

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL BACTERIOLÓGICO E CITOLÓGICO DE LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO DE EQUINOS SADIOS EM SISTEMA
INTENSIVO E EXTENSIVO**

LUIZ ALEXANDRE MOSCON

VILA VELHA
JULHO / 2019

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL BACTERIOLÓGICO E CITOLÓGICO DE LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO DE EQUINOS SADIOS EM SISTEMA
INTENSIVO E EXTENSIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

LUIZ ALEXANDRE MOSCON

VILA VELHA
JULHO / 2019

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

M895p Moscon, Luiz Alexandre.
Perfil bacteriológico e citológico de lavado traqueobrônquico de equinos sadios em sistema intensivo e extensivo / Luiz Alexandre Moscon. – 2019.
66 f. : il.

Orientador: Fernando Luiz Tobias.
Dissertação (mestrado em Ciência Animal) - Universidade Vila Velha, 2019.
Inclui bibliografias.

1. Medicina veterinária. 2. Equino. 3. Bacteriologia.
I. Tobias, Fernando, Luiz. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 636.89

LUIZ ALEXANDRE MOSCON

PERFIL BACTERIOLÓGICO E CITOLÓGICO DE LAVADO
TRAQUEOBRÔNQUICO DE EQUINOS SADIOS EM SISTEMA
INTENSIVO E EXTENSIVO


Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ciência Animal, para
a obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Aprovada em 26 de julho de 2019,

Banca Examinadora:


Clairton Marcolongo Pereira – UNESC


Tiago Facury – UVV


Fernando Luiz Tobias – UVV
Orientador

Dedico esse trabalho à minha família que tanto
contribuiu para esse desafio do qual fui
submetido. Sem a força deles esse objetivo não
seria atingido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças e condições de suportar todas as dificuldades desse imenso desafio e por passar por diversas provações ao longo desses dois anos.

Aos meus pais, Juarez Moscon e Giseli Cristina Braga Moscon pelo apoio incondicional nos bons momentos, mas, principalmente, nos momentos difíceis em que quase desisti de tudo. A eles todo o agradecimento por nunca desistirem de mim.

À minha família que tanto cresceu nesses dois anos, onde iniciei apenas eu e Mariana e terminei com Alícia e Esther iluminando nossas vidas. Todo passo que dou é pensando no futuro de vocês três. Meu amor, obrigado pela paciência e as orações diante de tantas viagens e ausências. Nosso esforço será recompensado. Amo muito vocês três.

Aos meus tios emprestados Fabiano e Kelly Chiepe, pela motivação e me fazer acreditar que seria possível e, também, poder tornar possível essa conquista.

Ao meu amigo Diogo Rondón, pelo companheirismo e parceria nesses difíceis tempos. Boas risadas e sustos ficaram na memória. Espero que minha conquista te dê ainda mais forças para alcançar a sua.

À minha colega de profissão e de área Jeanne, pela paciência em me ajudar num momento de tanta pressão e pressa. Agradeço aos seus ensinamentos.

A Universidade Federal do Rio de Janeiro, na pessoa de Larissa Botelho, por ceder o laboratório e me auxiliar na pesquisa, para conclusão da minha pesquisa.

Ao Centro Universitário do Espírito Santo por me permitir conciliar meu trabalho e meus estudos. Minha eterna gratidão a essa instituição que tanto me valoriza e me permite ser um profissional melhor.

Por fim, porém não menos importante, o meu orientador, professor Fernando Luiz Tobias, pela orientação e confiança em meu potencial e por permitir o desenvolvimento da pesquisa e do meu mestrado. Momentos de dúvidas e desafios apareceram, mas sua tranquilidade e confiança fez toda a diferença.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01** – Ambiente do G1 (piquetes no qual os nove animais habitam)
- Figura 02** – Ambiente do G2 (bacias em cama de areia)
- Figura 03** – Cateter Intracath tamanho 16G BD®
- Figura 04** – Tricotomia ampla na face medial do terço médio do pescoço.
- Figura 05** – Microplaca metálica com 96 demarcações (96 MSP, Bruker-Billerica, EUA)
- Figura 06** – MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de hemácias de equinos pertencentes ao GRUPO 1 (Regime Extensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Tabela 2. Valores de hemácias de equinos pertencentes ao GRUPO 2 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Tabela 3. Valores de leucócitos de equinos pertencentes ao GRUPO 1 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Tabela 4. Valores de leucócitos de equinos pertencentes ao GRUPO 2 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Tabela 5. Avaliação, quantitativa e qualitativa, da celularidade dos animais pertencentes ao G2, regime extensivo.

Tabela 6. Avaliação, quantitativa e qualitativa, da celularidade dos animais pertencentes ao G2, regime intensivo.

Tabela 7. Resultados gerais do total de células e seus percentuais dos animais pertencentes ao Regime Extensivo (G1).

Tabela 8. Resultados gerais do total de células e seus percentuais dos animais pertencentes ao Regime Intensivo (G2).

Tabela 9. Resultados das culturas bacterianas em meios aeróbios, provenientes dos LTB dos animais pertencentes ao Regime Extensivo de Criação (G1).

Tabela 10. Resultados das culturas bacterianas em meios aeróbios, provenientes dos LTB dos animais pertencentes ao Regime Intensivo de Criação (G2).

Tabela 11. Verificação das características bacterianas nos grupos pesquisados de todos os animais, separados pelos Regimes de Criação: G1 (Regime Extensivo) e G2 (Regime Intensivo).

LISTA DE ABREVIATURAS

LTB: Lavado Traqueobrônquico.

G1: Grupo 1.

G2: Grupo 2.

MALDI-TOF: Matrix Assisted Lazer Desorption Ionization – Time of flight

RESUMO

AM, LUIZ, M.Sc., Universidade Vila Velha – ES, Julho de 2019. Perfil Bacteriológico e Citológico de Lavado Traqueobrônquico de Equinos Sadios em Sistema Intensivo e Extensivo. Orientador: Fernando Luiz Tobias.

A equinocultura é uma atividade econômica relevante em grande parte do mundo, sendo as afecções respiratórias responsáveis por grandes perdas econômicas e quedas de desempenho esportivo. Objetivou-se com essa pesquisa traçar qualitativamente o perfil citológico e microbiológico do aparelho respiratório superior de equinos em duas situações de regimes de criações. Dentre os vários métodos de diagnóstico e de avaliação de prognóstico para pacientes portadores de afecções respiratórias, optou-se avaliar as amostras obtidas neste estudo por meio de lavado traqueobrônquico. Para tanto, foram analisados dezoito animais, separados em dois grupos: G1, com nove equinos mantidos em sistema extensivo de criação e G2, com nove equinos mantidos em baias no regime intensivo. Foram realizadas análises citológicas e bacteriológicas desses lavados. Os resultados citológicos foram condizentes com a literatura, observando-se a predominância celular de macrófagos alveolares. Numa avaliação comparativa, o G2 permitiu a detecção de hemossiderófagos, comprovando que os animais mantidos em baias possuem alto índice de partículas em superfície, aumentando a incidência de Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício (HPIE). A avaliação bacteriana evidenciou no G1 isolamento de 13 espécies no G1 e 19 no G2, com predominância de bacilos em ambos os grupos. Na pesquisa, foi possível concluir que há diferença qualitativa e quantitativa de flora bacteriana e de células inflamatórias entre os dois regimes de criação.

Palavras chaves: Equino; Bacteriologia, Citologia; intensivo; extensivo;

ABSTRACT

AM, LUIZ, M.Sc., Universidade Vila Velha - ES, February, 2019. Bacteriological and Cytological Profile of Tracheobronchial Wash of Healthy Horses in Intensive and Extensive System. Advisor: Fernando Luiz Tobias.

Echinoculture is a relevant economic activity in much of the world, with respiratory diseases responsible for large economic losses and declines in sports performance. The objective of this research was to qualitatively trace the cytological and microbiological profile of the upper respiratory tract of horses in two situations of breeding regimes. Among the various methods of diagnosis and prognosis evaluation for patients with respiratory diseases, it was decided to evaluate the samples obtained in this study by means of tracheobronchial lavage. For this, eighteen animals were analyzed, separated into two groups: G1, with nine horses kept in an extensive breeding system and G2, with nine horses kept in bays under intensive regime. Cytological and bacteriological analyzes of these washes were carried out. The cytological results were consistent with the literature, observing the cellular predominance of alveolar macrophages. In a comparative evaluation, the G2 allowed the detection of haemosiderophages, proving that the animals kept in bays have a high surface particle index, increasing the incidence of Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage (HPIE). The bacterial avaliated evidenced in G1 isolation of 13 species in G1 and 19 in G2, with predominance of bacilli in both groups. In the research, it was possible to conclude that there is qualitative and quantitative difference of bacterial flora and inflammatory cells between the two breeding regimes.

Keywords: equine; bacteriology; citology; intensive; extensive

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
INTRODUÇÃO	13
1 SISTEMA RESPIRATÓRIO EQUINO	15
1.2 AVALIAÇÃO SISTEMA RESPIRATÓRIO.....	15
1.3 EXAME FÍSICO	16
2 COLETA DE MATERIAL DE VIAS AÉREAS INFERIORES	18
2.1 LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO EM EQUINOS	18
2.1.1 Principais Indicações	19
2.1.2 Complicações.....	20
3 MICROBIOTA DO TRATO RESPIRATÓRIO EQUINO	21
3.1 PRINCIPAIS BACTÉRIAS	22
3.1.1 <i>Bacillus spp</i> (espécies <i>pumilus</i> e <i>cereus</i>)	22
3.1.2 <i>Acinetobacter Baumanii</i>	23
3.1.3 <i>Staphylococcus xylosus</i>	23
3.1.4 <i>Micrococcus luteus</i>	24
3.1.5 <i>Pantoea spp.</i>	25
4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA.....	26
5 CITOLOGIA DO TRATO RESPIRATÓRIO EQUINO	27
5.1 PRINCIPAIS CÉLULAS	28
5.1.1 Células Gigantes.....	29
5.1.2 Células Epiteliais	29
5.1.3 Hemossiderófagos.....	29
5.1.4 Macrófagos.....	30
5.1.5 Linfócitos.....	30
5.1.6 Eosinófilos	31
5.1.7 Neutrófilos.....	31
6 MATERIAL E MÉTODOS	33

6.1 POPULAÇÃO ESTUDADA.....	33
6.2 CRITÉRIOS PARA FORMAÇÃO DOS GRUPOS	34
6.3 LOCAL	35
6.4 EXAMES CLÍNICOS PRÉ-EXPERIMENTO	35
6.5 EXAMES COMPLEMENTARES.....	35
6.5.1 Hemograma	35
6.5.2 Bioquímicos	36
6.5.3 Lavado Traqueobrônquico.....	36
6.5.4 Avaliação Microbiológica	37
6.5.4.1 Avaliação Bacteriológica.....	38
6.5.4.2 Morfologia Colonial	38
6.5.4.3 Identificação Bacteriana pelo Método de MALDI-TOF	38
6.5.5 Avaliação Citológica.....	40
6.5.5.1 Centrifugação do material e confecção das lâminas	41
6.5.5.2 Coloração do Material.....	41
6.5.5.3 Avaliação Citológica	41
6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
7 RESULTADOS.....	42
7.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO	42
7.2 HEMOGRAMAS	42
7.3 BIOQUÍMICOS	45
7.4 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA	45
7.4.1 Comparativo citológicos entre os grupos 1 e 2.	47
7.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA.....	49
8 DISCUSSÃO	54
8.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DO PROCEDIMENTO	54
8.2 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA	55
8.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS DO LTB.....	57
CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

INTRODUÇÃO

A equinocultura é uma atividade econômica altamente relevante em grande parte do mundo, no Brasil possui, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2014), 5,31 milhões de animais, sendo 24,4% destes, localizados na região Sudeste. Em 2011, no estudo da Federação Internacional da Agricultura (FAO), a população mundial de equinos era de, aproximadamente, 59 milhões de cabeças. Pode-se dizer assim, que o Brasil detém cerca de 9% da espécie em seu território. Acrescenta-se a essas informações que o país movimenta em torno de 16 bilhões de reais de forma direta e indireta (MAPA, 2016).

No Brasil, o mercado de produtos voltados para os cavalos movimentam grande parte desses valores supracitados, acrescentando também, os gastos com Médicos Veterinários, que aumentam consideravelmente ano após ano, muito pelo alto investimento em animais cada vez com valores zootécnicos consideráveis. Diante das diversas finalidades criatórias de equinos, a utilização em práticas esportivas pode ser considerada aquela que mais se destaca. Devido a esta tendência, inúmeros estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de incrementar o desempenho dos equinos nas provas a que são submetidos (SANTOS *et al*, 2007).

Os distúrbios do sistema respiratório ocupam o segundo lugar, atrás dos distúrbios do sistema músculo – esquelético, na limitação do desempenho atlético dos equinos. Ocorrem grandes perdas econômicas quando os programas de treinamento de equinos são interrompidos em razão de enfermidades respiratórias (DIXON, 1997).

Para corroborar o dito anteriormente, pesquisas em cavalos de esporte mostraram evidências de que o sistema respiratório representa um fator limitante para desempenho máximo, chegando a representar, segundo AMARAL *et al* (1999), 42% de cavalos com queda de desempenho, seja uma disfunção leve ou moderada. A detecção dessas enfermidades, quando de forma precoce, torna-se essencial para o rápido retorno dos animais ao treinamento, pois com o rápido diagnóstico, evita-se que tal patologia se alastre, gerando prejuízos a saúde do animal e financeiros ao seu tutor.

Existem vários fatores que levantam a possibilidade das principais causas desse índice alto, relacionado ao aparelho respiratório. O regime de criação a ser utilizado,

é um desses fatores, pois em estudos recentes, foi possível constatar, que há um número infinitamente maior de partículas flutuantes dentro de baias (regime intensivo) quando comparados com animais criados em piquetes (regime extensivo).

As principais causas das patologias do sistema respiratório são os processos inflamatórios e/ou infecciosos, que são comuns em locais com aglomeração de equinos e transportes prolongados, a esse fato deve-se o fator de que agentes etiológicos propagam-se mais facilmente de um hospedeiro para o outro, de forma mais fácil, quando a aglomeração acontece.

Nos últimos anos, as doenças respiratórias em equinos foram amplamente estudadas, aumentando a compreensão sobre alguns aspectos importantes, como a imunologia e virologia. Somado a isso, métodos diagnósticos foram testados e aperfeiçoados (DIXON, 1997), objetivando elucidar diagnósticos precisos e mais rápidos e de forma menos invasiva e barata (FERNANDES *et al.*, 2000). Tais técnicas são muito úteis na localização do processo clínico, porém nem sempre tem a mesma eficácia na elucidação do agente causador (ETTINGER; FELDMAN, 1995). Por isso, técnicas de obtenção das secreções, seja do aparelho respiratório anterior ou posterior, sofreram aperfeiçoamentos contundentes nas últimas décadas.

Uma das técnicas que sofreram adaptações importantes é o Lavado Traqueobrônquico (LTB). Tal procedimento, hoje, é muito utilizado na rotina clínica, com objetivo de se obter fluidos presentes no trato respiratório inferior de equinos, com problemas respiratórios.

Na coleta de fluidos respiratórios, há a possibilidade de uma avaliação qualitativa da celularidade (avaliação citológica) e também de agentes pertencentes àquela região (avaliação microbiológica).

Dessa forma, o presente trabalho teve o objetivo de traçar o perfil citológico e bacteriológico, de forma qualitativa, do aparelho respiratório superior de equinos em duas situações de regimes de criações, através do lavado traqueobrônquico.

1 SISTEMA RESPIRATÓRIO EQUINO

O sistema respiratório é formado pelas narinas, fossas nasais, septo nasal, seios paranasais, nasofaringe, laringe, bolsas guturais, palato mole, traquéia, brônquios, pequenas vias aéreas, pulmões e cavidades pleurais (BEECH,1975 ; SPEIRS,1999).

Ele tem como funções o transporte de oxigênio e a remoção de dióxido de carbono da corrente sanguínea (ROBINSON e 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 e FURLOW, 2007). Para além da função da troca gasosa, o aparelho respiratório é responsável pelo metabolismo de alguns compostos, termo regulação e funciona como um reservatório de sangue graças à extensa rede de vasos que compõem o sistema de circulação pulmonar (ETTINGER; FELDMAN, 1995). O aparelho respiratório equino está dividido em duas porções, o trato respiratório anterior (cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe e traqueia) e o trato respiratório posterior (brônquios principais, brônquios segmentares, bronquíolos e alvéolos pulmonares) (GONÇALVES, 2004). A traqueia equina é uma estrutura tubular flexível que se encontra ente a faringe e a carina, é formada por quatro camadas (adventícia, musculocartilaginosa, submucosa e mucosa) e por 40 a 60 anéis fibrocartilágeos incompletos (VOSS e SEAHORN, 2004).

1.2 AVALIAÇÃO SISTEMA RESPIRATÓRIO

Para uma avaliação adequada do sistema respiratório de equinos, é importante iniciarmos com a coleta de informações, formando um adequado histórico que, conseqüentemente, irá direcionar um exame clínico acurado, o que, normalmente, é negligenciado na maioria das vezes (BEECH, 1975).

SPEIRS (1999) afirma que deve-se verificar a reclamação exata, duração e progressão dos sinais, exposição a agentes nocivos ao trato respiratório e estresse, como o de transporte, programas de vacinação e vermifugação, medicações, tipos de instalações e disposição de pastagem, estado de saúde e desempenho de outros

cavalos no mesmo grupo de cocheiras ou sob a responsabilidade do mesmo treinador.

A idade do cavalo, o tipo do ambiente (baia, cama e aeração), alimentação, estação do ano, introdução de animais novos no mesmo recinto ou local de permanência dos animais, enfim, mudanças em qualquer item do manejo podem ser importantes para que se possa realizar um diagnóstico preciso. Também é importante determinar há quanto tempo o proprietário ou treinador possui o cavalo (BEECH,1975 ; SPEIRS, 1999).

1.3 EXAME FÍSICO

Sempre o ideal é que a realização do exame físico seja em um ambiente calmo, livre de estresses, tanto para o avaliador quanto para o animal, onde qualquer sinal pode causar interferência que pode levar a avaliações equivocadas do quadro. É importante também notar a adoção de alguma posição especial no repouso e, se parece ansioso ou com sinais de dor (BEECH,1991).

Os movimentos associados à respiração, em um cavalo hígido, são quase imperceptíveis. A respiração normal em repouso é composta de uma sequência regular de movimentos inspiratórios e expiratórios com uma pausa entre eles (BEECH,1991 e SPEIRS,1999). Os mesmos autores citaram que um cavalo adulto normal possui uma frequência respiratória entre 18 a 20 movimentos respiratórios por minuto, em repouso.

Speirs (1999) citou que a avaliação da frequência dos movimentos respiratórios é facilmente realizada, mas a da respiração requer a medida do consumo de oxigênio e da produção de dióxido de carbono. Este autor, também descreveu que para facilitar a descrição clínica, a frequência e o volume (volume tidal) aparente podem ser descritos como diminuídos, normais ou aumentados e a dificuldade da realização dos movimentos respiratórios, como laboriosa ou difícil. Termos como dispnéia, hiperpnéia, polipnéia, hiperventilação e hipoventilação são usados para descrever a respiração e os movimentos respiratórios, mas são parâmetros subjetivos e quando usados como parte do exame clínico inicial, indicam alterações na ventilação que podem não existir.

Alguns sinais encontrados são de extrema importância para guiar o restante da avaliação e nortear quanto à solicitação de exames complementares. Por exemplo, a tosse, quando presente, deve ser caracterizada. Podem existir quantidades consideráveis de secreções nas vias aéreas inferiores e a tosse parecer não produtiva. Ela pode ser paroxística ocorrendo em qualquer indivíduo com as vias aéreas irritadas. A ausência de tosse, bem como de secreção visível externamente, não descarta a existência de exsudato presente nas vias aéreas. Grande parte da secreção produzida é deglutida quando atinge a faringe (BEECH,1991). A tosse pode ser provocada nos cavalos com o epitélio respiratório danificado, através da pressão da traquéia perto da laringe (MICHELOTTO, 1993).

Os ossos que cobrem os seios paranasais e as fossas nasais devem ser examinados visualmente, por palpação e por percussão. Os septos nasais devem ser examinados, para avaliação de qualquer problema que possa acarretar em desvio de septo, o que irá interferir na respiração normal do cavalo (SPEIRS,1999). Os seios paranasais devem ser percutidos, comparando-se cada lado (BEECH,1991; SPEIRS,1999). Deve-se avaliar os linfonodos regionais, notando a consistência, mobilidade, temperatura e sensibilidade dolorosa (MC GORUM, 1994).

Após uma avaliação minuciosa, onde o tempo irá variar de acordo com o avaliador e a emergencialidade do caso, deve-se proceder com exames complementares para dar novos direcionamentos ou até mesmo para elucidar determinados diagnósticos presuntivos. É de suma importância que sejam realizadas auscultações de todo o sistema respiratório, desde os seios paranasais até os pulmões, que são separados por lobos, para que a avaliação seja bem direcionada.

2 COLETA DE MATERIAL DE VIAS AÉREAS INFERIORES

Os materiais para realização da coleta de secreções das vias aéreas dos equinos podem ser conseguidos através do Lavado Traqueobrônquico (LTB) e/ou lavagem broncoalveolar (LARSON, 1985; MC GORUM, 1994 e SAVAGE, 2001).

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 e 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 afetar de um modo significativo às 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 e HODGSON, 2007).

2.1 LAVADO TRAQUEOBRÔNQUICO EM EQUINOS

O lavado traqueobrônquico (LTB) em equinos é uma das técnicas mais utilizadas com o objetivo de obtenção do conteúdo das secreções provenientes das vias aéreas distais. Essa técnica foi utilizada, inicialmente, na medicina humana, por PECORA (1959) e, em 1972, adaptada para equinos por MANSMANN e KNIGHT. Tais autores conseguiram constatar que a técnica tinha grande utilidade na identificação dos agentes etiológicos em afecções respiratórias com carácter infeccioso. Já BEECH, em 1975, observou que o exame citológico do LTB pode ser utilizado, também, na identificação de uma resposta inflamatória local das vias aéreas em cavalos com algum distúrbio respiratório.

DIXON (1997) considerou em sua pesquisa que o LTB é a técnica mais acurada para obter espécimes de secreção respiratória para exames

microbiológicos. A técnica permite avaliar, como mencionado acima, qualitativamente a microbiota traqueal de animais domésticos, não sendo indicado para avaliações quantitativas, pois a instilação de líquidos no lúmen traqueal pode diluir o muco e mascarar a real concentração de bactérias existentes na traquéia (HEWSON; VIEL, 2002).

O LTB pode ser amplamente utilizado para avaliação microbiológica e citológica do aparelho respiratório. Em equinos saudáveis a análise do fluido demonstra presença de macrófagos, hemossideróforos, células gigantes, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos (CHRISTLEY, *et al.*, 1999). Em cavalos adultos, o que predomina são macrófagos e linfócitos (60 e 30% aproximadamente, respectivamente). Já em potros, entre 80 e 90% são macrófagos alveolares (SPEIRS, 1999).

Quando em processos inflamatórios, o fluido traqueal, apresenta, segundo BAIN (1997), um aumento de mais de 40% na proporção relativa de neutrófilos. No lavado, em animais hígidos, são encontrados muco, grandes esporos e hifas fúngicas, mas, devido a forma de obtenção, com solução fisiológica, a contagem dessas células fica prejudicada, pois não é possível a coleta total dos fluidos instilados, variando de um animal para o outro. No entanto, a grande função da avaliação celular é a identificação de suas características (SWEENEY, 1996).

Alguns fatores podem interferir na avaliação dos fluidos respiratórios, podendo ser patológicos ou não. Em doenças pulmonares crônicas, grande quantidade de neutrófilos e células epiteliais são identificadas, com redução do número de macrófagos e linfócitos e raros eosinófilos (DERKSEN, *et al.*, 1989). Raidal *et al.* (1997), mensurou o efeito do transporte em cavalos, conseguindo constatar aumentos consideráveis de muco e celularidade, com destaque para macrófagos alveolares.

2.1.1 Principais Indicações

O LTB tem como principal indicação, avaliar a microbiota e a celularidade de pacientes aparentemente portadores de patologias associadas ao aparelho respiratório. Tal técnica possui uma vantagem importante de ser um procedimento minimamente invasivo oferecendo riscos mínimos ao paciente (LESSA, 2005)

Em cavalos de corrida, o LTB tem sido utilizado, com intuito de análise celular, onde é possível oferecer informações extremamente importantes relacionadas a Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício, e assim lidar melhor com prognósticos, quando na presença da patologia (SILVA, 2010).

2.1.2 Complicações

Apesar de difíceis e raras complicações, é possível que aconteça. Técnicas realizadas sem a devida antissepsia, pode ocasionar um mínimo risco de contaminação iatrogênica.

Na utilização de cateteres de polietileno, um inadequado manejo pré-anestésico, pode facilitar uma movimentação acentuada do paciente, podendo elevar o risco da superfície cortante da agulha do cateter, cortar o material dentro do lúmen traqueal, deixando um corpo estranho no local, podendo ocasionar uma lesão traqueal e posteriormente bronquial, caso avance. Para este acidente, é necessária uma rápida intervenção endoscópica com o objetivo de retirar tal material.

3 MICROBIOTA DO TRATO RESPIRATÓRIO EQUINO

A microbiota traqueal do cavalo pode servir de habitat para diversas espécies bacterianas e sofre influência direta do ambiente no qual o animal vive. Temperatura, contato com animais, tipo de cama, viagens, tipos de provas, são alguns fatores que podem influenciar na microbiota (LAVOIE *et al.*, 1994). No momento em que o equino passa a apresentar uma desordem respiratória, seja por agente infeccioso ou não, o local passa a ser “habitado” por agentes diferentes, podendo, a depender de alguns fatores, provocar a instalação de alguma patologia, normalmente associada às pneumonias (LOVE, 2000).

Segundo RAIDAL *et al.* (1995), a quantidade de bactérias presentes no lúmen traqueal varia de 0 a $2,43 \times 10^3$ unidades formadoras de colônia (UFC) por ml de lavado, onde um número maior que 10^6 já seria o suficiente para causar doença.

Entretanto esta densidade aumenta significativamente em situações que possam comprometer os mecanismos de depuração traqueal e fatores estressantes, como por exemplo, a permanência de equinos com a cabeça elevada por períodos superiores a 24-48 horas, o que leva ao prejuízo dos mecanismos de depuração microbiana, pois as bactérias presentes no lúmen traqueal apresentam um aumento significativo na sua população (RACKLYEFT; LOVE, 1990).

Para a avaliação da microbiota traqueal em equinos, o LTB é um método bastante eficaz, como afirmado por MANSMANN E KNIGHT (1972). O lavado permite analisar a presença de bactérias no lúmen traqueal por exames bacteriológicos e características citológicas dos espécimes colhidos, sendo a utilização concomitante destes exames, uma técnica mais sensível que a avaliação clínica para diagnóstico das pneumonias equinas (FREEMAN, *et al.*, 1993).

Bactérias aeróbias e anaeróbias são colonizadoras do lúmen traqueal. Dentro das aeróbicas, os gêneros que se destacam são *Streptococcus* alfa e beta-hemolítico, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolítica*, *Actinobacillus* sp, *Bacillus* sp., Actinomicetos, *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Acinetobacter* sp., *Proteus* sp., *Bordetella* sp., *Pseudomonas* sp. (DARIEN, *et al.*, 1990; RAIDAL, *et al.*, 1997) e *Rhodococcus equi* (LAVOIE, *et al.*, 1994).

Como em qualquer afecção infecciosa, para que seja constatada doença, precisa haver um desequilíbrio, partindo dos agentes etiológicos, no caso as

bactérias ou do hospedeiro, em caso de imunossupressão por qualquer ordem. Nesses casos, haverá uma crescente dos agentes colonizadores e, a depender de qual agente se sobressaiu, a determinada patologia irá se instalar, onde o mesmo irá influenciar na terapia e prognóstico do paciente (FERNANDES *et al.*, 2010).

3.1 PRINCIPAIS BACTÉRIAS

3.1.1 *Bacillus spp* (espécies *pumilus* e *cereus*)

Essas duas espécies citadas, possuem características morfofisiológicas parecidas. O *Bacillus pumilus* é normalmente encontrado no solo assim como o *B. cereus*.

Desde 1906, *Bacillus cereus* tem sido associado a intoxicações alimentares na Europa. No entanto, o primeiro pesquisador a descrever essa síndrome com precisão foi Plazikowski, e apenas em 1950 este bacilo foi reconhecido como causador de doença transmitida por alimento. O primeiro surto documentado nos EUA ocorreu em 1969 (JAY, 2005).

É um bacilo Gram-positivo, aeróbio facultativo, formador de endósporos, produtor de diferentes tipos de toxinas. Este microrganismo encontra-se amplamente disseminado na natureza, sendo isolado, com frequência, a partir de solo, água, sedimentos, vegetação, cereais e superfície corpórea dos animais. É frequentemente encontrado em alimentos secos: temperos, ingredientes farináceos, leite em pó, na forma de esporos resistentes ao calor. Seus endósporos podem sobreviver à cocção dos alimentos. A reidratação dos alimentos durante a cocção, por sua vez, dará condições à germinação do endósporo (PAIVA *et. al.*, 2009). A inativação da microbiota competidora, pela cocção, contribui para a multiplicação do *B. cereus* nos alimentos cozidos (GERMANO, 2011). Classicamente, as características que distinguem o *B. cereus* de outras bactérias aeróbias formadoras de endósporos são a sua incapacidade para produzir ácido a partir do manitol e o fato de produzir lecitinase (FRITZE, 2004).

A patogenicidade do *B. cereus* está associada à capacidade de produção de toxinas, sendo elas: três tipos de toxina diarreica, a toxina emética, quatro tipos de hemolisinas e três tipos diferentes de fosfolipase C. Além disso, há presença de uma

proteína na parede celular, responsável pela adesão do microrganismo. Contudo, a habilidade de produção destes fatores de virulência varia de acordo com as linhagens (MILAGRES, 2004). As linhagens causadoras de DTA estão associadas a dois tipos de síndromes: a diarreica e a emética.

3.1.2 *Acinetobacter Baumannii*

O gênero *Acinetobacter* é um bacilo gram negativo, estritamente aeróbio, ubiqüitário, não fermentador, imóvel, catálise positiva e oxidase negativa. Ao longo dos últimos 30 anos o *Acinetobacter spp.* sofreu modificação taxonômica significativa. Atualmente, o gênero *Acinetobacter* é membro da família Moraxellaceae e da ordem Pseudomonadales. Apesar de estarem identificadas cerca de 31 espécies genômicas, apenas a 17 foi atribuído nome, devido à difícil diferenciação (PELEG, SEIFERT E PATERSON, 2008).

Entre as diferentes espécies existentes, o *A. baumannii* é o de maior importância no que concerne à patologia humana, segundo Peleg e seus colaboradores (2008). Refere o autor, que este microrganismo faz parte do complexo *A. calcoaceticus–A. Baumannii*, que integra quatro diferentes espécies: *A.baumannii*, *A.calcoaceticus*, *Acinetobacter genoespecie 3* e *Acinetobacter genoespecie 13 TU*.

As diferentes espécies de *Acinetobacter* apresentam diversos habitats naturais tendo sido isoladas no solo, na água, em vegetais e em hospedeiros animais e humanos (Houang et al. 2001, Ash et al. 2002). Outras espécies fazem parte da flora comensal da pele e das mucosas humanas. Seifert et al. 1997 verificaram que 43% dos indivíduos saudáveis são colonizados (pele e mucosas) por este agente. No entanto, o *A. baumannii*, a espécie que mais frequentemente é isolada, raramente é encontrado na pele humana. Devido a sua presença ambiental, é comum encontrarmos no trato respiratório de animais de vida livre (Dijkshoorn et al. 2005).

3.1.3 *Staphilococcus xylosus*

É uma bactéria Gram Positiva de morfologia de cocos, pertencente ao gênero

Staphylococcus, coagulase negativa e comensal na pele de humanos, animais domésticos e ambiente. Sua importância na clínica médica veterinária é estar relacionada a algumas patologias em aves (Estafilococose aviária), bovinos (infecção mamária) e seres humanos (pielonefrite e dermatite nasal) (KLOOS *et al*, 1975).

É o mais importante membro da família *Micrococcaceae* no campo da microbiologia alimentar, sendo a espécie mais numerosa presente durante a fermentação de salames (LACUMIN *et al*, 2006).

Lucke *et al* (1994) destacou que as atividades metabólicas desejáveis desenvolvidas pelo *Staphylococcus xylosus* nos produtos fermentados são a produção de catalase, nitrato redutase e a redução do oxigênio na superfície do produto o que contribui para liberação de enzimas proteases e lipases que auxiliam no aroma e sabor de produtos.

3.1.4 *Micrococcus luteus*

Micrococcus luteus é uma bactéria que pertence ao grupo gram-positivo. Faz parte da microbiota das superfícies corporais dos mamíferos, bem como de algumas áreas internas do corpo (BENAGLI *et al*, 2011).

Foi descoberto por Alexander Fleming . Através de múltiplos estudos e pesquisas, Fleming determinou que esta bactéria é altamente sensível à liozima. Também é suscetível à bacitracina. Mesmo essa característica é o que a diferencia de outra bactéria semelhante, o *Staphylococcus aureus*. Geralmente o *Micrococcus luteus* é uma bactéria não patogênica. No entanto, quando existem certas condições, como imunossupressão do indivíduo ou a passagem das bactérias para a corrente sanguínea, certas patologias podem ser geradas (PELEG, SEIFERT e PATERSON, 2008).

O *Micrococcus luteus* é uma bactéria que tem uma forma esférica, com um diâmetro aproximado de 0,5 - 3,5 microns. Quando visto sob um microscópio, é geralmente observado que as bactérias são agrupadas em tetrads (grupos de 4). Na sua superfície não apresentam cílios nem flagelos (BENAGLI *et al*, 2011).

As colônias observadas nas culturas são circulares, lisas e convexas. Eles podem ter uma superfície brilhante ou opaca. Da mesma forma, eles mostram uma coloração esverdeada amarelada ou amarela (BENAGLI *et al*, 2011).

3.1.5 *Pantoea spp.*

As enterobactérias do gênero *Pantoea* sp. atualmente compreendem dezenove espécies que apresentam motilidade com flagelos peritríquios, com pigmentação amarela ou bege (KAHVECI, 2011). Os bacilos medem aproximadamente 0,5-1,3X1,0 a 3,0 µm. Os membros deste gênero têm sido isolados a partir de uma grande variedade de ambientes, incluindo solo, água, poeira, produtos lácteos, carnes, peixes, insetos, seres humanos e animais (DE MAYER, 2012). Podem ser considerados agentes patogênicos ou comensais (KAVUNCUOGLU, 2010). São considerados patógenos comuns em plantas.

Dentro do gênero, *Pantoea agglomerans* é a espécie mais comumente isolada em humanos, resultando em infecção de tecidos moles e/ou osso seguidas de traumas penetrante por vegetação. Os vários nichos ecológicos ocupados pelas espécies de *Pantoea*, incluindo tanto vegetal como hospedeiros animais, e seus estilos de vida distintos como epífitos e endófitos, agentes de controle biológico, ou como patógenos de plantas hospedeiras e animais são indicativos de uma extensa diversificação dentro do gênero e *Pantoea* (KAHVECI, 2010).

4 IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Vários são os métodos de identificação das espécies bacterianas, desde os mais rudimentares até os mais tecnológicos. Dentre os últimos métodos criados para se chegar a espécie, está a Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF). Tal ferramenta consiste num sistema no qual material biológico (uma colônia ou um concentrado de hemocultura) é colocado em uma placa em que há a matriz polimérica. Isso é irradiado com um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector (time of flight) é diferente. Isso é colocado em gráfico, dando vários picos e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado – tudo com muita rapidez (BENAGLI *et al*, 2011). Trata-se, portanto, de uma aplicação da espectrometria de massa.

Essa técnica permite diagnósticos microbiológicos complexos, como, por exemplo, a especiação correta dos estafilococos coagulase negativos (BONTEM *et al*, 2011) ou a sorologicamente lenta e sujeita a erros definição dos vários sorovariantes da *Salmonella* entérica (MALORNY e DIECKMANN, 2011). Diagnóstico de fungos de importância médica é possível (CASSAGNE *et al*, 2011) e de micobactérias, com modificações técnicas (COUDERC *et al*, 2011). À medida que o uso dessa técnica aumenta, os bancos de dados ficam mais completos e a identificação, melhor. Os bancos de dados são proprietários, o que é uma desvantagem quando comparados aos bancos de dados de ácidos nucleicos como o BLAST, que são públicos e de uso livre, mas sujeitos de depósitos errados e alterações. Já os bancos de dados proteômicos, por ora, são mais cuidados e mais bem avaliados antes de serem atualizados. A atualização, aliás, é permanente e faz parte dos contratos de uso das máquinas (MALORNY e DIECKMANN, 2011).

5 CITOLOGIA DO TRATO RESPIRATÓRIO EQUINO

A citologia é um exame complementar comumente usado no diagnóstico da doença do trato respiratório posterior nos equinos (LAVOIE, 2007). Esta tem como objetivos 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 e 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). A importância das informações veiculadas pelo exame citológico é determinada 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 artefatos 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).

Segundo DECONTO (1984), o estudo da citologia das secreções traqueobrônquicas deve ser realizado levando-se em conta não somente a quantidade de células presentes no esfregaço, mas também à apreciação do quadro morfológico das células. O autor também descreve que as alterações morfológicas celulares são de especial interesse, principalmente quando não são analisados como achados isolados, mas sim quando, ao mesmo tempo, seja levada em conta a

dinâmica do “clearance” pulmonar.

O exame citológico das vias aéreas inferiores pode ser realizado através de aspirado traqueal (por endoscopia) e transtraqueal, além de lavados traqueal, traqueobrônquico e broncoalveolar que auxiliam na avaliação das doenças do trato respiratório (FOGARTY, 1990; ERICKSON e POOLE, 2002).

A avaliação citológica do aspirado traqueal é feita pela contagem total de células na câmara de Neubauer, e pela avaliação diferencial dos tipos celulares. Para esta última, diferentes técnicas de coloração podem ser utilizadas, sendo empregadas a Diff-Quick, Wright-Giemsa, Leishman's, Azul da Prússia, My-Grunwald, Azul de Toluidina e Romanovski (HEWSON e VIEL, 2002; HODGSON e HODGSON, 2003). A coloração de Azul da Prússia facilita a visualização de hemossiderófagos (BIAVA, 2005), e para melhor visualizar mastócitos podem ser empregadas às colorações de Leishman's e o Azul de Toluidina (HEWSON e VIEL, 2002; HODGSON e HODGSON, 2003). Uma lâmina adequada para a avaliação citológica deve conter células de todos os níveis da árvore pulmonar, incluindo células epiteliais colunares e cuboides e macrófagos alveolares (SWEENEY *et al.*, 1992; CLARK *et al.*, 1995; HEWSON e VIEL, 2002; HODGSON e HODGSON, 2003).

Freeman e Roszel (1987) avaliaram o padrão citológico normal para LTB em equinos, em pacientes sadios. Tais resultados demonstraram celularidade discreta a moderada, ausência de sangue, baixa quantidade de proteína, fibrina e debris celulares, podendo ser encontrados pouca quantidade de muco. Um fator importante para a constatação de um exame bem executado da área terminal das porções do trato respiratório é a presença constante de macrófagos alveolares. Em animais sadios foram encontrados, ainda, baixo número de neutrófilos e linfócitos. Os eosinófilos podem ou não estarem presentes.

5.1 PRINCIPAIS CÉLULAS

Na avaliação citológica do LTB em equinos, é possível identificar uma variedade de células, onde cada uma possui a sua função frente a uma desordem, ou não, no sistema respiratório.

As principais encontradas são: neutrófilos, linfócitos, células gigantes, células

epiteliais, hemossiderófagos, macrófagos alveolares, eosinófilos, mastócitos. A observação fora do padrão de normalidade, que varia de acordo com diversos fatores, pode indicar a incidência de determinadas patologias, por exemplo, os hemossiderófagos, que sua contagem com resultados acima do normal, indica Hemorragia Pulmonar Induzida por Exercício. A análise quantitativa nesses casos corrobora o diagnóstico e contribui para avaliação (DECONTO,1984).

5.1.1 Células Gigantes

As células gigantes de corpo estranho são originárias de fusão de vários macrófagos ou monócitos. Elas aparecem ou formam-se quando partículas muito grandes são inspiradas e não podem ser fagocitadas por um só macrófago. Como a fusão dos macrófagos para a formação dessas células gigantes demora muitas horas ou até dias, o aparecimento dessas células é sempre um indício de depressão do “clearance” pulmonar ou de obstruções bronquiais. Quando estas células são provenientes dos pequenos brônquios ou bronquíolos, elas podem apresentar, também, vacúolos como dos macrófagos espumosos (DECONTO,1984).

5.1.2 Células Epiteliais

São reconhecidas pela sua forma cilíndrica e alongadas, podendo aparecer mais curtas e quase cubóides quando provenientes de partes mais distais da mucosa respiratória. Características principais dessas células são os cílios e a membrana cuticular, que pode identificar essas células no caso de perda dos cílios (DECONTO,1984).

5.1.3 Hemossiderófagos

Os hemossiderófagos são macrófagos responsáveis pela fagocitose de hemácias no espaço alveolar e sua presença no LTB tem sido relacionada diretamente com a síndrome de hemorragia pulmonar induzida por exercício (EIPH) em cavalos. Recentes estudos têm demonstrado que a contagem qualitativa destas células oferece uma melhor correlação com a presença e grau de EIPH (DECONTO,

1984).

5.1.4 Macrófagos

Os macrófagos alveolares são as células inflamatórias mais abundantes na LT e na LBA em cavalos sãos (HEWSON e VIEL, 2002). São células de grandes dimensões com citoplasma basofílico e abundante contendo inúmeros vacúolos e inclusões (HEWSON e VIEL, 2002). Nestes vacúolos podem ser observados eritrócitos, células em apoptose, esporos fúngicos, hemossiderina, pólen ou outros detritos não específicos (HEWSON e 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 e HODGSON, 2007).

São procedentes, em sua grande maioria, dos alvéolos pulmonares. Estão sempre presentes nas secreções traqueobrônquicas e faltam quando o material examinado é a saliva aspirada. Quando os macrófagos apresentam grandes partículas já fagocitadas no seu citoplasma, tais como esporos de fungos ou hifas, mostra desta forma, a ocorrência de uma deposição errônea de partículas no aparelho respiratório (HEWSON e VIEL, 2002).

5.1.5 Linfócitos

Os linfócitos são células de tamanho médio a pequeno, esféricas, de núcleo grande com citoplasma basofílico em pequena quantidade (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 e 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 e VIEL, 2002).

5.1.6 Eosinófilos

Eosinófilos granulócitos são considerados indícios de verminoses ou processos alérgicos. Mastócitos são também esperados nas secreções de animais alérgicos (DECONTO,1984).

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, reação de hipersensibilidade tipo I e na pneumonia parasitária (ex. *Dictyocaulus arnfieldi*) (VAN ERCK, 2009).

5.1.7 Neutrófilos

Os neutrófilos granulócitos são encontrados, na maioria das vezes, em grande número, nas secreções traqueobrônquicas de cavalos portadores de Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica e tendem a aumentar em número proporcionalmente ao grau de severidade da doença.

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 e 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 inflamação, a variação da porcentagem 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 fatores, 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 e 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 e FRENCH, 2007). A apoptose celular é caracterizada pela condensação do núcleo e pela redução da quantidade de citoplasma (STOKOL e FRENCH, 2007).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

O estudo foi realizado em Colatina, no Estado do Espírito Santo, no período de 01 a 23 de dezembro de 2018. Foram 18 equinos (15 machos e 3 fêmeas, da raça Quarto de Milha, puros e mestiços (meio sangue), com idade média de 6 anos (3 e 13 anos). São animais praticantes de provas de 3 tambores e Team Ropping (laço em dupla), com perfil atlético, com rotina de um treino de 60 minutos, em média, por dia.

Os grupos foram divididos em 2, conforme descrito abaixo:

- Grupo 1 (G1): 9 animais (7 machos e 2 fêmeas) em regime extensivo (animais estavam em 2 piquetes, com Tifton. Animais tinham acesso a água *ad libidum*). Esses cavalos recebiam, em cochos individuais, 4 quilogramas de ração em 2 tratamentos por dia). Animais saíam dos piquetes apenas para treinamento (FIGURA 01).
- Grupo 2 (G2): 9 animais (8 machos e 1 fêmea) em regime intensivo (baias, com cama de areia, com feno de Tifton e água a vontade, recebendo 6 quilogramas de ração comercial, em 3 tratamentos por dia). Animais saíam de suas baias apenas para treinamento (FIGURA 02).

Todos os animais são vacinados anualmente (Lexington 8® – vírus inativados por betapropilactona de Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza Equina cepa A/equine1/Praga/1/56, A/equine/2/Kentucky/94, Influenza eq/2/South África 04/03 e Herpes Vírus Equino tipo 1 e 4, adicionado de Toxóide Tetânico e adsorvidos por gel de hidróxido de alumínio) e são vermifugados de 3 em 3 meses, com variações de princípio ativo, conforme orientação do médico veterinário responsável.



Figura 01 – Ambiente do G1 (piquetes no qual os nove animais habitam)



Figura 02 – Ambiente do G2 (bairas em cama de areia)

6.2 CRITÉRIOS PARA FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Animais foram selecionados para o experimento, tendo como principal fator a higidez dos pacientes. Outro critério importante é o fato de pertencerem à

mesma propriedade e serem manejados pela mesma equipe, exercendo a mesma atividade física, com rotinas similares, só havendo diferenças nos regimes de criação, onde uma parte fica em regime intensivo e outra extensivo.

6.3 LOCAL

Os animais ficam numa propriedade (haras), localizada em Colatina-ES, no Bairro Martinelli (19°31'46"S 40°39'31"W).

6.4 EXAMES CLÍNICOS PRÉ-EXPERIMENTO

Todos os animais foram submetidos a um exame clínico geral e específico do aparelho respiratório, de acordo com o Departamento de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais do Hospital Veterinário UNESC, baseado em SPEIRS (1999):

- Inspeção das mucosas (oral, ocular e nasal), avaliando a coloração e o tempo de preenchimento vascular (TPC);
- Avaliação da presença ou não de secreções nasais;
- Avaliação dos linfonodos, quanto ao tamanho, mobilidade e reação dolorosa;
- Auscultação da traquéia e pulmões;
- Percussão da área pulmonar e seios paranasais;
- Auscultação e quantificação de movimentos respiratórios e cardíacos;
- Aferição de temperatura retal;

6.5 EXAMES COMPLEMENTARES

6.5.1 Hemograma

Todos os animais do experimento foram avaliados hematologicamente, com 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após as mesmas. As amostras foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário "Joaquim Rossi" – UNESC.

6.5.2 Bioquímicos

Todos os animais do experimento tiveram suas avaliações renais e hepáticas avaliadas, através das dosagens das seguintes enzimas: Cretinina, Uréia, Fosfatase Alcalina, Aspartato Aminotransferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT) e Albumina. Essas avaliações, assim como no hemograma, foram feitas 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após as coletas. As amostras foram analisadas no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário “Joaquim Rossi” – UNESC.

6.5.3 Lavado Traqueobrônquico

Para a realização dos lavados traqueobrônquicos nos dezoito equinos, foi adotada a técnica preconizada por Mansmann e Knight (1972), adaptada por Beech (1975) e Fernandes *et al.* (2000). Com os animais em estação, contidos em um tronco, podendo ser utilizada uma contenção física, através do uso do cachimbo, e realização de tricotomia (Figura 01) com posterior antisepsia de uma área aproximada de 12cm x 5cm, na face medial do terço médio do pescoço e cranial à bifurcação do músculo esternocéfálico, um cateter Intravenoso Central Intracath 16G (Figura 03), com uma agulha revestida por polietileno (material flexível com 30,5cm de comprimento) foi introduzida entre os anéis traqueais.



Figura 03 – Cateter Intracath tamanho 16G BD®

Através deste cateter, foi introduzido 40 ml de solução fisiológica estéril 0,9%, sendo rapidamente aspirada, para dentro da mesma seringa. As amostras foram consideradas adequadas quando era possível observar partículas suspensas ou filamento de mucos. Após a colheita, o material foi despejado em frascos não estéreis (aproximadamente 5ml), para ser encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário “Joaquim Rossi” – UNESC, para análise citológica e o restante do material (entre 10 e 15ml) foi adicionado em frascos estéreis e encaminhado ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Vila Velha, para posterior análise microbiológica.



Figura 4 - Tricotomia ampla na face medial do terço médio do pescoço.

6.5.4 Avaliação Microbiológica

Do momento das colheitas até o plaqueamento do material advindo dos lavados traqueobrônquicos, foram respeitados o tempo máximo de 4 horas, sendo conduzidos em caixa térmica resfriada (2 a 8°C), do local da colheita até o Laboratório de Microbiologia da UVV. Todas as amostras foram cultivadas em ambientes com aerobiose.

6.5.4.1 Avaliação Bacteriológica

Para que fossem diagnosticados os agentes bacteriológicos dos lavados, as amostras foram submetidas à plaqueamento em Ágar-Sangue enriquecido com 10% de sangue ovino, Ágar MacConkey e Caldo Brain Heart Infusion (BHI).

As respectivas amostras foram despejadas em Eppendorfs e centrifugadas numa centrífuga, a 3.600 rotações por minuto, durante 5 minutos, com o objetivo de que as bactérias se concentrassem no fundo dos recipientes e aumentassem a chance de crescimentos em placas. Ao final da sedimentação, as mesmas foram inoculadas nos meios citados acima, através de 100 microlitros do sedimento e espalhados com a Alça de Drigalski. Após o término da inoculação do conteúdo, as placas foram levadas à estufa bacteriológica, na temperatura média de 37° Celsius, onde ficaram por 72 horas, sendo observadas com 24 e 48 horas para leituras preliminares e registros fotográficos.

Após a inoculação e posterior crescimento, as colônias que obtiveram crescimento, foram purificadas nos respectivos meios de cultura, onde houve o crescimento. A partir daí foram coradas pelo método de Gram, no qual gram negativas e positivas foram selecionadas para identificação da espécie através do teste de Matrix Associated Laser Desorption-Ionization (MALDI-TOF) que será descrita posteriormente.

6.5.4.2 Morfologia Colonial

As colônias que foram obtidas nos meios de cultura, foram submetidas à técnica de esgotamento por estria em Ágar Sangue e Ágar Mackonkey com o objetivo de se obter bactérias purificadas e isoladas, para que assim fosse possível observar as características de pigmentação, tamanho, presença ou não de hemólise após a incubação a 37° Celsius por 24 – 72 horas.

6.5.4.3 Identificação Bacteriana pelo Método de MALDI-TOF

Os isolados foram submetidos à comparação do espectro da sua massa com o espectro de massa de cepas referenciadas em um banco de dados de

identificação bacteriana, através da análise proteômica MALDI-TOF. Esta técnica foi realizada no Instituto de Microbiologia Paulo Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (MOTTA et al.,2014).

Inicialmente os isolados foram cultivados em ágar BHI a 37°C por 18 horas. Então, foram transferidos para uma microplaca metálica com 96 demarcações (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA) (FIGURA 4), uma demarcação para cada isolado. Uma solução de lise de ácido fórmico a 70% (Sigma-Aldrich®) foi adicionada sobre cada demarcação em quantidade suficiente para cobrir o sedimento bacteriano e a microplaca foi deixada a temperatura ambiente para secagem. Posteriormente, 1µL de solução da matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi acrescido sobre cada demarcação e novamente a microplaca sofreu secagem à temperatura ambiente.



Figura 05 – Microplaca metálica com 96 demarcações (96 MSP, Bruker - Billerica, EUA)

A microplaca foi inserida em um espectrômetro de massa (MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®) (FIGURA 05) regulado pelo programa FlexControl 3.3 (Bruker®) para que os espectros fossem obtidos e analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker®).



FIGURA 06 – MALDI-TOF LT Microflex Bruker, Bruker®

6.5.5 Avaliação Citológica

Como citado acima, as amostras, ao serem obtidas, foram despejados em um frasco não estéril e encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário “Joaquim Rossi” – UNESC. As análises foram realizadas imediatamente após a coleta.

As amostras foram centrifugadas em uma centrífuga a velocidade de 110g durante 5 minutos, para que a celularidade, mais densa, se concentrasse no fundo do frasco. Após a centrifugação, uma alíquota foi coletada do fundo do frasco e despejado sobre uma lâmina e corada no Panótipo Rápido, permanecendo por 20 segundos em cada um dos três corantes. Ao secar, as lâminas foram analisadas quantitativamente (contagem total de 10 campos aleatórios) e qualitativamente (contagem de 100 células para obtenção dos percentuais de diferenciação celular).

6.5.5.1 Centrifugação do material e confecção das lâminas

Alíquotas de 5ml de lavado traqueobrônquico foram submetidos a centrifugação, conforme descrito acima, a velocidade de 110g durante 5 minutos. O sobrenadante foi dispensado e o fundo precipitado foi utilizado para confeccionar as lâminas. Utilizou-se a técnica de esfregação linear, segundo COWELL e TYLER (1992). Nesta técnica, coloca-se uma gota de solução numa das extremidades da lâmina. Com o auxílio de uma outra lâmina, desliza-se a gota sobre a mesma, interrompendo o movimento no centro, buscando concentrar as células de forma linear. Foram confeccionadas pelo menos duas lâminas de cada animal e fixada no Panótico Rápido.

6.5.5.2 Coloração do Material

Logo após a colheita do material e o respectivo processamento, foram confeccionadas 2 lâminas para análise quantitativa e qualitativa da celularidade. O corante utilizado foi o Panótico Rápido que propicia a identificação das principais células traqueais.

Uma gota foi despejada sobre uma lâmina e espalhada na superfície da mesma, sendo levada o corante supracitado, por 20 segundos em cada um dos 3 corantes do Panótico. Após a secagem, a lâmina foi analisada no microscópio.

6.5.5.3 Avaliação Citológica

A contagem diferencial dos tipos celulares de cada animal foi realizada por meio de análise de 10 campos aleatórios e diferentes, em objetiva de 100 vezes.

6.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises dos resultados foram submetidas no Microsoft Excel 2016, onde foram mensuradas as somas e médias.

7 RESULTADOS

A inspeção dos animais não revelou qualquer fator negativo quanto à condição física geral e ao estado nutricional. Nos quesitos comportamento, temperamento e expressão facial houve individualidade nas reações às manobras realizadas, o que é, naturalmente, justificado e esperado para a espécie. Quanto à postura, desenvolvimento muscular (atrofia, hipertrofia), cobertura de pelos, pele e anexos, não houve registros relevantes. Na inspeção de corrimentos bucais, nasais, oculares, otológicos, genitais ou anais, não houve nenhum achado significativo nos 18 animais estudados.

7.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DA REALIZAÇÃO DO EXPERIMENTO

Com a realização do experimento, a realização da referida pesquisa cumpriu com os seus objetivos em relação à identificação do perfil citológico e bacteriológico e a sua respectiva comparação entre animais em regime extensivo e intensivo. É importante salientar também que todos os cavalos utilizados neste experimento foram considerados hígidos com relação ao aparelho respiratório, pois não tinham sinais clínicos de afecções respiratórias, não apresentavam queda de desempenho e não apresentam alterações leucocitárias e eritrocitárias. É possível visualizar melhor os resultados nas TABELAS 1, 2, 3 e 4.

Outro fator de extrema importância está relacionado à influência da realização dos experimentos nos animais estudados. Nenhum deles apresentou alterações hematológicas após o experimento.

7.2 HEMOGRAMAS

Abaixo, seguem os resultados quantitativos de hemácias e leucócitos dos animais avaliados no experimento. É importante ressaltar, como mencionado acima, que não houve alterações na realização do experimento.

Tabela 1. Valores de hemácias de equinos pertencentes ao GRUPO 1 (Regime Extensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Animal	Hemácias (milhões) 7 Dias Antes	Hemácias (milhões) Dia da Coleta	Hemácias (milhões) 7 Dias Depois
1	6,37	6,58	7,01
2	6,88	6,51	6,82
3	8,31	8,03	7,63
4	6,13	6,25	6,27
5	9,31	9,11	8,88
7	8,05	7,03	7,52
8	7,99	7,12	7,46
9	7,32	7,64	8,12
10	7,36	7,21	6,66
Média	7,52	7,28	7,37

A Tabela 02 demonstra os valores de hemácias do GRUPO 2 (Regime Intensivo), também nos 3 momentos.

Tabela 2. Valores de hemácias de equinos pertencentes ao GRUPO 2 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Animal	Hemácias (milhões) 7 Dias Antes	Hemácias (milhões) Dia da Coleta	Hemácias (milhões) 7 Dias Depois
11	5,85	6,17	5,97
12	8,14	8,01	7,65
13	7,32	8,32	8,11
14	7,45	7,66	8,13
15	8,66	7,87	7,65
16	9,12	9,16	9,21
17	6,44	7,22	7,11
18	5,97	5,89	5,95
19	6,32	6,27	6,12
Média	7,25	7,40	7,32

Com a demonstração dos resultados acima, foi possível constatar que os animais não sofreram nenhum tipo de eventualidade que pudesse prejudicar a saúde dos mesmos, no que tange a quantidade e qualidade das hemácias. Nenhum dos animais estavam inaptos para o procedimento e nenhum dos mesmos apresentaram algum distúrbio eritrocitário com a realização do experimento.

Outro elemento importante na avaliação hematológica dos pacientes é a mensuração quantitativa e qualitativa de leucócitos. Na TABELA 3 estão demonstrados os valores quantitativos do G1.

Tabela 3. Valores de leucócitos de equinos pertencentes ao GRUPO 1 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Animal	Leucócitos 7 Dias Antes	Leucócitos Dia da Coleta	Leucócitos 7 Dias Depois
1	10.600	10.800	10.600
2	6.300	6.500	7.000
3	5.900	5.800	6.300
4	7.000	7.000	7.200
5	7.300	7.900	8.200
7	11.500	10.300	10.000
8	7.500	10.600	12.300
9	12.100	11.400	12.000
10	8.200	8.000	7.600
Média	8.489	8.700	9.022

Na TABELA 4 é possível visualizar o acompanhamento leucocitário dos animais do G2.

Tabela 4. Valores de leucócitos de equinos pertencentes ao GRUPO 2 (Regime Intensivo), 7 dias antes das coletas, no dia e 7 dias após.

Animal	Leucócitos 7 Dias Antes	Leucócitos Dia da Coleta	Leucócitos 7 Dias Depois
11	11.500	11.000	11.300
12	12.200	12.600	11.300
13	10.300	10.300	9.700
14	12.200	12.000	10.200
15	10.600	10.000	11.300
16	9.000	9.500	9.500
17	9.900	11.600	10.600
18	10.300	12.100	11.000
19	8.600	10.300	10.000
Média	10511	8.700	9.022

7.3 BIOQUÍMICOS

Conforme relatado no presente trabalho, além da avaliação do hemograma de todos os pacientes nos 3 tempos supracitados, foi realizada uma avaliação bioquímica, nos mesmos tempos. Para todos, foi solicitado AST, ALT, Creatinina, Uréia, Fosfatase Alcalina e Albumina. Dessa forma, é importante salientar que todos os animais do experimento em todos os tempos avaliados, não sofreram qualquer tipo de alteração. Com isso, todos os animais estavam aptos para o experimento e tal estudo não contribuiu para decréscimo da sanidade dos mesmos;

7.4 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

Na avaliação citológica do G1, os resultados do experimento estão descritos na TABELA 05. Na apresentação dos valores, é possível fazermos uma avaliação quantitativa e qualitativa.

Tabela 5. Avaliação, quantitativa e qualitativa, da celularidade dos animais pertencentes ao G2, regime extensivo.

Animal	CG	CE	HE	MAC	LIN	EOS	NEU	Total
1	1	32	0	60	2	0	0	95
2	0	1	0	16	4	1	1	23
3	3	0	0	36	0	7	0	46
4	0	0	0	4	4	0	116	124
5	3	0	0	49	4	0	0	56
7	3	0	0	71	4	0	5	83
8	3	15	0	42	0	0	0	60
9	0	1	0	27	3	0	9	40
10	4	0	0	17	2	1	0	24

CG: Células Gigantes
CE: Células Epiteliais
HE: Hemossiderófagos
MAC: Macrófagos
LIN: Linfócitos
EOS: Eosinófilos

NEU: Neutrófilos

Com a avaliação quantitativa, foi possível avaliar que o animal número 4 apresentou uma maior quantidade de células do que os demais. Acrescenta-se a essa informação, que de todos os animais avaliados, foi a de maior contagem de neutrófilos. Como o exame complementar deve, de fato, completar o exame clínico, deve-se considerar, após avaliações físicas gerais e específicas do sistema respiratório e hematológico, que o resultado foi um achado, pois nenhuma outra alteração que chamasse a atenção para algum tipo de afecção. Vale ressaltar, que de todos os animais avaliados no experimento, este foi o que apresentou o maior número de células, por este motivo, o animal foi reavaliado outras vezes, para que fosse verificado se de fato não haveria nenhuma alteração clínica.

Outro fator importante a ser analisado é que todos os animais desse grupo não possuíam hemossideróforos em suas secreções.

Dos demais animais testados, o número 3 e 10 foram os que apresentaram menor celularidade, na avaliação quantitativa.

Já diante da avaliação citológica do G2, foi possível constatar, de acordo com a Tabela 6, as seguintes avaliações qualitativas e quantitativas.

Tabela 6. Avaliação, quantitativa e qualitativa, da celularidade dos animais pertencentes ao G2, regime intensivo.

Animal	CG	CE	HE	MAC	LIN	EOS	NEU	Total
11	0	40	16	6	1	0	0	63
12	1	55	0	7	2	1	1	67
13	1	1	0	44	5	0	2	53
14	0	0	4	28	3	1	11	47
15	6	0	0	40	9	0	2	57
16	2	17	2	4	3	0	0	28
17	3	0	0	47	6	5	7	68
18	1	19	0	27	5	0	0	52
19	3	12	6	35	6	2	2	66

CG: Células Gigantes
CE: Células Epiteliais
HE: Hemossideróforos
MAC: Macróforos

LIN: Linfócitos
EOS: Eosinófilos
NEU: Neutrófilos

Na análise do G2, foi possível identificar algumas informações importantes. Assim como no G1, a célula de maior predominância foi o Macrófago,

7.4.1 Comparativo citológicos entre os grupos 1 e 2.

Num comparativo de celularidade entre os 2 grupos, foi possível constatar alguns fatores relevantes (GRÁFICO 1). O principal deles deve-se à presença, no G2, de hemossideróforos em 44,4% dos animais. Em contrapartida no G1 nenhum dos animais apresentaram tal célula em seu lavado. O número de macrófagos não é estatisticamente diferente de um grupo para o outro, podendo afirmar que, desse ponto de vista, não há diferença de regime de criação.

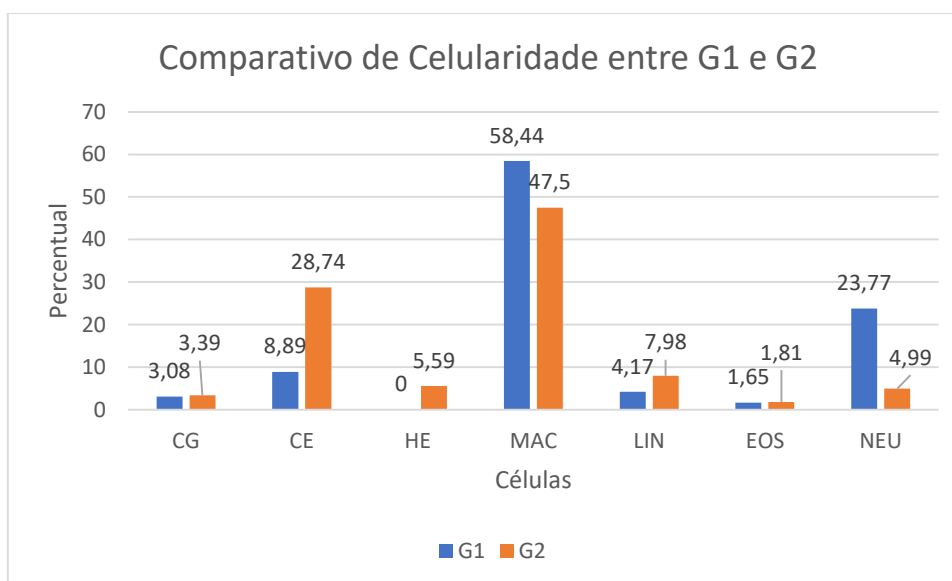


Gráfico 01 – Comparativo de celularidade entre os dois grupos: G1 e G2.

Como destacado acima, a presença de hemossideróforos no G2, pode predispor animais em regime intensivo a afecções respiratórias, pois é característica de animais que possuem hemorragia pulmonar induzida por exercício. A esse fato, pode-se creditar à presença muito maior de partículas em suspensão aspiradas por este grupo em comparação com os de regime extensivo, no qual a aspiração desses resíduos é muito menor.

Na avaliação das tabelas 7 e 8 abaixo, ressalta-se também, a diferença,

dentre G1 e G2 de células epiteliais. No G2 a quantidade encontrada é muito maior do que no G1, dando indícios de maiores riscos de lesões, pelo aumento de processo inflamatório, devido a agressão de partículas suspensas.

Tabela 7. Resultados gerais do total de células e seus percentuais dos animais pertencentes ao Regime Extensivo (G1).

RESULTADO GERAL DO GRUPO 1		
Células	N	Representação
CG	17	3,08%
CE	49	8,89%
HE	0	0,00%
MAC	322	58,44%
LIN	23	4,17%
EOS	9	1,65%
NEU	131	23,77%
TOTAL	551	100,00%

N: Contagem total de cada célula

Representação gráfica de celularidade no G1 (GRÁFICO 02).

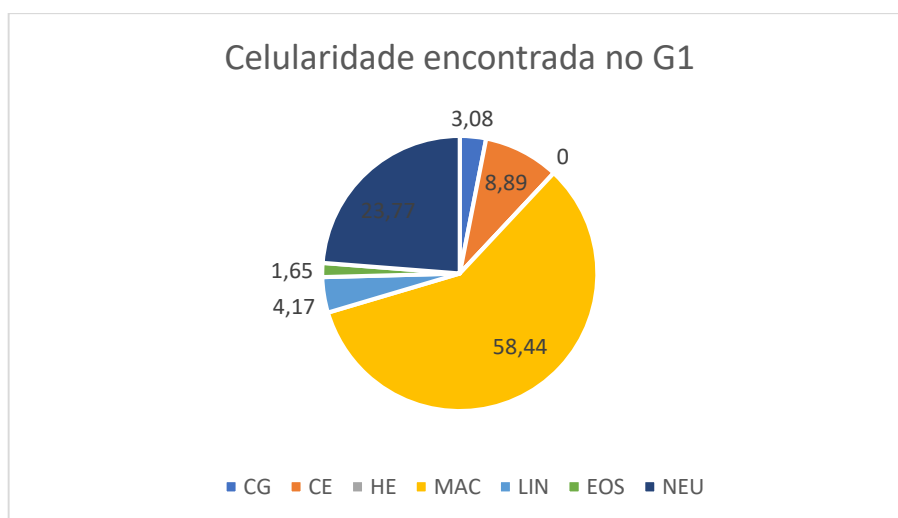


Gráfico 02 – Percentuais de celularidade do G1

Tabela 8. Resultados gerais do total de células e seus percentuais dos animais pertencentes ao Regime Extensivo (G1).

RESULTADO GERAL DO GRUPO 2		
Células	N	Representação
CG	17	3,39%
CE	144	28,74%
HE	28	5,59%
MAC	238	47,50%
LIN	40	7,98%
EOS	9	1,81%
NEU	25	4,99%
TOTAL	501	100,00%

N: Contagem total de cada célula

Representação gráfica do G2 é outra alternativa de analisar os números.

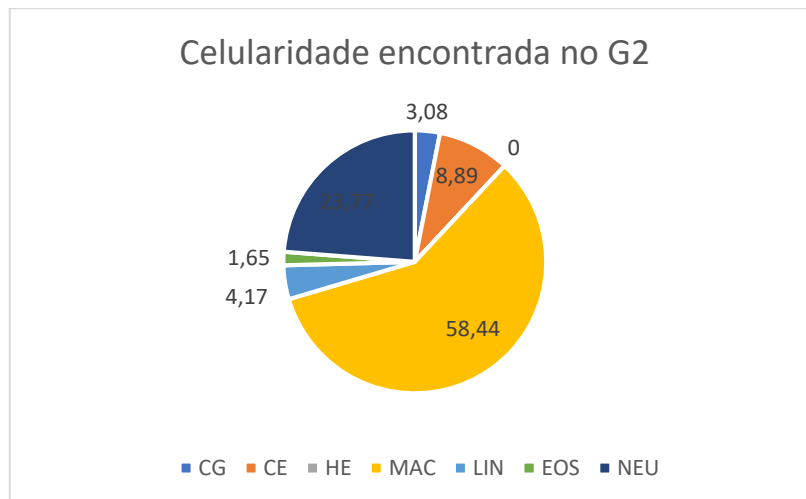


Gráfico 03 – Percentuais de celularidade do G2.

7.5 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA

Na avaliação microbiológica dos dois grupos, foi possível identificar as bactérias, de acordo com as tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Resultados das culturas bacterianas em meios aeróbios, provenientes dos LTB dos animais pertencentes ao Regime Extensivo de Criação (G1).

G1	
ANIMAL	BACTÉRIAS
1	A) <i>Bacillus cereus</i> B) <i>Bacillus pumilus</i> C) <i>Acinetobacter baumannii</i>
2	NÃO HOUE CRESCIMENTO
3	A) <i>Bacillus pumilus</i> B) <i>Klebsiella oxytoca</i> C) <i>Pseudomonas luteols</i> D) <i>Acinetobacter baumannii</i>
4	A) <i>Kocuria marina</i> B) <i>Bacillus cereus</i>
5	A) <i>Aeromonas caviae</i> B) <i>Acinetobacter baumannii</i>
7	A) <i>Micrococcus luteus</i> B) <i>Bacillus cereus</i>
8	A) <i>Bacillus pumilus</i> B) <i>Pantoea agglomerans</i> C) <i>Bacillus cereus</i>
9	A) <i>Staphylococcus xylosus</i> B) <i>Bacillus cereus</i>

10	<ul style="list-style-type: none"> A) <i>Bacillus cereus</i> B) <i>Micrococcus luteus</i> C) <i>Sphingobacterium multivorum</i> D) <i>Pasteurella aerogenes</i> E) <i>Acinetobacter baumannii</i> F) <i>Pantoea eucrina</i>
----	---

Tabela 10. Resultados das culturas bacterianas provenientes dos LTB, pertencentes ao G2.

G2	
ANIMAL	BACTÉRIAS
11	<ul style="list-style-type: none"> A) <i>Bacillus pumilus</i> B) <i>Rhodococcus rhodochrous</i> C) <i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
12	A) <i>Acinetobacter baumannii</i>
13	<ul style="list-style-type: none"> A) <i>Bacillus cereus</i> B) <i>Bacillus mycoides</i> C) <i>Staphylococcus arlettae</i> D) <i>Bacillus pumilus</i> E) <i>Staphylococcus sciuri</i>
14	<ul style="list-style-type: none"> A) <i>Bacillus cereus</i> B) <i>Pantoea eucrina</i> C) <i>Staphylococcus xylosus</i>
15	<ul style="list-style-type: none"> A) <i>Bacillus subtilis</i> B) <i>Bacillus pumilus</i>

16	<p>A) <i>Enterobacter cloacae</i> B) <i>Staphylococcus xylosus</i> C) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> D) <i>Bacillus cereus</i> E) <i>Vibrio scophthalmi</i></p>
17	<p>A) <i>Staphylococcus sciuri</i> B) <i>Acinetobacter baumannii</i> C) <i>Pseudomonas fulva</i> D) <i>Staphylococcus arlettae</i> E) <i>Pantoea eucrina</i></p>
18	<p>A) <i>Bacillus cereus</i> B) <i>Bacillus pumillus</i> C) <i>Pantoea agglomerans</i> D) <i>Staphylococcus xylosus</i> E) <i>Pseudomonas fulva</i></p>
19	<p>A) <i>Pantoea agglomerans</i> B) <i>Acinetobacter baumannii</i> C) <i>Sphingomonas paucimobilis</i> D) <i>Klebsiella ozaenae</i> E) <i>Brevibacterium linens</i> F) <i>Bacillus pumilus</i></p>

Nas avaliações das bactérias identificadas no experimento, foi possível isolarmos 13 espécies bacterianas diferentes no G1 e 19 espécies no G2.

É importante ressaltar que de todos os animais do experimento, 94,5% tiveram crescimento positivo, ficando apenas 1 (5,5%) animal sem nenhum tipo de crescimento bacteriano nos meios de cultura.

Na tabela 11, é possível destacarmos a divisão das bactérias encontradas, em caracterização de Gram, no qual 46,1% e 48,4% foram de características Gram Positivas no G1 e G2, respectivamente. Na caracterização de Gram negativas,

53,9% no G1 e 52,6% no G2. Tais dados nos mostram números bem similares, nos dois grupos, nesse quesito.

Tabela 11. Verificação das características bacterianas nos grupos pesquisados de todos os animais, separados pelos Regimes de Criação: G1 (Regime Extensivo) e G2 (Regime Intensivo).

GRUPO	GRAM POSITIVA	GRAM NEGATIVA
G1	6 (46,1%)	7 (53,9%)
G2	9 (48,4%)	10 (52,6%)

É possível notarmos que em ambos os grupos não houve diferença significativa entre a predominância de bactérias, conforme sua coloração de Gram.

No G2 a espécie bacteriana predominante foi um bacilo Gram positivo, denominado *Bacillus pumilus*, presente em 66,7% dos animais pesquisados deste grupo. Já no G1 a espécie predominante, também foi um bacilo gram positivo, mas a espécie foi diferente (*Bacillus cereus*). Outro destaque se dá pela morfologia bacteriana, no qual, em ambos os grupos foram de predominância de bacilos, representando 76,9% no G1 e 78,9% no G2.

8 DISCUSSÃO

Ratificando as descrições de GONÇALVES (1997), KUCHEMUCK e ALMEIDA (1990), FERNANDES, MORI E SANCHES (2000), esse experimento menciona a viabilidade da coleta de secreções do trato respiratório e a avaliação laboratorial do material, através do LTB.

Os registros aqui exibidos conciliam com os de PICKLES *et al.* (2002), em que todas as 18 alíquotas recuperadas foram consideradas adequadas para representação citológica baseando-se nos volumes recuperados, posto terem sido considerados satisfatórios para a representatividade celular.

A ocorrência de celularidades diversa, artefatos, muco e bactérias em maior ou menor intensidade, mas presentes em todos os grupos trabalhados concordam com MCGORUM (2001) de que fatores como a atmosfera das instalações, a apresentação do alimento e a utilidade do animal consistem em uma mescla variável de agentes que podem influenciar os resultados encontrados.

8.1 CONSIDERAÇÕES ACERCA DO PROCEDIMENTO

Os problemas pneumônicos de equinos estão entre as afecções mais frequentes na clínica de equinos e os processos infecciosos são a segunda categoria mais frequente de afecção pulmonar (DIXON *et al.*, 1995). Existem inúmeras espécies de microrganismos capazes de causar infecções pulmonares nos cavalos (RACKLYEFT; LOVE, 2000). Por estes motivos, considera-se que o conhecimento da biota do trato respiratório destes animais seja de suma importância para permitir uma análise mais acurada de resultados microbiológicos de amostras de lavados traqueobrônquicos coletados para fim de diagnóstico.

O trabalho cumpriu com seus objetivos em relação ao isolamento e reconhecimento de microrganismos do aparelho respiratório de equinos sadios por meio de técnicas de colheita de lavado traqueobrônquico.

Todos os cavalos utilizados neste experimento foram considerados hígidos com relação ao aparelho respiratório, pois não tinham sinais clínicos característicos do sistema, não apresentavam queda de desempenho e não apresentam alterações leucocitárias.

Não foram observadas complicações com as técnicas empregadas. A segurança das técnicas foi reforçada pela ausência de alterações hematológicas nos animais pesquisados, observadas nas leucometrias mensuradas sete dias depois da colheita, o que indica a ausência de complicações associadas às lesões produzidas durante a colheita. Isto condiz com trabalhos previamente descritos que referem apenas alterações auto limitantes após as colheitas de biopsias pulmonares (VIEL, 1980).

8.2 AVALIAÇÃO CITOLÓGICA

De acordo com DECONTO (1983) E BEECH (1991), o LTB é uma boa técnica para o diagnóstico da inflamação das pequenas vias aéreas.

O tipo celular predominante no LTB, nos 2 grupos, foi o macrófago, indo de encontro ao encontrado por FERNANDES *et al.* (2000), onde compararam métodos de coleta de fluidos traqueais (Lavado Traqueobrônquico com Lavado Bronco alveolar). Outro fator de impacto nesse tipo celular predominante é que a presença do mesmo indica que a técnica teve sucesso em obter amostras de áreas mais distais do sistema respiratório (BAIN, 1997).

MAIR *et al.* (1997) observaram 65% de macrófagos em LTB de cavalos ao utilizarem a técnica de aspiração percutânea transtraqueal, enquanto que na lavagem via endoscopia foram observados valores menores (43%). Observando as tabelas abaixo, pode-se ver que no G1 os percentuais de macrófagos foram de 58,44% no G1 e 47,5% no G2.

Um fato que deve ser levado em consideração é a questão da avaliação quantitativa das células encontradas. BEECH (1991) afirmou que a contagem total e diferencial não é considerada confiável devido as variações de volumes recuperados após serem infundidos, pois a mesma se dilui de forma desproporcional de um animal para o outro. Porém, FERNANDES *et al.* (2000), vai contra a afirmação pelo fato das amostras serem centrifugadas e apenas a celularidade precipitada é utilizada para realizar a avaliação e classificação. Por isso, nas recentes pesquisas, encontra-se várias formas de quantificar a celularidade, no entanto, os valores percentuais devem estar dentro do preconizado como referência. Os valores de referências no trabalho em questão é o indicado por ROBINSON (2003).

SILVA (2010) realizou uma avaliação citológica em cavalos de pólo pós-exercício e realizou a contagem celular através da avaliação de 300 células em objetiva de 100 vezes e calculou, posteriormente, a média do que encontrou. A presente pesquisa difere da forma de avaliação e mensuração quantitativa da que foi avaliada pela autora acima. Na presente pesquisa foram avaliados 10 pontos aleatórios e não repetidos da lâmina, somando as células e as caracterizando. Os resultados foram expostos acima.

Os critérios utilizados como referência para a citologia traqueal foram os propostos por ROBINSON (2003), sendo considerados sadios os animais com percentuais de contagem para neutrófilos, abaixo de 20% do total de células e abaixo de 1% para os eosinófilos.

Nesses valores de referências, propostos por ROBINSON (2003), corroboram a higidez dos pacientes. No grupo onde os animais permanecem soltos em piquetes (G1) o valor de neutrófilo está, na média, em 23,77%, porém, devido ao animal 4, com característica específica, já explicado acima. Em contagens individuais, nenhum outro animal ultrapassou a contagem de 9 neutrófilos. Já no grupo dos animais que ficam quase o tempo todo nas baias (G2), o valor está quase no limite máximo, em torno de 19,87%. No estudo de SILVA (2010), já citado acima, em 37 animais avaliados no experimento, a média de neutrófilos foi similar à encontrada no G2, de aproximadamente 18%.

No estudo realizado por FORTES JÚNIOR (2005) foi possível constatar que os animais em regime intensivo tiveram percentuais maiores de macrófagos (aproximadamente 60%) e neutrófilos (4,4%), evidenciando assim uma agressão maior ao sistema respiratório. Em contrapartida, no presente estudo, apenas o número de neutrófilos foram maiores no grupo 2, onde o percentual foi de aproximadamente 19% contra os 7% do grupo 1. Nessa mesma linha de estudo, BEECH (1991) conseguiu constatar que o fato de animais estabulados apresentarem um número maior de células inflamatórias, está diretamente relacionado com a alimentação a base de feno, normalmente com partículas suspensas (poeiras) e, posteriormente, encaminhados à prática de atividades físicas.

8.3 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS BACTERIOLÓGICOS DO LTB

SPEIRS (1999) citou em sua pesquisa que as vias aéreas não são estéreis e existe uma maior perspectiva de isolamento de microrganismos em locais fechados, como hospitais e estábulos, fato este que vai de encontro com o que foi encontrado na presente pesquisa, no qual foram isoladas diversas bactérias nos diferentes grupos, ficando apenas um animal (Equino 2 do G1, 5,5%) sem crescimento bacteriano.

O lavado transtraqueal para exames bacteriológicos é considerado uma das técnicas mais acuradas para obter espécimes de secreção respiratória para exames microbiológicos (DIXON, 1997). Esta técnica permite avaliar qualitativamente a microbiota traqueal de animais domésticos, não sendo indicada para quantificar microrganismos nos lavados traqueobrônquicos, pois a injeção de líquidos no lume traqueal pode diluir o muco e mascarar a real concentração de bactérias existentes na traquéia (HEWSON; VIEL, 2002).

Apenas um dos animais apresentou resultado negativo para cultura bacteriana. Estes patamares são próximos aos níveis máximos observados por outros pesquisadores, que concluíram que 32% a 92% dos eqüinos apresentam o isolamento de pelo menos uma espécie bacteriana (NUYTTEN, et al, 1983; CRANE, et al. 1989). Outro estudo de MARR (2000), com 30 pôneis, no qual comparou duas técnicas distintas de coleta de material, assim como

ROLIM DUARTE (2007) em sua dissertação encontrou, em animais a pasto, oito espécies bacterianas aeróbias, com destaque para *Enterobacter agglomerans* e *Hafnia alvei*. Em contrapartida, no presente estudo foram encontradas treze espécies distintas, com predominância para *Bacillus cereus* e *Acinetobacter baumannii*. No G2, com animais em regime intensivo, o mesmo autor acima encontrou nove espécies (predominância de *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e *Pasteurella spp*), contra dezenove deste estudo, sendo *Bacillus pumilus* e *Bacillus cereus* as mais incidentes.

Quanto a classificação de Gram, ROLIM DUARTE (2007) encontrou, a pasto, dez Gram Positivos e 13 Gram Negativos, contra seis Gram Positivos e sete Gram Negativos deste estudo. Em comparação, pode-se notar que esta pesquisa se diferiu da incidência do estudo de ROLIM DUARTE (2007). Em animais estabulados estudo

que serviu de comparação, teve predominância total de Gram Negativos (quinze contra quatro), no qual neste ponto se equivaleu, pois houve predominância, em ambos estudos, de Gram Negativos.

As bactérias do gênero *Streptococcus* alfa-hemolítico, *Acinetobacter spp*, *Staphylococcus spp* e as enterobactérias são microrganismos típicos da nasofaringe do equino (DARIEN *et al.*, 1990). A observação destas espécies na traquéia dos cavalos do presente estudo reitera que a contiguidade anatômica com a nasofaringe é fator de importância para o isolamento destas bactérias na traquéia destes animais.

A microbiota traqueal observada no presente estudo (tabelas 9 e 10) é similar à encontrada por outros pesquisadores, que observaram a ocorrência de cocos gram-positivos e bacilos gram-negativos.

Utilizando-se do lavado transtraqueal, MANNSMAN (1976) isolou *Bacillus spp*, *Acinetobacter spp*, *Corynebacterium sp*, *Enterobacter spp*, *Flavobacterium spp*, *Klebsiella sp*, *Micrococcus sp*, *Pseudomonas sp*, *Serratia sp* *Staphylococcus sp*, *Streptococcus equi*, *Streptococcus spp* e *Nocardia sp*. Um fator de extrema relevância deste estudo para os demais é que, com a utilização do MALDI-TOF, não só a família é identificada como sua espécie. É relevante salientar que não foram identificados estudos similares com tamanha identificação das bactérias.

As espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos já foram relatadas como causadoras de pneumonia de equinos (RACKLYEFT; LOVE, 2000). O significado de *S. alerttae* e *S. hominis* é incerto com relação ao seu potencial patogênico para o pulmão desta espécie.

Pode-se inferir que muitas das enterobactérias isoladas no presente trabalho (*Pantoea agglomerans*, *Pantoea eucrina*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella ozaenae*) devem ser originárias de porções mais altas do trato respiratório, como a nasofaringe e menos comumente da cavidade oral. Como predominam no intestino dos animais e no ambiente externo devem colonizar inicialmente estas porções mais altas, para posteriormente chegarem ao lume traqueal. Podem também ingressar diretamente na traquéia quando os animais fazem falsa – via com alimentos contendo estes microrganismos, pois alguns pesquisadores relatam que no lume traqueal é possível encontrar ingesta, especialmente durante o transporte dos animais em veículos (RACKLYEFT; LOVE, 1990).

A bacterioscopia de amostras de lavado traqueobrônquico permite observar a predominância de microrganismos Gram Positivos ou Gram Negativos, e assim fornecer informações essenciais para a escolha inicial de um antibiótico a ser empregado no tratamento (SELLON, 2001). Apesar de microrganismos Gram Positivos e Gram Negativos coexistirem em equilíbrio em diferentes sítios, não se recomenda a simples análise de colorações para determinar a etiologia de pneumonias bacterianas nos equinos, uma vez que ambos os grupos podem estar presentes. Somente com a observação na cultura de um único grupo de bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, é que se pode utilizar esse critério para instituição de antibioticoterapia (ORSINI; KREUDER, 2000; KR PAN, 1984).

Por fim, cabe ressaltar que no presente estudo, as amostras só foram submetidas a crescimentos em meio aeróbios, não acrescentando a possibilidade de bactérias anaeróbias e aerofilia. Fato este que pode ser acrescentado em futuras pesquisas. Vale ressaltar também que, como discutido anteriormente, os lavados transtraqueais são ferramentas importantes no diagnóstico das infecções pulmonares. Porém, é imperativo utilizar-se de bom senso na interpretação dos resultados das culturas microbiológicas, pois os resultados da presente pesquisa permitem concluir que muitos agentes de potencial patogênico são isolados da traquéia de animais saudáveis. Em vista disso, apenas pode-se considerar o isolamento como referente a uma infecção pulmonar, quando os microrganismos são isolados em cultura pura ou em grandes quantidades (HEWSON; VIEL, 2002).

CONCLUSÃO

Com a realização do estudo, foi possível concluir que, citologicamente, há uma diferença do grupo 1 para o grupo 2, no qual observou-se células inflamatórias em maior quantidade (hemossiderófagos).

Do ponto de vista microbiológico o grupo em regime intensivo de criação (G2), permitiu uma maior variedade de bactérias isoladas, concluindo que há um risco maior de desenvolvimento de afecções respiratórias quando comparados com o grupo 1.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, P. C.; GRACA, F. A. S.; VIANNA, L. F. C. G.; BORGES, J. R. J.; FERREIRA, A. M.; PIRES, N. R.; VOSS, C. Doença pulmonar obstrutiva crônica em equinos da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 6, n. 2, p. 77-83, 1999.
- BAILEY, G.D; LOVE, D.N. Oral associated bacterial infection in horses: studies on the normal anaerobic flora from the pharyngeal tonsillar surface and its association with lower respiratory tract and paraoral infections. **Vet. Microbiol.** 1991 Feb 15;26(4):367-79.
- BEECH, J. (1975). Cytology of tracheobronchial aspirates in horses. **Veterinary Pathology**, 12, 157-164.
- BEECH, J. Tracheobronchial aspirates. In: BEECH, J. **Equine respiratory disorders**, Philadelphia: Lea e Febiger, 1991b. p.27-53.
- BIAVA, P.S., GREEN, C., MAIN, J.P.M., TAYLOR, P.M., CUNNINGHAM, F.M., COOK, A.J.C., CHRISTLEY, R.M., HODGSON, D.R., ROSE, R.J., HODGSON, J.L., WOOD, J.L.; REID, S.W. (2005.) Coughing in thoroughbred racehorses: risk factors and tracheal endoscopic and cytological findings. *Veterinary Record*. 148, 99-104.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência à Saúde. **Modulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.
- CRANE, S.A.; ZIEMER, E.L.; SWEENEY, C.R. Cytologic and bacteriologic evaluation of tracheobronchial aspirates from clinically normal foals. *Am J Vet Res* 1989; 50:2042-2048.
- 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.
- 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.
- DE MAAYER P, CHAN WY, BLOM J, VENTER SN, DUFFY B, SMITS TH, COUTINHO TA. The large universal Pantoea plasmid LPP-1 plays a major role in biological and ecological diversification. **BMC Genomics**. 2012 Nov 15;13:625.
- 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).

DIXON, P.M.; RAILTON D.I.; MCGORUM, B. C. Equine pulmonary disease: a case control study of 300 referred cases. Part 1: Examination techniques, diagnostic criteria and diagnoses. **Equine Vet J.** 1995 Nov;27(6):416-21. Comment in: *Equine Vet J.* 1995 Nov;27(6):402-3.

DIXON, P.M, ROBINSON, N.E, Schumacher, J. (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery.* 1997 (pp. 565-589). Philadelphia: Elsevier Saunders.

ERICKSON, H. H.; POOLE, D. C. Exercise-Induced Pulmonary Hemorrhage. In: **Equine Respiratory Disease.** Ithaca, NY: International Veterinary Information Services. Available at www.ivis.org. Accessed 2019.

ETTINGER, S.J., FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Veterinária.** 4 ed. Philadelphia: Manole Ltda, v.1, 1995.

FERNANDES, W. R.; MORI, E.; SANCHES, A. Avaliação citológica de lavados traqueobrônquico e broncoalveolar em cavalos clinicamente sadios pelo método de coloração de Rosenfeld. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 52, n. 6, p. 604-609, 2000.

FORTES Jr., W.F. **Citologia Pulmonar de Equinos (*Equus caballus*) em situação de manejo estrito a campo e estabulados,** 2005. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

GONÇALVES, R. C. **Estudo clínico e citológico em bezerros clinicamente sadios e portadores de broncopneumonia moderada e grave** – o lavado traqueobrônquico como complemento diagnóstico. 1997. 144 f. Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

GONÇALVES, R. C.; KUCHEMUCK, M. R. G.; ALMEIDA, C. T. Lavagem traqueobrônquica por traqueocentese em bovinos. **Veterinária e Zootecnia,** v. 2, n. 2, p. 17-25, 1990.

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.

HODGSON, J. L.; HODGSON, D. R. Tracheal aspirates: indications, technique, and interpretation, In.:

ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine,** 5ed., St. Louis: Saunders, 2003, p.401-406.

HOFFMAN, A.M.; VIEL, L.; PRESCOTT, J.F. Association of microbiologic flora with clinical, endoscopic, and pulmonary cytologic findings in foals with distal respiratory tract infection. **Am J Vet Res** 1993; 54:1615-22.

KARL KARL H. SCHLEIFER E WESLEY E. KLOOS: Isolamento e caracterização de estafilococos da pele humana I. Descrições de *Staphylococcus epidermidis* e

Staphylococcus saprophyticus e descrições de três novas espécies: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus xylosus*. **Int J Syst Bacteriol** janeiro de 1975 25: 50-61;

KAVUNCUOGLU F, UNAL A, OGUZHAN N, TOKGOZ B, OYMAK O, UTAS C: First Reported Case of *Alcaligenes faecalis* Peritonitis. **Perit Dial Int** 2010, 30(1):118-119

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.

LAVOIE, J.P. (2007). Recurrent airway obstruction (heaves) and summer pasture-associated obstructive pulmonary disease. In B.C. MCGORUM, P.M. LEKEUX, P. LEKEUX (Ed.), *Equine Respiratory Diseases*. Ithaca, NY: International Veterinary Information.

LESSA, D. A. B. **Doença inflamatória das vias aéreas (DIVA) em equinos de policiamento na cidade do Rio de Janeiro, RJ**: estudo clínico e da atividade macrofágica alveolar. 2003. 102 f. Tese (Doutorado em Clínica Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LESSA, D. A. B.; MORI, E.; VIANA, E. B.; SANTOS, O. J.; MOREIRA, J. F. E.; FERNANDES, W. R. Lavado Broncoalveolar em Equinos: revisão de literatura Parte 2: Achados citológicos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 10, n. 1, p. 31-38, 2007.

MAIR, T.S.; Bacterial pneumonia associated with corticosteroid therapy in three horses. **Vet Rec**. 1996 Mar 2;138(9):205-7.

MANSMANN, R. A.; KNIGHT, H. D. Tracheal aspiration in the horse. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.160, n.11, p.1527- 15 29, 1972.

MANSMANN, R. A.; KING, C. How to perform BAL in practice. In: 44TH AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS ANNUAL CONVENTION, 1998. **Proceedings of the 44th American Association of Equine Practitioners**. v. 44, p. 186-188, 1998.

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.

MCGORUM, B. C. Respiratory secretion (RS) sampling techniques and interpretation. In: DIXON, P. M. **Equine Respiratory Endoscopy**. Bracknell: Boehringer Ingelheim Vetmedica, 1993. p. 118.

MCGORUM, B. C.; DIXON, P. M. The analysis and interpretation of equine bronchoalveolar lavage fluid (BALF) cytology. **Equine Veterinary Education**, v. 6, n. 4, p. 203-209, 1994.

McGORUM, B. Environmental factors as aetiological agents. **Equine Veterinary Journal**, v. 33, n. 1, p. 5-19, 2001. International Workshop On Equine Chronic Airway Disease.

McGORUM, B.C. McGorum, DIXON, P.M. Dixon, ROBINSON, N.E. Robinson, Schumacher, J. (Eds.), **Equine Respiratory Medicine and Surgery**. (pp. 119-149). Philadelphia: Elsevier Saunders.

MEYER, T.S., FEDDE, M.R., GAUGHAM, E.M., LANGSETMO, I. & ERICKSON, H.H. (1998). Quantification of exercise-induced pulmonary haemorrhage with bronchoalveolar lavage. **Equine Veterinary Journal**, 30, 284-288.

MICHELOTTO JUNIOR, P. V. Alterações no aspirado / lavado traqueal e no lavado broncoalveolar decorrentes da prática esportiva. In: IX CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 2008, São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo: ABRAVEQ, [2008] (CD-ROM).

MORI, E.; MORI, C. M. C.; FERNANDES, W. R. Avaliação da função de macrófagos alveolares em cavalos clinicamente saudáveis. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 2, p. 172-178, 2001.

MORRIS, D. D. Equine tracheobronchial aspirates: correlation of cytological and microbiological findings. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.184, n.3, p.340-341, 1984.

PECORA, D. V. A method of securing uncontaminated tracheal secretions for bacterial examination. **Journal of Thoracic Surgery**, v.37, n.5, p.653-654, 1959.

PICKLES, K. et al. *et al.* Cytological analysis of equine bronchoalveolar lavage fluid. Part 2: Comparison of smear and cytocentrifuged preparations. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, n. 3, p. 292-296, 2002.

PIOTTO Jr, S.B. **Correlação entre os exames citológico do aspirado traqueo-bronquial por fibroscopia e o histopatológico pulmonar por biópsia percutânea em equinos (*Equus caballus*)**, 2000. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná.

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.

RAPHEL C.F; BEECH J. Pleuritis secondary to pneumonia or lung abscessation in 90 horses. **J Am Vet Med Assoc**. 1982 Oct 15;181(8):808-10.

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**.

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.

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 Service.

ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do may-grunwald e do giemsa num só corante de emprego rápido. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20. p. 329-335, 1947.

SANCHES, A. Avaliação citológica do lavado traqueobrônquico de eqüinos clinicamente sadios e daqueles portadores de afecções do sistema respiratório. 1998. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SANTOS, L. C. P.; MICHELOTTO-JÚNIOR, P. V.; KOZEMJAKIN, D. A. Achados endoscópico e citológico das vias respiratórias de potros puro sangue inglês em início de treinamento no Jôquei Clube do Paraná. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar**, v.10, n.1, p.9-13, 2007.

SPEIRS, V. C. O sistema respiratório. In: SPEIRS, V.C. **Exame clínico de eqüinos**. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 37-81.

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.

TAKIZAWA, Y.; HOBBO, S.; YAMAUCHI, J.; YAMANE T. KUWAMOTO, Y.; WADA, R.; ANZAI, T. Cytological and bacteriological observation of tracheobronchial aspirates from young Thoroughbreds transported by vehicle over long distances. **Journal of Equine Science**, v.16, n.4, p.117-121, 2005.

TRAUB-DARGATZ, J. L. et al. Effect of transportation stress on bronchoalveolar lavage fluid analysis in female horses. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, n. 7, p. 1026-1029, July, 1988.

VIEL, L.; HEWSON, J. Bronchoalveolar lavage. In.: ROBINSON, N.E. **Current Therapy in Equine Medicine**, 5 ed., St. Louis: Saunders, 2003. p.407-411.

VOSS, E.; SEAHORN, T. (2004). Tracheobronchoscopy. In N.M. Slovis, *Atlas of equine endoscopy*. (pp. 97-118). St. Louis, Missouri: Mosby Marlin, D.J., Vicent, T.L. (2007). **Pulmonary blood flow**. In B.C. McGorum, P.M. Dixon, N.E. Robinson e J. Schumacher (Eds.), *Equine Respiratory Medicine and Surgery*. (pp. 33-42). Philadelphia: Elsevier Saunders.

