

Lavagem broncoalveolar (BAL) em suínos: confronto de duas técnicas e novas propostas para uma utilização concreta no campo



Claudio Mazzone*
Annalisa Scollo**

* Médico-veterinário autônomo
** Departamento de MAPS
Universidade de Padova
summa@pointvet.it

A lavagem broncoalveolar (BAL) é uma técnica de pesquisa para obter material com conteúdo celular ou não (fluido broncoalveolar), proveniente da superfície epitelial das vias respiratórias inferiores. A coleta tem fins diagnósticos, e nas amostras coletadas com a técnica (BAL) é possível identificar bactérias, vírus, protozoários e fungos, responsáveis por infecções pulmonares, como mostrado em várias publicações de medicina humana^{2, 18, 4 e 17}. Nos últimos dez anos, esta técnica vem ganhando cada vez mais importância na medicina veterinária, graças, principalmente, à broncoscopia com endoscópio de fibra ótica, que permite uma introdução mais fácil do cateter no trato respiratório⁶.

Na espécie suína, o fluido broncoalveolar obtido com o (BAL) (BALF) foi objeto de estudos citológicos, bioquímicos e bacteriológicos, que permitiram a descrição da flora bacteriana presente normalmente no trato respiratório desta espécie⁹ e o estabelecimento de valores de referência para a contagem celular de animais saudáveis⁶. Em nível experimental, o (BAL) também é utilizado para a diagnose etiológica de patologia respiratória, permitindo o isolamento de *M. hyopneumoniae* dos pulmões¹ e o estudo da resposta imunitária local, seguida de vacinação por via respiratória com cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae*¹⁰, *Pasteurella multocida*¹¹ e vírus Influenza³.

Em 1993, Ganter et al. descreveram o (BAL) como bom método de pesquisa etiológica, e, recentemente, Moorkamp et al. (2008) confirmaram a utilidade, verificando uma boa correlação entre a presença de bactérias mais comuns no (BALF) e no tecido pulmonar do mesmo animal após a necropsia, concluindo que o (BAL) representa um método



Foto 01 - Passagem da sonda via oral para obtenção do lavado broncoalveolar

apropriado para o isolamento de patógenos respiratórios.

Os primeiros estudos experimentais que previam o emprego do (BAL) em suínos são dos anos 70, mas na década seguinte as técnicas usadas para a coleta do material evoluíram e se diferenciaram. Inicialmente, os métodos descritos previam o isolamento de todo o pulmão, depois do sacrifício do animal¹³, para, alguns anos depois, passar para coleta de (BALF) sem sacrificá-lo, usando anestesia por meio da introdução de uma cânula via transtraqueal¹⁹. Ambos os métodos apresentam limites que diminuem a sua praticidade: no primeiro caso, a impossibilidade de acompanhar a evolução da infecção/doença *in vivo*; no segundo, a incisão dos tecidos para ter acesso à traqueia representa, sem dúvida, uma técnica invasiva, difícil e com riscos de contaminação da amostra³. Por estes motivos, a técnica atualmente mais utilizada é aquela que prevê a anestesia do suíno e a introdução, por via oral, de uma sonda traqueal de fibra ótica¹⁶.

Todavia, enquanto nas outras espécies de interesse veterinário esta técnica é amplamente utilizada, no suíno, o (BAL) encontra o seu uso quase exclusivamente em campo experimental, seja pela necessidade de observar rígidas regras de biossegurança com a instrumentação, como o broncoscópico óptico¹⁴, seja pelo risco ou porque o custo da anestesia do animal é pouco viável.

O objetivo do presente trabalho é descrever e confrontar duas técnicas de (BAL) que não preveem a anestesia do animal nem a utilização de um broncoscópico de fibra ótica, graças ao uso de sondas descartáveis, não excessivamente traumáticas ao animal, e a adoção de manual simples. Além disso, com base nas primeiras experiências amadurecidas pelos autores, serão avaliadas as situações em que melhor podem usufruir da técnica (BAL) em condições de campo, com o objetivo de integrar e melhorar os atuais métodos diagnósticos de infecções respiratórias, que cada vez mais necessitam de

estratégias de prevenção e tempestividade de diagnóstico para consentir a redução dos custos sanitários.

Material e método

A prova foi conduzida com 85 suínos de diversas condições de campo. Setenta e dois suínos eram provenientes de uma única granja, mostraram-se sãos ao exame clínico, de genética DanBred, e pesavam aproximadamente 50 kg ao início da prova. Os outros 13 animais eram provenientes de outras granjas e manifestavam síndrome respiratória mais ou menos grave. Três deles eram de origem holandesa, se encontravam no mesmo local de engorda e pesavam aproximadamente 80 kg. Os outros dez animais eram marrãs em fase de crescimento (cinco de tipo genético holandês e a outra metade de genética inglesa), provenientes de dois núcleos multiplicadores. Os 72 animais sãos foram submetidos à técnica (BAL) por quatro operadores em seis dias diferentes de provas, distribuídas em dois meses, com intervalos de aproximadamente 10 dias uma da outra. Em um dia de prova, em cada um dos animais, foram praticadas duas técnicas diferentes de (BAL): a via nasal¹ e a via oral². No último dia de prova foi realizado um peso médio dos animais de aproximadamente 80 kg. Os 13 animais com síndrome respiratória foram submetidos a um único (BAL) por via nasal, e ao mesmo tempo foram coletadas amostras de sangue da veia jugular com fins diagnósticos.

Técnica de lavagem broncoalveolar

Ambas as técnicas (BAL) foram realizadas em animais in vivo, sem uso de anestesia alguma (fotos 1 e 2). Os animais eram contidos por meio do laço em torno do focinho, o mais caudalmente possível, de modo de obter a quase imobilidade do animal. A extremidade livre do laço era mantida em posição sobrelevada, alinhando a cabeça com o eixo longitudinal do animal, com uma moderada extensão do pescoço.



Foto 02 - Passagem da sonda via nasal para obtenção do lavado broncoalveolar

Acesso ao pulmão por via nasal

A sonda utilizada para a amostragem media 90 cm de comprimento e 1,9 mm de diâmetro (*Compipath veterinaire*). Depois da limpeza do focinho, a sonda foi introduzida em um dos dois orifícios nasais, mantendo o mais medialmente possível ao longo do septo nasal, introduzindo gradualmente e delicadamente em profundidade. Para facilitar a entrada na traqueia, o avanço da sonda era realizado em concomitância com o ato inspiratório do animal. O movimento de introdução era bloqueado na presença de tosse, que indicava a chegada às vias respiratórias profundas. A prova de que fosse introduzido na traqueia era o embaçamento da sonda durante a expiração.

Acesso ao pulmão por via oral

Para manter aberta a cavidade oral do animal, foi utilizado um “abre-boca” tradicional. Foram utilizadas duas sondas: uma guia estéril longa de 50 cm (Unomedical) e uma sonda-cateter, mais comprida e sutil, com 90 cm de comprimento e de 1,9 mm de diâmetro (*Compipath veterinaire*). Depois da abertura da boca, a sonda-guia foi introduzida por todo seu comprimento na cavidade oral ao longo da linha medial do palato superior, mantendo-a o mais dorsalmente possível e paralela ao eixo

longitudinal do animal para facilitar a entrada na traqueia. A sua introdução em profundidade foi realizada delicadamente e sempre durante os atos inspiratórios. A segunda sonda foi introduzida dentro da guia, que permitiu fácil acesso à laringe. A introdução era bloqueada na presença de tosse, que indicava a chegada às vias respiratórias profundas. A certeza da entrada na traqueia era evidenciada pela mudança do timbre de voz do animal ao passar da sonda por meio da laringe e do embaçamento da sonda durante a expiração.

Em ambas as técnicas, depois da chegada às vias aéreas profundas, foi ligada à sonda uma seringa estéril, de 20 ml, contendo 15 ml de solução fisiológica isotônica e estéril e o equivalente a 5 ml de ar.

A injeção de ar imediatamente depois da rápida introdução da solução fisiológica no pulmão teve como objetivo esvaziar a sonda de todo o seu conteúdo, havendo, assim, a certeza de expirar exclusivamente o líquido que tivesse tido contato com o epitélio respiratório. Logo depois, houve a aspiração de uma quantidade de BALF de cerca 2 ml a 5 ml, que era, depois, estocada em uma proveta estéril.

Em caso de dificuldade de recuperação do BALF do pulmão, repetiu-se a introdução de 10 ml de solução fisiológica estéril por meio da sonda, repetindo a operação de aspiração (figura 1).



Foto 03 e 04 - Dificuldade inesperada para passagem da sonda via nasal

Resultados

Técnicas de lavagem broncoalveolar

Em nenhuma das 900 amostras realizadas durante a prova foram observados nos suínos sinais evidentes de desconforto depois da preparação ou execução da amostragem. Em cinco casos verificou-se a presença de hemácias no BALF, sem que fosse possível registrar qualquer reação de mal estar nos animais.

Acesso ao pulmão por via nasal

O (BAL) por via nasal requisiu somente um operador e a utilização de apenas uma sonda. O tempo empregado por cada amostragem foi de 5 a 15 minutos, segundo o comportamento dos animais, incluído o tempo de contenção dos animais. O percurso da sonda ao longo todo do trato respiratório externo normalmente provocou leves reações de intolerância nos animais, como espirros, tosse, desvio da cabeça e lacrimagem ocular.

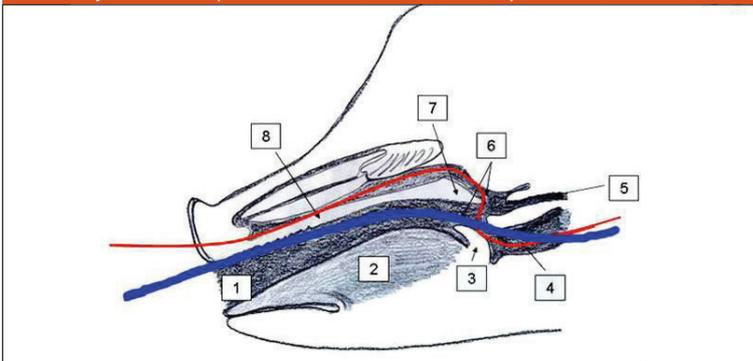
Nestas ocasiões, depois de observar tosse ou espirros, a sonda se torcia internamente nas vias nasais, obstruindo-se e impedindo uma correta amostragem (foto 3 e 4). Além disso, os operadores foram unânimes ao dizer que existiu maior dificuldade em fazer a amostragem nos 72 animais de proveniência DanBred durante a primeira parte da fase de engorda. A sonda, de fato, entrava frequentemente no esôfago, ao invés da traqueia, impedindo o recolhimento do (BAL). Nestes animais, em nenhuma amostragem feita no início do ciclo de engorda (cerca 50 kg. p.v.) houve um resultado positivo na primeira tentativa, tendo sido repetida a operação. Tal dificuldade foi resolvida gradualmente com o aumentar do peso do animal. Este fato raramente foi verificado nos 13 animais restantes, de diferentes proveniências genéticas. Um panorama das principais características da técnica (BAL) com a técnica nasal é ilustrado na tabela 1.

Análise de laboratório

O BALF e o soro obtido dos 13 suínos com síndrome respiratória foram submetidos em forma de dois pools por cada granja à pesquisa por meio de PCR

de *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV (Síndrome Respiratória e Reprodutiva Suína), PCV- 2 (Circovírus Suíno Tipo - 2), Vírus Influenza (H1N1 e H3N2) e vírus da doença de Aujeszky. Além disso, em todas as amostras de BALF foi realizado um exame bacteriológico.

Figura 01 - Corte sagital direito da cabeça do suíno
Trajeto do cateter por meio do nariz (linha vermelha) e por via oral (linha azul)



Legenda: 1. cavidade oral; 2. língua; 3. epiglote; 4. cavidade da laringe; 5. esôfago; 6. cavidade da faringe; 7. palato mole; 8. palato duro

Acesso ao pulmão por via oral

Para realizar o (BAL) por via oral foram necessários dois operadores e duas sondas.

O tempo necessário para cada amostragem foi igualmente de 5 a 15 minutos, segundo o comportamento do animal, incluído o tempo de contenção dele.

Não foram verificadas reações de intolerância à passagem da sonda por meio das vias respiratórias, exceto raros acessos de tosse quando ela superava a laringe. Ambas as sondas raramente apresentaram problemas de obstrução, e todos os operadores relataram certa facilidade na execução da amostra, mesmo antes de adquirir uma boa manualidade, independentemente do tipo genético suíno ou do peso do animal. Um panorama das principais características da técnica (BAL) é ilustrado na tabela 1.

Análise de laboratório

Os resultados obtidos dos pools de BALF e soro dos 13 animais que apresentavam sinais respiratórios são reportados na tabela 2. No pool da granja A e B verificou-se discordância entre os resultados obtidos com (BAL) (+) e soro (-) por conta da presença do vírus PRRS.

Discussão e conclusão

Analisando os resultados obtidos, o (BAL) realizado em um animal não anestesiado, sem o auxílio de um broncoscópio à fibra óptica, é uma técnica de pesquisa facilmente aplicável mesmo no campo, já que é economicamente viável, possui facilidade para o operador e se torna pouco invasiva para o animal. Não foi notado nenhum sinal de sofrimento ou reação dos animais, confirmando o que já foi observado por Abiven e Pommier (1993), de que a necrópsia depois da realização do (BAL) não encontrou nenhuma lesão nas vias respiratórias. No mais, a utilização da

Tabela 1. Características da técnica BAL por via nasal e por via oral: vantagens e desvantagens.

Via nasal	Via oral
VANTAGENS	DESVANTAGENS
Menos mão de obra: 1 operador	Mais mão de obra: 2 operadores
Menos material: 1 cateter	Mais material: 2 cateteres, 1 abre-boca
DESVANTAGENS	VANTAGENS
Frequentes reações leves de intolerância à passagem da sonda ou cateter ao longo do trato respiratório: espirros, episódios de tosse, desvio da cabeça ou pescoço e lacrimação ocular	Raros episódios de tosse à passagem da sonda ou cateter por meio da laringe
Frequente obstrução do cateter por encurvamento	Rara obstrução de ambos os cateteres por encurvamento
Elevada dificuldade em suínos jovens de genética dinamarquesa	Elevada facilidade de sucesso em todos os tipos genéticos e em todas as idades

sonda descartável é uma prática de boas normas de biossegurança, sempre indispensáveis no setor suinícola.

Mesmo que o (BAL) seja uma amostragem muito localizada e potencialmente não representativa de todo o pulmão¹⁵, Moorkamp et al.(2008) afirmam que um exame bacteriológico obtido da BALF, proveniente, principalmente, de lobo pulmonar caudal, é comparável à análise do tecido pulmonar como um todo e de tampões bronquiais recolhidos de lobos craniais e médios, com a grande vantagem de poder ser realizado em animais vivos.

Seja a via nasal ou a oral objetos de estudo neste artigo, ambas demonstraram-se facilmente aplicáveis no campo, mas na via oral há características específicas que tornam sua utilização mais idônea. Mesmo que sejam necessárias mais pessoas e materiais, não foi apresentado, de fato, nenhuma limitação ligada à conformação anatômica das diferentes linhas genéticas ou às diferentes idades ou peso dos animais. Já a via nasal é a de mais difícil realização em linhas genéticas Dan-

Bred de 50 kg a 70 kg de peso vivo, nas quais a sonda, com muita probabilidade, acabava no esôfago, ao invés da traqueia.

É possível que existam leves diferenças anatômicas entre linhas genéticas que fazem com que o trato compreendido entre o orifício nasal e a traqueia seja menos linear e acessível nesta linha genética. É possível que a obstrução da sonda no nível da laringe ocorra devido a uma diferente conformação da cartilagem aritnóidea ou por conta de maior extensão do palato mole.

Neste estudo, a análise laboratorial do (BAL), por meio de PCR, permitiu a identificação de *Mycoplasma hyopneumoniae*, PRRSV, PCV-2 e vírus Influenza. Mas em dois dos casos, a pesquisa de PRRSV nas diferentes matrizes biológicas do mesmo animal foram discordantes, indicando uma positividade para o (BAL) e negatividade para o soro. A interpretação de tal resultado pode fornecer informações temporais, em razão do processo infeccioso eventualmente em curso, mais importantes do ponto de vista epidemiológico do que clínico.

Tabela 2. Resultados dos exames de laboratório obtidos por PCR com a técnica BALF, sorologia e exame bacteriológico de material recolhido com BALF

Granja	Unidade	Tipo	Nº de Amostras	<i>M. hyo.</i>	PRRS	PCV-2	Influenza	Aujeszky	Bacteriológico
A <i>Streptococcus</i>	Engorda	BALF	3	Pos.	Pos.	-	-	-	Gen.
		Sangue	3	-	Neg.	Neg.	-	-	-
B <i>multocida</i>	Sítio 1	BALF	5	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pasteurella
		Sangue	5	-	Neg.	Neg.	-	-	-
C	Sítio 1	BALF	5	Pos.	Neg.	1.100 cópias	Neg.	Neg.	Neg.
		Sangue	5	-	Neg.	1.5000 cópias	-	-	-

Um recente estudo em medicina humana⁸ sugere o uso do (BAL) em caso de flogosi respiratória para obter um rápido diagnóstico, por meio dos valores leucocitários e de algumas citocinas recentes no (BAL). Nas condições de campo, em granjas de suínos, confrontar e interpretar os resultados que podem ser obtidos de (BAL) e soro do mesmo animal podem permitir um monitoramento do processo infeccioso, oferecendo informações epidemiológicas de forma veloz e permitindo intervenções precoces e focadas.

Em algumas importantes doenças respiratórias dos suínos, a comparação de duas diferentes matrizes biológicas, como o (BAL) e o soro, poderia dar informações de diagnóstico mais completas e específicas. Em particular, nos casos em que não estivessem disponíveis pulmões de animais mortos, evitando o sacrifício de outros animais para a diagnose e, principalmente, um segundo controle sorológico em fase de recuperação, reduzindo consideravelmente o tempo de intervenção terapêutica específica.

Mesmo não podendo tirar conclusões, esperando que futuras pesquisas sejam feitas no campo, é interessante considerar a melhor sensibilidade do BALF em respeito à sorologia, pelo menos com respeito à PRRS, e a possível capacidade de evidenciar o vírus nas vias respiratórias, mesmo no final da fase virêmica. Uma outra situação interessante de aplicação seria o uso da técnica como método de gestão de entrada de marrãs nas granjas comerciais ou de multiplicação.

Além disso, os dados laboratoriais disponíveis atualmente mostram uma constante positividade de BALF para o *Mycoplasma hyopneumoniae*. A identificação do agente in vivo é geralmente realizada por meio de PCR (Reação de Cadeia pela Polimerase) de tampões nasais, mas estudos experimentais indicam que o sítio de eleição para identificação deste patógeno encontra-se nas partes mais profundas do aparelho respiratório⁹, confirmando uma possível utilização desta técnica como uma pesquisa específica deste agente etimológico.

O (BAL) poderia representar um método de diagnóstico não só prático, mas também facilmente utilizável em condições de campo, além de ter uma elevada sensibilidade para oferecer informações adjuntas se realizado em paralelo com outros métodos de diagnóstico. 

Referências Bibliográficas

1. Abiven P., Pommier P. Technique de lavage traqueobronchique par voie transnasale pour la detection de *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant non anesthésié. *Veterinary Research*. 1993; vol. 24: pp. 515-522.
2. Cantral D.E., Tape T.G., Reed E.C., Spurzem J.R., Rennard S.I., Thompson A.B. Quantitative culture of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of bacterial pneumonia. *Am J Med*. 1993; vol. 95: pp. 601-7.
3. Charley B., Frenove B. & Villiers P. Description et efficacité d'une méthode modifiée de lavage pulmonaire chez le porc anaesthésié. *Annual de la Recherche Vétérinaire*. 1980; vol. 11: pp. 209-213.
4. Drew W. L., Finley T. N., Mintz L., Klein HZ. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchopulmonary lavage. *JAMA*. 1974; vol. 230: pp. 713-5.
5. Fablet C., Marois C., Dorenlor V., Eono F., Eve-no E., Poezevara T., Kobisch M., Madec F., Rose N. Evaluation de quatre techniques de prélèvement pour détecter *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc vivant. *JRP* 2011.
6. Ganter M., Hensel A. Cellular variables in bronchoalveolar lavage fluids (BALF) in selected healthy pigs. *Research in Veterinary Science*. 1997; vol. 63: pp. 215-217.
7. Ganter M., Kipper S., Schottger-Wegener H., Beckmann G. & Bunka S. Diagnosis of pneumonitis in living pigs by bronchoalveolar lavage. *Berliner & Munchner Tierärztliche Wochenschrift*. 1993; vol. 116: pp. 330-333.
8. Gidarid D., Kanakoudi-Tsakalidou F., Papa-kosta D., Tzimouli V., Taparkou A., Ventouri M., Tsanakas I. Bronchoalveolar lavage in children with inflammatory and non inflammatory lung disease. *Hippokratia*. 2010; vol. 14, n. 2: pp. 109-114.
9. Hensel A., Ganter M., Kipper S., Krehon S., Wit-tenbrink M. M. & Petzold K. Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *American Journal of Veterinary Research*. 1994; vol. 55: pp. 1697-1702.
10. Hensel A., Van Leengoed L.A.M.G., Szostak M., Windt H., Weissenböck J., Stockhofe-Zurwieden N., Katinger A., Stadler M., Ganter M., Bunka S., Pabst R. & Lubitz W. Induction of protective immunity by aerosol or oral application of candidate vaccines in a dose-controlled pig aerosol infection model. *Journal of Biotechnology*. 1996; vol. 44: pp. 171-181.
11. Kohler H., Lemser B., Müller G., Saalmüller A. Early changes in the phenotypic composition of lymphocytes in the bronchoalveolar lavage of pigs after aerogenic immunization with *Pasteurella multocida* aerosols. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1997; vol. 58: pp. 277-286.
12. Marchant D., Müller V. Técnica di Lavaggio Bronco Alveolare per via orale. *Clinique Réseau Cristal*. 2010; comunicação pessoal.
13. Mensik J., Franz J., Pospisil Z., Krejci J. The local role of antibodies in the protection of calves against viral respiratory infections. *Acta Vet*. 1971; suppl. 2: pp. 75-81.
14. Moorkamp L., Nathues H., Sperser J., Tegeler R., Grosse Beilage E. Detection of respiratory pathogens in porcine lung tissue and lavage fluid. *The Veterinary Journal*. 2008; vol. 175: pp. 273-275.
15. Reinhold P., Costabel U., Hamacher J., Thee-garten D., Ganter M., Rosenbruch M. Vergleichende Aspekte der broncho-alveolaren Lavage bei Mensch und Tier. *Pneumologie*. 2005; vol. 59: pp. 485-501.
16. Rudolph A., Markstaller K., Gast K. K., David M., Schreiber W. G. and Eberle B. Visualization of alveolar recruitment in a porcine model of unilateral lung lavage using 3He-MRI. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2009; vol. 53: pp. 1310-1316.
17. Sobonya R.E., Barbee R.A. Isolation of *Coccidioides immitis* from bronchoalveolar lavage is diagnostic of infection. *Am Rev Respir Dis*. 1991; vol. 143: p. 451.
18. Sternberg R.L., Baughman R.P., Dohn M.N., First M.R. Utility of bronchoalveolar lavage in assessing pneumonia in immunosuppressed renal transplant recipients. *Am J Med*. 1993; vol. 95: pp. 358-64.
19. Williams P.P. Collection and cultivation of and phagocytosis by pulmonary macrophages obtained from hysterectomy-derived pigs. *Am. J. Vet. Res*. 1978; vol. 39: pp. 485-489.