UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária

Dissertação

Fibrose pulmonar multinodular dos equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial

Pablo Estima Silva

Pelotas, 2017

Pablo Estima Silva

Fibrose pulmonar multinodular dos equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Drª. Ana Lucia Schild

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586f Silva, Pablo Estima

Fibrose pulmonar multinodular dos equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial. / Pablo Estima Silva ; Ana Lucia Schild, orientadora. — Pelotas, 2017.

32 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Doença pulmonar. 2. Fibrose pulmonar. 3. Equinos. 4. Estudo retrospectivo. I. Schild, Ana Lucia, orient. II. Título.

CDD : 636.1

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Pablo Estima Silva

Fibrose pulmonar multinodular dos equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial

Dissertação apresentada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 16/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dra. Ana Lucia Schild (Orientador)
Doutora em Patologia Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dra. Silvia Regina Leal Ladeira
Doutora em Ciências veterinárias pela Universidade Nacional de La Plata, Argentina

Prof. Dra. Eliza Simone Viégas Sallis
Doutora em Patologia pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Clairton Marcolongo-Pereira
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha família, em especial à minha mãe Elisabeth Estima e minha irmã Mariana Estima, pelo amor, apoio, incentivo e paciência em indecisões e momentos difíceis, tanto em minha vida acadêmica, como pessoal. São presenças imprescindíveis em minhas conquistas.

Agradeço à minha orientadora Ana Lucia Schild pelo rumo em minha vida profissional. Devo muito do que aprendi a ela.

Agradeço aos diversos colegas do curso de Pós-Graduação e às técnicas do laboratório de histoquímica pela confecção das lâminas.

Aos colegas e amigos Ana Carolina Barreto Coelho de Oliveira e Plínio de Oliveira, essenciais na minha vida profissional e pessoal.

Ao colega Clairton-Marcolongo Pereira pelas sugestões dadas neste trabalho.

Agradeço a Henrique Schuch, João Silva Filho e Paulo Barreto dos Reis que seguem me ensinando de onde estão.

E por último, e obviamente não menos importante, à Bruna pelo amor, companheirismo, pelo rumo me dado. Mas, principalmente, pelo maior presente que já ganhei: Julia (sentido da minha vida).

Agradeço, ainda, ao CNPq, pela concessão de bolsa.

Resumo

ESTIMA-SILVA, Pablo. **Fibrose pulmonar multinodular dos equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial**. 2017. 32f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Esta dissertação teve o objetivo de descrever um caso de fibrose pulmonar multinodular equina (EMPF) diagnosticada no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel). Os sinais clínicos caracterizaram-se por dificuldade respiratória, febre intermitente, anorexia e dispneia, com evolução de aproximadamente 10 dias. Macroscopicamente havia aumento de volume dos pulmões e nódulos esbranquiçados, pálidos, firmes e bem delimitados, de aproximadamente 7-10 cm de diâmetro, distribuídos pelo parênquima. Histologicamente, o tecido pulmonar apresentava nódulos caracterizados pela presença de espaços alveolares, com paredes revestidas por epitélio cuboidal achatado, contendo macrófagos e neutrófilos e havia, também, linfócitos e hiperplasia de pneumócitos tipo II e eventualmente células gigantes multinuacleadas. O interstício estava acentuadamente espessado por tecido conjuntivo fibroso maduro e por colágeno. Havia corpúsculos de inclusão intranucleares em macrófagos. A técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) para detecção do DNA de HVE-5 resultou positiva. Após a confirmação do diagnóstico foi realizado um estudo retrospectivo de casos de pneumonia com fibrose intersticial diagnosticados em equinos no LRD entre 2000 e 2015. De um total de seis casos diagnosticados com pneumonia e fibrose intersticial, dois equinos apresentaram lesões macroscópicas e histológicas similares às de EMPF, porém resultaram negativos na PCR para detecção de herpesvirus equino tipo 5 (HVE-5). Outros quatro casos apresentaram padrão histológico incompatível com EMPF descartando-se a possibilidade de tratar-se da doença. Este é o segundo relato da doença no Brasil, que foi descrita pela primeira vez em 2007 nos Estados Unidos. Concluiu-se com este estudo que EMPF é uma enfermidade esporádica, no entanto, deve ser levada em consideração em casos de doença respiratória em equinos. A descrição dos casos diagnosticados é importante para alertar veterinários sobre a ocorrência da mesma no Brasil. É necessário estabelecer o real papel do HVE-5 na patogenia da doença. Casos de fibrose pulmonar semelhantes à EMPF em que não esteja presente o vírus devem ser estudados a fim de ficar estabelecido se poderia ser uma forma idiopática da mesma doença.

Palavras chave: doença pulmonar; fibrose pulmonar; equinos; estudo retrospectivo

Abstract

ESTIMA-SILVA, Pablo. **Equine multinodular pulmonary fibrosis in Southern Rio Grande do Sul: pathology and differential diagnosis.** 2017. 32f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

This dissertation aimed to describe a case of equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) diagnosed in the Laboratório Regional de Diagnóstico of Faculdade de Veterinária of Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) in a 15-year-old undefined breed equine. Clinical signs were characterized by respiratory distress, intermittent fever, anorexia, and dyspnea, with evolution of approximately 10 days. Macroscopically there was enlargement of the lungs with whitish, pale, firm and well delimited nodules, approximately 7-10 cm in diameter, distributed throughout the parenchyma. Histologically, lung nodules had alveolar spaces, with walls covered by cuboidal epithelium, containing macrophages, neutrophils, lymphocytes and hyperplasia of type II pneumocytes, and eventually multinucleated giant cells. The interstitium was markedly thickened by mature fibrous connective tissue and collagen. There were intranuclear inclusion bodies in macrophages. The PCR technique for detecting the EHV-5 DNA was positive. After confirming the diagnosis, a retrospective study of pneumonia cases with interstitial fibrosis diagnosed in horses in the LRD between 2000 and 2015 was performed. Two horses out of six diagnosed with pneumonia and interstitial fibrosis had macroscopic and histological lesions similar to those of EMPF, but they were negative in the PCR for the HVE-5.Four cases presented histological pattern incompatible with EMPF, ruling out the possibility of being the disease. This is the second report of this disease in Brazil, which was first described in 2007 in the United States. It is concluded that EMPF is a sporadic disease in southern Brazil, nevertheless it should be considered in cases of respiratory disease in horses. Reports of cases like this is important to alert veterinarians about the occurrence of diseases in Southern Brazil. It is also necessary to establish the real role of EHV-5 in the pathogenesis of the disease. Cases of pulmonary fibrosis like EMPF in which the virus is not present should be studied to establish whether it could be an idiopathic form of the disease.

Keywords: pulmonary disease; pulmonary fibrosis; equines; retrospective study

Lista de Figuras

Figura 1 A. Pulmão de equino com fibrose pulmonar multinodular. Há nódulos esbranquiçados, pálidos, firmes e bem delimitados, de aproximadamente 7-10 cm de diâmetro distribuídos pelo parênquima. B. Corte histológico com espaços alveolares contendo macrófagos, neutrófilos, linfócitos e hiperplasia de pneumócitos tipo II. HE 20x. C. Tecido fibroso maduro ao redor dos espaços alveolares. TM 40x..... 24

Figura 2 A. Pulmão de equino apresentando nódulos coalescentes esbranquiçados evidenciados na superfície do órgão. B. Superfície de corte de pulmão de equino com áreas nodulares coalescentes e esbranquiçadas..... 25

Figura 3 A. Corte histológico de pulmão apresentado na Figura 2A. Observa-se espaços alveolares com células inflamatórias e proliferação de tecido conjuntivo fibroso no tecido intersticial. HE 20x B. Corte histológico de pulmão mostrado na Figura 2B. Há proliferação de pneumócitos tipo II e infiltrado inflamatório no interior dos alvéolos. HE 20x. C, D. Observa-se acentuada proliferação de tecido fibroso ao redor dos espaços alveolares. TM 20x..... 26

Sumário

1 Introdução..... 8

2 Revisão da Literatura..... 10

2.1 Doenças pulmonares dos equinos..... 10

2.1.1 Pneumonias virais..... 11

2.1.1.1 Vírus da Influenza Equina (IVE)..... 12

2.1.1.2 Herpes vírus equino (HVE)..... 12

2.1.2 Pneumonias bacterianas..... 13

2.1.2.1 Rodococose..... 13

2.1.3 Pneumonias fúngicas e outras pneumonias granulomatosas..... 14

2.1.4 Hemorragia pulmonar induzida por exercício..... 15

2.1.5 Doença pulmonar obstrutiva crônica..... 15

2.1.6 Fibrose pulmonar multinodular dos equinos..... 16

3 Artigo..... 18

4 Considerações Finais..... 27

Referências..... 28

1 Introdução

No Brasil estima-se que a equinocultura é responsável pela movimentação econômica da ordem de R$ 16 bilhões por ano e pela geração de três milhões de empregos diretos e indiretos, constituindo-se em importante segmento do agronegócio brasileiro (LIMA & CINTRA, 2015). O Rio Grande do Sul, cuja economia é caracterizada pela produção integrada de agricultura-pecuária, possui o segundo maior rebanho de equinos do país, com uma população aproximada de 535.000 animais (IBGE, 2013). Pela importância da espécie no cenário econômico do estado e do país é crescente a necessidade de manter o bom estado sanitário dos rebanhos e os serviços de diagnóstico são fundamentais para isso. Em função disso os equinos têm representado uma parcela importante dos materiais de animais de produção que chegam ao laboratório para diagnóstico. Entre 1978 e 2016 esta espécie representou aproximadamente 21,5% de todas as espécies domésticas de produção enviadas ao Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) no período (SCHILD et al., 2015).

Em um estudo de causas de morte ou razões para a eutanásia em equinos realizado nos Estados Unidos, a prevalência de doenças respiratórias foi de 4,2% de um total de 241 equídeos de várias raças (MILLER et al., 2016). Em criatórios do extremo sul do Brasil, enfermidades associadas ao trato respiratório frequentemente ocorrem em equinos PSI com menos de 6 meses de vida, atrás apenas de alterações musculoesqueléticas (FREY JR., 2006). Nos Estados Unidos, Cohen (1994) concluiu que a pneumonia é a causa primária de doença e morte em potros PSI jovens.

Dentre as enfermidades diagnosticadas em equinos na área de influência do LRD/UFPel, entre os anos de 1978 e 2012, as enfermidades respiratórias representaram 9,5% das doenças infecciosas de um total de 253 casos diagnosticados com essas etiologias (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014). Percentual semelhante (10,4%) foi observado em um estudo sobre achados de

necropsia relacionados com a morte de 335 equinos entre 1968 e 2007 na região central do Estado (PIEREZAN et al., 2009).

Enfermidades pulmonares de equinos relacionadas com fibrose intersticial têm sido descritas em diversas raças equinas. Em um estudo retrospectivo realizado na Flórida, doença pulmonar intersticial proliferativa foi descrita em 14 potros entre três dias e seis meses e em seis equinos entre dois e 14 anos (BURGUELT et al., 1986).Casos de pneumonia intersticial e fibrose pulmonar têm sido, também, descritos na literatura ocorrendo duas formas com etiologias não identificadas, uma em potros e outra em equinos adultos (DONALDSON et al., 1998). A fibrose pulmonar multinodular dos equinos (EMPF) é uma enfermidade pulmonar intersticial descrita pela primeira vez em 2007 associada ao herpesvirus equino-5 (WILLIAMS et al., 2007). A enfermidade tem sido mencionada como uma doença pulmonar, fibrótica, multifocal crônica de equinos adultos com sinais clínicos caracterizados por febre intermitente, perda de peso, anorexia, letargia, tosse, descarga nasal e sinais respiratórios que podem variar de discreta taquipneia a acentuada dispneia (PANZIERA et al., 2014).

Com base no exposto os objetivos deste trabalho foram descrever a patologia de fibrose pulmonar multinodular dos equinos diagnosticada na região sul do Rio Grande do Sul, a qual se caracteriza por pneumonia intersticial com fibrose do parênquima estabelecendo o diagnóstico diferencial de outras doenças pulmonares dos equinos que cursam com fibrose do parênquima pulmonar.

2 Revisão de Literatura

Enfermidades do trato respiratório são algumas das maiores fontes de perdas econômicas em animais de produção. Diagnóstico e práticas sanitárias e de manejo são extremamente relevantes para reduzir o impacto dessas doenças na economia de uma região, estado ou de um país (LOPÉZ, 2009). Chaffin (2003) associou características de manejo como: elevada lotação animal, fluxo transitório de equinos, ausência da avaliação da transferência de imunidade passiva, a falta de protocolo de vacinação e a carência de controle antiparasitário como causas de ocorrência de doenças do trato respiratório em potros PSI nos Estados Unidos.

Na espécie equina as doenças do trato respiratório representaram aproximadamente 10% dos diagnósticos realizados em equinos no LRD/UFPel em um período de mais de 30 anos (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2014) e, também, na região central do Estado (PIEREZAN et al., 2009). Na maioria dos casos essas doenças estão relacionadas a agentes infecciosos bem conhecidos como o vírus da influenza e agentes bacterianos como *Rodococcus equi* e *Streptococcus* spp. Alguns casos, no entanto, caracterizam-se por fibrose acentuada do parênquima pulmonar associada a inflamação sem que se evidencie claramente sua etiologia.

2.1 Doenças pulmonares dos equinos

As pneumonias são um grupo heterogêneo de desordens pulmonares caracterizadas por dano das paredes alveolares e perda da função de troca entre as unidades alvéolo-capilares. A resposta proliferativa envolve as paredes alveolares e um estroma de sustentação segue-se à injúria inicial que se caracteriza pela fase exsudativa (BURGELT et al., 1986).

As doenças pulmonares caracterizadas por pneumonia intersticial podem ser agudas, tais como a injúria pulmonar aguda e a síndrome do estresse respiratório, e tornarem-se crônicas, ou serem crônicas e evoluírem para a fibrose (WILKINS & LASCOLA, 2015).

Os agentes infecciosos que causam pneumonia em equinos incluem vírus, bactérias, parasitas, protozoários e fungos causando principalmente pneumonia aguda acentuada caracterizada por dano severo ao parênquima pulmonar na região alveolar (WILKINS & LASCOLA, 2015).

Equinos afetados por pneumonia intersticial frequentemente apresentam tosse, perda de peso, descarga nasal, intolerância ao exercício, dispneia acentuada e cianose com um padrão de respiração restrito. A febre é variável, dependendo do agente e do grau de cronicidade (WILKINS & LASCOLA, 2015). Múltiplos agentes têm sido implicados como causas de pneumonia intersticial em equinos, mas poucos têm sido identificados. Nas pneumonias intersticiais agudas as principais causas são as infecções, a inalação de produtos químicos, a ingestão de toxinas, as reações adversas a drogas e a hipersensibilidade e ainda, a idiopática ou criptogênica (WILKIN & LASCOLA, 2015).

As pneumonias crônicas são na sua maioria devidas a bronquiolites alérgicas (VERRYKEN et al., 2010). Em alguns casos, porém, são atribuídas a outras causas como os granulomas micóticos, os abscessos bacterianos e a pneumoconiose por inalação de sílica. Em muitos casos, porém as pneumonias crônicas em equinos permanecem com etiologia desconhecida (PUSTERLA et al., 2003; VERRYKEN et al., 2010). Nas pneumonias crônicas as causas podem ser semelhantes às das pneumonias agudas e ocorrer fibrose pulmonar. Outras causas são a ingestão de toxinas e desordens no colágeno dos vasos. Ocorrem, ainda, a pneumonia crônica idiopática ou criptogênica (WILKINS & LASCOLA, 2015).

2.1.1 Pneumonias virais

As doenças pulmonares virais dos equinos são importantes causas de morte, especialmente em animais jovens entre 2-3 meses e estão provavelmente relacionadas ao declínio dos anticorpos maternos e outros fatores que podem comprometer a eficiência dos mecanismos de defesa, tais como irritantes ambientais, altas temperaturas e parasitismo (PATERSON-KANE et al., 2008).

2.1.1.1 Virus da Influenza Equina (IVE)

A influenza equina é uma das doenças respiratórias dos eqüinos mais importante economicamente devido a sua natureza contagiosa e a rápida disseminação entre os animais susceptíveis. O vírus da influenza equina é endêmico na Europa e nas Américas e os grandes surtos da doença são associados a aglomeração de animais em eventos equestres e competições, tanto em animais vacinados como em não vacinados (PERGLIONE et al., 2015). A transmissão do vírus ocorre por aerossóis por inalação de perdigotos contendo o vírus, que é eliminado pela tosse a partir de equinos doentes (WEIBLEN, 2007).

A apresentação clínica usual consiste de anorexia, letargia, descarga nasal e tosse, que associados a febre são os primeiros sinais clínicos observados, geralmente entre 48 e 96 horas após a infecção. A descarga nasal é serosa nos primeiros dias e pode se tornar muco purulenta 3-4 dias pós infecção (WILKINS & LASCOLA, 2015). O vírus causa pneumonia aguda de pouca gravidade, no entanto infecções bacterianas secundárias podem levar os animais a morte. As lesões histológicas se caracterizam por bronquiolite com exsudato seroso ou mucoso nos bronquíolos. Em um estudo da patologia da influenza equina em 35 animais afetados os autores observaram lesões em 28, sendo que 11 morreram com severa broncopneumonia reconhecida como devido à infecção bacteriana secundária à infecção viral. A infecção secundária foi mais frequente em equinos adultos do que nos potros de um a 14 dias. A maioria dos potros apresentou pneumonia bronco intersticial (BEGG et al., 2011).

2.1.1.2 Herpes vírus equino (HVE)

Os mais importantes HVE associados com doença respiratória em equinos são alfa-HVE-1 e alfa-HVE-4, sendo que o alfa-HVE-1 afeta equinos, burros e mulas e ocasionalmente zebras e outras espécies e o HVE-4 restringe-se aos equinos. O gama HVE-2 pode estar associado a doenças respiratórias, porém a patogenicidade é baixa e o gama-HVE-5 tem sido associado a fibrose multinodular pulmonar dos equinos que será abordada mais adiante (WILKINS & LASCOLA, 2015). As infecções respiratórias causadas pelo HVE-1 e HVE-4 são mais frequentes em equinos jovens e resultam de infecção que permanece latente e que ocorre nas

primeiras semanas ou meses de vida. A ocorrência de moderada doença respiratória associada com febre em equinos até dois anos de idade leva a interrupção de programas de treinamento de equinos sendo esta uma das consequências econômicas mais importantes da infecção por este vírus. A doença respiratória em animais susceptíveis apresenta um período de incubação de um a três dias e os sinais clínicos caracterizam-se por febre geralmente bifásica, com um pico em 24-48 horas associada a infecção do trato respiratório superior e outro, quatro a oito dias após associado a viremia. Macroscopicamente há congestão acentuada ou consolidação pulmonar e histologicamente ocorre severa broncopneumonia necrotizante com presença de corpúsculos de inclusão *Cowdry* tipo A. Lesões no fígado e intestino podem, também, ocorrer (MURRAY et al., 1998).

2.1.2 Pneumonias bacterianas

Agentes bacterianos têm sido isolados de equinos com pneumonia intersticial. A distribuição das lesões nas broncopneumonias bacterianas em equinos em geral é caudo-ventral. A maioria das infecções bacterianas são oportunistas com exceção de *Rhodococcus equi* que tem sido isolado de potros com severa pneumonia bronco intersticial com distribuição difusa nos pulmões (WILKINS & LASCOLA, 2015).

2.1.2.1 Rodococose

A rodococose é causada por uma bactéria cocobacilar Gram-positiva, aeróbia denominada *Rhodococcus equi*. Esta bactéria encontra-se no ambiente e fezes de herbívoros e os potros geralmente são infectados nos primeiros dias de vida, porém a manifestação clínica inicia entre o primeiro e sexto mês de vida, sendo que a maioria dos animais apresenta sinais clínicos antes dos 4 meses (SANTOS et al., 2013). A bactéria causa broncopneumonia piogranulomatosa grave e frequentemente fatal (VARGAS, 2007). Clinicamente pode manifestar-se de três formas: pneumonia aguda, pneumonia crônica com presença de piogranulomas e enterocolite ulcerativa associada a linfadenite mesentérica (VARGAS, 2007). Mesmo que metade dos equinos que apresentam pneumonia tenham enterocolite, raramente encontram-se animais que apresentem apenas a forma intestinal (LÓPEZ, 2009). Histologicamente há infiltração de neutrófilos e macrófagos nos

espaços bronco-alveolares que persiste por longos períodos devido a capacidade de *R. equi* de sobreviver no interior de macrófagos. Nos casos crônicos as lesões culminam com a formação de grandes massas necróticas com extensa fibrose do parênquima pulmonar circundante (LÓPEZ, 2009).

2.1.3 Pneumonias fúngicas e outras pneumonias granulomatosas

Doenças intersticiais pulmonares granulomatosas difusas ou nodulares podem ser causadas por uma série de agentes incluindo fungos como *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans,Histoplasma capsulatum, Blastomyces dermatitidis* e por inalação de poeiras minerais, poeiras orgânicas e inorgânicas e inalação de dióxido de silício (silicose).

A infecção fúngica em equinos é incomum, porém dependendo da área geográfica a prevalência pode ser altamente variável. As enfermidades do sistema respiratório causadas por fungos são frequentemente adquiridas por inalação uma vez que os esporos são pequenos o suficiente para penetrar nas vias aéreas distais e nos alvéolos. Os fatores que predispõe as pneumonias fúngicas incluem: a qualidade e a quantidade de anormalidades granulocíticas e a presença de tecido desvitalizado (WILKINS & LASCOLA, 2015).

Equinos com pneumonia intersticial granulomatosa frequentemente tem histórico de perda de peso crônica, intolerância ao exercício, depressão, anorexia, febre, taquipneia e descarga nasal. Algumas causas são endêmicas de determinadas regiões tais como a pneumoconiose por inalação de sílica e a coccidioidomicose (PUSTERLA et al., 2003). Por outro lado, tem aumentado o número de casos de pneumonia granulomatosa intersticial idiopática que se presume ser uma resposta anormal a presença de um antígeno não identificado similar a sarcoidose do homem ou doença de Besnier-Boeck (PUSTERLA, 2003). Esta enfermidade caracteriza-se pela presença de granulomas em geral nos pulmões e linfonodos e histologicamente apresenta-se como granulomas não caseosos afetando vários órgãos evoluindo para a resolução ou pela substituição por tecido conjuntivo (MITCHELL et al., 1977).

2.1.4 Hemorragia pulmonar induzida por exercício

Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício (HPIE) em cavalos é a presença de sangue livre na árvore traqueobrônquica após exercício intenso. Ocorre comumente em animais da raça PSI, outras raças de corrida ou em animais que são submetidos a exercício intenso (HINCHCLIFF et al., 2015). A patologia é multifatorial e não existe um fator etiológico único (PULZ et al., 2005). A teoria mais aceita é que o sangramento é secundário ao aumento da pressão vascular transmural associado com exercício de alta intensidade. Doenças inflamatórias das vias aéreas, obstrução das vias aéreas superiores e anormalidades hematopoiéticas também são fatores contribuintes (CRISPE et al., 2015).

Os sinais clínicos são basicamente diminuição do rendimento do animal e presença de epistaxe, este último ocorrendo apenas em 0,25 a 13% dos animais acometidos. A morte é rara, mas pode acontecer, ocorre por edema pulmonar e asfixia (OTAKA, 2011). O melhor método para diagnóstico é a realização da endoscopia traqueal entre 30 e 90 minutos após o exercício (OTAKA et al., 2014).

2.1.5 Doença pulmonar obstrutiva crônica

A doença pulmonar obstrutiva crônica é uma das enfermidades pulmonares mais comuns dos equinos, distribuída mundialmente e que afeta o sistema respiratório de animais adultos de diversas raças (GHOSH et al., 2016). É conhecida mundialmente como *heaves.* No Brasil é conhecida, também, como doença do feno ou bronquiolite crônica (AMARAL et al., 1999).A enfermidade é definida como uma doença ocupacional de equinos que são mantidos sob condições de modo a manter sua performance para o trabalho ou o esporte (ROBINSON et al., 1996). Alguns autores concluíram tratar-se de uma enfermidade multifatorial com base genética (ROBINSON et al., 1996).

A condição tem duas formas distintas: uma devido a inalação contínua de poeira orgânica e por endotoxinas em locais de pouca ventilação, com clima frio levando a uma reação de hipersensibilidade do trato respiratório (PIRIE, 2013). A outra forma está associada a pastagem de verão, na qualalérgenos transportados pelo ar são inalados pelos equinos e ocorre em regiões de clima ameno e úmido. Macroscopicamente, a doença caracteriza-se por enfisema pulmonar sendo que os

pulmões não colapsam na abertura da cavidade torácica durante a necropsia. A falha no colabamento dos pulmões deve-se ao gás que fica retido nas vias aéreas obstruídas. Histologicamente, a lesão principal caracteriza-se por bronquiolite. Ocorre acúmulo peribronquial de células inflamatórias, principalmente linfócitos e acúmulo intraluminal de neutrófilos e eventualmente eosinófilos. Há alteração das células epiteliais das pequenas vias aéreas com perda da granulação das células clara e metaplasia das células *globet*. Há acúmulo de muco na luz das vias aéreas e alvéolos adjacentes (ROBINSON et al., 1996).

2.1.6 Fibrose pulmonar multinodular dos equinos

A fibrose pulmonar multinodular dos equinos (EMPF) é uma enfermidade pulmonar intersticial descrita pela primeira vez em 2007 associada ao herpes virus equino-5 (WILLIAMS et al., 2007). A enfermidade tem sido mencionada como uma doença pulmonar, fibrótica, multifocal crônica de equinos adultos com sinais clínicos caracterizados por febre intermitente, perda de peso, anorexia, letargia, tosse, descarga nasal e sinais respiratórios que podem variar de discreta taquipneia a acentuada dispneia (VERRYKEN et al., 2010; BACK et al., 2012; PANZIERA et al., 2014). Radiografias torácicas revelam um padrão pulmonar intersticial nodular e as alterações hematológicas principais são a neutrofilia e a hiperfibrinogenemia (BACK et al., 2012).

A doença ocorre em diferentes raças equinas (PUSTERLA et al., 2015) e tem sido descrita em animais entre quatro e 26 anos de idade com média de 14,5 anos (WILLIAMS et al., 2007; WONG et al., 2008), poucos casos foram relatados em equinos jovens (AINSWORTH, 2012). A evolução é variável e pode ser de 10 dias (BACK et al. 2012), duas a três semanas (VERRYKEN et al., 2010), um mês (PANZIERA et al., 2014) e dois meses (DUNOWSKA et al., 2014).

As lesões macroscópicas mais importantes na EMPF caracterizam-se por estarem restritas aos pulmões afetando todas as regiões do órgão. Existem duas manifestações pulmonares: a mais comum apresenta numerosos nódulos coalescentes de fibrose, variando entre 1-5 cm de diâmetro. Os nódulos são pálidos, moderadamente firmes e as bordas discretamente evidentes. Quando se apresenta dessa forma, normalmente a área afetada do pulmão é menor (WILLIAMS et al., 2007). A manifestação macroscópica menos comum, consiste de múltiplos nódulos

separados por áreas pulmonares não afetadas. Estes nódulos podem ser confundidos com um processo neoplásico. As massas de fibrose são maiores do que a forma coalescente da doença (até 10 cm de diâmetro), pálidas e firmes (WILLIAMS et al., 2007).Histologicamente, a doença se caracteriza por lesões restritas ao parênquima pulmonar alveolar, independentemente da apresentação macroscópica. Os nódulos são acentuadamente demarcados, com colágeno maduro bem organizado. Observa-se infiltrado misto de células inflamatórias, constituído principalmente de linfócitos e, em menor número, de macrófagos, neutrófilos e, ocasionalmente, eosinófilos (WILLIAMS et al., 2007). Observa-se manutenção de uma arquitetura semelhante aos alvéolos, delimitados por células epiteliais cuboidais. Nos espaços alveolares há infiltrado inflamatório de neutrófilos e macrófagos. Raramente são observados grandes macrófagos com abundante citoplasma eosinofílico e inclusão viral intranuclear eosinofílica sugestiva para viroses por herpesvirus (WILLIAMS et al., 2007; WONG et al., 2008; HART et al., 2008).

3 Artigo

Equine multinodular pulmonary fibrosis in southern Brazil: pathology and differential diagnosis

Pablo Estima-Silva, Clairton Marcolongo-Pereira, Bianca Lemos dos Santos, Ana Carolina Barreto Coelho, Lorena Alvariza Amaral, Ailam Lim, Steven R. Bolin e Ana Lucia Schild

Submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira

Equine multinodular pulmonary fibrosis in southern Brazil: pathology and differential diagnosis[1]

Pablo Estima-Silva[2], Clairton Marcolongo-Pereira[5], Bianca Lemos dos Santos[2], Ana Carolina Barreto Coelho[2], Lorena Alvariza Amaral[3], Ailam Lim[4], Steven R. Bolin[4] e Ana Lucia Schild[5]*

ABSTRACT.- Estima-Silva P, Marcolongo-Pereira C., Santos B.L., Coelho A.C.B., Amaral L.A., Lim A., Bolin S.R. &Schild A.L. 2017. [**Equine multinodular pulmonary fibrosis in southern Brazil: pathology and differential diagnosis.**] Fibrose pulmonar multinodular em equinos no Sul do Rio Grande do Sul: patologia e diagnóstico diferencial. *PesquisaVeterináriaBrasileira*xx(x):xxx-xxx. Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Pelotas, RS 96010-900, Brazil. E-mail: alschild@terra.com.br

A case of equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF), diagnosed at the Laboratório Regional de Diagnóstico of the Faculdade de Medicina Veterinária of the Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel), is described. Differential aspects of other pulmonary diseases in horses with pneumonia and interstitial fibrosis were discussed. The case occurred in a 15-year-old equine that presented with clinical signs of respiratory distress, intermittent fever, anorexia, and dyspnea. Macroscopically, there was enlargement of the lungs with whitish, pale, firm and well-delimited nodules, approximately 7-10 cm in diameter, distributed throughout the parenchyma. Histologically, the lung nodules had alveolar spaces with walls covered by cuboidal epithelium containing macrophages, neutrophils, lymphocytes, hyperplasia of type II pneumocytes and, eventually, multinucleated giant cells. The interstitium was markedly thickened by mature fibrous connective tissue and collagen. There were intranuclear inclusion bodies in the macrophages. The PCR technique for detecting the EHV-5 DNA was positive. In a retrospective study of pneumonia cases in horses with interstitial fibrosis diagnosed in the LRD/UFPel, two animals had macroscopic and histological lesions similar to those with EMPF, but they were negative for EHV-5 in PCR. Four cases diagnosed with pneumonia and interstitial tissue fibrosis had a histological pattern that was different from that observed in the EMPF animal, thus eliminating the possibility of EMPF. It is concluded that EMPF is a sporadic disease that should be considered in cases of respiratory disease in horses. Reports of such cases are important to alert technicians about the occurrence of rare diseases in Brazil. It is also necessary to establish the true role of EHV-5 in the pathogenesis of EMPF. Cases of pulmonary fibrosis such as EMPF, in which the virus is not present, should be studied to establish whether it could be an idiopathic form of the disease.

INDEX TERMS: horses, disease of horses, retrospective study, pathology

---

[1] Received on ……
Accepted for publication on ……

[2] Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária (FV), Universidade Federal de Pelotas- (UFPel), Campus Capão do Leão, s/n, , Capão do Leão, RS 96015-560

[3]MédicoVeterinárioAutônomo

[4] Diagnostic Center for Population and Animal Health, Michigan State University, 4125 Beaumont Road, Lansing, MI 48910-8104, USA.

[5] Laboratório Regional de Diagnóstico, FV, UFPel, Campus Capão do Leão, 96010-900, Pelotas, RS. *Corresponding author:, e-mail: alschild@terra.com.br

RESUMO.- Descreve-se um caso de fibrose multinodular pulmonar equina (EMPF) diagnosticado no Laboratório Regional de Diagnóstico da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Foram discutidos a patologia da doença e os aspectos diferenciais de outras enfermidades pulmonares de equinos que cursam com pneumonia e fibrose intersticial. O caso ocorreu em um equino sem raça definida de 15 anos de idade que apresentou sinais clínicos de dificuldade respiratória febre intermitente, anorexia e dispneia, com evolução de aproximadamente 10 dias. Macroscopicamente havia aumento de volume dos pulmões e nódulos esbranquiçados, pálidos, firmes e bem delimitados, de aproximadamente 7-10 cm de diâmetro, distribuídos pelo parênquima. Histologicamente, o tecido pulmonar apresentava nódulos caracterizados pela presença de espaços alveolares, com paredes revestidas por epitélio cuboidal achatado, contendo macrófagos e neutrófilos e havia, também, linfócitos e hiperplasia de pneumócitos tipo II e eventualmente células gigantes multinuacleadas. O interstício estava acentuadamente espessado por tecido conjuntivo fibroso maduro e por colágeno. Havia corpúsculos de inclusão intranucleares em macrófagos. A técnica de PCR para detecção do DNA de HVE-5 resultou positiva. Em um estudo retrospectivo de casos de pneumonia com fibrose intersticial diagnosticados no LRD entre 2000 e 2015,

dois equinos apresentaram lesões macroscópicas e histológicas similares às de EMPF, porém resultaram negativos na PCR para detecção de HVE-5. Quatro casos de pneumonia com fibrose do tecido intersticial apresentaram padrão histológico diverso da EMPF descartando-se a possibilidade de tratar-se da doença. Conclui-se que EMPF é uma enfermidade esporádica, no entanto deve ser levada em consideração em casos de doença respiratória em equinos. A descrição dos casos diagnosticados é importante para alertar técnicos sobre a ocorrência da mesma no Brasil. É necessário estabelecer o real papel do HVE-5 na patogenia da doença. Casos de fibrose pulmonar semelhantes à EMPF em que não esteja presente o vírus devem ser estudados a fim de ficar estabelecido se poderia ser uma forma idiopática da mesma doença.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: equinos, doenças pulmonares, fibrose pulmonar, herpesvirus equino-5

INTRODUCTION

Equine multinodular pulmonary fibrosis (EMPF) is a rare, spontaneous fibrosing pulmonary disease in horses that is associated with pulmonary infection by equine herpesvirus 5 (EHV-5); it was first reported in the United States (Williams et al., 2007) and has been recently documented in European countries (Poth et al. 2009). It mainly occurs in adult and senile animals; however, rare cases have been described in young animals (Ainsworth 2012). In Brazil, the disease was diagnosed for the first time in a seven-year-old Thoroughbred mare that died after presenting with chronic respiratory disease characterized by tachypnea, dyspnea and cough accompanied by weight loss, anorexia and intermittent fever (Panziera et al., 2014).

The etiology of EMPF is associated with EHV-5 infection. However, the specific role of this agent in the development of pathology has not yet been elucidated (Hart et al., 2008). There are two distinct gross characteristics of the disease. The most common characteristic presents as numerous coalescing nodules of fibrosis, ranging from 1-5 cm in diameter. The nodules are pale and moderately firm, and the edges are discreetly evident (Williams et al., 2007). A lesser common gross characteristic consists of multiple nodules that are separated by unaffected lung areas. These nodules can be confused with a neoplastic process and they are larger than the coalescing form of the disease (up to 10 cm in diameter); additionally, they are pale and firm (Williams et al., 2007). Histological lesions are confined to the alveolar pulmonary parenchyma, regardless of the gross presentation. The nodules consist of well-organized mature collagen with mixed infiltration of inflammatory cells, mainly lymphocytes and, to a lesser extent, macrophages, neutrophils and occasional eosinophils (Williams et al., 2007). An alveolar-like architecture is preserved and delimited by cuboidal epithelial cells. In the alveolar spaces, there is an inflammatory infiltrate of neutrophils and macrophages. Rarely, large macrophages with abundant eosinophilic cytoplasm and eosinophilicintranuclear viral inclusion are observed (Williams et al., 2007).

The aim of the present study was to describe the pathology of equine multinodular pulmonary fibrosis diagnosed in the Laboratório Regional de Diagnóstico of the Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) and to discuss its differences with other equine pulmonary fibrosing diseases diagnoses in LRD/UFPel between the years of 2000 and 2015.

MATERIALS AND METHODS

Lung fragments from a horse were sent to the Laboratório Regional de Diagnóstico of the Universidade Federal de Pelotas (LRD/UFPel) for diagnosis. The material was fixed in 10% buffered formalin, cleaved and routinely processed. Histological sections with a thickness of 5 μm were stained with hematoxylin and eosin and Masson's trichrome. Due to the suspicion for equine multinodular pulmonary fibrosis, paraffin blocks were sent to Michigan State University's Diagnostic Center for Population and Animal Health for HVE-5 detection by PCR, and DNA extraction was performed according to the technique described by Panziera et al. (2014).

Then, a retrospective study of respiratory diseases with interstitial fibrosis diagnosed in horses in the LRD, from 2000 to 2015, was performed. All LRD / UFPel necropsy protocols were reviewed, and the epidemiological data, clinical signs and description of the gross and histological pathology of each case were recovered. New histological slides were made from the paraffin blocks of the LRD / UFPel collection and stained with hematoxylin and eosin. The presence of fibrosis was observed by Masson's trichrome staining. Two other cases were also sent to Michigan State University's Diagnostic Center for Population and Animal Health for equine herpesvirus 5 detection by the same technique.

RESULTS

Fragments of the lung from a free range, mixed breed, 15-year-old horse were sent to the LRD / UFPel for analysis. The animal had a history of respiratory difficulty that resolved with the use of

bronchodilators one year before death. Later, the horse had intermittent fever, anorexia and dyspnea over approximately 10 days. Ultrasound revealed the presence of nodular areas that were suggestive of lung abscesses. After a week with these signs, the horse died and was necropsied on the property. Gross lesions were characterized by enlargement of the lungs, which had rib printing and whitish, firm, well-defined nodules that were approximately 7-10 cm in diameter. The nodules were distributed throughout the parenchyma (Fig. 1A). Histologically, the lung had nodules that were characterized by the presence of alveolar spaces containing macrophages, neutrophils, lymphocytes and hyperplasia of type II pneumocytes (Fig. 1B). Eventually, giant multinucleated cells could be observed. The alveolar walls were delimited by flattened epithelial cells, and the interstitium in these areas was markedly thickened by mature fibrous connective tissue and collagen that was better demonstrated by Masson's trichrome staining (Fig. 1C). Intranuclear inclusion bodies were observed in macrophages. The PCR for detecting EHV-5 DNA was positive in this case.

The retrospective study identified six cases, numbered one to six, in order of arrival to the LRD / UFPel with a diagnosis of pneumonia. All cases were characterized by the presence of fibrous connective tissue that was diffusely distributed around the alveoli and in the pulmonary interstitial tissue. Four mixed-breed horses, between eight and 15 years of age (cases 1, 2, 3, and 5) were identified; MangalargaMarchador (case 4) was 22 years old, and a Criollo breed horse (case 6) was four months old.

The clinical signs observed in two horses (cases 4 and 6) were characterized by tachypnea and nasal secretion with disease progression from one to four weeks. Ultrasound examination performed on case 6 revealed areas suggestive of abscesses. This foal was treated with antibiotics for one month, but no improvement was observed. The horse in case 5 was in an urban setting and had clinical signs of nasal secretion, mandibular trismus and permanent decubitus. Three other horses (cases 1, 2 and 3) were from a slaughterhouse and lacked a clinical history; only the lungs were sent to the laboratory for examination.

Gross lesions in two cases (cases 4 and 6) were characterized by enlargement of the lungs with rib impressions and the presence of whitish, pale and firm nodules distributed in the parenchyma. Fibrin was also observed on the surface of the organ. In both horses, the nodules were coalescing and ranged from 1-5 cm (Fig. 2A and B). In one case (case 5), there were cavitations in the lung parenchyma surrounded by firm, whitish connective tissue. One equine (case 2) had an increase the lung volume and a firm cut surface. In another horse (case 3), the lungs were congested and had suppurative foci; in yet another (case 1), there was no macroscopic description in the necropsy protocol.

Histologically, cases 4 and 6 had coalescent nodules with alveolar spaces delimited by epithelial cells containing neutrophils, macrophages, and type II pneumocyte proliferation (Figs 3A and B). Moreover, there was mature fibrous tissue proliferation surrounding the alveolar spaces, which was best demonstrated with Masson's trichrome staining (Figs 3C and D). In cases 1, 2, 3 and 5, there was a loose connective tissue proliferation around the alveoli, which had thin walls with mixed inflammatory infiltrate in the interior. In case 5, there was inflammatory infiltration of neutrophils in the interstitium. PCR for detecting EHV-5 DNA was negative in cases 4 and 6.

DISCUSSION

Equine multinodular pulmonary fibrosis associated with EHV-5 infection was confirmed by the identification of viral DNA by PCR in lung fragments of a 15-year-old mixed-breed equine lung sent to the LRD / UFPel. The clinical signs observed in the horse with EMPF in the present study were non-specific, which is similar to the cases of disease described in the literature. Other reports of the disease mentioned clinical signs, such as an increased respiratory rate, weight loss (Verryken et al. 2010), fever, tachycardia, nasal secretion (Dunowska et al. 2014 Panziera et al. 2014), reluctance to move, tachypnea and discrete cough (Back et al., 2012). These clinical signs occur in several respiratory diseases in horses. In a study on the detection of EHV-5 in horses with EMPF and other respiratory diseases, the clinical signs observed in different groups were similar (Pusterla et al., 2015), thus demonstrating their non-specificity. EMPF is difficult to diagnose in a living animal and may be suspected based on clinical and radiological examination, lung biopsy, and identification of EHV-5 by tracheal lavage with PCR analysis (Williams et al., 2013).

In an EMPF report in Belgium, the authors considered neoplasia; idiopathic granulomatous pneumonia; and bacterial, fungal or parasitic pneumonias in the differential diagnosis based on the clinical signs and radiological and ultrasonographic findings (Verryken et al. 2010). In the case of EMPF described in this study, there was suspicion for lung cancer or an abscess, as observed by ultrasonography. Ultrasonography performed on a foal (case 6) with respiratory signs suggested the presence of abscesses in the lung, and the suspicion was for *Rhodococcusequi* infection because this disease causes pulmonary abscesses in foals from one to six months of age (Giguère& Prescott 1997). Other pneumonias with fibrosis can be differentiated by the macroscopic and histological pattern of the lesions, as evidenced in

the present study. Of the six cases with a histological description of pneumonia and interstitial fibrosis, only two had a histological pattern such as that described for EMPF. These two cases were negative for EHV-5. Nevertheless, EMPFcannot be ruled out in these two cases that lack EHV-5 DNA amplification. It has been observed a negative effect of prolonged fixation on PCR products. Periods of fixation greater than 45 days produce negative or weakly positive results with the PCR technique (Crawford et al. 1999).

The gross lesions observed in the horse with EMPF in this paper were characterized as a less frequent form of the disease, as mentioned in a previous description (Williams et al., 2007). Comparing the case with EMPF and the retrospective study cases, four cases had different macroscopic lesions, which made it possible to rule out EMPF. However, two cases had macroscopic lesions that are characteristic of the disease. One case was a four-month-old foal with gross lesions similar to those mentioned by other authors (Panziera et al., 2014). The lesions in this foal were characterized as the most frequent pattern of the disease (Williams et al. 2007). It is noteworthy that the disease is rare in young animals and few cases have been diagnosed in horses under 4 years of age (Ainsworth 2012).

The histological lesions observed in the equine with EMPF were similar to prior descriptions (Williams et al., 2007, Panziera et al., 2014). In contrast, in the two cases in which the virus was not detected, the similarity of the histological lesions suggests that they have the same disease or are an idiopathic form of pulmonary fibrosis. The cuboidal epithelium that lines the alveoli, the presence of well-organized mature fibrous tissue in the interstitium around the alveoli, and the presence of intranuclear inclusion bodies in macrophages have been noted in reports of the disease from different countries (Williams et al., 2007, Verryken et al., 2010, Back et al., 2012, Panziera et al., 2014). EHV-5 infection plays a key role in the development of EMPF, but the mechanism by which the virus causes the disease is not fully understood. However, there is strong evidence indicating EVH-5 plays a primary or complicating role in the etiology of the disease. Most reports have mentioned amplification of viral DNA in the lungs of affected animals (Wong et al. 2008, Hart et al. 2008). EHV-5 was detected in six clinical cases of the disease and in 24 necropsied horses. The virus was detected in nasal swabs, peripheral blood mononuclear cells and various tissues of healthy horses and foals (Ainsworth 2012).

Based on this and other studies, EMPF appears to have a sporadic nature (Verryken et al., 2010, Back et al., 2012, Dunowska et al., 2014). The virus prevalence is relatively high in some countries and may be isolated in numerous horses or in some populations, which contrasts the small number of diagnosed EMPF cases (Verryken et al., 2010). In Brazil, there are no data on the prevalence of EVH-5 infection, and this is the second confirmed report of the disease in at least one of the equines with similar gross and histological lesions. The other case was also diagnosed in Rio Grande do Sul by Panziera et al. (2014).

CONCLUSIONS

EMPF is present in Rio Grande do Sul, and despite its sporadic nature, it should be considered in equine chronic pneumonia cases with fibrosis. Because EMPF is a recently described disease, it is essential to report new cases as they are diagnosed. Veterinarians should be aware of its occurrence in the Rio Grande do Sul state and in other regions of the country. More studies are needed to determine the role of EHV-5 in the disease pathogenesis. Cases of pulmonary fibrosis similar to EMPF in which no viral DNA is detected should be studied in further detail to determine whether the horse has an idiopathic form of pulmonary fibrosis.

REFERENCES

Ainsworth D. M. 2012.Equine Multi-nodular Pulmonary Fibrosis (EMPF).Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, 18, 2012. Bologna. Proceedings. Bologna: IVIS, 17-21.

Back H., Kendall A., Grandón R., Ullman K., Treiberg-Berndtsson L., Ståhl K. & Pringle J. 2012. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. ActaVeterinariaScandinavica, 54-57.

Dunowska M., Hardcastle M. R. & Tonkin F. B. 2014.Identification of the first New Zealand case of equine multinodular pulmonary fibrosis. New Zealand Veterinary Journal**,** 62(4): 226-231.

Giguère S. & Prescott J. F. 1997.Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of Rhodococcus equi infections in foals. Vet. Microbiol, 56: 31 3-334.

Hamatani K., Eguchi H., Takahashi K., Koyama K., Mukai M., Ito R., Taga M., Yasui W. & Kei Nakachi. 2006. Improved RT-PCR Amplification for Molecular Analyses with Long-term Preserved Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Specimens. J. Histochem. Cytochem, 54(7): 773–780.

Hart K. A., Barton M. H., Williams K. J., Flaminio M. J. B. F. &Howerth E. W. 2008. Multinodular pulmonary fibrosis, pancytopenia and equine herpesvirus-5 infection in a Thoroughbred gelding. Equine Vet. Educ,20(9): 470-476.

Panziera W.,Giaretta P. R., Galiza G. J. N., Lim A., Bolin S. R., Borges C. H., Fighera R. A. & Barros C. S. L. 2014. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis Associated with Equine Herpesvirus 5 in a Horse in Brazil. Braz. J. Vet. Pathol**,** 7(1): 17-20.

Pusterla N., Magdesian K. G., Mapes S. M., Zavodovskaya R. &Kass P. H. 2015. Assessment of quantitative polymerase chain reaction for equine herpesvirus-5 in blood, nasal secretions and bronchoalveolar lavage fluid for the laboratory diagnosis of equine multinodular pulmonary fibrosis. Equine Vet. J.,0: 1–5.

Poth T., Niedermaier G., Hermanns W. 2009. Foal-related risk factors associated with development of Rhodococcus equi pneumonia on farms with endemic infection. Veterinary Medicine Austria, 96: 203-208.

Verryken K., Saey V., Maes S., Borchers K., Van de Walle G., Ducatelle R. &Deprez P. 2010. First report of multinodular pulmonary fibrosis associated with equine herpesvirus 5 in Belgium. Vlaams Dier genees kundig Tijdschrift, 79: 297-301.

Williams K. J., Robinson N. E., Lim A., Brandenberger C., Maes R., Behan A. & Bolin S. R. 2013. Experimental Induction of Pulmonary Fibrosis in Horses with the Gamma herpesvirus Equine Herpesvirus 5.Plos One, 8(10): e77754.

Williams K. J., Maes R., Del Piero F., Lim A., Wise A., Bolin D. C., Caswell J., Jackson C., Robinson N. E., Derksen F. M. A., Scott M. A., Uhal B. D., Li X., Youssef S. A. & Bolin S. 2007. R. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis: A newly recognized Herpesvirus-Associated Fibrotic Lung Disease. Vet. Pathol., 44: 849–862.

Wong D. M., Belgrave R. L., Williams K. J., Del Piero F., Alcott C. J., Bolin S. R., Marr C. M., Nolen-Walston R., Myers R. K. & Wilkins P. A. 2008. Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. J. Am. Vet. Med. Ass., 232: 898-905.

Figure1. **A**. Equine lung with multinodular pulmonary fibrosis. There are whitish, firm and well-defined nodules that were approximately 7-10 cm in diameter distributed in the parenchyma. **B**. Histological section of the lung showing alveolar spaces containing macrophages, neutrophils, lymphocytes and hyperplasia of type II pneumocytes. HE 20X. **C**. Mature fibrous connective tissue around alveolar spaces. TM 40X.

Figure 2.A. Equine lung presenting whitish, pale and firm nodules distributes in the parenchyma. **B**. The cut surface of the lung showing coalescing nodular areas.

Figure3.**A**. Histological section of lung shown in Figure 2A. The alveolar spaces show inflammatory cells and connective tissue proliferation. HE 20X **B**. Histological section of lung shown in Figure 2B. There is proliferation of type II pneumocytes and inflammatory cells within alveoli. HE 20X. C, D. There is a marked proliferation of fibrous tissue around the alveolar spaces. TM 20X.

4 Considerações finais

Esta dissertação permitiu concluir que:

1. Fibrose pulmonar multinodular equina (EMPF) está presente na região Sul do Rio Grande do Sul.
2. A EMPF é uma doença esporádica na região já que entre 2000-2015 apenas um caso foi confirmado com identificação do DNA de herpesvirus equino-5.
3. As lesões histológicas de EMPF são características podendo ser diferenciadas das principais enfermidades respiratórias de equinos que são frequentes na região.

Referências

AINSWORTH, D.M. Equine Multi-nodular Pulmonary Fibrosis (EMPF).Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, 18, 2012.Bologna. **Proceedings.** Bologna: IVIS, 2012, p.17-21.

AMARAL, P.C.; GRAÇA, 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 eqüinos da Polícia Militar do Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasilira de Ciência Veterinária**,v.6, n.2, p.77-83, 1999.

BACK, H.; KENDALL, A.; GRANDÓN, R.; ULLMAN, K.; TREIBERG-BERNDTSSON, L.; STÅHL, K.; PRINGLE, J. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis in association with asinine herpesvirus type 5 and equine herpesvirus type 5: a case report. **Acta Veterinaria Scandinavica**, p.54-57, 2012.

BEGG, A.P.; REECE, R.L.; HUM, S.; TOWNSEND, W.; GORDOND, A.; CARRICKE, J. Pathological changes in horses dying with equine influenza in Australia, 2007.**Australian Veterinary Journal,** v.89, p.19–22, 2011.

BUERGELT, C.D.; HINES, S.A.; CANTOR, G.; STIRT, A.; WILSON, J.H. A retrospective study of proliferative interstitial lung disease of horses in Florida.**Veterinary Pathology**, v.23, p.750-56, 1986.

CHAFFIN, M. K.; COHEN, N. D.; MARTENS, R. J.; EDWARDS, R. F.; NEVILL, M.Foal-related risk factors associated with development of *Rhodococcus equ i*pneumonia on farms with endemic infection. **Journal American Veterinary Medical Association**, v.223, n.12, p.1791-1799, 2003.

COHEN, N.D. Causes of and farm management factorsassociated with disease and death in foals. **Journal American Veterinary Medical Association,** v.204, n.10, p.1644-1651,1994.

CRISPE, E.J.; LESTER, G.D.; ROBERTSON, I.D.; SECOMBE, C.J. Bar shoes and ambient temperature are risk factors for exercise induced pulmonary haemorrhage in Thorough bred race horses. **Equine Veterinary Journal**, v.48 p.438–441, 2015.

DONALDSON, M.T.; BEECH, J.; ENNULAT, D.; HAMIR, A. N. Interstitial pneumonia and pulmonary fibrosis in a horse.**Equine Veterinary Journal**, v.30, n.2, p.173-175, 1998.

DUNOWSKA, M.; HARDCASTLE, M.R.; TONKIN, F.B. Identification of the first New Zealand case of equine multinodular pulmonary fibrosis. **New Zealand Veterinary Journal,** v.62, n.4, p.226-231, 2014.

FREY JUNIOR, Friedrich. **Índices epidemiológicos em potros Puro Sangue de Inglês, do nascimento ao sexto mês de vida, em dois haras na região de Bagé-RS.** 2006. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2006.

GHOSH, S.; DAS, P.J.; MCQUEEN, C.M.; GERBER, V.; SWIDERSKI, C.E.; LAVOIE, J.P.; CHOWDHARY, B.P.; RAUDSEPP, T. Analysis of genomic copy number variation in equine recurrent airway obstruction (heaves). **Stichting International Foundation for Animal Genetics,** v.47, p.334–344, 2016.

GIGUÈRE, S.;PRESCOTT, J.F. Clinical manifestations, diagnosis, treatment, and prevention of Rhodococcus equi infections in foals. **Veterinary Microbiology,** v.56, p.31 3-334, 1997.

HAMATANI, K.; EGUCHI, H.; TAKAHASHI, K.; KOYAMA, K.; MUKAI, M.; ITO, R.; TAGA, M.; YASUI, W.; NAKACHI, K. Improved RT-PCR Amplification for Molecular Analyses with Long-term Preserved Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue Specimens. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry,** v.54, n.7, p.773–780, 2006.

HART, K.A.; BARTON, M.H.; WILLIAMS, K.J.; FLAMINIO, M.J.B.F.; HOWERTH, E.W. Multinodular pulmonary fibrosis, pancytopenia and equine herpesvirus-5 infection in a Thoroughbred gelding. **Equine Veterinary Education,** v.20, n.9, p.470-476, 2008.

HINCHCLIFF, K.W.;COUETIL, L.L.;KNIGHT, P.K.;MORLEY, P.S.; ROBINSON, N.E.; SWEENEY, C.R.; VAN ERCK, E. Exercise Induced Pulmonary Hemorrhage in Horses: American College of Veterinary Internal Medicine Consensus Statement. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.29, p.743–758, 2015.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal.** Rio de Janeiro: Centro de Documentação e Disseminação de Informações. 2013. 108 p.

LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo.** Brasília: Assessoria de Comunicação e Eventos do MAPA. 2015. 54 p.

LÓPEZ, A. Doenças do Sistema Respiratório. In: MCGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. (Ed.) **Bases da patologia em Veterinária**. 4.ed., São Paulo: Mosby, Elsevier. St. Louis, seção II, 2009. p.473-558.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; ESTIMA-SILVA, P.; SOARES, M.P.; SALLIS, E.S.V.; GRECCO, F.B.; RAFFI, M.B.; FERNANDES, C.G.; SCHILD, A.L. Doenças de equinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.34, n.3, p.205-210, 2014.

MILLER, M. A.; MOORE, G. E.; BERTIN, F. R.J; KRITCHEVSKY, E. What's new in Old Horses? Postmortem Diagnoses in Mature and Aged Equids. **Veterinary Pathology,** v. 53, n.2, p.390-398, 2016.

MITCHELL, D.N.; SCADDING, J.G.; HEARD, B.E.; HINSON, K.F.W. Sarcoidosis: histopatholofical definition and clinical diagnosis. **Journal of Clinical Pathology,** v.30, p. 395-408, 1977.

MURRAY, M.J.; DEL PIERO, F.; JEFFREY, S.C.; DAVIS, M.S.; FURR, M.O.; DUBOVI, E.J.; MAYO, J.A. Neonatal equine herpesvirus type 1 infection on a thoroughbred breeding farm. **Journal Veterinary Internal Medicine,** v.12, n.1, p.36-41, 1998.

OTAKA, J.N.P.; SILVA, K.M.; JORGE, M.L.A.L.; GONÇALVES, C.A.P.G.; OTAKA, D.Y.; LESSA, D.A.B. Ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício em cavalos de pólo na cidade do Rio de Janeiro/RJ. **Archives of Veterinary Science**, v.19, n.2, p.46-51, 2014.

OTAKA, J.N.P. **Ocorrência de hemorragia pulmonar induzida pelo exercício em cavalos de pólo na cidade do Rio de Janeiro/RJ.** 2011. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Clínica e Reprodução Animal), Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2011.

PANZIERA, W.; GIARETTA, P.R.; GALIZA, G.J.N.; LIM, A.; BOLIN, S.R.; BORGES, C.H.; FIGHERA, R.A.; BARROS, C.S.L. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis Associated with Equine Herpesvirus 5 in a Horse in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research an Animal Science,** v.7, n.1, p.17-20, 2014.

PATTERSON-KANE, J.C.; CARRICK, J.B.; AXON, J.E.; IWILKIE, I.; BEGG, A.P. The pathology of bronchointerstitial pneumonia in young foals associated with the first outbreak of equine influenza in Australia. **Equine Veterinary Journal,** v.40**,** n.3, p.199-203. 2008

PERGLIONE, C.O.; GILDEA, S.; RIMONDI, A.; MIÑO, S.; VISSANI, A.; CAROSSINO, M.; CULLINANE, A.; BARRANDEGUY M. Epidemiological and virological findings during multiple outbreaks of equine influenza in South America in 2012. **Influenza and Other Respiratory Viruses,** v.10, n.1, p.37-46, 2015.

PIEREZAN, F.; RISSI, D.R.; RECH, R.R.; FIGHERA, R.A.; BRUM, J.S.; BARROS, C.S.L. Achados de necropsia relacionados com a morte de 335 eqüinos: 1968-2007. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v.29, n.3, p.275-280, 2009.

PIRIE, R.S. Recurrent airway obstruction: A review. **Equine Veterinary Journal**, v.46**,** p.276–288, 2013.

POTH, T.; NIEDERMAIER, G.; HERMANNS, W. Foal-related risk factors associated with development of Rhodococcus equi pneumonia on farms with endemic infection. **Veterinary Medicine Austria**, v.96, p.203-208, 2009.

PULZ, R.S.; PEZZI, A.F.; SILVA, C.A.; PETRUCCI, B.P.L.; PICAWY, L.; SILVEIRA, R.F.S. Hemorragia pulmonar induzida pelo exercício em cavalos de pólo. **Veterinária em Foco**, v.3, n.1, p.43-50, 2005.

PUSTERLA, N.; MAGDESIAN, K.G.; MAPES, S.M.; ZAVODOVSKAYA, R.; KASS, P. H. Assessment of quantitative polymerase chain reaction for equine herpesvirus-5 in blood, nasal secretions and bronchoalveolar lavage fluid for the laboratory diagnosis of equine multinodular pulmonary fibrosis. **Equine Veterinary Journal,** v.0, p.1–5, 2015.

PUSTERLA, N.;PESAVENTO, P.A.; SMITH, P.; DURANDO, M.M.; MAGDESIAN, K.G.; WILSON W.D. Idiopathic granulomatous pneumonia in seven horses. **Veterinary Record,** v.153, p.653-655, 2003.

ROBINSON,N. E.; DERKSEN, F.J.; OLSZEWSKI, M.A.; BUECHNER-MAXWELL, V. A.The pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease of horses. **Brazilian Veterinary Journal Research and Animal Science,** v.152, n.3, p.283-306, 1996.

SANTOS, F.C.C.; FEIJÓ, L.S.; LADEIRA, S.L.; NOGUEIRA, C.E.W.; CURCIO, B.R. Pneumonia causada por *Rhodococcus equi* em um potro da raça Crioula. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.41, p.01-06, 2013.

SCHILD, A.L.; OLIVEIRA, P.A.; SALLIS, E.S.V.; RAFFI, M.B.; MARCOLONGO-PEREIRA, C. Doenças diagnosticadas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico no ano de 2014. In: LADEIRA, S. R. L.; RUAS, J. L.; SOARES, M. P.; SCHILD, A. L. **Boletim do Diagnóstico Regional de Diagnóstico,** n.36, p.64., 2015.

VARGAS, A.C. Infecção por *Rhodococcus equi.* In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p. 309-320.

VERRYKEN, K.; SAEY, V.; MAES, S.; BORCHERS, K.; VAN DE WALLE, G.; DUCATELLE, R.; DEPREZ P. First report of multinodular pulmonary fibrosis associated with equine herpesvirus 5 in Belgium. **Vlaams Diergenees kundig Tijdschrift,** v.79, p.297-301, 2010.

WEIBLEN, R. Influenza equina.In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A.L.; LEMOS, R.A.A.; BORGES, J.R.J. **Doenças de Ruminantes e Equídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. p.152-159.

WILKINS, P.A.; LASCOLA, K.M. Update on Interstitial Pneumonia. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice,** v.31, p.137-157, 2015

WILLIAMS, K.J.; ROBINSON, N.E.; LIM, A.; BRANDENBERGER, C.; MAES, R.; BEHAN, A.; BOLIN S.R. Experimental Induction of Pulmonary Fibrosis in Horses with the Gamma herpesvirus Equine Herpesvirus 5.**Plos One,** v.8, n.10, e77754. 2013.

WILLIAMS, K.J.; MAES, R.; DEL PIERO, F.; LIM, A.; WISE, A.; BOLIN, D.C.; CASWELL, J.; JACKSON, C.; ROBINSON, N.E.; DERKSEN, F.; SCOTT, M.A.; UHAL, B.D.; LI, X.; YOUSSEF, S.A.; BOLIN, S.R. Equine Multinodular Pulmonary Fibrosis: A newly recognized Herpesvirus-Associated Fibrotic Lung Disease. **Veterinary Pathology,** v.44, p.849–862, 2007.

WONG, D.M.; BELGRAVE, R.L.; WILLIAMS, K.J.; DEL PIERO, F.; ALCOTT, C.J.; BOLIN, S.R.; MARR, C.M.; NOLEN-WALSTON, R.; MYERS, R.K.; WILKINS, P.A. Multinodular pulmonary fibrosis in five horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association,** v.232, p.898-905, 2008.