focal no local da lavagem.

2.4.3 Processamento de Amostras

Após a colheita, as amostras obtidas deverão ser avaliadas em relação ao odor, turvação, coloração, presença de muco entre outros (ex. detritos, coágulos) (Hoffman, 2008). As amostras recuperadas por LBA apresentam um aspecto espumoso o que indica a presença do surfactante pulmonar (Hoffman, 2008). As secreções respiratórias são inodoras, claras ou com um índice de turvação médio na ausência de doença respiratória (Hoffman, 2008). A presença de um odor fétido pode indicar infecção por bactérias anaeróbias ou a necrose do tecido pulmonar (Hoffman, 2008). A coloração do fluido varia tendo em conta a percentagem de eritrócitos e de células nucleadas presentes, assim o aumento do índice de turvação está associado à hipersecreção de muco, aumento das contagens celulares ou de detritos (Hodgson & Hodgson, 2007). Na presença de um episódio recente de HPIE, a cor varia entre rosa a vermelho passando posteriormente a castanho pela deposição de hemossiderina (Hodgson & Hodgson, 2007). A avaliação da quantidade de muco presente na LT e na LBA deverá ser realizada em conjunto com a endoscopia do aparelho respiratório (Hodgson & Hodgson, 2007). O mecanismo de *clearance* mucociliar nos cavalos são é eficiente, de tal modo que a eliminação e a produção de muco se mantém em equilíbrio (Hodgson, 2006). Assim, estes animais apresentam muito pouco ou nenhum material mucocelular translúcido, de coloração verde-claro e um pequeno número de células livres (Hodgson, 2006). Nas lâminas coradas pelo método de Wright, o muco surge com coloração rosa ou azul claro (Zinkl, 2002). A hipersecreção de muco e a subsequente acumulação deste ao nível dos bronquíolos menores poderá causar a formação de espirais observada no exame citológico denominadas espirais de Curschmann

(Zinkl, 2002). O aumento da produção de muco ou de secreção mucopurulenta é observado na OAR, DRI, bronquite crónica e na pneumonia (bacteriana, fúngica ou parasitária) (Holcombe et al., 2006). A hipersecreção de muco moderada a severa está associada à má *performance* desportiva mesmo na ausência de outros sinais de doença respiratória (Holcombe et al., 2006).

A análise das amostras deverá ser realizada imediatamente após o procedimento para prevenir as alterações celulares e a multiplicação bacteriana (Van Erck, 2009). Alternativamente, as amostras poderão ser armazenadas em tubos contendo EDTA à temperatura ambiente por um período máximo de 8 horas ou refrigeradas a 4 °C até 24 horas até que a análise seja possível (Van Erck, 2009). O EDTA preserva a morfologia celular, retarda o crescimento bacteriano e evita a formação de coágulos (Taylor et al., 2010). As bactérias anaeróbias são particularmente susceptíveis ao EDTA, pelo que de um modo geral as amostras com destino à cultura bacteriana são armazenadas em tubos sem anticoagulante ou em meios de transporte adequados sob refrigeração devendo ser processadas o mais rapidamente possível para preservação das amostras e prevenção do sobrecrecimento de microorganismos contaminantes (Taylor et al., 2010).

O processamento das amostras destinadas a exame citológico inclui a preparação de esfregaços, fixação e coloração previamente ao exame microscópico propriamente dito. Os esfregaços deverão ser realizados imediatamente após a colheita, na medida em que são usados como referência em termos da morfologia celular e da população bacteriana (Hodgson & Hodgson, 2007). A celularidade (número de células) das amostras é um factor condicionante para a preparação dos esfregaços, pois o maior ou menor índice de turvação determinam a necessidade da centrifugação prévia das amostras (Schaer & Orsini, 2007). A celularidade das amostras pode ser estimada a partir da turvação das mesmas, presença de muco, cor ou determinada através da contagem celular total (Schaer & Orsini, 2007). Assim, nas amostras com celularidade elevada (> 30 000 células nucleadas/ μ L) pode-se proceder ao esfregaço directo; as amostras com celularidade moderada (3000 a 30 000 células nucleadas/ μ L) deverão ser centrifugadas e o esfregaço realizado a partir do sedimento e nas amostras com baixa celularidade (< 3000 células nucleadas/ μ L) é recomendado o uso da citocentrifugação (Schaer & Orsini, 2007). A centrifugação não é completamente inócua no que concerne à contagem diferencial. Richard et al. (2010) referem que nas amostras sujeitas a centrifugação as contagens de neutrófilos não são afectadas significativamente, a percentagem de linfócitos é menor e a percentagem de macrófagos, mastócitos e eosinófilos é maior. A citocentrifugação tem a vantagem de concentrar as células num único ponto facilitando a avaliação microscópica (Richard et al., 2010). Após a preparação do esfregaço este deverá ser fixado por secagem ao ar e corado. Estão disponíveis diferentes corantes para a identificação e a quantificação

das populações celulares presentes na LT e na LBA. Os neutrófilos, macrófagos, linfócitos e as células epiteliais são facilmente identificados com base na sua morfologia através do uso de derivados do corante Romanowsky (ex. Diff-Quik[®], Wright, Hematoxilina-eosina) (Stokol & French, 2007). Os corantes tipo Romanowsky ou policromáticos são os corantes padrão usados na citologia, são formados pela combinação do azul (cor azul, pH básico) e da eosina (cor vermelha, pH ácido) (Stokol & French, 2007). Os corantes básicos ligam-se a estruturas ácidas (ex. DNA, RNA) corando-as em várias tonalidades do azul ao púrpura, enquanto os corantes ácidos se ligam às estruturas alcalinas presentes no citoplasma corando-as em diferentes tons de vermelho (Stokol & French, 2007). Denicola (2007) refere que a maior vantagem destes corantes advém do facto de poderem ser usados em amostras fixadas por secagem ao ar dando ao patologista tempo para preparar adequadamente as amostras sem ter de recorrer ao uso de etanol ou de outros agentes fixadores. A percentagem média de mastócitos determinada em lâminas coradas com derivados Romanowsky é menor do que quando são usados corantes específicos, nomeadamente o May-Grunwald Giemsa e o azul de Tuloidina (Leclere, Desnoyers, Beauchamp, & Lavoie, 2006). Os corantes tipo Romanowsky não coram os grânulos metacromáticos, pelo que a identificação dos mastócitos é trabalhosa, subjectiva e está dependente da experiência do patologista (Hughes, Malikides, Hodgson & Hodgson, 2003; Radostitis et al., 2009).

2.4.4 Citologia

A citologia é um exame complementar comumente usado no diagnóstico da doença do tracto respiratório posterior nos equinos (Lavoie, 2007). Esta tem como objectivos procurar reconhecer a presença de inflamação ou de neoplasia, verificar os efeitos da lesão tecidual e a natureza do processo (ex. infeccioso, alérgico, imunomediado) (Raskin, Meuten & Rebar, 2005). O diagnóstico da doença respiratória é frequentemente baseado na proporção de células inflamatórias específicas, nomeadamente os neutrófilos e os linfócitos (Raskin et al., 2005). Não obstante, ainda há muito para ser descoberto sobre a distribuição de eosinófilos e mastócitos no tracto respiratório posterior de animais doentes e saudáveis (Hughes et al., 2003). Hughes et al. (2003) referem que na sua experiência pessoal, os mastócitos são mais frequentes nas amostras das vias respiratórias distais, enquanto os eosinófilos são encontrados com maior frequência nas vias respiratórias proximais. Assim, a técnica de colheita poderá ter influência nos tipos celulares obtidos, pelo que a LBA é mais recomendada para a detecção e quantificação de mastócitos, enquanto a LT para a observação de eosinófilos de acordo com o autor. O diagnóstico definitivo nem sempre é conseguido através da

citologia, todavia o processo geral da doença (inflamação ou neoplasia) pode muitas vezes ser rapidamente reconhecido se uma abordagem correcta for usada (French, 2009). A importância das informações veiculadas pelo exame citológico são determinadas em conjunto com a anamnese e sinais clínicos bem como com base nos dados obtidos através dos restantes meios complementares de diagnóstico.

O exame citológico é realizado a partir de esfregaços corados observados ao microscópio óptico. Este exame pode ser dividido em quatro fases, determinação da qualidade do esfregaço através do reconhecimento de artefactos associados ao processamento das amostras (ex. fixação, coloração); observação da morfologia celular geral (pesquisa de alterações nucleares ou degeneração celular); contagem celular total e a contagem diferencial (Denicola, 2007). No decurso do exame microscópico é fundamental determinar se os tipos celulares e a morfologia correspondem ao esperado, se há indicações de inflamação e identificar o tipo celular mais frequente e pesquisar a presença de contaminantes na amostra (ex. bactérias, pólen, elementos fúngicos, cristais, detritos) (Denicola, 2007). Para que isto seja possível é necessário estar familiarizado com a morfologia e o tipo de células que compõem o aparelho respiratório equino, as doenças mais frequentes e os seus efeitos na árvore respiratória. O aparelho respiratório é composto por diferentes tipos celulares, nomeadamente células epiteliais e células inflamatórias (ex. neutrófilos, linfócitos, macrófagos, eosinófilos).

2.4.4.1 Células Epiteliais

O tipo de célula epitelial varia de acordo com a porção do aparelho respiratório submetida a amostragem, assim as células observadas poderão ser usadas para a confirmação do local de colheita bem como para a identificação de uma possível contaminação durante o procedimento (tabela 14) (Zinkl, 2002).

Tabela 14 – Distribuição celular no aparelho respiratório (adaptado de French, 2009)

TRA	TRP		
	Traqueia e Brônquios	Bronquíolos Terminais	Alvéolos
	Células colunares ciliadas		
Células colunares ciliadas	Células globulares	Células cuboidais não ciliadas ou células colunares (células Clara)	Pneumócitos tipo I e II
Células escamosas	Células basais		Macrófagos alveolares
	Células neuroendócrinas		

A faringe é coberta por um epitélio primariamente pseudoestratificado colunar ciliado, também podem ser encontradas regiões formadas por epitélio estratificado escamoso (Junqueira & Carneiro, 2004). A mucosa das bolsas guturais e dos seios paranasais é composta por um epitélio de transição, epitélio colunar ciliado simples ou cuboidal e células globulares (Junqueira & Carneiro, 2004). As células epiteliais cuboidais são células de tamanho médio, margens arredondadas, citoplasma basofílico e núcleo grande em posição central (Junqueira & Carneiro, 2004). As células escamosas são células de grandes dimensões, achatadas e moderadamente basofílicas (Christley et al., 2001). Estas células deverão estar ausentes na LT e LBA de cavalos sãos, a sua presença está associada a contaminação orofaríngea ou a metaplasia no tracto respiratório posterior por inflamação ou irritação crónica (Christley et al., 2001). A traqueia e os brônquios são cobertos por epitélio pseudoestratificado e as células colunares ciliadas são o tipo celular predominante nesta porção do aparelho respiratório (Meuten, Raskin & Rebar, 2005). As células colunares são células de tamanho médio, alongadas, de citoplasma basofílico, núcleo em posição central ou basal e os cílios irradiam a partir do pólo apical (Meuten et al., 2005). As células globulares são células produtoras de muco não ciliadas encontradas entre as células epiteliais colunares (Meuten et al., 2005). O número de grânulos secretores presentes no citoplasma condiciona o tamanho e a forma destas células (Meuten et al., 2005). O núcleo é observado no pólo apical da célula, os grânulos surgem no pólo oposto com coloração variável entre vermelho a púrpura (Meuten et al., 2005). As células basais são encontradas adjacentes à membrana basal, são células indiferenciadas provavelmente precursoras das células ciliadas e das células globulares (Zinkl, 2002). As células neuroendócrinas só são observadas aquando do uso de técnicas de coloração específicas ou através da microscopia electrónica (Zinkl, 2002). Os bronquíolos terminais são cobertos por células cuboidais não ciliadas ou células colunares denominadas células Clara (French, 2009). Na porção alveolar são observados

os pneumócitos tipo I e II e macrófagos alveolares (French, 2009). Os pneumócitos tipo I surgem em maior número, são células achatadas podendo ser encontradas na superfície onde as trocas gasosas ocorrem (French, 2009). Os pneumócitos tipo II apresentam um formato cuboidal ou arredondado e são responsáveis pela secreção do surfactante pulmonar (French, 2009). No exame citológico, os pneumócitos tipo II surgem arredondados e com citoplasma vacuolizado tornando difícil a sua diferenciação dos macrófagos alveolares (French, 2009).

No exame citológico de amostras recuperadas através da LT são observadas células de todo o tracto respiratório posterior incluindo células epiteliais colunares (traqueia e brônquios), células epiteliais cuboidais (porção distal dos brônquios e bronquíolos) e macrófagos alveolares (Hodgson & Hodgson, 2007). As células epiteliais surgem em pequeno número na LT nos cavalos sãos, contudo a contagem de células observadas poderá estar aumentada quando a colheita é realizada através da endoscopia (Hodgson & Hodgson, 2007). As células epiteliais de igual modo poderão ser observadas no fluido obtido por LBA, mas surgem com menor frequência do que na LT (Hodgson & Hodgson, 2007). Na citologia são observadas essencialmente células epiteliais colunares ciliadas, células cuboidais não ciliadas e macrófagos alveolares (Richard et al., 2010). O aumento do número de células epiteliais nas amostras (LT ou LBA) é relativamente raro, a alteração mais comum consiste numa variação da morfologia celular (Richard et al., 2010).

2.4.4.2 Contagem Celular Total

A contagem celular total é um dado importante para a estimativa da celularidade das amostras bem como para a interpretação dos resultados obtidos na contagem diferencial. Esta é influenciada por diversos factores, tais como a quantidade de solução fisiológica instilada, presença de muco, processamento das amostras e método de contagem celular (Richard et al., 2010). A infusão de solução fisiológica na LT e na LBA promove a diluição da concentração celular estando o seu efeito dependente da quantidade de fluido usada (Richard et al., 2010). Hewson e Viel (2002) sugerem que a padronização dos métodos de colheita, dos locais de lavagem/aspiração e a recuperação de cerca de 40 a 80% do fluido instilado diminuem o efeito da diluição das secreções respiratórias. A presença de muco pode diminuir a contagem celular total devido ao efeito de aprisionamento das células pelas cadeias que formam o muco (Richard et al., 2010). A contagem total de células nucleadas e a de eritrócitos deverá ser realizada por meio de uma câmara de Neubauer ou de um contador automático (Hodgson & Hodgson, 2007). A filtração das amostras previamente à contagem pode causar a diminuição da contagem celular bem como a perda selectiva de alguns

tipos celulares, nomeadamente as células epiteliais, macrófagos e mastócitos (Hewson & Viel, 2002). Aquando do uso de contadores automáticos dever-se-á ter em consideração o facto de que estes dispositivos poderão não estar calibrados para diferentes dimensões celulares ou preparados para a presença de aglomerados de células epiteliais o que invariavelmente influencia a interpretação dos resultados (Hodgson & Hodgson, 2007). De um modo geral, a LT de um equino clinicamente saudável contém menos de 10^9 células/L, com poucos eritrócitos presentes (Hewson & Viel, 2002). No caso da LBA, a contagem celular é menor que 10^9 células/L, ainda que também se use um limite superior de 4×10^8 células/L (Hewson & Viel, 2002). A contagem celular total aumenta na pneumonia bacteriana, pleuropneumonia, OAR e nas infecções pulmonares parasitárias refere o mesmo autor.

2.4.4.3 Contagem Diferencial

Na contagem diferencial deverão ser quantificadas pelo menos 300 células consecutivas para a contagem de neutrófilos, macrófagos, linfócitos e eosinófilos e pelo menos 500 células para a contagem de mastócitos (De Brauwer, Jacobs, Nieman, Bruggeman & Drent, 2002). A contagem diferencial é influenciada por diversos factores, nomeadamente o exercício, tosse ou trauma durante o procedimento, método de colheita, rapidez e qualidade do processamento, entre outros (De Brauwer et al., 2002). Nos cavalos sem doença respiratória, as células mais encontradas na LT são as células epiteliais colunares (ciliadas e não ciliadas), os macrófagos alveolares, um pequeno número de neutrófilos e linfócitos (Taylor et al., 2010). Na LBA, as células epiteliais colunares e os macrófagos alveolares são os tipos celulares mais comuns em cavalos sãos, seguidos pelos linfócitos e um pequeno número de neutrófilos (Taylor et al., 2010). Na contagem diferencial de amostras obtidas por LT poderá ser difícil estabelecer o tipo celular, na medida em as células surgem frequentemente em estado de degeneração (Taylor et al., 2010). Contrariamente, na LBA as células estão melhor preservadas e mais facilmente identificáveis segundo o mesmo autor.

Eritrócitos

A presença de um pequeno número de eritrócitos na LT e na LBA é comum sendo atribuída a uma hemorragia iatrogénica de menor gravidade durante a colheita (Hodgson & Hodgson, 2007). No cavalo são, as amostras obtidas através da LT e da LBA são claras e não deverão apresentar sinais de hemólise (Hodgson & Hodgson, 2007).

Células Inflamatórias

A presença de um processo inflamatório é determinada com base no aumento do número de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e macrófagos (Stokol & French, 2007). Os mastócitos e os basófilos são raramente observados na resposta inflamatória nos equinos (Stokol & French, 2007). Na LT, o número de células inflamatórias é moderado (há predomínio dos macrófagos alveolares), enquanto na LBA estas células são o tipo celular mais comum (McKane, 2010). Está reportada uma grande variação na percentagem de células inflamatórias obtidas na LT e na LBA em cavalos sãos, o que poderá ser o reflexo de diferentes técnicas de colheita, do processamento ou até mesmo das condições ambientais no momento da colheita (McKane, 2010). Os animais mantidos em regime de estabulação apresentam uma maior proporção de células inflamatórias, provavelmente devido à irritação do aparelho respiratório causado pelos agentes inalados (Hodgson & Hodgson, 2007). O aumento moderado da proporção destas células muitas vezes é acompanhado por um incremento médio da quantidade de muco sem que haja o comprometimento da função respiratória (Hodgson & Hodgson, 2007). Se a irritação persistir, esta poderá agir como um factor de risco para o desenvolvimento de uma afecção respiratória mais severa (Hodgson & Hodgson, 2007). Nas tabelas 15 e 16 estão sumarizados os valores de referência da citologia das amostras obtidas através da LT e da LBA em equinos sem sinais de doença respiratória.

Tabela 15 – Contagem diferencial (média ± desvio padrão) na citologia de amostras obtidas através da LT (adaptado de Richard et al., 2010)

	VSF (mL)	CCT	Epi	Macr	Neu	Linf	Eos	Mast
Mair al. (1987)	30	n.d.	19.8±6.1	65.0±3.7	6.4±5.5	7.4±3.8	1.2±1.4	0.2±0.4
Derksen et al. (1989)	20	n.d.	34±20.9	24.0±12.7	32.0±28.0	8.2±6.0	<1.0	n.d.
Christley et al. (1999)	20	n.d.	n.d.	74.2±87.6	10.0±10.8	13.0±7.6	1.9±1.2	n.d.
Richard et al. (2009)	30	n.d.	n.d.	79.6±8.2	9.3±4.9	9.3±5.8	0.2±0.6	0.0±0.0
Sgorbini et al. (2010)	-	230±150	n.d.	57.6±19.6	3.3±3.6	27.6±9.7	0.9±1.3	n.d.

Legenda: VSF - Volume de solução fisiológica administrada; CCT - Contagem celular total; Epi - Células epiteliais; Macr - Macrófagos; Neu - Neutrófilos; Linf - Linfócitos; Eos - Eosinófilos; Mast - Mastócitos; n.d. - Não determinado.

Tabela 16 – Contagem diferencial (média \pm desvio padrão) na citologia de amostras de lavagem broncoalveolar (adaptado de Richard et al., 2010)

	VSF (mL)	CCT	Epi	Macr	Neu	Linf	Eos	Mast
MacKane et al. (1993)	65	832 \pm 578	0.4 \pm 0.6	59 \pm 9.7	8.8 \pm 6.4	31.3 \pm 9.3	0.5 \pm 3.1	n.d.
Clark et al. (1995)	200	92.1 \pm 142	n.d.	56 \pm 13	5.9 \pm 4.6	36.7 \pm 14.8	0.5 \pm 0.9	0.8 \pm 1.8
Holcombe et al. (2001) pasture	300	94 \pm 47	8.1 \pm 6.5	41 \pm 10.8	3.6 \pm 3.5	42.6 \pm 11.5	0.7 \pm 1.7	6.6 \pm 5.1
Holcombe et al. (2001) stable	300	89 \pm 39	8.4 \pm 9.0	41.4 \pm 9.7	10.3 \pm 8.9	37 \pm 9.8	1.2 \pm 2.2	4.4 \pm 3.9
Richard et al. (2009)	250	255 \pm 81	0.0 \pm 0.0	61.9 \pm 16.9	5.1 \pm 2.0	20.4 \pm 9.9	0.3 \pm 0.5	0.6 \pm 0.5

Legenda: VSF - Volume de solução fisiológica administrada; CCT - Contagem celular total; Epi - Células epiteliais; Macr - Macrófagos; Neu - Neutrófilos; Linf - Linfócitos; Eos - Eosinófilos; Mast - Mastócitos; n.d. - Não determinado.

Há uma franca necessidade do estabelecimento dos valores de referência para a LT e LBA em cavalos clinicamente sadios em diferentes condições ambientais, dada a grande variabilidade entre os diferentes estudos realizados até os dias de hoje. De um modo geral, o aspirado traqueal deverá apresentar < 20% de neutrófilos, < 1% de eosinófilos, < 10% de linfócitos e poucos mastócitos (Robinson & Hoffman, 2003). O fluido obtido na LBA deverá apresentar < 5% de neutrófilos, < 2% de mastócitos, < 0.5 de eosinófilos, 30 a 60% de linfócitos e 40 a 70% de macrófagos (Robinson & Hoffman, 2003).

Macrófagos Alveolares

Os macrófagos alveolares são as células inflamatórias mais abundantes na LT e na LBA em cavalos sãos (Hewson & Viel, 2002). São células de grandes dimensões com citoplasma basofílico e

abundante contendo inúmeros vacúolos e inclusões (Hewson & Viel, 2002). Nestes vacúolos podem ser observados eritrócitos, células em apoptose, esporos fúngicos, hemossiderina, pólen ou outros detritos não específicos (Hewson & Viel, 2002). A alteração da morfologia celular causada pelo aumento do número e da dimensão dos vacúolos citoplasmáticos está associada à presença de doença pulmonar (infecciosa, alérgica, obstrutiva) (Hodgson & Hodgson, 2007). As células gigantes ou macrófagos multinucleados podem ser observados na ausência de inflamação, contudo o aumento do número destas células pode indicar inflamação crónica (Hodgson & Hodgson, 2007). Após um episódio de hemorragia, os eritrócitos presentes no aparelho respiratório são rapidamente fagocitados pelos macrófagos alveolares (eritrófagos) (McKane, 2010). Os eritrócitos são posteriormente degradados, o pigmento heme é reduzido a hemossiderina dando origem aos chamados hemossiderófagos (McKane, 2010). A hemossiderina surge com um tom verde-acastanhado a negro com os corantes tipo Romanowsky podendo ser difícil de distinguir de detritos celulares fagocitados ou de outros pigmentos (McKane, 2010). O corante Azul da Prússia cora o ferro de azul sendo útil para confirmar se o pigmento intracelular é efectivamente hemossiderina ou não (McKane, 2010).

Neutrófilos

Os neutrófilos são células com núcleo segmentado de citoplasma claro, estas células estão presentes em pequeno número nas secreções respiratórias na ausência de doença respiratória (Hodgson & Hodgson, 2007). A proporção de neutrófilos é maior nas amostras obtidas através da LT do que na LBA, o que poderá ser explicado pela maior exposição das grandes vias respiratórias a elementos nocivos (Hodgson & Hodgson, 2007). Estudos recentes demonstraram a presença de uma relação entre o aumento do número de neutrófilos, sinais clínicos consistentes com doença respiratória (ex. tosse) e o aumento do número de bactérias isoladas na cultura bacteriana (Chapmann et al., 2000; Christley et al., 2001; Laus et al., 2009). Na LBA observa-se uma menor variação na proporção do número de neutrófilos em cavalos sãos havendo uma forte associação entre o aumento do número de neutrófilos e a presença de sinais histológicos de inflamação respiratória (Malikides, Hughes & Hodgson, 2003). Na inflamação, a variação da percentagem de neutrófilos nas amostras obtidas através da LT e da LBA poderá ser explicada tendo em conta o tipo de inflamação, isto é, localizada (porção proximal ou distal) ou difusa (Malikides et al., 2003). Assim, a interpretação do aumento do número de neutrófilos deverá ter em conta outros factores, tais como o aumento da quantidade de muco no aparelho respiratório e a contagem celular total (Malikides et al., 2003). Algumas doenças

respiratórias causam o aumento do número de células em fase de degeneração (ex. pneumonia bacteriana, pneumonia fúngica) (Stokol & French, 2007). A alteração degenerativa mais comum é a cariólise que consiste na observação de edema celular, perda de segmentação nuclear, coloração menos intensa do núcleo que passa de púrpura a rosa e, eventualmente lise celular (Stokol & French, 2007). A apoptose celular é caracterizada pela condensação do núcleo e pela redução da quantidade de citoplasma (Stokol & French, 2007).

Linfócitos

Os linfócitos são células de tamanho médio a pequeno, esféricas, de núcleo grande com citoplasma basofílico em pequena quantidade (McKane, 2010). Os linfócitos estão presentes em pequeno número na LT e em maior número na LBA (McKane, 2010). Na LT é por vezes difícil diferenciar os linfócitos dos macrófagos de menores dimensões e das células sem núcleo (McKane, 2010). Há uma grande variação na proporção de linfócitos obtidos pelos diferentes autores, pelo que a interpretação do aumento do *ratio* de linfócitos é complicada na ausência de doença respiratória (Hewson & Viel, 2002). Esta variação poderá ser o reflexo de diferenças na coloração e interpretação, bem como do tipo de ambiente onde os animais são mantidos e a falha na identificação de cavalos com DRI subclínica (Hewson & Viel, 2002). O aumento do número de linfócitos foi reportado em equinos com má *performance* desportiva, tosse crónica, mas o seu significado ainda não foi esclarecido (McGorum & Dixon, 2007). Na LT, o intervalo entre os valores de referência é mais estreito, contudo ainda não foi estabelecida nenhuma associação consistente entre o aumento da proporção de linfócitos e a presença de uma doença respiratória específica (McGorum & Dixon, 2007).

Eosinófilos

Os eosinófilos são ligeiramente maiores que os neutrófilos, apresentam um núcleo lobulado grande e inúmeros grânulos citoplasmáticos acidófilos (Van Erck, 2009). O aumento do número de eosinófilos é comum na pneumonia eosinofílica, bronquite alérgica, reacção de hipersensibilidade tipo I e na pneumonia parasitária (ex. *Dictyocaulus arnfieldi*) (Van Erck, 2009).

Mastócitos

Os mastócitos são células de dimensões variáveis, contém inúmeros grânulos metacromáticos no citoplasma (Zinkl, 2002). Os mastócitos são raros na LT surgindo em maior número na LBA (Zinkl, 2002). Estas células poderão surgir em diferentes fases de desgranulação no exame citológico dependendo da presença de doença respiratória e do processamento do fluido da LBA (Hughes et al., 2003). A identificação dos mastócitos poderá ser mais difícil em caso de desgranulação ou quando são usados os corantes de rotina (ex. tipo Romanowsky) (Hughes et al., 2003).

2.4.4.4 Causas das Alterações no Exame Citológico

As alterações observadas no exame citológico das amostras obtidas através da LT e da LBA poderão ser justificadas por erros no processamento, contaminação acidental das amostras antes ou durante a colheita ou devido à presença de doença respiratória (Zinkl, 2002).

Erros no Processamento das Amostras

O aumento do período de tempo entre a colheita e o processamento causa inúmeras alterações na morfologia celular mesmo em amostras obtidas a partir de animais sem doença respiratória (Stokol & French, 2007). Os macrófagos poderão sofrer vacuolização *in vitro* e apresentar sinais de eritrofagia dificultando a diferenciação entre hemorragia verdadeira e amostras contaminadas por sangue periférico (Stokol & French, 2007). As restantes células nucleadas podem apresentar sinais de envelhecimento celular, tais como a hipersegmentação e picnose à semelhança do que se verifica na doença inflamatória crónica quando o processamento não é realizado de imediato (Hodgson & Hodgson, 2007). De igual modo, o uso incorrecto da técnica da preparação de esfregaços pode resultar na alteração da morfologia celular, o uso de corantes envelhecidos pode estar associada à precipitação do corante no esfregaço que facilmente poderão ser confundidos com cocos ou outros contaminantes (Hodgson & Hodgson, 2007).

Contaminação Orofaríngea

Ocasionalmente, as amostras da LT e da LBA são contaminadas por material oral ou faríngeo (Davis, 2007). As bactérias são encontradas geralmente no tracto respiratório anterior e na cavidade

oral, mas podem ser isoladas transitoriamente no tracto respiratório posterior (Davis, 2007). Nestes casos, o exame citológico revela a presença de inúmeras células epiteliais escamosas e de bactérias, incluindo *Simonsiella spp.* (Teske, 2010). As bactérias que compõem a microflora orofaríngea não causam uma resposta inflamatória significativa, excepto aquando da alteração do mecanismo de *clearance* mucociliar ou de outros factores que aumentem a susceptibilidade para a infecção (Teske, 2010). Outros contaminantes podem ser observados no exame citológico, tais como elementos fúngicos (esporos, macroconídeos, hifas), pólen, ácaros ou outros detritos que são o reflexo do ambiente onde os cavalos são mantidos (Zinkl, 2002).

Doença Respiratória

A doença respiratória está muitas vezes associada a alterações no exame citológico das amostras recuperadas através da LT e da LBA, pelo que este exame poderá fornecer informações fundamentais para a confirmação da suspeita clínica. Contudo, a interpretação dos resultados obtidos deverá ser realizada com especial precaução dada a grande variabilidade dos valores de referência publicados, importância atribuída ao aumento ligeiro a moderado do número de células inflamatórias e da quantidade de muco produzida e os seus efeitos na função do aparelho respiratório (Lavoie, 2007).

O diagnóstico da OAR e da DPOAPV é confirmado através da identificação de inflamação neutrofílica e a reversibilidade dos sinais de obstrução respiratória através do maneo ambiental e/ou administração de broncodilatadores (Ainsworth, 2010). A LBA é o exame mais representativo das vias respiratórias posteriores sendo por isso a mais indicado nestas situações (Mazan & Tizard, 2012). Na citologia da LBA observa-se inflamação neutrofílica (>25%), grande quantidade de muco e aumento do número de células epiteliais, em alguns casos são observadas espirais de Curschmann (Robinson, 2001). No período de remissão da doença, o exame citológico poderá estar inalterado (Sgorbini et al., 2010). A contagem de neutrófilos na LT apresenta uma fraca correlação com a obtida na LBA e os resultados da histopatologia (Traub-Dargatz et al., 1992). As informações obtidas na citologia não são específicas sendo comuns a outras doenças respiratórias inflamatórias, pelo que o diagnóstico da OAR e da DPOAPV deverá ser efectuado com base na história clínica (ex. idade, animais mantidos em confinamento ou na pastagem, sistema de ventilação inadequado, alimentados à base de feno, camas de palha) e quadro clínico (dificuldade respiratória na expiração, narinas dilatadas e a alteração dos ruídos respiratórios) para além da citologia (Allen & Franklin, 2007).

Na DRI, o perfil inflamatório mais comum inclui o aumento da contagem celular total, neutrofilia moderada (> 5% na LBA e > 20% na LT), linfocitose e monotocitose (Ainsworth & Cheetham, 2010). Com menor frequência estão descritos outros perfis inflamatórios, nomeadamente a inflamação eosinofílica e a inflamação metacromática que são definidas por uma percentagem de eosinófilos e mastócitos superior a 0.1 e 2, respectivamente (Ainsworth & Cheetham, 2010). Na presença de um perfil inflamatório eosinofílico, o clínico deverá conduzir outros exames complementares para excluir outras causas do aumento da contagem de eosinófilos, tais como a pneumonia parasitária ou a pneumonite eosinofílica (Christley & Rush, 2007). O uso da citologia da LT por si só é considerado insuficiente para o diagnóstico da DRI, na medida em que não existem dados que permitam estabelecer uma relação entre a citologia da LT e a *performance* desportiva e pelo facto de que há uma fraca correlação entre os resultados obtidos na citologia de amostras obtidas através da LT e da LBA (Couëtil et al., 2007; Mazan, 2010b). A presença de doença inflamatória está associada à observação de células epiteliais atípicas, estas células apresentam edema celular, vacuolização, degeneração nuclear, hipocromasia e núcleos picnóticos (Hodgson & Hodgson, 2007). A doença inflamatória crónica poderá induzir metaplasia escamosa precoce, displasia ou hiperplasia das células brônquicas e broncoalveolares (Hodgson & Hodgson, 2007).

A HPIE poderá ser diagnosticada e caracterizada através da visualização de sangue na traqueia na endoscopia, avaliação citológica de amostras obtidas por LT ou LBA e a ocorrência de epistaxis (<1% dos casos de HPIE) (Durando, 2012). No exame citológico observa-se a presença de eritrócitos íntegros ou fagocitados por macrófagos e/ou hemossiderófagos (Durando, 2012). A LBA é mais sensível que a LT e a endoscopia na detecção e na determinação da extensão da hemorragia pulmonar (Erickson, 2000). A diferenciação entre a hemorragia iatrogénica e a hemorragia pulmonar preexistente (HPIE é a causa mais comum) é baseada na visualização de hemossiderófagos que em princípio estão ausentes na hemorragia iatrogénica (Erickson, 2000). A citologia apresenta uma maior sensibilidade no diagnóstico da HPIE do que o exame endoscópico, na medida em que permite a detecção de hemorragia mesmo que residual imediatamente após o episódio ou algum tempo depois dada a longevidade dos hemossiderófagos (Meyer, Fedde, Gaughann, Langstemo & Erickson, 1998). A quantificação de hemossiderina nos macrófagos alveolares é um método sensível para o diagnóstico da HPIE em cavalos sem história prévia de doença pulmonar (ex. pleuropneumonia, abscessos pulmonares) (Doucet & Viel, 2002). Contudo, este método carece de um maior esclarecimento no sentido de determinar a longevidade dos hemossiderófagos bem como o período de tempo mais indicado entre o episódio de hemorragia e a colheita reduzindo assim a proporção de falsos negativos (Doucet & Viel, 2002).

Para que as células neoplásicas possam ser recuperadas através da LBA, a neoplasia terá que ter invadido os brônquios ou bronquíolos não periféricos (Rush & Mair, 2004). No caso das neoplasias mediastinais de tipo exfoliativo (ex. melanoma, carcinoma das células escamosas, hemangiosarcoma) podem ser observadas células neoplásicas no exame citológico (Rush & Mair, 2004). Contudo, radiografia, a biópsia e a análise do fluido pleural continuam a ser os exames complementares mais usados no diagnóstico da neoplasia torácica (Wilkins, 2003).

Na citologia da LBA de cavalos sujeitos à inalação de fumo ou dos que habitam regiões com elevado índice de poluição poderão ser observadas partículas de carbono fagocitadas pelos macrófagos alveolares (Zinkl, 2002).

No que concerne às doenças respiratórias infecciosas, (ex. pneumonia bacteriana, pneumonia parasitária, pneumonia fúngica, pneumonia viral), as alterações citológicas incluem de um modo geral inflamação neutrofílica, inflamação eosinofílica, linfocitose, entre outras. A LT é o método mais indicado para o diagnóstico da pneumonia bacteriana/pleuropneumonia (Guiguère, 2010). No exame citológico há predominância de neutrófilos (> 40% ou > 90% nos casos agudos) muitas vezes em fase de degeneração e são observadas bactérias intracelulares ou extracelulares (Beech, 1975; Shumacher & Holl, 2011). A citologia de amostras obtidas a partir de cavalos com suspeita de pneumonia parasitária revela com frequência a presença de inflamação eosinofílica, contudo esta não é patognomónica de infecção parasitária como foi referido anteriormente (Mair, 2007). Na presença de eosinofilia é recomendada a pesquisa de larvas no aparelho de Baermann de amostras fecais do paciente e dos potenciais hospedeiros reservatórios (Mair, 2007). Os cavalos adultos raramente desenvolvem infecção patente (2%), deste modo a obtenção de resultados negativos no teste de Baermann não exclui a hipótese de parasitose pulmonar (Mair, 2007). A confirmação da suspeita é realizada com base na combinação da exposição ao hospedeiro natural (no caso da parasitose por *Dictyocaulus arnfieldi*), alterações observados na endoscopia, perfil inflamatório eosinofílico na citologia de amostras obtidas por LBA, remissão dos sintomas após o tratamento com um antihelmíntico apropriado e, eventualmente a presença de eosinofilia periférica (Couëtil et al., 2007). A citologia da LT de cavalos com pneumonia fúngica poderá revelar inflamação neutrofílica, contudo também poderão ser observados eosinófilos e macrófagos (Pusterla et al., 2006). A observação de esporos fúngicos na citologia da LT por si só não é indicadora de pneumonia fúngica, na medida em que estes poderão ser observados no exame citológico de amostras obtidas a partir de cavalos sãos (Paxson, 2012). Assim, a presença de uma reacção inflamatória significativa e a detecção de hifas fagocitadas aumentam a suspeita de pneumonia fúngica (Paxson, 2012). O fungo *Aspergillus spp.* é isolado em cerca de 16% das amostras obtidas

por LT devido à inalação de esporos que poderá resultar ou não na infecção do aparelho respiratório (Rush & Mair, 2004). Para a diferenciação entre a exposição e a doença clínica é recomendada a repetição do isolamento podendo ser necessário proceder à confirmação através da observação de hifas no parênquima pulmonar no exame histopatológico (Rush & Mair, 2004). O diagnóstico de infecção viral primária é raro, pois com frequência esta última é acompanhada por infecção bacteriana secundária (Pusterla et al., 2006). Em alguns casos há aumento do número de linfócitos e das células epiteliais observados no exame citológico (Pusterla et al., 2006). As células epiteliais podem surgir isoladas ou aglomeradas com sinais de degeneração, cilicitoftoria, marginação da cromatina e/ou a presença de múltiplos núcleos (Van Erck, 2009). A inflamação neutrofílica poderá ocorrer na pneumonia causada por fungos à semelhança do que se observa na pneumonia bacteriana (Van Erck, 2009). O diagnóstico *ante mortem* da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* é geralmente realizado através da citologia de amostras obtidas por LBA coradas por técnicas específicas, tais como o Azul de Tuloidina, Gomori e Gram-Weigert (Roberts & Janovy, 2009). Na citologia observa-se um perfil de inflamação neutrofílica, os quistos surgem com uma coloração basofílica, com um formato oval ou irregular no interior dos macrófagos alveolares (Long, 2012). A LBA não é usada como um exame complementar de rotina em poldros com doença respiratória incorrendo-se o risco de não se poder diagnosticar esta forma de pneumonia e, conseqüentemente instituir a terapêutica mais indicada (Rush & Mair, 2004). A citologia e a cultura de amostras obtidas por LT não são apropriadas para o diagnóstico da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii*, dado que este não cresce em cultura e raramente está presente nas secreções traqueais (Roberts & Janovy, 2009). A nebulização com solução salina hipertónica 10 minutos antes da LT aumenta a taxa de recuperação do parasita aumentando a probabilidade de este ser observado no exame citológico (Rush & Mair, 2004). Na pneumonia intersticial geralmente ocorre a diminuição do número de neutrófilos na LT, enquanto na LBA poderá ocorrer o inverso (Lascola, 2012). A LT e a LBA não estão indicadas para o diagnóstico da pneumonia causada por metacéstodes (Zinkl, 2002).

2.4.5 Exame Microbiológico

O exame microbiológico das secreções respiratórias está indicado sempre que se suspeite de infecção respiratória (Dixon, 1997). As secreções recuperadas através da LBA são ocasionalmente submetidas para exame microbiológico, particularmente para o diagnóstico da pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* ou na presença de abscessos pulmonares (Dixon, 1997). Idealmente, este

exame deverá ser realizado a partir de amostras obtidas previamente à administração de antimicrobianos ou após o período de tempo necessário para a eliminação completa do princípio activo do organismo (24 a 72 horas) (Dixon, 1997). Na doença respiratória infecciosa, a cultura bacteriana poderá revelar a presença de mais do que uma população bacteriana dependendo da espécie animal, da idade e do estado clínico (Dixon, 1997). O número e o tipo de bactérias isoladas são dados importantes para a determinação do significado que se deverá atribuir aos resultados obtidos (Dixon, 1997). O diagnóstico é conseguido através do isolamento, exame microscópico e da detecção dos agentes infecciosos através da realização de testes bioquímicos, imunológicos ou moleculares refere o mesmo autor.

Para o isolamento de microorganismos é necessário proceder à cultura das amostras em meios de cultura adequados (sólidos, semi-sólidos ou líquidos) (Quinn, Markey, Carter, Donnelly & Leonard, 2005). Os meios de cultura sólidos têm a vantagem de facilitar o crescimento de colónias isoladas e a quantificação de bactérias (Quinn et al., 2005). Os meios de cultura líquidos permitem recuperar um pequeno número de bactérias podendo ser usados para estimular a multiplicação de bactérias nutricionalmente mais exigentes (Quinn et al., 2005). Na cultura bacteriana, o meio padrão usado para o isolamento de microorganismos é o agar sangue (Hirsh, Zee, & Castro, 2003). Muitos laboratórios também usam o agar MacConkey em conjunto com o anterior sendo as placas em ambos os casos incubadas em estufa nas condições ambientais (ex. temperatura, humidade relativa e concentração de oxigénio) apropriadas para otimizar o crescimento dos microorganismos presentes na amostra (Hirsh et al., 2003). O agar sangue é um meio enriquecido que favorece o crescimento da maior parte das bactérias (Hirsh et al., 2003). Este meio é usado para o isolamento primário, classificação de microorganismos com base na detecção da produção de hemolisinas e para a identificação presuntiva de *Haemophilus spp.* (Hirsh et al., 2003). O agar MacConkey é um meio selectivo para as enterobactérias (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) assim como para *Pseudomonas* não entéricas (Quinn et al., 2011). O crescimento de bactérias Gram-positivo (ex. estafilococos e enterococos) é inibido pela presença do Cristal Violeta presente no meio de cultura (Quinn et al., 2011). O agar MacConkey permite diferenciar as bactérias que fermentam a lactose das que não utilizam este açúcar (Quinn et al., 2011). Os subprodutos originados a partir da fermentação da lactose acidificam o meio tornando-o rosa, enquanto a fermentação de outros compostos (ex. peptona) é manifestada através de uma coloração amarelada do meio de cultura (Quinn et al., 2011). As placas são inoculadas usando a técnica de esgotamento por estria ou outra para facilitar o crescimento de colónias isoladas sendo posteriormente colocadas em estufa a 37 °C para estimular o crescimento bacteriano (Songer & Post, 2005). A maior parte das bactérias

produzem colónias visíveis 24 a 48 horas após incubação, contudo algumas necessitam de um maior período de tempo para o efeito (Songer & Post, 2005). Após o período de incubação estipulado, as placas devem ser avaliadas quanto à morfologia, número e tipo de colónias formadas e a quanto à presença de hemólise no agar sangue (Songer & Post, 2005). A tabela 17 resume os procedimentos usados para a identificação de microorganismos obtidos após cultura bacteriana.

Tabela 17 – Metodologia para a identificação de microorganismos na cultura bacteriana (adaptado de Quinn et al., 2005).

1	Morfologia e coloração das colónias
2	Presença ou ausência de hemólise no agar sangue
3	Coloração de Gram
4	Motilidade
5	Crescimento em agar MacConkey
6	Reacção no teste de oxidação-fermentação
7	Reacções nos testes de catalase e oxidase

As culturas bacterianas em meio líquido são avaliadas quanto ao grau de turvação, presença e tipo de sedimento (granuloso, floculoso, viscoso), presença de película superficial, entre outras características (Prescott, Harley & Klein, 2005a). Em relação ao meio sólido, as colónias isoladas deverão ser avaliadas tendo em conta o número, forma (punctiforme, circular, filamentosa, lenticular, etc.), elevação (plana, elevada, convexa, etc.), margem (ondulada, lobada, irregular, filamentosa, etc.), superfície (regular, rugosa, granular, etc.), consistência (seca, mucosa, mucopurulenta, etc.), transparência (opaca, translúcida), tipo de crescimento (rápido, moderado, lento), cor (branca, rosada, amarelada, esverdeada, etc.), diâmetro, odor, bem como outras características consideradas pertinentes para a identificação das bactérias (Prescott et al., 2005a). A determinação do número de bactérias é conseguida através da diluição seriada de um dado inóculo num meio de cultura adequado e incubação em estufa por um período de 24 a 48 horas a 37°C (Collins, Lyne, Grange & Falkinham, 2004). No caso dos meios de cultura líquidos, o número de bactérias é determinado através da comparação do grau de turvação obtido com escalas de turvação desenvolvidas para o efeito, produção de gás (ex. caldo de Bilis Verde Brilhante a 2%), cor (ex. meio de Baag, meio de Baird-Parker) (Collins et al., 2004). Na cultura em placa, o número de bactérias é obtido pela média de colónias presentes em duas placas multiplicado pelo factor de diluição e pelo volume de inóculo utilizado (Collins et al., 2004). O número de bactérias é apresentado sob a forma de unidades formadoras de colónias por mililitro (UFC/mL) (Collins et al.,

2004). Para que um microorganismo seja implicado na doença do aparelho respiratório será de esperar um crescimento moderado a intenso em cultura ($\geq 1 \times 10^6$ UFC/mL), a identificação de microorganismos fagocitados e a presença de neutrófilos degenerados (Dixon, 1997). Em determinadas situações, a morfologia das colónias, reacção hemolítica e as características de crescimento em meios selectivos ou diferenciais permitem a classificação dos microorganismos isolados numa dada família ou género (Forbes, Sahn & Weissfeld, 2007). Mas há casos em que é necessário recorrer a outros procedimentos para identificar o agente patogénico envolvido, nomeadamente testes bioquímicos, reacções enzimáticas (ex. catalase, oxidase), sensibilidade antimicrobiana, imunológicos e moleculares (Forbes et al., 2007). Os testes bioquímicos são baseados na capacidade de utilização de diferentes substratos como fonte de energia para o metabolismo bacteriano (Forbes et al., 2007). Estão disponíveis diferentes protocolos e *kitts* comerciais desenhados para a identificação de bactérias tendo em conta o padrão das reacções bioquímicas observadas no teste (Forbes et al., 2007). A catalase é uma enzima produzida pela maior parte das bactérias anaeróbias facultativas e aeróbias, tais como *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Listeria spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus spp.* e *Moraxella catarrhalis* (Aslanzadeh, 2006). Esta enzima decompõe o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água (Aslanzadeh, 2006). A presença da catalase (teste positivo) é demonstrada através da observação da formação de bolhas de ar aquando do contacto entre as colónias que codificam esta enzima com o peróxido de hidrogénio numa lâmina de vidro (Aslanzadeh, 2006). A oxidase está presente em todas as bactérias aeróbias (ex. enterobactérias) tendo um papel importante nas reacções de fosforilação oxidativa (Aslanzadeh, 2006). A presença de oxidase é demonstrada através da colocação de uma gota de reagente (N-dimetilparafenilenodiamina a 1% em álcoolisoamílico) sobre papel de filtro e a colocação de uma pequena porção da cultura sobre esta (Aslanzadeh, 2006). Na presença de oxidase (teste positivo) observa-se o aparecimento de uma cor azul escura no local onde se colocou a amostra, inversamente na ausência desta enzima não se observa qualquer alteração de cor (Aslanzadeh, 2006). O teste da sensibilidade antimicrobiana é um método amplamente usado em microbiologia que se baseia na resistência/sensibilidade dos microorganismos a diferentes agentes antimicrobianos (Qi, Stratton & Zheng, 2006). Este teste fornece informações essenciais no que concerne à terapêutica (selecção do princípio activo, cálculo da dose) e à caracterização fenotípica das bactérias com base na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração mínima bactericida (CMB) para cada antimicrobiano (Qi et al., 2006).

O exame microscópico das colónias obtidas poderá ser realizado através do microscópio óptico, de campo escuro (ex. *Brachyspira hyodysenteriae*, *Leptospira* e *Borrelia burgdorferi*) ou fluorescente (Songer & Post, 2005). Estão disponíveis diferentes técnicas de coloração para o exame microbiológico, tais como a coloração de Gram, Diff Quik, Wright-Giemsa ou de Ziehl-Neelsen (Songer & Post, 2005). A coloração de Gram é um dos métodos mais usados no exame microbiológico, pois providencia informações úteis para a caracterização fenotípica das bactérias (Kutasi, Balogh, Lajos, Nagy & Szenci, 2011). Esta técnica permite classificar as bactérias em dois grupos com base na composição química da parede e da membrana celular, em bactérias Gram-positivo e bactérias Gram-negativo (Kutasi et al., 2011). O método de Gram é uma técnica de coloração diferencial que consiste no uso de um corante primário (solução de roxo Genciana ou Cristal Violeta), de um mordente (soluto de Lugol), de um agente descorante (álcool a 95% ou álcool-acetona) e de um corante de contraste (Fucsina de Ziehl ou Safranina) (Shoemaker, 2009). Para a coloração preparar e fixar pelo calor os esfregaços das amostras recuperadas na LT ou na LBA (Shoemaker, 2009). Numa primeira fase cobrir o esfregaço com o Cristal de Violeta, ao fim de 2 a 5 minutos escorrer o corante e cobrir a lâmina com o mordente (Shoemaker, 2009). Cerca de 30 a 60 segundos depois lavar a lâmina com água destilada, diferenciar com a solução de álcool-acetona e lavar novamente para remover o excesso (Shoemaker, 2009). Por último cobrir o esfregaço com o corante de contraste e ao fim de 10 a 15 segundos lavar a lâmina com água destilada, deixar secar e observar ao microscópio óptico (Shoemaker, 2009). O Cristal Violeta cora o citoplasma bacteriano de púrpura através de uma ligação iónica entre os grupos básicos do corante e os grupos ácidos das células bacterianas (Prescott, Harley & Klein, 2005b). O soluto de Lugol aumenta a afinidade das ligações iónicas formadas entre o Cristal Violeta e a célula bacteriana formando um complexo insolúvel no citoplasma (Prescott et al., 2005b). O álcool actua como um solvente lípidico dissolvendo o complexo que se formou anteriormente (Prescott et al., 2005b). Este penetra mais facilmente na membrana celular das bactérias Gram-negativo onde dissolve o complexo deixando a célula incolor (Prescott et al., 2005b). Nas bactérias Gram-positivo, o álcool penetra com maior dificuldade no citoplasma não havendo dissolução do complexo e a célula mantém a coloração púrpura induzida pelo Cristal Violeta (Prescott et al., 2005b). O corante Fucsina de Ziehl cora o citoplasma das bactérias Gram-negativo de vermelho permitindo a sua diferenciação das bactérias Gram-positivo (Prescott et al., 2005b). O exame directo dos esfregaços corados pelo método de Gram tem um bom valor preditivo da cultura (bactérias Gram-positivo ou Gram-negativo) e poderá ser usado na selecção da terapêutica mais indicada enquanto se aguarda pelos resultados da cultura propriamente dita (Roy & Lavoie, 2003). Os corantes hematológicos (ex. Diff Quik, Wright-Giemsa) são usados aquando da suspeita da presença de determinados

microorganismos, nomeadamente *Pneumocystis carinii*, *Ehrlichia*, *Borrelia* ou *Rickettsia spp.* (Songer & Post, 2005). O corante de Ziehl-Neelsen é usado sobretudo na detecção de microorganismos como *Nocardia* e *Mycobacterium spp.* (Songer & Post, 2005).

Os procedimentos descritos acima têm como vantagens o facto de serem sensíveis, específicos, relativamente rápidos e de fácil realização (Wise, Carter & Flores, 2005). Contudo, a existência de espécies geneticamente similares torna a diferenciação com base nas características fenotípicas por si só mais complexa (Wise et al., 2005). Assim, o recurso a testes imunológicos (ex. ELISA, precipitação, aglutinação, fixação de complemento, etc.) ou moleculares (ex. PCR) é cada vez mais comum na rotina dos laboratórios de microbiologia (Wise et al., 2005). Estes testes são desenvolvidos para a detecção de antigénios, anticorpos ou de DNA/RNA de microorganismos que não se multiplicam ou que demoram mais tempo a crescer *in vitro*, tais como vírus, micobactérias, espiroquetas, entre outros (Wise et al., 2005). O advento dos testes imunológicos e moleculares na microbiologia contribuiu também para o conhecimento da patofisiologia e dos factores de virulência inerentes a diferentes agentes etiológicos associados à doença respiratória equina (ex. *African Horse Sickness*, anemia infecciosa equina, vírus *West Nile*, vírus influenza, HVE, entre outros) (Fortier et al., 2006).

A microflora residente do aparelho respiratório limita-se às cavidades nasais e faringe sendo composta principalmente por estreptococos e estafilococos coagulase-positivos cuja principal função é conferir resistência à colonização por microorganismo potencialmente patogénicos (Biberstein, 2003). A função da microflora orofaríngea é prejudicada pelo uso de antibióticos e pelas alterações ambientais que modificam a composição da flora residente (Biberstein, 2003). O tracto respiratório posterior é considerado uma região estéril (Biberstein, 2003). Contrariamente, o tracto respiratório anterior dos cavalos em estado hígido inclui muitas bactérias, tais como *Streptococcus spp.*, *Pasteurella spp.*, *Escherichia coli* e *Actinomyces spp.* (Davis, 2007). No cavalo saudável, as bactérias anaeróbias predominam na cavidade oral sendo delas exemplo *Bacteroides fragilis*, *Fusobacterium spp.*, *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Veillonella spp.* e *Megasphera spp.* (Davis, 2007). De um modo geral, na infecção do tracto respiratório posterior uma ou mais destas espécies poderão estar envolvidas (Davis, 2007). Este facto fortalece o conceito de que a contaminação das vias respiratórias mais distais ocorre a partir do tracto respiratório anterior provavelmente após o exercício, transporte prolongado ou durante o procedimento de colheita de secreções respiratórias (Davis, 2007). A passagem destes microorganismos para o tracto respiratório posterior por aspiração contribui assim para a acumulação de muco no aparelho respiratório favorecendo o desenvolvimento bacteriano (Davis, 2007). Esta contaminação é comum em animais

aparentemente sadios e muitos deles apresentam culturas bacterianas positivas, pelo que é necessário saber diferenciar entre a contaminação transitória do tracto respiratório posterior e a infecção propriamente dita segundo o mesmo autor.

A infecção do tracto respiratório posterior poderá ser causada por diferentes espécies bacterianas sendo frequentemente mista (Ode et al., 2007). Os estreptococos β -hemolíticos, sobretudo o *Streptococcus equi zooepidemicus*, são os microorganismos mais frequentemente isolados em cavalos adultos com broncopneumonia (Ode et al., 2007; Giguère, 2010). A bactéria *Streptococcus pneumoniae* não é reconhecida como agente de patologia respiratória em equinos (Sweeney, 1999). As bactérias Gram-negativo não entéricas, tais como *Pasteurella spp.* e *Actinobacillus spp.* são também comumente isoladas como agentes etiológicos únicos ou em conjunto com *Streptococcus zooepidemicus* (Giguère, 2010). As bactérias Gram-negativo entéricas, nomeadamente *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* e *Salmonella enterica* de igual modo podem ser isoladas em equinos com doença respiratória infecciosa (Giguère, 2010). Outras bactérias, como *Staphylococcus spp.*, *Rhodococcus equi*, *Pseudomonas spp.* e *Bordetella bronchiseptica* são ocasionalmente isoladas (Giguère, 2010). As bactérias anaeróbias são isoladas em aproximadamente um terço dos cavalos adultos com broncopneumonia, pleuropneumonia ou abecedação pulmonar severa, sendo delas exemplo *Bacteroides spp.* (sobretudo *Bacteroides fragilis*), *Clostridium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Fusobacterium spp.* e *Eubacterium spp.* (Giguère, 2010). As bactérias patogénicas como *Pseudomonas spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Proteus spp.* raramente causam infecção estando na maior parte das vezes associadas à contaminação durante a colheita não tendo um significado clínico importante (Hodgson, 2006). Destes microorganismos, a bactéria *Pseudomonas spp.* é comumente isolada em endoscópicos inadequadamente desinfectados entre cada exame (Hodgson, 2006). O isolamento de outras bactérias, tais como *Bacillus spp.* ou estafilococos coagulase negativos em cultura mista é um indicador de contaminação durante o processo de colheita de amostras (Hodgson, 2006). O grau de contaminação por bactérias orofaríngeas poderá ser estimado com base no número de células epiteliais escamosas na amostra, pois aparentemente existe uma relação linear entre o número de células epiteliais escamosas por mililitro de fluido e o número de UFC/mL na LT (Radostitis et al., 2009). Assim, a presença de uma contagem superior a 10 células epiteliais escamosas/mL é um indicador de um elevado grau de contaminação das amostras, pelo que é recomendada a repetição da colheita (Radostitis et al., 2009).

Os resultados do exame microbiológico deverão ser interpretados tendo em conta a informação fornecida pelo exame físico e pela citologia (Hewson & Viel, 2002). Assim, a maior ou menor

importância atribuída às informações obtidas está dependente da presença de um quadro clínico de doença respiratória (ex. febre, corrimento nasal, taquipneia, ruídos respiratórios adventícios, etc.), isolamento de bactérias reconhecidas como agentes etiológicos de doença respiratória, contagens bacterianas muito elevadas e um perfil citológico compatível com inflamação/infecção (ex. bactérias intracelulares, inflamação neutrofílica) (Schumacher & Holl, 2011).

3. Material e Método

3.1 Objectivos

O objectivo geral deste trabalho consistiu na implementação e desenvolvimento de um protocolo para a colheita, processamento e avaliação das secreções respiratórias em equinos. Secundariamente pretendeu-se comparar os tipos celulares obtidos na LT e na LBA em equinos sem história clínica e sinais de doença respiratória e, deste modo inferir sob a importância e aplicabilidade de ambas as técnicas no estudo da patologia respiratória.

3.2 Critérios de inclusão

Os animais usados neste trabalho foram seleccionados com base na ausência de um historial médico e a ausência de sinais clínicos de doença respiratória no exame físico que foi realizado previamente à colheita de secreções respiratórias.

3.3 Grupo de Animais

Neste trabalho foram utilizados cinco cavalos adultos (A1, A2, A3, A4 e A5), com idades compreendidas entre os 6 e os 12 anos de idade (tabela 18). Estes animais apresentavam uma boa condição corporal, o estado vacinal e de desparasitação estavam normalizados, eram mantidos em piquete sendo alimentados à base de silagem de milho e de ração.

Tabela 18 – Caracterização do grupo de animais utilizados no trabalho

	A1	A2	A3	A4	A5
Sexo	Fêmea	Fêmea	Fêmea	Macho	Macho
Idade (anos)	12 (06/2000)	11 (02/2001)	12 (02/2000)	9 (08/2003)	6 (11/2006)

Previamente à colheita, os cavalos foram submetidos a um exame físico completo (mucosas, TRC, palpação de linfonodos, auscultação cardíaca e pulmonar, FC, FR, determinação do estado de

hidratação, motilidade intestinal e temperatura), determinação do hematócrito e proteínas totais como poderá ser verificado na tabela 19. Os parâmetros avaliados não revelaram quaisquer alterações.

Tabela 19 – Relatório do exame físico, hematócrito e proteínas totais realizado previamente à colheita de amostras

	A1	A2	A3	A4	A5
Mucosas	Rosadas	Rosadas	Rosadas	Rosadas	Rosadas
TRC	< 2 seg	< 2 seg	< 2 seg	< 2 seg	< 2 seg
Linfonodos	Tamanho normal	Tamanho normal	Tamanho normal	Tamanho normal	Tamanho normal
Hidratação	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
FR (mrm)	20	26	24	16	16
FC (bpm)	44	46	40	38	38
MI	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
T (°C)	37.8	38.0	38.4	37.8	37.8
Hct (%)*	36	33	42	38	38
PT (g/dL)*	7.0	7.2	7.0	7.2	7.2

*Hematócrito 32-53 e Proteínas Totais 6.6-7.7 (Radostistis et al., 2009)

3.4 Metodologia

Este trabalho foi desenvolvido no hospital veterinário Luiz Quintiliano de Oliveira da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho durante o mês de Agosto de 2011. A metodologia usada para a colheita e processamento das amostras foi baseada em Schaer e Orsini (2007) com algumas adaptações. A cultura microbiana, a coloração de Gram e o teste da catalase foram realizados de acordo com o protocolo usado no laboratório de microbiologia da faculdade. Este trabalho foi iniciado com a endoscopia do aparelho respiratório, seguida da LBA e da LT tendo-se repetido a mesma sequência para todos os animais. A LT foi efectuada por meio de punção e aspiração transtraqueal. Para a LBA foi usado um catéter colocado no canal de trabalho do endoscópio para

maximizar a recuperação da solução fisiológica administrada. A qualidade das amostras foi avaliada com base no volume de fluido recuperado, aspecto espumoso nas amostras obtidas por LBA, coloração e quanto à presença de muco (quantidade, tipo) de acordo com Beech (1975). Foram efectuadas duas colheitas, uma no início do mês de Agosto e a segunda no final do mesmo mês. A segunda colheita foi levada a cabo para corrigir erros cometidos na colheita e processamento das amostras obtidas pela LT e LBA que tornaram impossível a contagem diferencial na primeira colheita. Infelizmente, não foi possível proceder à LBA na segunda colheita devido à indisponibilidade dos catéteres necessários para o procedimento. Seguidamente serão apresentados os protocolos usados para a colheita, processamento e avaliação das amostras obtidas através da LT e LBA.

3.4.1 Lavagem Broncoalveolar

Materiais

- Endoscópio flexível de fibra óptica com 160 cm de comprimento e 12 mm de diâmetro (Karl Storz Endoskope GMBH & Co.)
- Água destilada
- Seringa e agulha
- Xilazina
- Catéter para LBA (BD CAT 2.4 m, 6 mm)
- Seringas de 60 mL
- 300 mL de solução fisiológica a 0,9%
- Tubos com EDTA e sem anticoagulante

Método

As narinas foram higienizadas com solução fisiológica para reduzir a contaminação aquando da introdução do endoscópio. Foi necessário proceder à sedação do equino A4 tendo-se para tal usado 1 mg/Kg de xilazina IV. Para o exame, o endoscópio foi colocado numa das narinas (direita ou esquerda) em direcção ao meato nasal ventral. A cavidade nasal foi avaliada quanto a coloração da mucosa, presença de corrimento, edema, erosões, úlceras, entre outros. Para a observação da faringe

e tracto respiratório posterior, o endoscópio foi introduzido progressivamente ao longo do aparelho respiratório tendo-se observado a epiglote (coloração, morfologia), cartilagens aritenóides (mucosa, simetria e movimento), traqueia (mucosa, presença de muco e caracterização quanto à quantidade, tipo e localização) e, por último a região da bifurcação traqueal e brônquios principais pesquisando quaisquer alterações que pudessem indicar doença respiratória. No brônquio de menor diâmetro foi colocado o catéter para LBA (figura 2) no canal de trabalho do endoscópio e se procedeu à administração 50 mL de solução fisiológica tépida. O processo de instilação e recuperação foi repetido 3 vezes para maximizar a taxa de fluido recuperada (figura 3). Entre cada colheita, as amostras para citologia foram colocadas em tubos com EDTA e as para exame microbiológico em tubos sem anticoagulante sendo armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

Figura 3 – Catéter para LBA

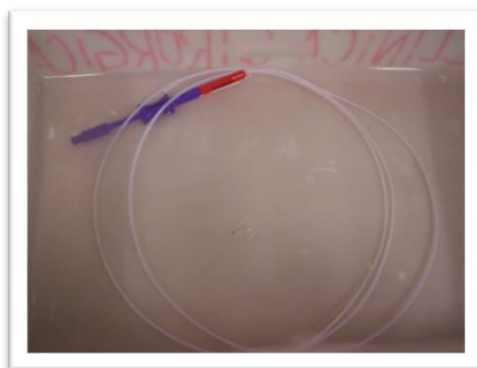


Figura 4 – Processo de instilação e recuperação da solução fisiológica na LBA



3.4.2 Lavagem e Aspiração Transtraqueal

Materiais

- Aziar
- Tosquiadora
- Material para preparação asséptica
- Luvas estéreis
- Catéter (19 G, 1.1 mm e 30.5 cm) com agulha (17 G, 1.5 mm e 5.1 cm) (BD Intracath, CAT. 785904)
- Seringas de 60 mL
- 100 mL de solução fisiológica a 0.9%
- Tubos contendo EDTA e sem anticoagulante
- Sistema de transporte para culturas

Método

Previamente à LT, todos os cavalos foram submetidos à tricotomia e assepsia (com solução de iodopovidona e álcool etílico) da região do terço médio ventral da traqueia correspondendo a uma área com aproximadamente 10 cm² na linha média (figura 5). A traqueia foi localizada e estabilizada manualmente e com a outra mão foi posicionada a agulha perpendicularmente à pele tendo-se posteriormente puncionado a traqueia entre dois anéis traqueais. Após a punção, o catéter foi direccionado para a entrada do tórax tendo-se removido o mandril, acoplado a seringa ao catéter e procedeu-se então à administração de 30 mL de solução fisiológica tépida. O fluido instilado foi rapidamente recuperado após a administração. Para maximizar a taxa de recuperação, o processo de administração e instilação de solução fisiológica foi repetido 3 vezes para cada animal. Após a colheita, o catéter foi retirado cuidadosamente para evitar a lesão dos anéis traqueais e tecido subcutâneo. As amostras destinadas para citologia foram colocadas em tubos contendo EDTA e as amostras para exame microbiológico em tubos sem anticoagulante, em ambos casos as amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C até o processamento.

Figura 5 – Preparação asséptica do local de punção na LT

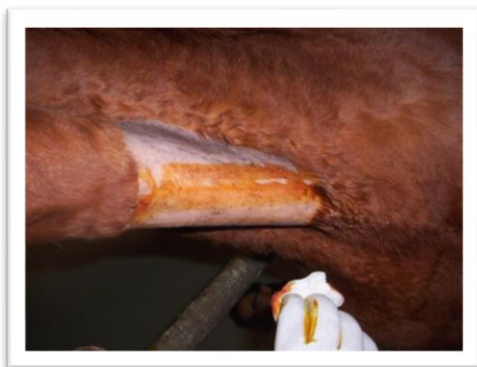
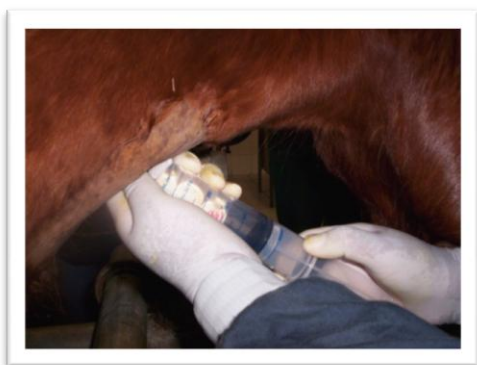


Figura 6 – Administração e recuperação da solução fisiológica na LT



3.4.3 Citologia

Materiais

- Pipeta
- Tubo cónico
- Centrífuga (Baby[®] I Centrifuge, Mod. 206 Brushless FANEM[®] São Paulo, Brasil)
- Suporte para lâminas
- Filtro citológico (FANEM[®], São Paulo, Brasil)
- Lâminas de vidro e lamelas
- Citocentrífuga (Centrífuga Citológica Microprocessada, 2000D REVAN CIRNTEC[®], São Paulo Brasil)

- Cubas para coloração
- Água destilada
- Corante Panótico (Panótico Rápido LB, Laborclin)

Método

Após a colheita foram centrifugados 300 µL de cada amostra em tubo cónico durante 10 minutos a 1500 rpm (rotações por minuto) tendo-se posteriormente eliminado o sobrenadante. Tendo em conta o grau de turvação de cada amostra foram pipetadas 50 e 100 µL do sedimento obtido para um suporte de lâminas com filtro citológico das amostras com maior e menor grau de turvação, respectivamente. As amostras foram colocadas na citocentrífuga durante 5 minutos a 1000 rpm. Após o processamento, as lâminas foram retiradas do suporte, sujeitas a fixação ao ar e coradas segundo a técnica do Panótico (corante tipo Romanowsky). Durante o processo de coloração, o esfregaço foi submetido à acção de um fixador e de duas soluções corantes através de imersões de 5 segundos cada. Para a coloração foram colocados os reagentes 1 (solução de triarilmetano a 0.1%), 2 (solução de xantenos a 0.1%) e 3 (solução de tiazinas a 0.1%) em cubas de coloração. As lâminas foram depositadas na solução 1 mantendo-se um movimento vertical contínuo durante 5 segundos. O mesmo procedimento foi repetido para as soluções 2 e 3. Posto isto, as lâminas foram lavadas com água destilada e colocadas em posição vertical num suporte para secarem para posteriormente serem observadas ao microscópico óptico.

No exame microscópico, as lâminas foram avaliadas tendo em conta a qualidade do esfregaço obtido, técnica de coloração e quanto ao grau de preservação celular. Para a contagem celular total e diferencial foram quantificadas 200 a 300 células consecutivas na menor e maior ampliação microscópica. Contudo, para uma melhor diferenciação celular recorreu-se à objectiva de imersão. Cada lâmina foi avaliada no sentido de estimar a percentagem de células epiteliais, de neutrófilos (hipersegmentados ou degenerados), eosinófilos, basófilos, linfócitos (de tipo reactivo ou plasmocítico) e a percentagem de eritrócitos íntegros. Na população de células epiteliais não foi realizada uma contagem propriamente dita, apenas foi determinado o tipo celular predominante, isto é, células epiteliais ciliadas ou células globulares.

Figura 7- Citocentrífuga

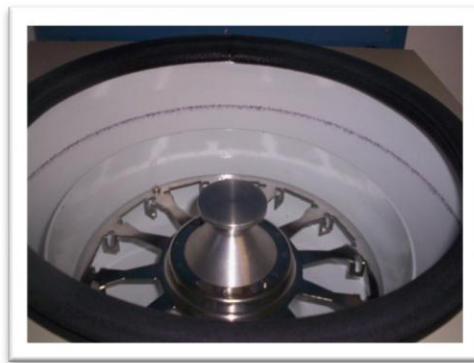


Figura 8 – Suporte e filtro citológico



3.4.4 Cultura Bacteriana

Material

- Pipeta
- Centrífuga (Baby[®] I Centrifuge, Mod. 206 Brushless FANEM[®] São Paulo, Brasil)
- Ansa de inoculação
- Meio de agar sangue
- Meio de agar MacConkey

Método

Após a colheita, as amostras destinadas para exame microbiológico foram submetidas a centrifugação durante 5 minutos a 1500 rpm tendo-se descartado o sobrenadante. O sedimento obtido foi usado para sementeira por esgotamento em meio de agar sangue e agar MacConkey, as placas foram colocadas em estufa a 37 °C e observadas às 24, 48 e 72 horas de incubação. As placas foram avaliadas tendo em conta a morfologia, número, tipo e coloração das colónias formadas bem como quanto à presença de hemólise no agar sangue.

3.4.5 Teste da Catalase

Materiais

- Cultura em meio sólido
- Peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 3%
- Pipeta
- Lâmina de vidro
- Ansa de inoculação

Método

Para o teste da catalase foi colocada uma gota de peróxido de hidrogénio numa lâmina de vidro ao qual foi adicionado uma pequena porção das colónias isoladas aguardando-se para inferir sob o tipo de bactérias presentes, isto é, catalase positivas ou negativas.

3.4.6 Coloração de Gram

Materiais

- Ansa de inoculação
- Meio de BHI (*brain heart infusion*)

- Lâminas de vidro e lamelas
- Água destilada
- Violeta Genciana
- Soluto de Lugol
- Solução álcool-acetona
- Fucsina de Ziehl

Método

Para a coloração de Gram, as colónias obtidas foram inoculadas em meio de BHI e colocadas em estufa a 37 °C durante 24 horas. O caldo de BHI é um meio de enriquecimento que pode ser usado para promover a multiplicação de diferentes microorganismos, nomeadamente para cultura de estreptococos, pneumococos, meningococos, enterobactérias, bactérias não fermentadoras, leveduras e fungos (Atlas, 2010). Após o período de incubação, o inóculo obtido foi usado para a preparação de um esfregaço deixando-se secar e, posteriormente recorreu-se ao calor para fixar a amostra. Para a coloração de Gram cobriu-se o esfregaço com o corante Violeta Genciana durante um minuto, após o período de tempo referido o corante foi removido e substituído pelo soluto de Lugol. Cerca de 15 a 20 segundos depois removeu-se o soluto de Lugol lavando a lâmina de vidro com água destilada, foi adicionada uma gota de álcool-acetona até a remoção completa do corante anterior e foi repetida a lavagem do esfregaço. Posteriormente foi adicionado o corante Fucsina de Ziehl e 2 a 3 segundos depois foi repetido o procedimento de lavagem do esfregaço. Após a coloração, deixar as lâminas secar e observar ao microscópio óptico com lente de imersão (ampliação 1000x). Microscopicamente, os esfregaços foram avaliados quanto à forma e dimensão das bactérias, modo de associação, presença eventual de esporos ou de outros contaminantes e, com base na reacção em bactérias Gram-positivo ou Gram-negativo.

3.5 Resultados

Os resultados apresentados são referentes à colheita de secreções respiratórias através da lavagem e aspiração transtraqueal realizada no final de Agosto de 2011.

Tabela 20 – Relatório do exame endoscópico realizado antes da colheita de secreções respiratórias

Observações	
A1	Mucosa da cavidade nasal rosada e húmida; epiglote, laringe, traqueia e bifurcação traqueal sem alterações.
A2	Mucosa da cavidade nasal rosada e húmida; alguns folículos linfóides de cor branca ao nível da parede lateral da laringe; epiglote, traqueia e bifurcação traqueal sem alterações; secreção mucosa de cor branca em pequena quantidade no terço médio da traqueia.
A3	Mucosa da cavidade nasal rosada e húmida; epiglote, laringe, traqueia e bifurcação traqueal sem alterações.
A4	Mucosa da cavidade nasal rosada e húmida; alguns folículos linfóides de cor branca e poucos de cor rosada na parede dorsal e lateral da laringe; secreção mucosa de cor branca em pequena quantidade no terço médio-distal da traqueia.
A5	Mucosa da cavidade nasal rosada e húmida; epiglote, laringe, traqueia e bifurcação traqueal sem alterações.

Tabela 21 – Contagem diferencial na citologia de amostras obtidas por LT em cavalos sem sinais clínicos de doença respiratória

	Macrófagos		Neutrófilos		CCT
	F	Fr	F	Fr	F
A1	197	0.36	16	0.26	213
A2	43	0.08	7	0.11	50
A3	136	0.25	18	0.30	154
A4	63	0.12	6	0.10	69
A5	104	0.19	14	0.23	118
Total	543	1	61	1	604
Média	-	27.2	-	2.8	120.8

Figura 9 – Macrófago alveolar com dois eritrócitos fagocitados na LT (Coloração Panótico, 1000x)

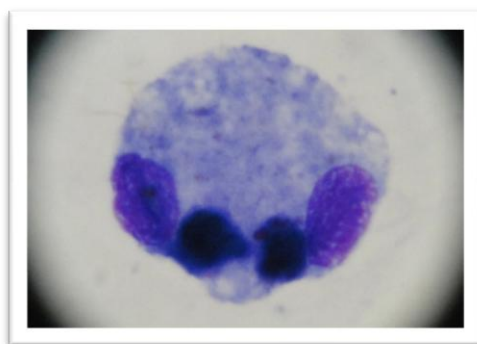


Figura 10 – Macrófago alveolar na LT (Coloração Panótico, 1000x)

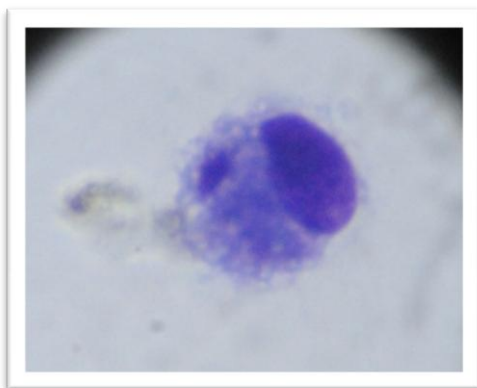


Figura 11 – Células globulares e alguns eritrócitos na LT, amostra A4 (Coloração Panótico, 1000x)

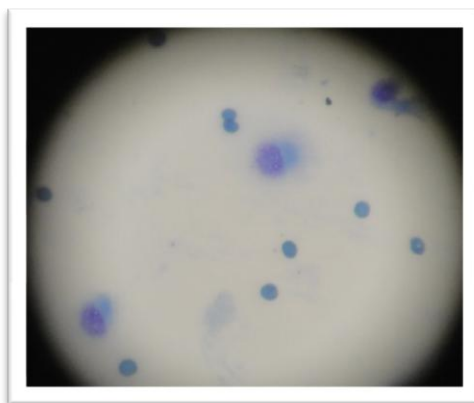


Figura 12 – Célula colunar ciliada na LT (Coloração Panótico, 1000x)

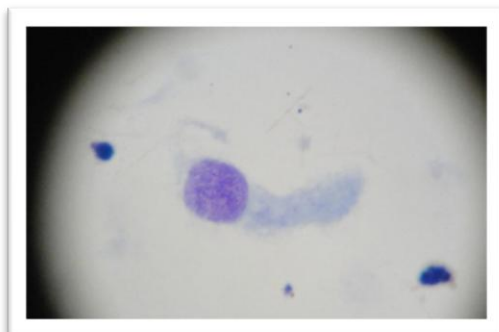


Figura 13 – Célula colunar ciliada na LT (Coloração Panótico, 1000x)

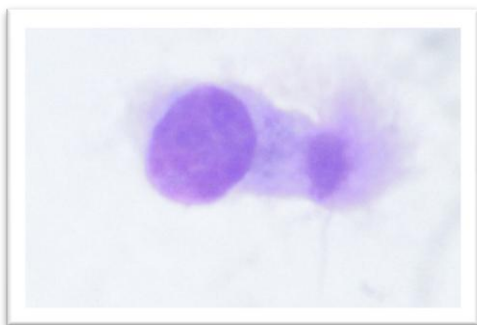


Figura 14 – Três células colunares ciliadas e um macrófago alveolar na LT (Coloração Panótico, 1000x)

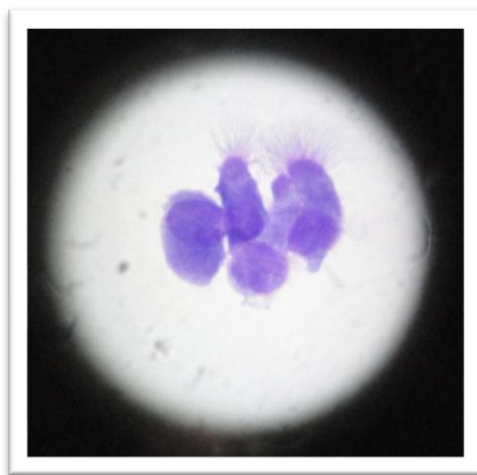


Tabela 22 – Caracterização das colónias isoladas no meio de agar sangue, resultados do teste da catalase (reacção positiva +, reacção negativa -) e coloração de Gram das amostras obtidas por LT

A1

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso sem hemólise	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	+	Cocobacilos Gram-negativo bipolares
Colónia 2	Colónias grandes, opacas, margens irregulares, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	Idem	+	Bacilos grandes Gram-positivo
Colónia 3	-	Colónias brilhantes, rosadas e redondas	Idem	+	Cocobacilos e cocos Gram-positivo

A2

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso sem hemólise	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	+	Cocobacilos Gram-negativo bipolares
Colónia 2	Colónias grandes, opacas, margens irregulares, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	Idem	+	Bacilos grandes Gram-positivo

A3

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso sem hemólise	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	+	Cocobacilos Gram-negativo bipolares
Colónia 2	Colónias grandes, opacas, margens irregulares, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	Idem	+	Bacilos grandes Gram-positivo
Colónia 3	-	Colónias brilhantes, rosadas e redondas	Idem	+	Cocobacilos e cocos Gram-positivo

A4

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso sem hemólise	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	+	Cocobacilos Gram-negativo bipolares
Colónia 2	Colónias grandes, opacas, margens irregulares, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	Idem	+	Bacilos grandes Gram-positivo

A5

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso sem hemólise	Inúmeras colónias pequenas, lisas e brilhantes, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	+	Cocobacilos Gram-negativo bipolares
Colónia 2	Colónias grandes, opacas, margens irregulares, branco-acinzentadas, com odor intenso com hemólise	Idem	Idem	+	Bacilos grandes Gram-positivo

Figura 15 – Hemólise numa placa de agar sangue de uma amostra obtida por LT

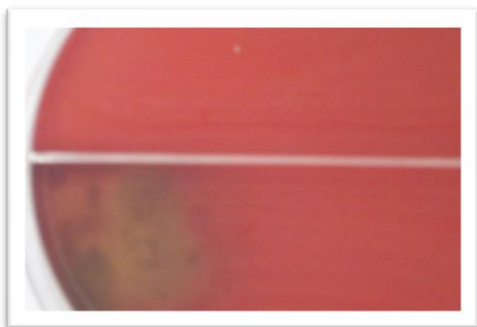


Figura 16 – Colónias em agar sangue de uma amostra obtida por LT



Figura 17 – Colónias formadas am agar sangue de uma amostra obtida por LT

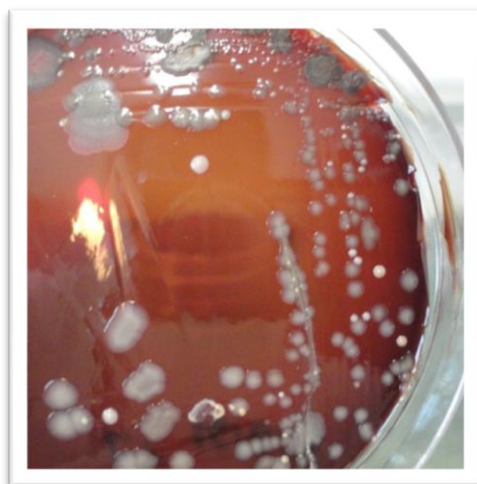


Tabela 23 – Caracterização das colónias isoladas no meio de agar MacConkey, resultados do teste da catalase (reacção positiva +, reacção negativa -) e coloração de Gram das amostras obtidas por LT

A1

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	-	Inúmeras colónias, lactose +, margens irregulares, mamilonadas com odor intenso	Idem	-	Bacilos Gram-negativo

A2

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	-	Inúmeras colónias, lactose +, margens irregulares, mamilonadas com odor intenso	Idem	-	Bacilos Gram-negativo

A3

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colónia 1	-	Inúmeras colónias, lactose +, margens irregulares, mamilonadas com odor intenso	Idem	-	Bacilos Gram-negativo

A4

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colônia 1	-	Inúmeras colônias, lactose +, margens irregulares, mamilonadas com odor intenso	Idem	-	Bacilos Gram-negativo

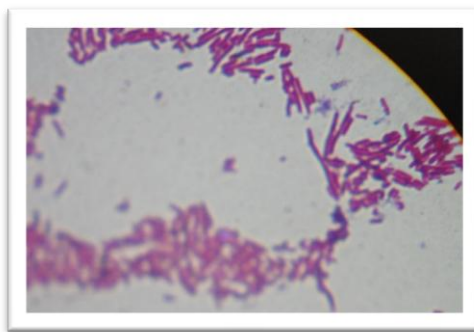
A5

	24 Horas	48 Horas	72 Horas	Catalase	Gram
Colônia 1	-	Inúmeras colônias, lactose +, margens irregulares, mamilonadas com odor intenso	Idem	-	Bacilos Gram-negativo

Figura 18 – Colônias obtidas na LT em agar MacConkey



Figura 19 – Bacilos na coloração de Gram, placa agar MacConkey (1000x)



3.6 Discussão e Conclusão

No exame físico que foi realizado previamente à colheita de secreções respiratórias não foram detectadas quaisquer evidências de doença respiratória, contudo o exame endoscópico revelou a presença de hiperplasia linfóide folicular de grau 1 no cavalo A2 e hiperplasia linfóide folicular de grau 1 para 2 no caso do cavalo A4 de acordo com a classificação de Woodie (2010). Esta condição ocorre com maior frequência em animais jovens não sendo considerada clinicamente relevante em equinos com idade inferior a 2 anos, uma vez que acaba por deixar de ser observada com o desenvolvimento do sistema imunitário (Byars, 2004). Nos equinos mais velhos, a hiperplasia linfóide folicular ocorre aquando da inflamação da nasofaringe por exposição a diferentes tipos de alergenicos, tais como bactérias, vírus ou outras partículas com capacidade antigénica (Holcombe & Ducharme, 2007). Os cavalos com hiperplasia linfóide folicular de grau 1 e 2 geralmente não apresentam nenhuma sintomatologia clínica não havendo indicação para tratamento médico (Holcombe & Ducharme, 2007). Os graus 3 e 4 poderão ser acompanhados por ruídos respiratórios adventícios e intolerância ao exercício devido à alteração do fluxo respiratório e à redução do diâmetro da laringe nos casos mais graves (Barakzai, 2007). Nestes casos estão indicados a vacinação (ex. vírus influenza, HVE-1 e 4), aplicação local de *sprays* antimicrobianos e/ou anti-inflamatórios ou tratamento cirúrgico (ex. aplicação de ácido tricloroacético, electrocauterização, crioterapia) (Rush & Mair, 2004).

A LT foi realizada de modo rápido e com um menor grau de dificuldade ao contrário do se estava à espera. A LBA foi um pouco mais trabalhosa devido ao esforço necessário para instilar e recuperar a solução fisiológica dado o diâmetro do catéter utilizado na colheita, assim com um grau de dificuldade moderado a marcado. O catéter usado neste trabalho apresentava um diâmetro inadequado para a LBA, pelo que a quantidade de fluido recuperado foi menor. Regra geral, a LT e

a LBA foram bem toleradas pelos cavalos usados neste trabalho exigindo o mínimo de contenção para garantir a segurança do procedimento. As colheitas foram realizadas no período da manhã para minimizar o período de tempo entre a colheita e o processamento das amostras. As amostras obtidas através da LT eram claras, com exceção da A4 que apresentava uma tonalidade levemente rosada devido à hemorragia iatrogénica que ocorreu no momento da punção traqueal. Macroscopicamente observou-se uma pequena quantidade de muco nas amostras A2 e A4 não tendo sido observados quaisquer outros detritos ou contaminantes. As amostras obtidas através da LBA realizada no início de Agosto de 2011 eram claras e não apresentavam o aspecto espumoso esperado neste procedimento. Entre cada colheita, as amostras destinadas para citologia foram colocadas em tubos com EDTA e as amostras para exame microbiológico foram transferidas para tubos sem anticoagulante e armazenadas sob refrigeração a 4 °C para garantir a máxima preservação das células.

No que concerne à citocentrifugação, esta se revelou um método importante no processamento das secreções traqueias com uma baixa contagem celular. Assim, na segunda colheita incluímos a citocentrifugação no processamento, uma vez que esta concentra as células num único ponto facilitando a contagem celular total. Ao contrário do que se constatou na primeira colheita obtivemos uma distribuição homogénea das células e a morfologia das células estava preservada o que nos permitiu fazer a contagem total e a contagem diferencial. A contagem celular total média obtida na segunda colheita foi de 120.8 células por esfregaço. Na citologia das amostras obtidas através da LT observou-se a predominância de células colunares ciliadas, células globulares e de macrófagos alveolares (27.2%), também foram observados alguns neutrófilos (2.1%) (tabela 21). Não foram visualizados linfócitos, eosinófilos, mastócitos ou contaminantes nas amostras, nomeadamente pólen, esporos fúngicos, células epiteliais escamosas ou outros. O número de eritrócitos presentes não foi determinado, na amostra A4 foram observados alguns eritrócitos devido à hemorragia iatrogénica que ocorreu durante a colheita (figura 10). Numa das amostras observou-se um macrófago alveolar de grande dimensão com citoplasma vacuolizado contendo dois eritrócitos fagocitados o que pode ser justificado por um episódio de hemorragia no aparelho respiratório dias antes da realização do procedimento (figura 8). Os valores obtidos na contagem diferencial são tendencialmente inferiores aos valores de referência publicados para a citologia de amostras obtidas através da LT em cavalos sem sinais clínicos de doença respiratória (tabela 15). Radostitis et al. (2009) referem que o desvio em relação aos valores no exame citológico variam consideravelmente dependendo da espécie, idade, manejo, do volume de fluido administrado, da presença e da gravidade da doença respiratória. As diferenças encontradas nos valores que

obtivemos muito provavelmente são devidas a pequenas variações na metodologia de colheita, número de animais usados, o diâmetro do catéter usado na LBA e a quantidade de solução fisiológica recuperada na LT e na LBA. Com a segunda colheita conseguimos corrigir alguns erros cometidos na primeira tentativa, porém os nossos resultados confirmam a necessidade de uma terceira ou quarta tentativas para aperfeiçoar o protocolo usado adequando-o à rotina do hospital onde este trabalho foi levado a cabo. Os critérios utilizados para a determinação de ausência e a contribuição do meio ambiente para o desenvolvimento de doença respiratória (ex. estábulo *versus* pastagem) são de igual modo dados importantes a considerar quando se pretende realizar este tipo de estudo. A falha no reconhecimento da presença de doença respiratória subclínica também pode contribuir para as variações encontradas. Neste trabalho os equinos utilizados foram seleccionados com base na ausência de sinais clínicos e de uma história clínica de doença respiratória tendo-se construído um grupo de cinco animais que cumpriam os critérios estabelecidos. Contudo, a realização da endoscopia e as informações obtidas com este exame revelaram que dois cavalos apresentavam hiperplasia linfóide folicular mas que não apresentavam quaisquer sinais de doença respiratória no exame físico.

No exame bacteriológico foram obtidos resultados similares no que concerne aos tipos e características das colónias formadas no agar sangue e no agar MacConkey, na coloração de Gram e no teste da catalase, como se pode verificar nas tabelas 22 e 23. No agar sangue ocorreu o crescimento de dois tipos distintos de colónias 24 horas após incubação. Às 48 horas constatou-se a presença de um terceiro tipo de colónia com características diferentes das anteriores ainda no agar sangue. No agar MacConkey só se verificou crescimento às 48 horas tendo-se observado a formação de apenas um tipo de colónia. Este meio de cultura é selectivo para enterobactérias sendo que uma vez presentes nas amostras, estas apresentam um crescimento rápido formando colónias às 24 horas após incubação. Assim, a significância atribuída a este crescimento é menor pois muito provavelmente ocorreu por contaminação ambiental. Todas as colónias foram repicadas e submetidas ao teste da catalase que se revelou positivo nas três situações. A cultura positiva de secreções traqueais obtidas a partir de animais saudáveis nem sempre é o resultado da presença de infecção traqueal, esta como foi referido anteriormente pode ser causada pela contaminação transitória do aparelho respiratório posterior. Assim, a interpretação dos resultados do exame microbiológico deverá ser feita tendo em conta se o exame clínico, a citologia e os microorganismos isolados confirmam a suspeita clínica de infecção respiratória. A caracterização das bactérias isoladas a partir da LT de cavalos está muito bem documentada. Não foram efectuados testes para a identificação das bactérias isoladas nas placas, pelo que os resultados e as

conclusões daí retirados foram baseados apenas nas características de crescimento, aspecto das colónias, teste da catalase, coloração de Gram e com base na microflora residente do aparelho respiratório equino. Deste modo, os resultados são apresentados como crescimento provável dos microorganismos *Pasteurella spp.* (colónia 1), *Bacillus spp.* (colónia 2) e de *Rhodococcus equi* (colónia 3) no agar sangue. A identificação bacteriana através de testes bioquímicos, enzimáticos, imunológicos ou moleculares é um procedimento essencial no exame microbiológico ainda que não tenha sido realizado no presente trabalho para evitar a subjectividade na identificação de microorganismos com base apenas nas características das colónias ou na reacção na coloração de Gram.

Em conclusão, a LT e LBA constituem dois métodos rápidos, fáceis e de baixo custo igualmente importantes para a investigação da patologia respiratória equina. Ambas permitem a obtenção de amostras representativas de diferentes porções do aparelho respiratório devendo por isso ser seleccionadas tendo em conta a suspeita clínica. Este trabalho realçou a necessidade de que haja uma padronização dos materiais, equipamentos, procedimentos de colheita e processamento das amostras para que se possa estabelecer comparações entre os diferentes valores de referência publicados anteriormente e partir daí sermos capazes de usar as informações obtidas para a confirmação da suspeita clínica. A citologia é um método rápido, relativamente económico e eficaz para o diagnóstico de inúmeras afecções. É importante salientar que apesar dos inúmeros exames complementares disponíveis actualmente, uma boa e completa história clínica e um correcto exame físico são de extrema importância para o reconhecimento do problema, estabelecimento da lista de diagnósticos diferenciais e na definição da abordagem a seguir para se chegar ao diagnóstico definitivo.

4. Bibliografia

1. Ainsworth, D.M. (2010). Review of recurrent airway obstruction (RAO, Heaves): diagnosis and treatment options. Proceedings of the American Association of Equine Practitioners – Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases. Salt Lake City, USA. Published in International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
2. Ainsworth, D.M. & Cheetham, J. (2010). Disorders of the respiratory system: diagnostic approach to respiratory disorders. In S.M. Reed, W.M. Bayly, & D.C. Sellon, Equine internal medicine (3rd Ed). (pp. 289-341). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
3. Allen, G.P. (2002). Respiratory infections by equine herpesvirus types 1 and 4. In P. Lekeux (Ed.), Equine Respiratory Diseases. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
4. Allen, K. & Franklin, S. (2007). RAO and IAD: respiratory disease in horses revisited. In Practice, 29, 76-82.
5. Anon (2003). Workshop summary. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 89-91). R & W Publications, Newmarket.
6. Aslanzadeh, J. (2006). Biochemical profile-based microbial identification systems. In Y.W. Tang & C.W. Stratton, Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. (pp. 84-116). New York: Springer Science+Business Media, LLC.
7. Atlas, R.M. (2010). Handbook of microbiological media (4th Edition). (pp. 130, 244). Washington D.C.: CRR Press, Taylor & Francis Group.
8. Barr, B.S. (2006). *Rhodococcus equi* pneumonia in a foal. Veterinary Clinics, Equine Practice, 22, 239-246.
9. Barakzai, S. (2007). Trachea and bronchi. Handbook of equine respiratory endoscopy. (pp. 89-102). Philadelphia: Saunders Elsevier.
10. Beech, J. (1975). Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. Veterinary Pathology, 12, 157-164.
11. Biberstein, E.L. (2003). O tracto respiratório como habitat microbiológico. In D.C. Hirsh & Y.C. Zee, Microbiologia veterinária. (pp. 106-107). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
12. Brazil, T. (2010). A practitioner's guide to bronchoscopy in the horse. Proceedings of the European Veterinary Conference: Voorjaarsdagen, Amsterdam, the Netherlands, 22-24 April, pp. 277-278. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
13. Brinton, M.A. & Snijder, E.J. (2008). Arteriviruses. In B.W.J. Mahy & M.H.V. Van Regenmortel, Encyclopedia of virology (3rd Ed.). (pp. 176-185). Oxford: Academic Press.

14. Burrell, M.H., Wood, J.L.N., Whitwell, K.E., Chanter, N., Mackintosh, M.E. & Mumford, J.A. (1996). Respiratory disease in thoroughbred horses in training: the relationships between disease and viruses, bacteria and environment. *Veterinary Record*, 139, 308-313.
15. Byars, D. (2004). Pharyngoscopy and laryngoscopy. In N.M. Slovis, *Atlas of equine endoscopy*. (pp. 55-81). St. Louis, Missouri: Mosby.
16. Carter, G.R. & Davis, E. (2007). Microbial diseases discussed in alphabetical order. In G.R. Carter, P.A. Payne & E. Davis (Eds.). *A concise guide to the microbial and parasitic diseases in horses*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
17. Chapman, P.S., Green, C., Main, J.P.M., Taylor, P.M., Cunningham, F.M., Cook, A.J.C. & Marr, C.M. (2000). Retrospective study of the relationships between age, inflammation and the isolation of bacteria from the lower respiratory tract of thoroughbred horses. *Veterinary Record*, 146, 91-95.
18. Christley, R.M. & Rush, B.R. (2007). Inflammatory airway disease. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 591-600). Philadelphia: Elsevier Saunders.
19. Christley, R.M., Hodgson, D.R., Rolse, R.J., Reid, S.W.J. & Hodgson, J.L. (1999). Comparison of bacteriology and cytology of tracheal fluid samples collected by percutaneous transtracheal aspiration or via an endoscope using a plugged, guarded catheter. *Equine Veterinary Journal*, 31 (3), 197-202.
20. Christley, R.M., Hodgson, D.R., Rose, R.J., Hodgson, J.L., Wood, J.L. & Reid, S.W. (2001.) Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Veterinary Record*. 148, 99-104.
21. Clutton, R.E. (2007). Blood gas analysis. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 201-209). Philadelphia: Elsevier Saunders.
22. Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. & Falkinham, J.O. (2004). Estimating microbial numbers. In Collins and Lyne's *Microbiological Methods* (8th Ed.). (pp.144-155). London: Arnold.
23. Costa, L.R.R. (2012). Summer pasture-associated recurrent airway obstruction. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 591-593). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
24. Couëtil, L.L., Hoffman, A.M., Hodgson, J., Buechner-Maxwell, V., Viel, L., Wood, J.L.N & Lavoie, J.P. (2007). Inflammatory airway disease of horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 356-361.
25. Davidson, E.J. & Martin, B.B. (2003). Diagnosis of upper respiratory tract disease in the performance horses. *The Veterinary Clinics, Equine Practice*, 19, 51-62.
26. Davis, E.C. (2007). Respiratory infections. In D.C. Sellon, & M.T., Long, *Equine infectious diseases*. (pp. 1-13). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

27. Davis, E. & Rush, B.R. (2002). Equine recurrent airway obstruction: pathogenesis, diagnosis and patient management. *The Veterinary Clinics, Equine Practice*, 18, 453-467.
28. Davis, M.S. & Foster, W.M. (2002). Inhalation toxicology in the equine respiratory tract. In P. Lekeux (Ed.). *Equine respiratory diseases*. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
29. De Brauwer, E.I., Jacobs, J.A., Nieman, F., Bruggeman, C.A. & Drent, M. (2002). Bronchoalveolar lavage fluid differential cell count. How many cells should be counted? *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 24, 337-341.
30. Denicola, D.B. (2007). Introduction to cytologic interpretation. *Proceedings of the North American veterinary Conference*, Orlando, Florida, 13-27 January, pp. 232-238. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
31. Dixon, P.M. (1997). Ancillary diagnostic techniques for the investigation of equine pulmonary disease. *Equine Veterinary Education*, 9 (2), 72-80.
32. Dixon, P.M., McGorum, B.C. & Pirie, R.S. (2003). Inflammatory airway disease: European clinicians' perspective. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 7-8). R & W Publications, Newmarket.
33. Doucet, M. Y. & Viel, L. (2002). Alveolar macrophage graded hemosiderin score from bronchoalveolar lavagem in horses with exercise-induced pulmonary hemorrhage and controls. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 16, 281-286.
34. Durando, M. (2012). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 192-193). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
35. Eaton, B.T. & Wong, L.F. (2008). Henipaviruses. In B.W.J. Mahy & M.H.V. Van Regenmortel, *Encyclopedia of virology* (3rd Ed.). (pp. 321-327). Oxford: Academic Press.
36. Erickson, H.H. (2000). A review of exercise-induced pulmonary hemorrhage and new concepts for prevention. In *Proceedings of the 46th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners (AAEP)*, 26-27 November, San Antonio Texas.
37. Feitosa, F.L.F. (2004). Exame físico geral ou de rotina. In F.L.F. Feitosa, *Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico*. (pp. 77-102). São Paulo: Editora Roca.
38. Forbes, B.A., Sahm, D.F. & Weissfeld, A.S. (2007). Traditional cultivation and identification. In *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (12th Ed.). (pp. 93-119). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
39. Fortier, G., Léon, A., Pronost, S., Laugier, C., Giguère, S. & Zientara, S. (2006). Current trends in equine infectious diseases diagnosis. *Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association*, 22-26 January, Marrakech, Morocco.
40. French, C.A. (2009). Respiratory tract. In E.S. Cibas & B.S. Ducatman, *Cytology Diagnostic Principles and Clinical Correlates* (3rd Ed.). (pp. 65-70). Philadelphia: Saunders Elsevier.

41. Gerber, V. & Robinson, N.E. (2007). Airway secretions and mucociliary function. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 55-69). Philadelphia: Elsevier Saunders.
42. Ghio, A.J. (2003). Aetiological agents: outdoor environment and airways. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 29-30). R & W Publications, Newmarket.
43. Giguère, S. (2000). *Rhodococcus equi* infections. In P.A. Wilkins & J.E. Palmer (Eds.), *Recent advances in equine neonatal care*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
44. Giguère, S. (2010). Pneumonia in adult horses. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners – Focus on upper and lower respiratory diseases*, Salt Lake City, UT, USA. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
45. Giguère, S. (2010b). Rhodococcal pneumonia. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners – Focus on upper and lower respiratory diseases*, Salt Lake City, UT, USA. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
46. Giguère, S. & Jacks, S. (2005). Immunity to *Rhodococcus equi* infections in foals and adult horses: implications for vaccine design. In D.M. Ainsworth, B.C. McGorum, L. Viel, N.E. Robinson & N.G. Ducharme (Eds.), *Third World Equine Airways Symposium*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
47. Gonçalves, R.C. (2004). Semiologia do sistema respiratório. In F.L.F. Feitosa, *Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico*. (pp. 314-331). São Paulo: Editora Roca.
48. Greet, T. (2008). The Management of diseases causing equine dynamic upper airway obstruction. *Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association*, Moscow, Russia. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
49. Gruntman, A.M. (2012). Pneumonia, parasitic. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 454-455). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
50. Gruntman, A.M. (2012b). Pneumonia, viral. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 455-457). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
51. Hagid, J.H. (2006). Pneumonia and pleuritis in a mare. *Veterinary Clinics, Equine Practice*, 22, 247-254.
52. Hanson, R.R. (2012). Smoke inhalation. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (457-458). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
53. Hewson, J. & Viel, L. (2002). Sampling, microbiology and cytology of the respiratory tract. In P. Lekeux (Ed.), *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).

54. Hines, M.T. (2004). *Rhodococcus equi*. In D.C. Sellon, & M.T. Long, Equine infectious diseases. (pp. 281-295). St. Louis, Missouri: Saunders: Elsevier.
55. Hines, S. (2012). Adenovirus. In D.A. Wilson. Clinical veterinary advisor: the horse. (pp. 7-8). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
56. Hinchcliff, K.W. (2007). Exercise-induced pulmonary hemorrhage. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), Equine Respiratory Medicine and Surgery. (pp. 619-629). Philadelphia: Elsevier Saunders.
57. Hirsh, D.C., Zee, Y.C. & Castro, A.E. (2003). Diagnóstico Laboratorial. In D.C. Hirsh & Y.C. Zee, Microbiologia veterinária. (pp. 14-16). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.
58. Hodgson, J.L. (2006). Collection and interpretation of tracheal wash and bronchoalveolar lavage for diagnosis of infectious and non-infectious lower airway disorders. Proceedings of the 9th International Congress of World Equine Veterinary Association, Marrakech, Morocco, 22 – 26 January. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
59. Hodgson, J.L. & Hodgson, D.R. (2007). Collection and analysis of respiratory tract samples. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), Equine Respiratory Medicine and Surgery. (pp. 119-149). Philadelphia: Elsevier Saunders.
60. Hoffman, A. (2002). Newest diagnostic methods for inflammatory airway disease. In: Annual Convention of the AAEP Proceedings, vol. 48. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
61. Hoffman, A.M. (2008). Bronchoalveolar lavage: Sampling technique and guidelines for cytologic preparation and interpretation. The Veterinary Clinics - Equine Practice, 423-435.
62. Holcombe, S.J., Jackson, C., Gerber, V., Jefcoat, A., Berney, C., Eberhardt, S. & Robinson, N.E. (2001). Stabling is associated with airway inflammation in young Arabian horses. Equine Veterinary Journal, 33 (3), 244-249.
63. Holcombe, S.J., Robinson, N.E., Derksen, F.J., Bertold, B., Genovese, R., Miller, R., De Feiter Rupp, H., Carr, E.A., Eberhardt, S., Boruta, D. & Kaneene, J.B. (2006). Effect of tracheal mucus and tracheal cytology on racing performance in Thoroughbred racehorses. Equine Veterinary Journal, 38 (4), 300-304.
64. Holcombe, S.J. & Ducharme, N.G. (2007). Disorders of the nasopharynx and soft palate. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), Equine Respiratory Medicine and Surgery. (pp. 437-457). Philadelphia: Elsevier Saunders.
65. Horohov, D.W. (2004). Immunology of the equine lung. In P. Lekeux (Ed.), Equine Respiratory Diseases. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
66. Hughes, K.J., Malikides, N., Hodgson, D.R. & Hodgson, J.L. (2003). Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 1. Evaluation of cytological stains and the percentage of mast cells and eosinophils. Australian Veterinary Journal, 81 (11), 681-684.

67. Junqueira, L.C. & Carneiro, J. (2004). Aparelho respiratório. (pp. 339-357). Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S.A.
68. Kusano, K., Hobo, S., Ode, H. & Ishikawa, Y. (2008). Tracheal endoscopic and cytological findings and blood examination results in thoroughbred racehorses suspected to have lower respiratory tract disease. *Journal of Equine Science*, 19 (4), 97-102.
69. Kutasi, O., Balogh, N., Lajos, Z., Nagy, K. & Szenci, O. (2011). Diagnostic approaches for the assessment of equine chronic pulmonary disorders. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31, 400-410.
70. Lamb, R.A. (2008). Influenza. In B.W.J. Mahy & M.H.V. Van Regenmortel, *Encyclopedia of virology* (3rd Ed.). (pp. 95-103). Oxford: Academic Press.
71. Langsetmo, I., Fedde, M.R., Meyer, T.S. & Erickson, H.H (2000). Relationship of pulmonary arterial pressure to pulmonary haemorrhage in exercising horses. *Equine Veterinary Journal*, 32, 379-384.
72. Lascola, K.M. (2012). Pneumonia, interstitial foal (pp. 452-453). In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
73. Laus, F., Attili, A.R., Cerquetella, M., Spaterna, A., Tesei, B. & Cuteri, V. (2009). Endoscopic findings, microbiological and cytological evaluation of tracheal aspirates in a population of Standardbred horses with poor performance. *Veterinari Medicina*, 54, 444-450.
74. Lavoie, J.P. (2007). Recurrent airway obstruction (heaves) and summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 565-589). Philadelphia: Elsevier Saunders.
75. Leclere, M., Desnoyers, M., Beauchamp, G. & Lavoie, J.P. (2006). Comparison of four staining methods for detection of mast cells in equine bronchoalveolar lavage fluid. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20, 377-381.
76. Léguillette, R., Roy, M.F. & Lavoie, J.P. (2002). Foal pneumonia. In P. Lekeuk (Ed.), *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (www.ivia.org).
77. Léguillette, R. (2003). Recurrent airway obstruction. *The Veterinary Clinics, Equine Practice*, 19, 63-86.
78. Long, M.T. (2012). *Pneumocystis*. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (p. 449-451). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
79. Lunn, D.P., Breathnach, C. & Soboll, G. (2007). Immunology and immunopathology. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 71-81). Philadelphia: Elsevier Saunders.
80. MacLachlan, N.J. & Dubovi, E.J. (2011). *Fenner's Veterinary Virology* (4th Ed.). (pp.321-322). London: Academic Press.

81. Mair, T.S. (1996). Obstructive pulmonary disease in 18 horses at summer pasture. *Veterinary record*, 138, 89-91.
82. Mair, T.S. (2007). Miscellaneous pulmonary disorders. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 601-615). Philadelphia: Elsevier Saunders.
83. Malikides, N., Hughes, K.J. & Hodgson, J.L (2003). Comparison of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage in racehorses. 2. Evaluation of the diagnostic significance of neutrophil percentage. *Australian Veterinary Journal*, 81 (11), 685-687.
84. Marlin, D.J. & Vicent, T.L. (2007). Pulmonary blood flow. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 33-42). Philadelphia: Elsevier Saunders.
85. Marsh, P.S. (2009). Smoke inhalation. In B.P. Smith, *Large animal internal medicine* (4th Edition). (555-556). St. Louis, Missouri: Mosby.
86. Mayhew, I.G. (2000). Clinical examination of horses and foals. In O.M. Radostitis, I.G.J. Mayhew & D.M. Houston (Eds.), *Veterinary clinical examination and diagnosis*. (pp. 139-149). London, UK: Elsevier W.B. Saunders.
87. Mazan, M.R. (2010). How to examine the equine respiratory system. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases*, Salt Lake City, UT. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
88. Mazan, M.R. (2010b). Inflammatory airway disease in the horse. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases*, Salt Lake City, UT. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
89. Mazan, M.R. (2012). Inflammatory airway disease. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (p. 297-298). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
90. Mazan, M.R. & Tizard, I. (2012). Airway obstruction, recurrent. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (p. 16-17). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
91. McGorum, B.C., Dixon, P.M., Radostitis, O.M. & Abbott, J.A. (2000). Clinical examination of the respiratory tract. In O.M. Radostitis, I.G.J. Mayhew & D.M. Houston (Eds.), *Veterinary clinical examination and diagnosis*. (pp. 299-346). London, UK: Elsevier W.B. Saunders.
92. McGorum, B.C. & Dixon, P.M. (2007). Clinical examination of the respiratory tract. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 103-117). Philadelphia: Elsevier Saunders.
93. McGorum, B.C. & Prie, R.S. (2003). Aetiological agents: indoor environment and endotoxins. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 27-28). R & W Publications, Newmarket.

94. McKane, S.A. (2010). Tracheal wash and bronchoalveolar lavage: sampling technique and fluid interpretation. Proceedings of the 49th British Equine Veterinary Association Congress BEVA, Birmingham, United Kingdom, 8-11 September. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
95. Mendes, L.C.N. & Peiró, J.R. (2004). Semiologia do sistema digestório de equinos. In F.L.F. Feitosa, *Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico*. (pp. 139-179). São Paulo: Editora Roca.
96. Meuten, D.J., Raskin, R.E. & Rebar, A.H. (2005). Cytology of internal organs. Proceedings of the North American Veterinary conference, 8-12 January, Orlando, Florida. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
97. Meyer, T.S., Fedde, M.R., Gaughan, E.M., Langsetmo, I. & Erickson, H.H. (1998). Quantification of exercise-induced pulmonary haemorrhage with bronchoalveolar lavage. *Equine Veterinary Journal*, 30, 284-288.
98. Neto, D.M. (2004). Semiologia do sistema circulatório de equinos e ruminantes. In F.L.F. Feitosa, *Semiologia Veterinária, a Arte do Diagnóstico*. (pp. 234-281). São Paulo: Editora Roca.
99. Newton, J.R., Wood, J.L. & Chanter, N. (2003). A case control study of factors and infections associated with clinically apparent respiratory disease in UK thoroughbred racehorses. *Preventive Veterinary Medicine*, 60, 107-132. Elsevier
100. Newton, J.R., Wood, J.L.N., Smith, K.C., Marlin, D.J. & Chanter, N. (2003b). Aetiological agents: bacteria. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 40-44). R & W Publications, Newmarket.
101. Nolen-Walston, R.D. & Sweeney, C.R. (2009). Equine restrictive lung disease, part 3: Interstitial diseases. In P. Lekeux (Ed.). Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
102. Ode, H., Hobo, S., Katayama, Y., Niwa, H., Kuwamoto, Y., Yamane, T. & Anzai T. (2007). Cytological and bacteriological observation of tracheal aspirates and bronchoalveolar lavage fluid obtained from thoroughbred racehorses with pneumonia associated with transport. *Journal of Equine Science*, 18 (4), 161-165.
103. Osterrieder, N. (2009). Herpesvirus in horses – The current status. Proceedings of the 4th World Equine Airways Symposium, Berne, Switzerland, 5-7 August. pp. 141-144. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
104. Payne, P.A., Carter, G.R. (2007). Parasitic diseases: cestodes, hydatidosis, trematodes and other trematodes. In G.R. Carter, P.A. Payne and E. Davis (Eds.). *A concise guide to the microbial and parasitic diseases of horses*. Ithaca, New York: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
105. Paxson, J.A. (2012). Pneumonia, fungal. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 451-452). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.

106. Piero, F.D. & Wilkins, P.A. (2009). Equine thoracic neoplasia. In B.P. Smith, Large animal internal medicine (4th Edition). (pp.576-577). St. Louis, Missouri: Mosby.
107. Phillips, T.J. & Dixon, P.M. (2000). Clinical examination of the alimentary system, horses. In O.M. Radostitis, I.G.J. Mayhew & D.M. Houston (Eds.), Veterinary clinical examination and diagnosis. (pp. 364-414). London, UK: Elsevier W.B. Saunders.
108. Pilette, C., Ouadrhiri, Y., Godding, V., Vaerman, J.P. & Sibille, Y. (2001). Lung mucosal immunity: immunoglobulin A revisited. In M. Spiteri & L.P. Nicol (Eds.), Series "Lung infection and lung immunity", number 1. European Respiratory Journal, 18, 571-588.
109. Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005a). Microbial nutrition. Microbiology (6th Edition). (pp. 102-108). New York, USA: McGraw Hill.
110. Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (2005b). The study of microbial structure: microscopy and specimen preparation. Microbiology (6th Edition). (pp. 17-30). New York, USA: McGraw Hill.
111. Pusterla, N., Watson, J.L. & Wilson, W.D. (2006). Diagnostic approach to infectious respiratory disorders. Clinical Techniques in Equine practice, 5, 174-186.
112. Qi, C., Stratton, C.W. & Zheng, X. (2006). Phenotypic testing of bacterial antimicrobial susceptibility. In Y.W. Tang & C.W. Stratton, Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. (pp. 63-83). New York: Springer Science+Business Media, LLC.
113. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. & Leonard, F.C. (2005). Diagnóstico laboratorial de doenças bacterianas. Microbiologia veterinária e das doenças infecciosas. (pp. 37-41, 61-73, 90-93, 115-122 e 143-148). Porto Alegre: Artemed.
114. Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J. (2011). Laboratory diagnosis of bacterial disease. In Veterinary Microbiology and Microbial Disease (2nd Ed.). (pp. 173-180). West Sussex: Wiley-Blackwell.
115. Radostitis, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D. (2009). Diseases of the respiratory system. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses (10th ed). (pp. 470-519). London, UK: W.B. Saunders Elsevier.
116. Raskin, R.E., Meuten, D.J. & Rebar, A.H. (2005). General principles of cytologic interpretation. Proceedings of the North American Veterinary conference, 8-12 January, Orlando, Florida. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
117. Richard, E.A., Fortier, G.D., Denoix, J.M., Art, T., Lekeux, P.M. & Van Erck, E. (2009). Influence of subclinical inflammatory airway disease on equine respiratory function by impulse oscillometry. Equine Veterinary Journal, 41, 384-389.
118. Richard, E.A., Fortier, G.D., Lekeux, P.M. & Van Erck, E. (2010). Laboratory findings in respiratory fluids of the poorly-performing horse. The Veterinary Journal, 185, 115-122.
119. Roberts, L. & Janovy, J. (2009). *Pneumocystis carinii*. Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts Foundations of parasitology (8th Ed.). (pp. 143-144). New York: McGraw Hill.

120. Robinson, N.E. (2001). International workshop on equine chronic airway disease. 16-18 June 2000, Michigan State University. *Equine Veterinary Journal*, 33, 5-19.
121. Robinson, N.E. (2008). Equine COPD, heaves, RAO, IAD: understanding the phenotypes of equine airway disease. In *Proceeding of the Southern European Veterinary Conference*, 17-19 October, Barcelona, Spain. Published in *International Veterinary Information Service* (www.ivis.org).
122. Robinson, N.E. & Furlow, P.W. (2007). Anatomy of the respiratory system. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 3-18). Philadelphia: Elsevier Saunders.
123. Robinson, N.E. & Hoffman, A. (2003). Inflammatory airway disease: defining the syndrome. *Conclusions of the Havemeyer workshop*. *Equine Veterinary Education*, 15, 61-63.
124. Roy, M.F. & Lavoie, J.P. (2003). Tools for the diagnosis of equine respiratory disorders. *The Veterinary Clinics – Equine Practice*, 19, 1-17.
125. Rush, B. & Mair, T. (2004). *Equine respiratory disease* (1st Ed.). (pp. 1-9; 237-240; 291-294) Oxford: Blackwell Science Ltd.
126. Rush, B. (2006). Infectious respiratory diseases. *Proceedings of the North American Veterinary Conference*, 7-11 January, Orlando, Florida,
127. Schaer, B.D. & Orsini, J.A. (2007). Respiratory system. Diagnostic and therapeutic procedures. In J.A. Orsini & T. Divers, *Equine emergencies: treatment and procedures* (3rd Edition). (pp. 436-439). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
128. Schumacher, J. & Holl, H.D. (2011). Collection of lower airway secretion. In J. Schumacher & H.D. Holl (Eds.), *A manual of equine diagnostic procedures*. (pp. 1-6). Jackson, WY: Teton New Media.
129. Seino, K.K. (2012). Herpesvirus. In D.A. Wilson. *Clinical veterinary advisor: the horse*. (pp. 271-274). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
130. Sellon, D.C. (2001). Current concepts in pediatrics: investigating outbreaks of respiratory disease in older foals. *Proceedings of the Annual Convention of AAEP*, vol. 47. (pp. 447-455).
131. Sgorbini, M, Bassini, R.F., Attili, Preziuso, S., Bizzeti, M., Cuteri, V. & Corazza, M. (2010). Evaluation of cytology and bacteriology in BALF collected from healthy not performing horses after exposure to environmental allergens. *Proceedings of the 16th Italian Association of Equine Veterinary Congress: Internal medicine*, Carrara, Italy, 29 a 31 de January, SIVE Publication, pp. 262-263. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
132. Shapiro, L.S. (2010). *Endoparasites of large animals. Pathology & parasitology for veterinary technicians* (2nd Ed.). (pp.174-182). New York: Delmar Cengage Learning.
133. Shoemaker, G.F. (2009). Laboratory diagnosis in equine practice. In D. Reeder, S. Miller, D. Wilfong, M. Leitch & D. Zimmel (Eds.), *American association of equine veterinary Technicians*

- and assistants. Equine manual for veterinary technicians. (pp. 214-216). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.
134. Slovis, N.M. (2008). The respiratory system. In S. B. McAuliffe & N. M. Slovis, Color atlas of diseases and disorders of the foal (pp. 132-166) Philadelphia: Saunders Elsevier.
 135. Songer, J.G. & Post, K.W. (2005). The genus *Pneumocystis*. Veterinary microbiology, bacterial and fungus of animal disease. (pp.406-408). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
 136. Stokol, T. & French, T.W. (2007). Cytology. Cytologic evaluation. In J.A. Orsini & T. Divers, Equine emergencies: treatment and procedures (3rd Edition). (pp. 565-588). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
 137. Studdert, M.J. (2003). Equine adenoviruses. In P. Lekeux (Ed.). Equine respiratory diseases. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
 138. Sweeney, C.R. (1999). Evaluating the lungs. Proceedings of the Annual Convention of the AAEP. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
 139. Taylor, I.G.R., Brazil, T.J. & Hillyer, M.H. (2010). Respiratory diseases. In Diagnostic techniques in equine medicine (2nd Ed.). (pp. 217-248). London: Saunders Elsevier.
 140. Teske, E. (2010). Cytology of the respiratory tract. In Proceedings of the European Veterinary Conference Voorjaarsdagen, 22-24 April, Amsterdam, the Netherlands.
 141. Traub-Dargatz, J.L., McKinnon, A.O., Thrall, M.A., Jones, R.L., Bruyninckx, W., Blancquaert A.M. & Dargatz, D.A. (1992). Evaluation of clinical signs of disease, bronchoalveolar and tracheal wash analysis, and arterial blood gas tensions in 13 horses with chronic obstructive pulmonary disease treated with prednisolone, methyl sulfonmethane and clenbuterol hydrochloride. American Journal Veterinary Research, 52, 1908-1916.
 142. Van Erck, E. (2009). Sampling the respiratory tract: Techniques and interpretation. In 11th Geneva Congress on Equine Medicine and Surgery, Westergren, Belgium, 15-17 December. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
 143. Viel, L. (2009). Diagnostic methodologies: RAO and IAD. Proceedings of the 4th Airway Symposium, Berne, Switzerland, 5-7 August. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
 144. Voss, E. & Seahorn, T. (2004). Tracheobronchoscopy. In N.M. Slovis, Atlas of equine endoscopy. (pp. 97-118). St. Louis, Missouri: Mosby.
 145. Wiedmeyer, C. (2012). Blood gas analysis. In D.A. Wilson. Clinical veterinary advisor: the horse. (pp. 913). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
 146. Wilfong, D. & Waldridge, B. (2009). Technical procedures. In D. Reeder, S. Miller, D. Wilfong, M. Leitch & D. Zimmel (Eds.), American association of equine veterinary technicians and assistants. Equine manual for veterinary technicians. (pp. 305-310). Ames, Iowa: Wiley-Blackwell.

147. Wilkins, P.A. (2003). Lower airway disease of the adult horse. *The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice*, 19, 101-121.
148. Wilkins, P.A. (2009). Diseases of the respiratory system. Diagnostic procedures for the respiratory system. In B.P. Smith, *Large animal internal medicine* (4th Edition). (pp.490-551). St. Louis, Missouri: Mosby.
149. Wilkins, P.A. (2010). Diseases of the respirator tract. In S.M. Reed, W.M. Bayly, & D.C. Sellon, *Equine internal medicine* (3rd Ed). (pp. 3008-3016). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
150. Willians, K.J., Maes, R., Del Piero, F., Lim, A., Wise, A., Bolin, D.C., Caswell, J., Jackson, C., Robinson, N.E., Derksen, F., Scott, M.A., Uhal, B.D., Li, X., Youssef, S.A. & Bolin, S.R. (2007). Equine multinodular pulmonary fibrosis: a newly recognized herpesvirus-associated fibrotic lung disease. *Veterinary Pathology*, 44, 849-862.
151. Wise, D.J., Carter, G.R. & Flores, E.F. (2005). Laboratory diagnosis of viral infections. In G.R. Carter, D.J. Wise & E.F. Flores (Eds.), *A Concise review of veterinary virology*. Ithaca, New York: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
152. Wood, J.L.N., Newton, J.R., Smith, K.C. & Marlin, D.J. (2003). Aetiological agentsviruses and inflammatory airway disease. In A. Hoffman, N.E. Robinson & J.F. Wade (Eds.), *Workshop on Inflammatory Airway Disease: Defining the Syndrome*. Havemeyer Foundation Monograph Series No. 9. (pp. 33-36). R & W Publications, Newmarket.
153. Wood, J.L., Newton, J.R., Chanter, N. & Mumford, J.A. (2005). Association between respiratory disease and bacterial and viral infections in British racehorses. *Journal of Clinical Microbiology*, 43, 120–126.
154. Wood, J.L., Newton, J.R., Chanter, N. & Mumford, J.A. (2005b). Inflammatory airway disease, nasal discharge and respiratory infections in young Bristish racehorses. *Equine Veterinary Journal*, 37, 236-242.
155. Wood, J., Smith, K.C., Daily, J.M. & Newton, J. (2007). Viral infections of the equine respiratory tract. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson & J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 287-326). Philadelphia: Elsevier Saunders.
156. Woodie, B. (2010). How to evaluate the horse with an upper respirator noise. *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. Focus on Upper and Lower Respiratory Diseases*, Salt Lake City, UT. Ithaca, NY: Published by International Veterinary Information Service (www.ivis.org).
157. Wong, D.M., Belgrave, R.L., Williams, K.J., Del Piero, F., Alcott, C.J., Bolin, S.R., Marr, C.M., Nolen-Walston, R., Myers, R.K. & Wilkins, P.A. (2008). Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. *Journal of the American Medical Association*, 232, 898-905.
158. Zinkl, J.G. (2002). Lower respiratory tract. In R.L. Cowell & R.D. Tyler (Eds.), *Diagnostic cytology and hematology of the horse* (2nd Edition). (pp. 73-86). St. Louis, Missouri: Mosby.