

JULIANA FALCATO VECINA

**AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DA
RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM
CÃES**

CAMPINAS – SP

2009

JULIANA FALCATO VECINA

AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM CÃES

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação
da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre
em Ciências Médicas, área de concentração Ciências
Biomédicas*

Projeto Financiado pela FAPESP

Processos nº 07/56716-3 e 06/59251-9

ORIENTADOR: PROF.^a Dr.^a HELENA ZERLOTTI WOLF GROTTTO

CAMPINAS

Unicamp

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

V497a Vecina, Juliana Falcato
Avaliação dos marcadores da resposta inflamatória aguda em cães
/ Juliana Falcato Vecina. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientador : Helena Zerlotti Wolf Grotto

Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação. 2. Reação de fase aguda. 3. Cão como animal
de laboratório. 4. Interleucina – 6. 5. Proteína C reativa. I.
Grotto, Helena Zerlotti Wolf. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Evaluation of acute inflammatory response markers in dogs

Keywords: • Inflammation
• Acute phase reaction
• Dog
• Interleukin-6
• C-Reactive protein

Titulação: Mestre em Ciências Médicas
Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Prof. Dr. Claudio Lúcio Rossi
Prof. Dr. Paulo César Ciarlini

Data da defesa: 02-06-2009

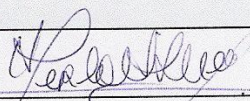
Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Juliana Falcato Vecina

Orientadora: Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto

Membros:

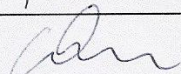
1. Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto -



2. Prof. Dr. Paulo César Ciarlini -



3. Prof. Dr. Claudio Lucio Rossi -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 02/06/2009

DEDICATÓRIA

*Aos meu pais, Aline e José Francisco
que sempre me apoiaram e ao meu irmão, Juarez, que
mesmo morando longe sempre me incetivou.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre iluminar meus passos e sempre me guiar de forma clara.

À minha orientadora, Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto, por aceitar minha persistência, pela oportunidade, por compartilhar seus conhecimentos, tanto profissionais quanto pessoais e principalmente pela amizade e carinho quando foi preciso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por conceder minha bolsa de mestrado e auxílio ao projeto.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Bárbara Lima dos Anjos e Eliana da Costa Alvarenga, por aceitarem como sou e pela ajuda tanto nas horas difíceis quanto fáceis. Sem esquecer-se de nossos almoços e jantares sempre divertidos...

À ONG Pata Amiga, em especial a Angela Milani (proprietária) e Ana (braço direito da Angela), pela amizade e por ser um exemplo de força e dedicação no auxílio aos animais abandonados.

A todos os proprietários pela cooperação e ajuda permitindo que seus cães participassem do projeto.

Ao professor Dr. Paulo César Ciarlini, pela amizade e por me guiar para a vida acadêmica.

Ao Marcos Ituo Okada, além de grande amigo um irmão, por todo apoio e ajuda em parte para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos do laboratório de Hematologia (Divisão de Patologia Clínica – HC) pelas gentilezas, conselhos e ajuda quando necessário.

Aos amigos, Patrícia, Adriana, Thiago, Fernanda (s), Aline e Marcela, conquistados durante esse período.

Ao Prof. Dr. Claudio Lúcio Rossi pelos ensinamentos em Imunologia, pela paciência e por manter a porta de sua sala sempre aberta para mim.

À Regina Coeli, secretária do Departamento, pela ajuda interminável, por mover tantos pauzinhos por mim e pela amizade conquistada.

Aos professores Dr. Rovilson Gilioli, Dra. Paula Virginia Bottini e Dr. Claudio Lúcio Rossi pela paciência e pelas sugestões na minha qualificação.

Ao laboratório da Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela, em especial a sua aluna Thaís Mazzola, pelos auxílios nos protocolos de ELISA, boas risadas e conselhos sempre regados a “cafezinho” e bolo.

Ao laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental pela confiança e por permitir que parte das análises fosse realizada lá.

Ao CEMIB e a colega médica veterinária, Sônia Cano Montebelo Rachel pela disponibilidade e cooperação permitindo o intercâmbio de conhecimentos.

Aos professores Dr. Claudio Lúcio Rossi e Dr. Paulo César Ciarlini pela atenção e leitura cautelosa do meu manuscrito e por integrarem minha banca de defesa.

A todos da minha família que sempre acreditaram em mim. Em especial àqueles que sempre acenderam uma “velhinha” para iluminar meu caminho.

A todos que me acompanharam durante esses dois anos e meio de altos e baixos, sem deixar o bom humor de lado e que um dia, com certeza, essa jornada será tema de um bom livro.

A Gesa Maria, minha gata de estimação e companheira de todas as madrugadas de estudo.

Ao meu irmão e melhor amigo, Juarez, que sempre me acompanhou a distância (de Curitiba) e retornou minhas ligações a cobrar com conselhos e todo apoio que só um irmão pode dar quando necessário.

Aos meus pais, Aline e José Francisco, pelo amor, carinho e compreensão. E, principalmente por acreditarem e continuar acreditando no meu potencial e se sacrificarem para que eu sempre tivesse o melhor. Obrigada! Amo vocês...

*“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas
nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.*

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A leucocitose e a presença de hipertermia são os indicadores primários de inflamação/infecção sistêmica na maioria das espécies animais. Em cães as alterações leucocitárias podem ser evidenciadas em 72 horas, enquanto a elevação sérica das proteínas de fase aguda e a velocidade de hemossedimentação ocorrem mais precocemente sendo úteis na monitorização do processo inflamatório/infeccioso. A interleucina-6 é o principal regulador da resposta inflamatória, ocasionando o aumento da síntese hepática das proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa e o fibrinogênio. A elevação da velocidade de hemossedimentação, por sua vez, é conseqüente ao aumento das proteínas de fase aguda. O diagnóstico da inflamação/infecção em cães é realizado por meio de técnicas manuais, carentes de precisão e padronização na maioria dos laboratórios veterinários. O objetivo desse estudo foi a investigação de parâmetros e métodos laboratoriais, que possam auxiliar no diagnóstico e monitoramento do processo inflamatório/infeccioso em cães. A avaliação e padronização de tais parâmetros poderão contribuir para o esclarecimento diagnóstico com maior precisão e em um menor intervalo de tempo e poderão ser incluídos na rotina laboratorial veterinária.

Materiais e métodos: Foram estudados 117 cães adultos de diferentes raças divididos inicialmente em dois grupos: controle (n=31) e inflamatório/infeccioso (n=86). Posteriormente, os animais doentes foram subdivididos em: inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57). O leucograma foi obtido em contador automatizado e a contagem diferencial de leucócitos realizada em esfregaços de sangue corados com May-Grünwald-Giemsa. Os valores de fibrinogênio e velocidade de hemossedimentação foram determinados por métodos automatizados, a proteína C reativa e a interleucina-6 usando kit de ELISA comercial espécie-específicos.

Resultados: A velocidade de hemossedimentação automatizada foi o melhor marcador do processo inflamatório/infeccioso, seguida da proteína C reativa. Apresentaram positividade em 82,56% e 65,12% dos casos, respectivamente. Os demais marcadores foram positivos em menos de 50% dos animais. Quando os animais doentes foram subdivididos, o grupo

com inflamação apresentou maior frequência de positividade do que o grupo infeccioso. A concentração de hemoglobina e o número de plaquetas foram superiores no grupo controle, enquanto a contagem total de leucócitos, número de basófilos e presença de desvio à esquerda apresentaram valores elevados no grupo de animais doentes. Níveis superiores de velocidade de hemossedimentação, proteína C reativa e interleucina-6 foram observados no grupo com inflamação/infecção quando comparados aos controles. Quando subdivididos, no grupo de animais com processo inflamatório os níveis de fibrinogênio e proteína C reativa foram superiores aos do grupo infeccioso, enquanto os valores de velocidade de hemossedimentação e interleucina-6 foram semelhantes.

Conclusões: A determinação da velocidade de hemossedimentação apresentou a melhor acurácia na detecção do processo inflamatório/infeccioso. Na análise global os níveis de interleucina-6, proteína C reativa e fibrinogênio foram superiores no grupo inflamatório/infeccioso, mas mostraram eficácia limitada na detecção individual de cães doentes. Cães com processo inflamatório mostraram uma resposta mais exacerbada tanto nas determinações sorológicas/plasmáticas como nos parâmetros hematológicos do que os cães com processo predominantemente infeccioso.

ABSTRACT

Introduction: Leukocytosis and hyperthermia are the primary indicators of inflammation/infection in most animal species. White blood cell count changes are evident after 72 hours in dogs, while the increase of serum acute phase proteins levels and erythrocyte sedimentation rate occur earlier. Thus they are considered as useful and precocious markers in identifying and monitoring inflammatory/infection process. Interleukin-6 is the major inflammatory response regulator and increases hepatic synthesis of acute phase proteins such as C-reactive protein and fibrinogen. Erythrocyte sedimentation rate rises as a consequence of acute phase protein stimulus. The investigation of the presence of inflammation/infection process in dogs is performed in most veterinary laboratories by manual techniques, which show poor precision and fail in standardization of procedures. The aim of this study was to evaluate new parameters and laboratory methods, which may help in the identification of the inflammatory/infection process in dogs. The evaluation and standardization of these parameters may contribute to the diagnosis with greater precision and in a shorter period of time and may be included in the routine veterinary laboratories.

Materials and methods: We studied 117 adult dogs of different breeds. They were divided into two groups: normal controls (n = 31) and suspicious of inflammatory / infectious diseases (n = 86). Subsequently, animals were subdivided into animals with inflammatory (n = 29) or infection conditions (n = 57). Hematological parameters were obtained using an automated counter and differential count was performed by microscopic observation in blood smears stained with Giemsa-May-Grünwald. Fibrinogen concentration and erythrocyte sedimentation rate were determined by automated methods and plasma C-reactive protein and interleukin-6 were measured by commercial ELISA kits.

Results: Erythrocyte sedimentation rate was the most sensitive marker of the inflammatory/infection process, showing significant increase in 82,56% of the cases, followed by C-reactive protein measurement (65,12%). The other markers were positive in less than 50% of the animals. When the animals were subdivided according to inflammatory or infection condition the group with inflammation showed higher frequency

of positivity than the infectious group. The concentration of hemoglobin and the number of platelet were higher in the control group, while white blood count, number of basophils and presence of left shift showed high values in the group of sick animals. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein and interleukin-6 levels were higher in the group with inflammation/infection when compared to controls. Animals with inflammatory process showed fibrinogen and C-reactive protein levels higher than those with infection, while erythrocyte sedimentation rate and interleukin-6 levels were similar.

Conclusions: Results of this study indicate that erythrocyte sedimentation rate showed the best accuracy in identifying inflammatory/infectious process. Interleukin-6, C-reactive protein and fibrinogen levels were higher in inflammatory/infectious group, but showed limited efficacy in detection of individual sick animals. Dogs with inflammatory process demonstrate a more remarkable response in both serum/plasma determinations and hematological parameters when compared with dogs presenting predominantly infectious process.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Velocidade de hemossedimentação (mm) antecipada para o sangue canino em mm para valores de hematócrito (%) de 9 a 50 (Feldman, 2000).

Tabela 2- Precisão do método de precipitação pelo calor e método automatizado para determinação do Fib plasmático canino em amostras com diferentes concentrações de Fib (n=3).

Tabela 3- Valores de mediana (mínimo e máximo) de Fib plasmático de cães com e sem inflamação/infecção e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizado e manual (precipitação pelo calor) (n=117).

Tabela 4- Precisão do método automatizado para determinação da VHS de cães em amostras com diferentes valores de VHS (n=3).

Tabela 5- Valores de mediana (mínimo e máximo) de VHS de cães com e sem inflamação/infecção e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizado e manual (Wintrobe) (n=117).

Tabela 6- Valores de mediana (mínimo e máximo) da concentração de HGB, número de leucócitos totais e PLT de cães sadios e doentes e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizados (n=117).

Tabela 7- Valores de mediana (mínimo e máximo) da contagem diferencial de leucócitos de cães com e sem inflamação/infecção determinados pelos três métodos automatizados e método manual (n=117).

Tabela 8- Resultados das análises de concordância entre os métodos manuais e automatizados na contagem diferencial de leucócitos (n=117).

Tabela 9- Frequência e porcentagem da presença de desvio à esquerda na contagem manual e automatizada de cães sadios e com processo inflamatório/infeccioso.

Tabela 10- Distribuição dos animais estudados de acordo com o sexo.

Tabela 11- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS e PCR) em cães saudáveis (n=31) e portadores de diversas doenças (n=86).

Tabela 12- Frequência da positividade dos marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) no grupo de cães com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Tabela 13- Frequência dos marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) nos grupos inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57).

Tabela 14- Valores de coeficiente de correlação e p-valor entre os marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) (n=117).

Tabela 15- Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros relacionados ao hemograma entre os grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Tabela 16- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros relacionados ao hemograma em fêmeas e machos dos grupos controle e inflamatório.

Tabela 17- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 dos animais entre os grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Tabela 18- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 em fêmeas e machos dos grupos controle e inflamatório/infeccioso.

Tabela 19- Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros relacionados ao hemograma entre os grupos com processo inflamatório (n=29) e com processo infeccioso (n=57).

Tabela 20- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 dos animais entre os grupos controle e grupo com processo inflamatório/infeccioso.

Tabela 21- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros avaliados no grupo de cães com hemoparasitose (n = 12) obtidos em 3 momentos de coleta.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem microscópica de bastonete tóxico canino em sangue periférico corado por May-Grünwald-Giemsa (objetiva de 100X) (Arquivo pessoal).

Figura 2- Imagem microscópica do “rouleaux” em sangue periférico canino, corados por May-Grünwald-Giemsa (objetiva de 100X) (Arquivo pessoal).

Figura 3- Apresentação esquemática do “*box plot*”.

Figura 4- Estabilidade do teste para determinação do Fib realizada em amostras com diferentes concentrações de Fib (n=3) quando obtido pelo método de precipitação de calor (Figura 4.A) e pelo método automatizado (Figura 4.B).

Figura 5- Estabilidade da VHS de cão obtida em amostras com diferentes valores de VHS (n=3) quando determinada pelo método automatizado.

Figura 6- Correlações das contagens de LIN (A) e GRA (B) de cães com e sem inflamação/infecção obtidas no equipamento automatizado Pentra DX e pelo método manual (n=117).

Figura 7- Box plot das determinações do hemograma: HGB (A), PLT (B) e contagem total de leucócitos (C) dos grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Figura 8- Box plot das determinações: Fib (A), VHS (B), PCR (C) e IL-6 (D) dos grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Figura 9- Box plot das determinações do hemograma: HGB (A), PLT (B) e contagem total de leucócitos (C) dos grupos com processo inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57).

Figura 10- Box plot das determinações: Fib (A), PCR (B) e número de bastonetes (C) dos grupos com processo inflamatório e infeccioso.

Figura 11- Valores médios e desvios padrões da temperatura (A), contagem total de leucócitos (B), dosagem de HGB (C), número de PLT (D), concentração de Fib (E) e determinação da VHS (F). Valores de p avaliados em 3 coletas.

LISTA DE ABREVIATURAS

α_1 AG	Glicoproteína α_1 ácida
aa	Aminoácidos
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
BASO	Basófilos
Bast	Bastonetes
BSF-2	Fator 2 estimulador de células B
C1q	Componente C1q do Sistema Complemento
CHCM	Média da concentração de hemoglobina corpuscular
CV	Coefficiente de variação
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (anticoagulante)
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EOS	Eosinófilos
F	Fêmea
Fc γ R	Receptores específicos para porção Fc de imunoglobulinas
Fe	Ferro
Fib	Fibrinogênio
GRA	Granulócitos
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina

Hp	Haptoglobina
ICC	Coefficiente de concordância intraclassas
IC	Intervalo de confiança
IFN	Interferon
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor de Interleucina-6
IL-7	Interleucina-7
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-11	Interleucina-11
IL-12	Interleucina-12
JAKs	Janus cinase
Leuc	Leucócitos
LIN	Linfócitos
MON	Monócitos
NEUT	Neutrófilos
PCR	Proteína C reativa

PCT	Plaquetócrito
PDW	Platelet Distribution Width
PFA _s	Proteínas de fase aguda
PLT	Plaquetas
PGE ₂	Prostaglandina 2
PPT	Proteína plasmática total
PPT:Fib	Relação proteína total plasmática e fibrinogênio
RDW	Red Cell Distribution Width
RFA	Resposta de fase aguda
SAA	Amilóide A sérico
SAP	Amilóide P sérico
SD	Desvio padrão
STATs	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
T	Temperatura
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNF β	Fator de necrose tumoral β
TR-IFMA	Ensaio imunofluorométrico em tempo real
VCM	Volume corpuscular médio
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
VPM	Volume plaquetário médio

SUMÁRIO

	Págs.
RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
1- INTRODUÇÃO	37
1.1- Febre	41
1.2- Resposta de fase aguda	41
1.3- Citocinas e a resposta de fase aguda	43
1.4- Interleucina-6	44
1.5- Velocidade de hemossedimentação	46
1.6- Proteínas de fase aguda	49
1.7- Fibrinogênio	49
1.8- Proteína C-reativa	51
1.9- Resposta de fase aguda na medicina e medicina veterinária	55
2- OBJETIVOS	57
3- MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1- Casuística	63
3.1.1- Animais	63
3.1.2- Critérios de exclusão	63
3.1.3- Critérios clínico-laboratoriais para o diagnóstico do processo inflamatório	63
3.1.4- Tipo de estudo	64

3.2- Métodos	64
3.2.1- Coleta das amostras	64
3.2.2- Análises realizadas	65
3.2.2.1- Hemograma completo	65
3.2.2.2- Fibrinogênio	66
3.2.2.3- VHS	67
3.2.2.4- PCR	69
3.2.2.5- IL-6	70
3.2.3- Validação dos métodos	70
3.2.4- Correlação clínico-laboratorial	71
3.3- Análise Estatística	71
4- RESULTADOS	73
4.1- Validação dos ensaios	75
4.1.1- Precisão e Estabilidade dos métodos para determinação do Fib plasmático	75
4.1.2- Comparação dos métodos de determinação do Fib plasmático	76
4.1.3- Validação do Método automatizado para determinação da VHS	77
4.1.4- Comparação entre os métodos de determinação do VHS	78
4.1.5- Determinação da PCR através do método automatizado	79
4.1.6- Validação do Hemograma	79
4.2- Avaliação dos parâmetros laboratoriais nos grupos controle e inflamatório/infeccioso	84

4.2.1- Frequência dos marcadores da resposta inflamatória nos grupos	87
4.2.2- Correlação entre os marcadores da resposta inflamatória	88
4.2.3- Análise comparativa dos parâmetros entre os grupos controle e com processo inflamatório/infeccioso	89
4.2.4- Análise comparativa dos parâmetros dos animais nos grupos inflamatório e infeccioso	95
4.3- Análise Evolutiva dos animais com hemoparasitose (n = 12)	99
5- DISCUSSÃO	101
6- CONCLUSÕES	113
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	117
8- ANEXOS	133
Anexo 1: Grupo controle (n=31) - Resultados individuais (globais, valores de Fib, VHS, PCR e IL-6) dos cães saudáveis, separados por sexo.	135
Anexo 2: Grupo controle (n=31) - Resultados individuais (contagem diferencial de leucócitos) dos cães saudáveis, separados por sexo.	137
Anexo 3: Grupo com processo inflamatório/infeccioso (n=86) - Resultados individuais (globais, valores de Fib, VHS, PCR e IL-6) dos cães , separados por sexo.	139
Anexo 4: Grupo com processo inflamatório/infeccioso (n = 86) - Resultados individuais (contagem diferencial de leucócitos) dos cães saudáveis.	143
Anexo 5: Carta de aprovação de Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) – IB – UNICAMP	149
Anexo 6: Resumo expandido apresentado no 8º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (CONPAVEPA) realizado de 17 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo – SP.	151

Anexo 7: Resumo apresentado no 20º International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) realizado de 28 de setembro a 02 de outubro de 2008 em Fortaleza - CE. 157

Anexo 8: Artigo submetido a Revista Científica: Veterinary Pathology 161

1- INTRODUÇÃO

A leucocitose e a presença de hipertermia são indicadores primários de inflamação/infecção sistêmica na maioria das espécies animais (Harr, 2004). O número total de leucócitos em cães varia de 6.000 a 17.000/ μ L, sendo mais elevado em filhotes e decresce gradativamente com a idade. O leucograma inflamatório geralmente apresenta contagem total de leucócitos entre 20.000 e 30.000/ μ L, e é caracterizado por neutrofilia com desvio à esquerda (mais do que 300 bastonetes/ μ L ou presença de células da linhagem granulocítica anteriores aos bastonetes), sendo evidente apenas após 72 horas do início do processo (Feldman, 2000) (Figura 1).

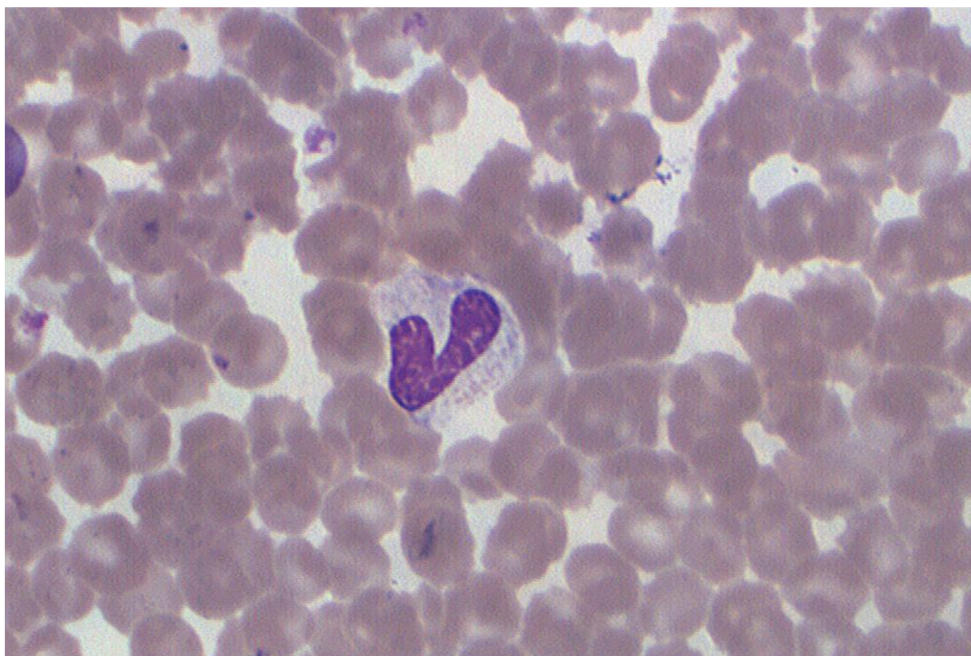


Figura 1- Imagem microscópica de bastonete tóxico canino em sangue periférico corado por May-Grünwald-Giemsa (objetiva de 100X) (Arquivo pessoal).

Na fase inicial o cão portador de processo inflamatório pode apresentar uma leucocitose fisiológica devido à excitação no momento da coleta sangüínea ou ao estresse causado por processo doloroso associada à doença. Nesta fase é possível observar aumento

dos níveis de interleucina-6 (IL-6) e da velocidade de hemossedimentação (VHS), enquanto as alterações do leucograma ainda não são evidentes. A determinação do fibrinogênio (Fib) plasmático possui pouco valor para identificação dos processos inflamatórios em cães, diferentemente do que ocorre nas espécies bovina e eqüina (Hoshiya *et al.*, 2001a; Schutze, 2000). Assim, geralmente os clínicos solicitam apenas o leucograma para investigar a presença de inflamação em cães. O uso de automação permite que o hemograma possa ser realizado em poucos minutos, fornecendo resultados bastante confiáveis. Entretanto, são escassos os dados da literatura referentes à validação e interpretação dos parâmetros fornecidos por sistemas hematológicos automatizados na medicina veterinária (Roleff *et al.*, 2007; Dewhurst *et al.*, 2003; Pastor *et al.*, 1997).

As proteínas de fase aguda (PFAs) são consideradas indicadores mais confiáveis da resposta sistêmica frente aos processos inflamatórios/infecciosos, quando comparadas a outros achados como febre, elevação da VHS e presença de leucocitose associada à neutrofilia (Bonagura e Twedt, 2008). O estímulo para o aumento de síntese dessas proteínas acontece dentro de 6 a 8 horas após a agressão e a concentração máxima ocorre dentro de 2 a 5 dias, sendo tal concentração variável dependendo do metabolismo do animal (Jain, 1993a).

A concentração sangüínea das PFAs é modulada por citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF) (Baumman e Gauldie, 1994; Gabay e Kushner, 1999; Martinez-Subiela *et al.*, 2001). A concentração destas proteínas normalmente é baixa, não sendo detectável em animais sadios. Assim, a elevação dos níveis plasmáticos das PFAs é utilizada no diagnóstico e monitoramento de processos inflamatórios (Kajikawa *et al.*, 1999; Thomas, 2000). Em humanos, aumento dos níveis séricos é proporcional à intensidade da agressão e da subsequente destruição tecidual (Santos *et al.*, 2000).

1.1- Febre

O objetivo da termorregulação é manter a temperatura real do organismo em nível pré-estabelecido (Silbernagl e Lang, 2006). Em cães, a temperatura corpórea normal varia entre 37,5°C e 39,3°C, sendo a hipertermia caracterizada por temperaturas acima de 39,3°C (Dunn, 2001). Na febre, o nível pré-estabelecido encontra-se elevado, portanto os mecanismos termorregulatórios são responsáveis por manter a temperatura elevada (Silbernagl e Lang, 2006).

Dentro do amplo espectro de reações sistêmicas na inflamação, a febre é uma resposta fisiológica em particular associada ao processo agudo (Baumann e Gauldie, 1994). Ela ocorre em resposta à presença de substâncias indutoras de febre, os pirógenos. Os pirógenos exógenos são constituintes de alguns patógenos, como por exemplo, os lipopolissacarídeos presentes em bactérias gram-negativas. Tais patógenos, são fagocitados por macrófagos, os quais liberam citocinas, entre elas os pirógenos endógenos (interleucinas, interferon e fator de necrose tumoral). Acredita-se que tais citocinas alcancem os órgãos circunventriculares do encéfalo podendo causar reação febril nesses órgãos e áreas vizinhas por meio da prostaglandina E₂ (PGE₂) (Silbernagl e Lang, 2006)

1.2- Resposta de fase aguda

O termo resposta de fase aguda (RFA) refere-se a todas as mudanças que ocorrem no organismo num breve espaço de tempo na tentativa de restaurar a homeostase (Martínez-Subiela e Cerón, 2005). Portanto, compreende a resposta bioquímica e fisiológica não específica de animais à maioria das formas de danos teciduais, infecção, inflamação e neoplasia maligna (Pepys e Hirschfield, 2003). Após a injúria tecidual, trauma ou infecção uma séria de reações complexas ocorrem no organismo a fim de prevenir o

aumento do dano, isolar e destruir o possível agente etiológico (Baumann e Gauldie, 1994, *Apud Gruys et al.*, 2005).

Pepys e Baltz (1983) relataram que são vários os estímulos que induzem a RFA, mas todos possuem um denominador comum: a produção de dano ou morte celular ou tecidual. O termo “fase aguda” foi introduzido por Avery e colaboradores para se referir ao soro obtido de pacientes que estavam agudamente doentes com infecções e que tinham proteína C-reativa (PCR) na sua composição (Pepys e Baltz, 1983).

Um processo sequencial é iniciado no local da infecção ou trauma, levando a liberação de mediadores solúveis que mobilizam a resposta metabólica de todo o organismo. Os macrófagos e monócitos são as células comumente associadas com o início desse processo. As células ativadas liberam mediadores, como a IL-1 e TNF que atuam localmente e à distância. Estas substâncias são responsáveis pela liberação secundária das demais citocinas envolvidas na RFA (Baumann e Gauldie, 1994). As citocinas interagem com receptores de várias células alvo resultando em ativação do eixo adrenal-hipófise-hipotálamo, redução de hormônios de crescimento e alterações clínicas caracterizadas por febre, anorexia, balanço negativo de nitrogênio e catabolismo muscular (revisado por Hoshiya *et al.*, 2001a, Streetz, *et al.*, 2001). Além disso, ocorre uma série de mudanças determinadas laboratorialmente, tais como diminuição do número de leucócitos, aumento nos valores do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) e glicocorticóides, ativação dos sistemas complemento e hemostático, diminuição dos níveis séricos de cálcio, zinco, ferro (Fe), vitamina A e α -tocoferol e uma alteração na concentração de várias proteínas plasmáticas, as PFAs, principalmente devido a mudanças no metabolismo hepático (Pepys e Baltz, 1983). Quando os receptores celulares são ativados repetitivamente, a RFA pode tornar-se crônica (*Apud Gruys et al.*, 2005).

1.3- Citocinas e a resposta de fase aguda

As citocinas são proteínas secretadas pelas células do sistema imune. São produzidas em resposta a microorganismos e outros antígenos. Diferentes citocinas estimulam respostas diversas das células envolvidas na imunidade e inflamação (Abbas e Lichtman, 2005).

Pelo menos quinze diferentes mediadores peptídicos de baixo peso molecular são secretados pela ativação de leucócitos (interleucinas) e outras células. São coletivamente chamadas de citocinas e estão envolvidas no desencadeamento da RFA (*Apud Gruys et al.*, 2005).

Existem dois tipos de interferentes na concentração das citocinas: fatores biológicos, que envolvem todas as flutuações causadas por condições naturais, como idade, variação sazonal e diária, e fatores pré-analíticos, tais como coleta e estocagem inadequadas (Kenis *et. al.*, 2002).

Três principais grupos de citocinas podem ser determinados: citocinas que primariamente atuam tanto como fatores de crescimento positivo ou negativo para uma variedade de células (IL-2, IL-3, IL-4, IL-7, IL-10, IL-11, IL-12 e fator de estimulação de colônia granulócito-macrófago); citocinas com propriedades pró-inflamatórias (TNF- α/β , IL-1 α/β , IL-6, Interferon- α/γ (IFN- α/γ), IL-8 e proteína 1 inibidora de macrófago) e fatores com atividade anti-inflamatória (antagonistas do receptor de IL-1, receptores solúveis de IL-1, proteína ligante de TNF- α e proteína ligante de IL-1) (*Apud Gruys et al.*, 2005).

As citocinas pró-inflamatórias são responsáveis pela indução de febre e catabolismo muscular e ativação de precursores de leucócitos na medula óssea, fibroblastos e macrófagos. Tais citocinas são responsáveis por um amplo espectro de efeitos antagonistas e sinérgicos que influenciam a resposta imune específica. TNF- α , IL-1 β e IFN- γ são cruciais para indução de outras citocinas (IL-6 e IL-8) e agentes como o fator de ativação de plaquetas, prostaglandinas, leucotrienos e óxido nítrico (*Apud Gruys et al.*, 2005).

Na RFA hepática, TNF- α , IL-1 e IL-6 ativam os receptores dos hepatócitos iniciando a síntese de PFAs. A IL-6 é o maior mediador da secreção hepática da maioria das PFAs. Além disso, o TNF- α provoca o catabolismo muscular que também é mediado por glicocorticóides, assim como hiperglicemia induzida pelo glucagon e requerimento de aminoácidos pelo fígado. A IL-1 estimula um aumento no influxo de aminoácidos para todo o organismo e ativa o sistema adrenal-hipófise-hipotálamo. Tem sido demonstrado que as células de Kupffer desempenham um importante papel na RFA. IL-6 deprime a produção de IL-1 e TNF- α pelo sistema fagocítico mononuclear, portanto atenua a reação em cascata. A regulação da produção hepática das PFAs é obtida após rápida remoção das citocinas circulantes, liberação de IL-10 pelas células de Kupffer que resulta na supressão da produção local de IL-6. Parte das PFAs hepáticas são suprimidas pela IL-1 e IL-4 e algumas PFAs podem modular a produção de citocinas pelos monócitos (*Apud Gruys et al.*, 2005). Portanto, os níveis séricos de citocinas são um retrato da resposta das PFAs (Sorensen *et. al.*, 2006). Entretanto, por apresentarem uma meia vida curta, não são muito úteis para a maioria dos diagnósticos ao contrário das PFAs (*Apud Gruys et. al.*, 2005).

1.4- Interleucina-6

A principal reguladora da ativação da resposta inflamatória aguda é a IL-6 conhecida como uma citocina pleotrópica, que é liberada na circulação na maioria das situações onde ocorrem alterações na homeostasia como endotoxemia, traumas e inflamações/infecções agudas. Juntamente com outras citocinas, como a TNF, IL-1, IL-8 e interferons, induz a RFA (Streetz *et al.*, 2001). Foi originalmente identificada como fator inespecífico para diferenciação de células B em culturas de células mononucleares e denominada como fator 2 estimulador de células B (BSF-2) (*Apud Naka*, 2002).

A IL-6 tem de peso molecular entre 22 e 28 kDa e na espécie canina é constituída por 187 aminoácidos (aa). Apresenta 67%, 77%, 56%, 68%, 37%, 39% e 58% de sua sequência de aa idêntica a dos eqüinos, felinos, bovinos, suínos, camundongos, ratos e

humanos, respectivamente (Shin *et. al.*, 2001). Várias células expressam receptores para IL-6, entre elas: fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, queratinócitos, células T e B, osteócitos, osteoblastos e mastócitos (Barton, 1997).

Em humanos, sua forma funcional é um homodímero, com cada subunidade formando um domínio globular com quatro α -hélices. O receptor para IL-6 consiste de duas proteínas de membrana: uma proteína de ligação à citocina (IL-6R) e de uma subunidade transdutora de sinal, ambas pertencentes à família dos receptores de citocinas tipo I. A subunidade transdutora de sinal cujo peso molecular é 130 kD é chamada gp130; ela ativa uma via de sinalização enzimática e é também o componente de sinalização de outros receptores de citocina (Abbas e Lichtman, 2005). O IL-6R é composto por um subunidade α de peso molecular 80 kDa, IL-6R α , que após sua ligação com a IL-6 forma um complexo com β subunidades gp130 constituindo o complexo de ativação ligante-receptor. A dimerização das subunidades β é necessária para a ativação do receptor (Moshage, 1997). O complexo IL-6-IL-6R induz a homodimerização do componente para o sinal de transdução (gp130) (Romano *et. al.*, 1997). Assim quando ocorre a associação da IL-6 com o IL-6-R e a gp130, as enzimas denominadas Janus-cinase (JAKs) associadas ao receptor se tornam ativadas; elas também fosforilam resíduos de tirosina nas porções citoplasmáticas dos receptores agrupados. Algumas dessas metades são reconhecidas por domínios SH2 dos fatores de transcrição chamados transdutores de sinal e ativadores da transcrição (STATs), os quais são fosforilados pelas JAKs associadas ao receptor. O domínio SH2 é capaz de se ligar a resíduos fosfotirosina de outra STATs. Como resultado, duas proteínas STATs se ligam uma à outra e se dissociam do receptor. Os dímeros de STATs migram para o núcleo, onde se ligam a sequência de DNA nas regiões promotoras dos genes responsivos às citocinas e ativam a transcrição gênica (Heinrich *et. al.*, 2003, Abbas e Lichtman, 2005).

As funções da IL-6 na inflamação incluem a indução da diferenciação e desenvolvimento de células B, células T, células mielóides, megacariócitos, osteoclastos, células neurais e hepatócitos. Atua ainda como fator de crescimento para células de carcinoma renal, sarcoma Kaposi e promove o crescimento de células tronco-hematopoiéticas (Streetz *et. al.*, 2001).

A IL-6, IL-1 e TNF são liberadas por monócitos ativados e interagem entre si. A IL-1 e TNF induzem a IL-6, enquanto o TNF induz a IL-1, e a IL-6 causa a supressão da produção dessas citocinas pelos macrófagos. As três citocinas são pró-inflamatórias, ocasionando febre e aumento da síntese hepática de PFA. Em humanos a IL-1, TNF e IL-6 estimulam a síntese hepática de PCR, glicoproteína α_1 ácida (α_1 AG), C3, haptoglobina, amilóide A sérica (SAA) e amilóide P sérica (SAP). A IL-6, por sua vez diminui a síntese hepática de albumina (Scott e Oppenheim, 1993). Em cães foi observado que o aumento da atividade da IL-6 e TNF ocorre antes da elevação de PCR e α_1 AG, não tendo sido detectada a elevação na atividade sérica da IL-1 (Yamashita *et al.*, 1994).

1.5- Velocidade de hemossedimentação

Edmund Biernacki (1866-1912), um físico polonês, foi o primeiro a notar um aumento na taxa de sedimentação do sangue em pacientes doentes correlacionando com a presença de Fib. Em 1918, Robin Fahraeus (1888-1968) deu continuidade ao trabalho de Biernacki. Alf Westergren (1881-1968) redefiniu a técnica para determinação da VHS e reportou ser útil na determinação do prognóstico de pacientes com tuberculose. Uma variação metodológica foi publicada por Wintrobe em 1935. Em 1977, O Cômite Internacional de Padronização em Hematologia recomendou a adoção do método de Westergren como método referência para a determinação da VHS (*Apud* Hameed e Waqas, 2006).

A VHS embora um marcador não específico da atividade de diversas doenças, é bastante útil na clínica médica no monitoramento de doenças inflamatórias, infecção, trauma e doenças malignas (Plebani *et al.*, 2002).

Quando uma amostra de sangue coletada com anticoagulante é colocada em um tubo vertical em repouso, os eritrócitos tendem a sedimentar em direção ao fundo do tubo. Os mecanismos físicos-químicos da sedimentação baseiam-se na agregação e conseqüente

formação em “rouleaux” dos eritrócitos. A formação em “rouleaux” (Figura 2) é limitada pela carga negativa dos eritrócitos, que se repelem. O efeito repulsivo dessa carga de superfície é modificado pelas proteínas plasmáticas circulantes (Olshaker e Jerrard, 1997). Assim, a presença de proteínas plasmáticas inflamatórias como Fib (Santos *et al.*, 2000, Hoshiya *et al.*, 2001b), globulinas α , β , e γ , e albumina, aceleram a VHS. Fatores que reduzem a VHS incluem a rigidez e alterações morfológicas dos eritrócitos (Santos *et al.*, 2000). A VHS é um exame acessível, de baixo custo, rápido e pouco invasivo. Tem valor prognóstico, permitindo acompanhar a evolução do quadro e a presença de possível complicação (Lanzara *et al.*, 2001).

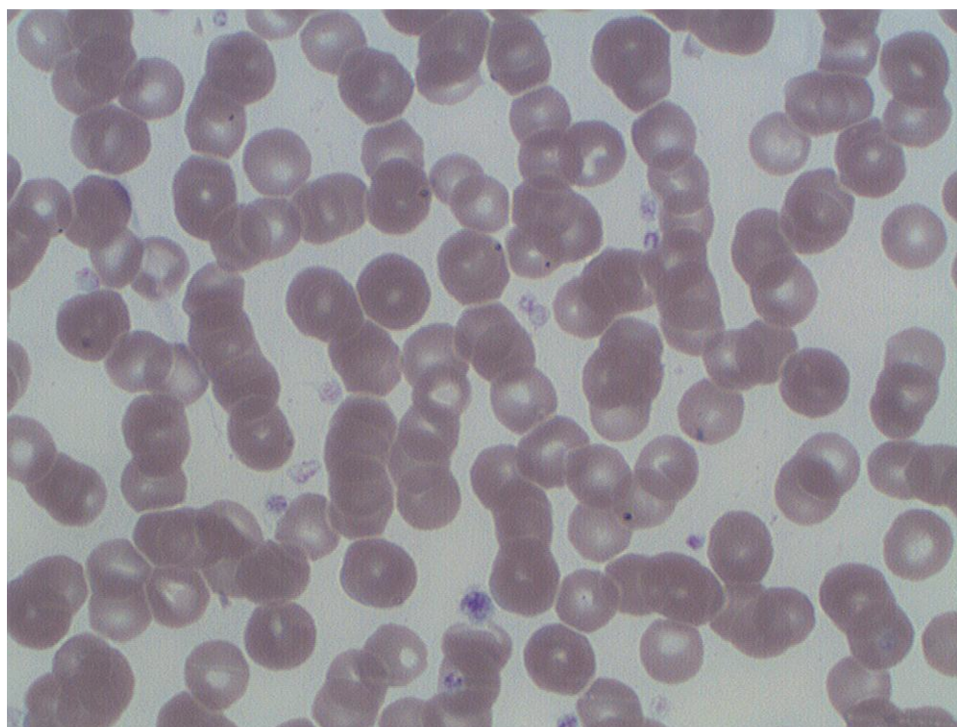


Figura 2- Imagem microscópica do “rouleaux” em sangue periférico canino, corados por May-Grünwald-Giemsa (Objetiva de 100X) (Arquivo pessoal).

No método de Westergren o sangue venoso com anticoagulante é diluído 4:1 com citrato de sódio e colocado na vertical em um tubo com 200 mm de altura e 2,5 mm de diâmetro. No final de uma hora, a leitura obtida corresponde à distância entre o menisco e a

coluna de hemácias, medida em mm. Uma das desvantagens desse método seria o efeito da diluição do sangue com citrato que pode diminuir a concentração de macromoléculas, favorecendo o empilhamento das hemácias. Dessa forma, a VHS estaria falsamente elevada quando da presença de valores reduzidos de hematócrito. Tal técnica não é tão sensível quanto o método de Wintrobe. O segundo método mais utilizado para determinação da VHS é o método de Wintrobe que utiliza um tubo de 100 mm de altura onde o sangue será colocado. Não requer nenhuma diluição e pode ser mais sensível que o método de Westergren em VHS normais e discretamente elevadas (*Apud* Olshaker e Jerrard, 1997).

Vários outros fatores influenciam a VHS, dentre eles a idade, sexo e terapêutica associada (*Apud* Hameed e Waqas, 2006). A concentração do eritrócito e sua morfologia, isto é tamanho, forma, e densidade também podem influenciar a VHS (van Leeuwen e van Rijswijk, 1994).

A VHS é um teste mais utilizado na avaliação clínica de cães. A elevação da VHS em cães está relacionada com processos infecciosos agudos, inflamatórios localizados (pleurites, pericardites e peritonites), traumáticos (cirurgias em geral), neoplásicos, prenhes e nefropatias terminais. Muitos testes foram desenvolvidos, mas na rotina veterinária o método de Wintrobe é o mais freqüentemente utilizado (Jain, 1975a). Nas últimas décadas, várias técnicas semi ou totalmente automatizadas para determinação da VHS foram desenvolvidas e introduzidas na rotina laboratorial. Visando a proteção do operador ao usar sistemas fechados, a otimização do trabalho e recursos humanos, a padronização da determinação da VHS e a utilização da mesma amostra de sangue requisitada para outros exames (Plebani *et al.*, 2002). Atualmente já é possível a determinação do VHS em sistema semi ou totalmente automatizado, que fornece resultados precisos e na metade do tempo da técnica manual (Plebani *et al.*, 1998, Romero *et al.*, 2003).

1.6- Proteínas de fase aguda

Algumas horas após o início da lesão tecidual a síntese hepática das proteínas é drasticamente alterada resultando em aumento de algumas proteínas sanguíneas (PFAs positivas) e diminuição de outras (PFAs negativas). Dentre as PFAs negativas temos a albumina, proteína ligante de retinol, globulina e transferrina. As PFAs positivas são principalmente a PCR, a soro amilóide A (SAA) e a haptoglobina (Hp) que são liberadas pelos hepatócitos após a estimulação pelas citocinas (*Apud Gruys et al.*, 2005).

As PFAs contribuem para a defesa do organismo neutralizando diretamente agentes inflamatórios, minimizando a extensão do dano tecidual, assim como participam no reparo e regeneração teciduais. Induzem, ainda, a um rápido aumento na concentração plasmática de muitos componentes do sistema complemento, estimulam a quimiotaxia de neutrófilos, macrófagos e proteínas plasmáticas para o local da lesão, que participam da morte de agentes infecciosos, da formação de debris celulares e reparo do tecido lesionado. Componentes da hemostasia, tal como o Fib, desempenham papel essencial na cicatrização. O aumento plasmático de proteínas ligantes de metais, como a lactoferrina, previne a perda de ferro durante a infecção ou injúria e também minimiza os níveis de ferro heme disponível para o crescimento da bactéria. A concentração plasmática das PFAs é variável, dependendo da quantidade necessária de que cada proteína durante determinado estímulo para a RFA (Steel e Whitehead, 1994).

1.7- Fibrinogênio

O Fib foi a primeira PFA a ser reconhecida. A sua síntese hepática é estimulada pelo processo inflamatório e a concentração plasmática é proporcional à gravidade do processo, atinge um pico de concentração entre o quinto e o sétimo dias após a inflamação e permanece elevada por vários dias. A concentração sérica do Fib sofre variação dependente

da idade, sexo, presença de exercício ou hemorragia (Schalm, 1970, Jain, 1993b, Harr, 2004).

A principal função do Fib está relacionada com a hemostasia. O Fib é responsável pela formação da fibrina no tecido lesionado sobre o qual ocorrerá o reparo tecidual e pode migrar para o local onde ocorre o dano tecidual para auxiliar no isolamento do agente etiológico responsável por tal dano. Dessa forma, valores elevados de Fib são úteis para indicar a existência de processo inflamatórios/infecciosos, assim como sua gravidade (Schalm *et al.*, 1970).

O valor de normalidade para o Fib plasmático em cães é compreendido entre 1 e 5 g/L (Schalm *et al.*, 1970; Jain, 1975b). Valores superiores podem indicar processo inflamatório desde que seja afastada a presença de hemoconcentração (Sutton e Johnstone, 1977). Dessa forma, recomenda-se o cálculo da relação proteína plasmática total e Fib (PPT:Fib) (Sutton e Hobman, 1975) com o propósito de relacionar o aumento do fibrinogênio com hemoconcentração ou aumento da produção (Schalm, 1970; Schalm *et al.*, 1970; Schalm *et al.*, 1975; Sutton e Hobman, 1975). A relação PPT:Fib menor que 10 indica marcante aumento do fibrinogênio relacionado com processo inflamatório. A relação PPT:Fib maior do que 10 e menor ou igual a 15 é considerada como suspeita de inflamação. Valores PPT-Fib superiores a 15 descartam hiperfibrinogenemia de origem inflamatória (Schalm, 1970; Feldman, 2000).

Várias técnicas são empregadas para quantificar a concentração do Fib plasmático. São freqüentemente empregados os ensaios baseados no tempo em que a amostra leva para coagular após a adição de trombina. Outros métodos como a precipitação pelo calor ou métodos imunológicos baseados em anticorpos monoclonais são usados com menor freqüência em humanos (*Apud Jensen et al.*, 2000).

Na rotina laboratorial veterinária, a concentração de Fib é determinada pelo método de precipitação pelo calor (Kaneko e Smith, 1967; Feldman, 2000), conforme preconizado por Jain (1993b), utilizando-se refratômetro clínico previamente calibrado. Seu uso como

teste de triagem é aceitável, mas para obtenção de resultados mais precisos o Fib deve ser determinado pelo Método de Clauss (Kaneko, 1997).

1.8- Proteína C-reativa

A PCR é uma PFA pertencente à família das proteínas pentraxinas, presente no soro de muitos vertebrados (Parra *et. al.*, 2006a). Foi descoberta por Tillet e Francis em 1930 na circulação de pacientes infectados por *Streptococcus pneumoniae* devido à sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo C pneumocócico (Apud Gruys *et al.*, 2005). É produzida somente pelos hepatócitos em resposta ao estímulo da IL-6 originada no local da doença ou agressão. A síntese da PCR inicia-se rapidamente após o estímulo e a vida média plasmática é curta (cerca de 19 horas). Assim, a determinação da concentração circulante reflete a intensidade do processo patológico que provocou sua produção (Pepys e Hirschfield, 2003).

A PCR tem sido usada no diagnóstico clínico e prognóstico de várias doenças em humanos. Possui a capacidade de se ligar a fosfocolina e assim reconhecer antígenos e células lesadas que tenham fosfolípides na sua constituição (Gabay e Kushner, 1999). Além disso, pode ativar o sistema complemento quando ligada à fração C1q. Também pode se ligar a receptores específicos presentes em células fagocíticas (FcγRI e FcγRII em leucócitos) favorecendo a opsonização e produção de citocinas inflamatórias (Marnell *et al.*, 2005). Estudos *in vitro* sugerem que a PCR ativa neutrófilos, inibe a agregação plaquetária, inicia a degranulação de plaquetas, pode otimizar a atividade das células “*natural killers*” (NK), facilita as reações citotóxicas celulares contra as células infectadas e estimula a atividade anti-tumoral dos monócitos-macrofágos. A PCR possui, ainda, capacidade de ligar-se aos ácidos nucleicos, heparina e proteína básica de mielina sugerindo função direta na limpeza do tecido necrótico do organismo (Apud Jaye e Waites, 1997).

Presente no soro de muitos vertebrados, a PCR tem algumas peculiaridades nas diferentes espécies animais. Foram identificadas reações imunoquímicas cruzadas entre certas espécies de mamíferos, já que análogos da proteína foram encontrados no macaco e coelho e demonstraram ser imunologicamente relacionadas com a PCR humana (Gotschlich e Stetson, 1960). Segundo Maudsley e Pepys (1987), pode ocorrer reação cruzada entre as pentraxinas das diferentes espécies. Poucos relatos sobre a concentração sérica da PCR felina são encontrados, mas sabe-se que diferentemente dos cães a PCR felina sofre pouca elevação durante a RFA (Kajikawa *et. al.*, 1999). Em eqüinos a PCR sérica não apresenta elevação tão evidente como o Fib, que é mais comumente utilizado para o diagnóstico do processo inflamatório nessa espécie (revisado por Hultén *et. al.*, 1999). Nos bovinos a PCR não apresenta características de PFA e costuma aparecer como proteína associada à lactação (revisado por Cheryk *et. al.*, 1996, Lee *et.al.*, 2003). Em cães, a PCR é uma das principais PFAs (Eckersall *et.al.*, 1991) com aumento rápido frente à resposta inflamatória (Parra *et.al.*, 2006a). Na espécie suína, há relatos da medida da concentração da PCR no soro (Parra *et. al.*, 2006b), na saliva (Gutiérrez *et. al.*, 2008a) e macerado de carne (Gutiérrez *et al.*, 2008b) para o diagnóstico e monitoramento de processos inflamatórios/infecciosos.

A existência da PCR canina foi documentada por Caspi e colaboradores em 1984. Tem peso molecular de 100 kD e consiste de 5 subunidades de 20 kD (Cerón *et.al.*, 2005); entretanto, alguns autores relataram que a PCR canina é composta por 2 subunidades de 28 kD e 3 subunidades de 24 kD (Caspi *et. al.*, 1984, Onishi *et. al.*, 1994). Por meio de microscopia eletrônica foi observado que a PCR canina é similar à PCR humana, sendo a principal diferença o fato de 2 das 5 subunidades da PCR canina serem glicosiladas, o que poderia explicar a dificuldade para utilizar anticorpos contra PCR humana para determinação da PCR canina (Cerón *et al.*, 2005). A concentração sérica normal geralmente é menor que 15 µg/mL (Otabe *et al.*, 1998) e aumenta drasticamente em 24 horas após o dano tecidual (Hayashi *et al.*, 2001), podendo atingir valores superiores a 100 vezes o valor normal (Parra *et al*, 2005a). As determinações séricas da PCR têm sido úteis para avaliar a presença de inflamações agudas (Otabe *et al.*, 1998; Hayashi *et al.*, 2001), na detecção do

grau de atividade da enfermidade (Ndung'u *et al.*, 1991; Yamamoto *et al.*, 1993; Otabe *et al.*, 2000) e determinação do prognóstico e monitoramento da doença (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003a). Concentrações séricas elevadas de PCR foram relatadas após trauma cirúrgico (Yamamoto *et al.*, 1993), infecções por *Trypanosoma brucei* (Ndung'u *et al.*, 1991), *Erlichia canis* (Rikihisa *et al.*, 1994) e *Leishmania infantum* (Martínez-Subiela *et al.*, 2002), pneumonia (Yamamoto *et al.*, 1993), neoplasias e enfermidades não associadas com inflamação (diabetes mellitus, falência hepática, falência renal, insuficiência pancreática exócrina) (Tecles *et al.*, 2005). Foi também relatada a elevação dos níveis de PCR em algumas espécies animais submetidos à administração de ACTH, sugerindo a participação do estresse no comportamento da PCR (Thomas, 2000). Segundo Martínez-Subiela e Cerón (2004), a concentração de PCR não é afetada pela administração exógena de glicocorticóides, tais como prednisolona e acetato de metilprednisolona.

Os valores de referência em cães saudáveis são variáveis. Existem relatos em que valores menores que 1 µg/mL devem ser interpretados com cautela, pois podem ser influenciados pelas condições analíticas (Yamamoto *et al.*, 1992, Yamashita *et al.*, 1994, Otabe *et al.*, 1998, Martínez-Subiela *et al.*, 2004). Portanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus valores referenciais. Vários fatores biológicos podem influenciar os valores de PCR canina, tais como idade (Cerón *et al.*, 2005) e prenhez (Kuribayashi *et al.*, 2003, Cerón *et al.*, 2005). Existem relatos na literatura da variação da atividade de PCR nas diferentes idades em cães, isto é animais de menos de 1 mês não sofre elevações nos valores de PCR, enquanto em cães com 3 meses sua produção é menor que um animal adulto (Hayashi *et al.*, 2001). Observa-se variação individual entre os cães que vivem em ambientes restritos e adequadamente higienizados e aqueles de vida livre, possivelmente devido à exposição a fatores ambientais que estimulem o sistema imune (Cerón *et al.*, 2005).

Diversos métodos podem ser utilizados para a determinação de PCR em cães (Eckersall *et al.*, 1991, Yamamoto *et al.*, 1992). Na medicina humana os métodos para determinação de PCR foram inicialmente desenvolvidos baseados na sua habilidade de precipitar a fração C do polissacarídeo. Após sua caracterização bioquímica em 1978 e a

descrição de anticorpos monoclonais específicos, vários métodos imunológicos quantitativos foram disponibilizados (*Apud* Jaye e Waites, 1997). Assim como na medicina humana, a PCR canina foi inicialmente isolada utilizando sua capacidade de se ligar ao polissacarídeo C pneumocócico (*Apud* Fujise *et al.*, 1992). A PCR canina pode ser estimada por: eletroimunoensaio (Caspi *et al.*, 1987), imunodifusão (Conner *et al.*, 1988), ensaio imunoenzimático (ELISA) (Yamamoto *et al.*, 1993, Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003a), ensaio imunoturbidométrico (Eckersall *et al.*, 1991, Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003b, Parra *et al.*, 2005a), aglutinação do látex por capilaridade reversa passiva (Tagata *et al.*, 1996), ensaio rápido semi-quantitativo baseado em imunocromatografia (McGrotty *et al.*, 2004) e ensaio imunofluorométrico em tempo real (TR-IFMA) (Parra *et al.*, 2006a).

Não há dados suficientes sobre a sensibilidade dos kits comerciais disponíveis. Embora anticorpos espécie-específicos sejam recomendados, ensaios que utilizam anticorpos anti-PCR de diferentes espécies (principalmente humano) têm sido descritos como sendo uma alternativa possível, principalmente por apresentarem menor custo. Entretanto, tais ensaios devem ser validados e padronizados (Cerón *et al.*, 2005).

Em humanos, foi descrita a determinação da PCR por método automatizado, acoplado ao contador de células sangüíneas, utilizando a mesma amostra de sangue colhida para a realização do hemograma. Além de apresentar baixo custo o resultado é obtido em poucos minutos, o que é especialmente interessante em situações emergenciais (Grotto *et al.*, 2002).

A validação do PCR automatizado proporcionaria o diagnóstico precoce e monitoramento de processos inflamatórios agudos em cães. Além disso, ele utiliza pequena quantidade de amostra para análise, ponto favorável frente à dificuldade de coleta em muitos animais que não permitem adequada contenção.

1.9- Resposta de fase aguda na medicina e medicina veterinária

Na medicina humana, as PFAs possuem extremo valor como marcadores de enfermidades (*Apud Parra et. al.*, 2005b) e sua determinação é padronizada e usada rotineiramente (Tecles *et. al.*, 2007a), mas seu uso na medicina veterinária ainda é limitado devido a pouca disponibilidade de testes comerciais, material para controle de qualidade e conhecimento para interpretação dos dados (Eckersall, 2004, *Apud Parra et. al.*, 2005b). O desenvolvimento de métodos padronizados para uma rápida e fácil determinação das PFAs em animais poderá permitir amplo uso dessas determinações na prática clínica. Os métodos humanos podem ser convenientemente modificados para o uso na prática veterinária, mas especialmente no caso de ensaios imunológicos, esses métodos devem ser validados para cada nova espécie (Tecles *et. al.*, 2007a). A validação de métodos analíticos é um passo essencial para o estabelecimento de um novo protocolo num laboratório ou para uso numa determinada espécie animal. Estudos de validação podem assegurar que tais métodos sejam capazes de detectar os valores correspondentes sendo úteis para a identificação de animais doentes e saudáveis (Tecles *et. al.*, 2007b).

A despeito das dificuldades, muitos avanços no monitoramento da resposta das PFAs em animais com propósitos clínicos e experimentais ocorreram nas duas últimas décadas, como por exemplo, o estabelecimento de ensaios para as PFAs, assim como as diferenças entre as espécies. Há também crescente interesse na elucidação dos mecanismos das PFAs e padronização dos ensaios (*Apud Murata et. al.*, 2004).

2- OBJETIVOS

2.1- Gerais: Sabe-se que em cães as alterações ao leucograma podem ser evidenciadas em 72 horas, enquanto a elevação sérica das proteínas de fase aguda e a velocidade de hemossedimentação ocorrem anteriormente. Dessa forma, o estudo pretendia avaliar alguns marcadores da resposta inflamatória em cães, comparando diferentes técnicas laboratoriais, com o objetivo de propor um protocolo laboratorial que possa ser implantado na rotina clínica veterinária que represente uma melhoria na qualidade e na rapidez no diagnóstico de processos inflamatórios/infecciosos.

2.2- Específicos:

- Comparar a sensibilidade, especificidade e precisão de diversos marcadores (temperatura, leucograma, VHS, Fib e PCR) do processo inflamatório/infeccioso rotineiramente utilizados na clínica de cães.
- Validar as técnicas (Hemograma, VHS, Fib e PCR) e equipamentos (AbcVet, Micros CRP 200, Pentra DX 120, MicroTest 1X, AMAX Destiny Plus Amilung) automatizados disponíveis no mercado.
- Comparar os valores leucocitários de cães obtidos por automação e microscopia.
- Determinar as alterações leucocitárias indicativas de processo inflamatório/infeccioso.
- Comparar os valores de Fib de cães obtidos pelos métodos de precipitação pelo calor e o método de Clauss quanto à sensibilidade. Dependendo do resultado observado poderá ser utilizado também na investigação de alterações na hemostasia em cães.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Casuística

3.1.1- Animais: Foram estudados 117 cães adultos de ambos os sexos e diferentes raças atendidos em clínicas e laboratórios veterinários particulares da cidade de Campinas e Valinhos. Todos os cães foram submetidos à adequada anamnese e exame físico prévio composto da observação da coloração das mucosas, medidas das frequências cardíaca e respiratória, auscultação cardio-pulmonar, palpação abdominal e medida da temperatura retal. Todo experimento foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética na Experimentação Animal da Universidade (CEEAA/IB - UNICAMP) (Anexo 5).

3.1.2- Critérios de exclusão: Foram excluídos filhotes (animais com idade inferior a 1 ano), gestantes, animais que receberam medicações prévias num período de 7 dias, principalmente aqueles que receberam corticosteróides e/ou antibióticos e animais que não tinham realizado o jejum prévio necessário para a coleta do sangue.

Os animais foram agrupados em:

- Grupo controle (sem inflamação): n = 31 animais. Animais sem histórico de doença prévia e sem alterações clínico-laboratoriais, trazidos para vacinação ou cirurgias eletivas.
- Grupo de animais com hipótese diagnóstica de inflamação/infecção: n = 86 animais

3.1.3- Critérios clínico-laboratoriais para o diagnóstico do processo inflamatório:

- a. Presença de hipertermia (temperatura corpórea $> 39,3^{\circ}\text{C}$) (Dunn, 2001) e/ou
- b. Presença de desvio à esquerda no leucograma: contagem de bastonetes superior a $300/\mu\text{L}$; presença de metamielócitos e/ou mielócitos, com ou sem leucocitose (Jain, 1975b, Schultze, 2000) e/ou

- c. Hiperfibrinogenemia (Fib maior que 500 mg/dl) com relação PPT:F (PPT – F/F) menor que 10 (Schalm, 1970, Schalm *et al*, 1970, Jain, 1975a) e/ou
- d. VHS > 10 mm (Jain, 1975b) e/ou
- e. PCR > 15 µg/mL (Otabe *et al.*, 1998).

3.1.4- Tipo de estudo: Prospectivo.

3.2- Métodos

3.2.1- Coleta das amostras

Os cães foram submetidos à punção venosa usando seringas plásticas e agulhas descartáveis. Foram colhidos 20 ml de sangue, distribuídos em três tubos: um tubo com EDTA K₂ 8% (para realização do hemograma, determinações da VHS, do Fib pelo método manual e PCR), um tubo com citrato de sódio 3,8% (para avaliação do Fib pelo método automatizado) e um com gel ativador de coágulo (para avaliação da PCR e IL-6 pelo método de ELISA). O hemograma, a determinação do Fib e a VHS foram processados no dia da coleta e refrigerados (4°C) até a análise. Os esfregaços sangüíneos foram realizados em até duas horas após a coleta. O soro foi preparado por centrifugação (1.500g/5 minutos) após a obtenção da amostra de sangue e estocado a -80°C para posterior análise (tempo máximo de estocagem foram 6 meses).

3.2.2- Análises realizadas

3.2.2.1- Hemograma completo:

a. Contador automático para uso veterinário AbcVet (Medical Horiba, Japão). Foram obtidos os valores de leucócitos, hemácias e plaquetas por impedância, hemoglobina determinada por método colorimétrico (cianometahemoglobina), hematócrito (Hct), volume corpuscular médio (VCM) e a média da concentração de hemoglobina corpuscular (CHCM) utilizando-se um cartão espécie-específico. A contagem diferencial de leucócitos quantificou os valores de monócitos, linfócitos e granulócitos.

b. Contador automatizado Micros CRP 200 (Medical Horiba, Japão): programado para medições em sangue humano, obteve-se os valores de leucócitos, hemácias e plaquetas por impedância, hemoglobina determinada por método colorimétrico (cianometahemoglobina), além do Hct, o VCM e a CHCM. O diferencial de leucócitos quantificou monócitos, linfócitos e granulócitos. O equipamento não permite ajuste para sangue canino, portanto foi utilizado a mesma programação para sangue humano.

c. Contador automatizado Pentra DX 120 (Medical Horiba, Japão): programado originalmente para medições em sangue humano. Foi obtido os valores de leucócitos, hemácias e plaquetas por impedância, hemoglobina determinada pelo método colorimétrico (cianometahemoglobina), o Hct, o VCM, a CHCM entre outros índices hematimétricos (RDW, PCT, VPM, PDW). O diferencial de leucócitos é realizado em cinco partes: monócitos, linfócitos, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos. O aparelho libera alarmes (*flags*) indicativos da presença de desvio à esquerda entre outros. O contador foi

ajustado para a espécie canina pelo ajuste do “*threshold*”, segundo análise microscópica de sangue canino normal.

Todos os hemogramas foram realizados em duplicata. A calibração e manutenção dos equipamentos foram realizadas segundo as recomendações do fabricante. O uso de controle (Difftrol, Retic e Minotrol, Medical Horiba, Japão) comercial era feito diariamente antes da realização de qualquer análise experimental.

d. Contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sangüíneo corado com May-Grünwald-Giemsa (2 lâminas/animal; 200 células observadas pelo mesmo microscopista).

3.2.2.2- Fibrinogênio:

Método de precipitação pelo calor (Kaneko e Smith, 1967): O método é baseado na característica de desnaturação do Fib pelo calor. Dois tubos de micro-hematócrito foram preenchidos com sangue até $\frac{3}{4}$ de sua capacidade e centrifugados (13.500g durante 5 minutos). Com um refratômetro portátil (RTP-12, Instrutherm, São Paulo) efetuou-se a leitura do plasma de um dos tubos, o que corresponde a PPT. Outro tubo foi colocado em banho-maria a 56°C durante 3 minutos. O tubo foi novamente centrifugado, separando o Fib precipitado do plasma. Realizou-se a leitura do segundo tubo e a partir da diferença entre as leituras obteve-se a concentração de Fib (Feldman, 2000).

Método de Clauss: O teste é baseado no tempo em que a amostra leva para coagular após a adição de trombina, o qual é proporcional à concentração de Fib (Laffan e Manning, 2001).

A determinação do Fib foi realizada pelo método de Clauss automatizado (AMAX Destiny Plus, Trinity Biotech, Irlanda) usando kit comercial (AMAX Trinity Biotech, Irlanda). Resumidamente, o plasma foi inicialmente diluído (1:10 em tampão imidazol) a fim de diminuir os níveis de inibidores da reação, entre eles os fatores de degradação do fibrinogênio. O reativo de trombina foi reconstituído e mantido a temperatura ambiente durante a análise. Foram adicionados 200 µL do plasma já diluído na cubeta do equipamento, seguido de um período de incubação de 1 a 3 minutos a 37°C. Então, 100 µL de solução rica em trombina (75 U NIH/mL) foram acrescentados e aguardou-se o tempo de formação do coágulo. Os resultados foram obtidos de acordo com a curva de calibração do equipamento, onde o eixo x corresponde ao valor de Fib em mg/dL. As análises foram realizadas em duplicata. A calibração e manutenção dos equipamentos foram realizadas segundo as recomendações do fabricante. O uso de controle (AMAX Acculot™ Control, Trinity Biotech, Irlanda) comercial era feito diariamente antes da realização de qualquer análise experimental.

3.2.2.3- VHS:

Método de Wintrobe: Foi preenchido um tubo de Wintrobe (macro-hematócrito) com sangue até a marca zero, que foi colocado em posição vertical à temperatura ambiente e observado após uma hora. A VHS foi obtido calculando-se o volume ocupado pelo plasma (em mm) após uma hora. Como o Hct é bastante variável entre os cães saudáveis e pode ser afetado pelo grau de hidratação do animal, é importante comparar a VHS adquirida com a VHS antecipada correspondente ao Hct da amostra, devendo-se observar a tabela padrão preconizada por Feldman (2000) (Tabela 1).

Tabela 1- Velocidade de hemossedimentação (mm) antecipada para o sangue canino em mm para valores de hematócrito (%) de 9 a 50 (Feldman, 2000).

HCT	VHS	HCT	VHS	HCT	VHS
%	mm	%	mm	%	mm
9	82	23	40	37	13
10	79	24	38	38	12
11	76	25	36	39	11
12	73	26	34	40	10
13	70	27	32	41	9
14	67	28	30	42	8
15	64	29	28	43	7
16	61	30	26	44	6
17	58	31	24	45	5
18	55	32	22	46	4
19	52	33	20	47	3
20	49	34	18	48	2
21	46	35	16	49	1
22	43	36	14	50	0

Método automatizado (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Itália): O método para leitura baseiou-se em fotometria e capilaridade interrompida por análise da cinética sendo uma modificação do método de Westergren (De Jonge *et. al.*, 2000).

3.2.2.4- PCR:

Imunoturbidimetria: A reação de imunoturbidimetria para pesquisa de PCR foi realizada em equipamento automatizado Micros CRP 200 (Horiba ABX Diagnostics, Montpellier, França). O ensaio compreende três fases: na primeira realizou-se a lise das hemácias pela adição do reagente R1 (saponina), na segunda a inibição dos possíveis interferentes com a adição do reagente R2 (tampão) e na terceira, com a adição do reagente R3, que contém partículas de látex revestidas com anticorpos policlonais anti-PCR humana, ocorreu a formação de complexos antígeno-anticorpo. A concentração da PCR foi determinada pela absorbância em comprimento de onda 850 nm após a reação de aglutinação. Essa reação pode ser feita com o mesmo material utilizado para a realização do hemograma, sendo o resultado fornecido em 4 minutos.

ELISA: A reação ELISA para determinação da concentração de PCR foi realizada utilizando kits da marca BD Biosciences (San Diego, Estados Unidos). Resumidamente, para a realização da curva padrão, o primeiro ponto foi determinado a partir de 50 µL de padrão estoque e 250 µL de wash buffer (WB), os demais pontos foram diluições seriadas de 250 µL da solução obtidas e 250 µL de WB num total de 7 pontos. Às cavidades de placas de ELISA revestidas com anti-PCR canina, foram adicionados 100 µL dos padrões (1,3 - 400 µg/mL) e soros em diluições apropriadas. Após incubação (30 minutos a temperatura ambiente) e lavagem (4 vezes com WB) das cavidades da placa, 100 µL do conjugado (corresponde a 100 µL do anticorpo conjugado a 100X e 9900 µL de WB - anti-PCR canina marcada com peroxidase) foram acrescentados a cada cavidade. Após novo período de incubação (30 minutos a temperatura ambiente) seguido de lavagem (4 vezes com WB), foram adicionados 100 µL da solução do substrato (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio). Após incubação por 10 minutos, no escuro, as reações foram bloqueadas com 100 µL de solução ácido fosfórico e as absorbâncias lidas em leitora de ELISA

Multiskan MS (Labsystems, Helsinki, Finlândia) a 450 nm. Níveis de PCR superiores a 15 µg/mL foram considerados significativos. As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.2.5- IL-6

ELISA: A reação ELISA para determinação da concentração de IL-6 foi realizada utilizando kits Quantikine da marca R & D Systems (Minneapolis, Estados Unidos). A curva padrão foi realizada segundo informações do fabricante. Resumidamente, às cavidades da placa de ELISA revestidas com anti-IL-6 canina, foram adicionados inicialmente 50 µL de diluente comercial (Assay Diluent RD1-75) e 100 µL dos padrões (31,3 - 2000 pg/mL) e soros em diluições apropriadas. Após incubação (2 horas a temperatura ambiente e em agitação “*shaker*” a 86 rpm) e lavagem (5 vezes com WB) das cavidades da placa, 200 µL do conjugado (anti-IL-6 canina marcada com peroxidase) foram acrescentados a cada cavidade. Após novo período de incubação (2 horas a temperatura ambiente e em agitação “*shaker*” a 86 rpm) seguido de lavagem (5 vezes com WB), foram adicionados 120 µL da solução do substrato (tetrametilbenzidina/peróxido de hidrogênio). Após incubação por 30 minutos, no escuro sem agitação, as reações foram bloqueadas com 120 µL de solução ácido clorídrico e as absorbâncias lidas em leitora de ELISA Multiskan MS (Labsystems, Helsinki, Finlândia) a 450 nm. Níveis de IL-6 superiores a 47,08 pg/mL foram considerados significativos. As análises foram realizadas em duplicata.

3.2.3- Validação dos métodos:

Foram realizados os seguintes testes em duplicata para avaliar o desempenho dos métodos para determinação do Fib manual e automatizado e VHS automatizada: precisão inter-banho (3 amostras, 7 a 10 repetições), precisão intra-banho (3 amostras, 7 a 10

repetições), estabilidade no tempo (0, 2, 4, 8, 12 e 48 horas a 4°C) e concordância entre métodos. Foram ainda verificadas as concordância entre os desempenhos dos três sistemas hematológicos automatizados e a contagem diferencial de leucócitos realizada por automação e pela observação microscópica.

3.2.4- Correlação clínico-laboratorial:

Após a validação dos diversos métodos foram selecionados aqueles com melhor desempenho técnico, que foram posteriormente testadas nos grupos controle e doente para determinar quais parâmetros seriam mais eficientes no reconhecimento da presença do processo inflamatório agudo. Foi testado também o desempenho dos mesmos testes quando os cães doentes foram subdivididos em grupo predominantemente inflamatório ou infeccioso. Esse diagnóstico foi presumido a partir dos dados clínicos dos animais. Algumas limitações foram notadas, uma delas diz respeito ao diagnóstico presumido dos cães que foi baseado somente nos dados clínicos e laboratoriais o que pode ter levado a possíveis equívocos na classificação dos mesmos. Além disso, um grupo de animais que apresentou suspeita clínica de hemoparasitose foi acompanhado clínica e laboratorialmente durante dois meses, com retornos a cada três semanas, a fim de determinar a evolução do provável processo inflamatório/infeccioso.

3.3- Análise Estatística:

A estatística descritiva compreendeu média, desvio-padrão, valores mínimo, mediana e máximo. A apresentação gráfica foi realizada por meio de “*box-plot*” do tipo esquemático onde foram apresentados os valores descritos na figura abaixo.

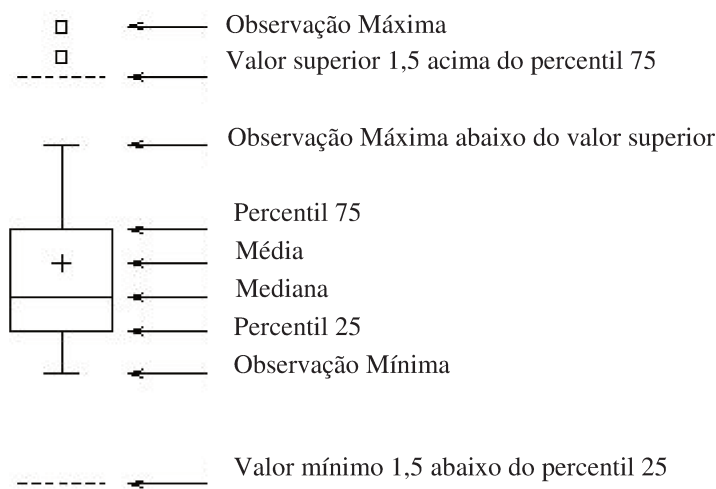


Figura 3- Apresentação esquemática do “*box plot*”.

A comparação dos resultados obtidos pelas diferentes metodologias, assim como a comparação entre os grupos controle e de estudo foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. O coeficiente de correlação intraclass (ICC) foi utilizado para verificar a concordância entre resultados obtidos por duas técnicas diferentes. Já a correlação entre dois diferentes marcadores inflamatórios foi determinada pelo coeficiente de Spearman. A comparação de proporções foi realizada pelo teste Qui-quadrado. Foi analisada a sensibilidade, especificidade e acurácia dos parâmetros no reconhecimento da presença de inflamação. A análise da evolução nos cães com suspeita de hemoparasitose: foi realizada pela ANOVA para medidas repetidas seguida pelo teste de perfil de contrastes, quando necessário. A transformação por postos foi aplicada devido à ausência de distribuição Normal. O nível de significância adotado para os testes foi de 5% ou $p \leq 0,05$. Os programas computacionais utilizados foram: SAS System for Windows (Statistical Analysis System) versão 9.1.3 Service Pack 3. SAS Institute INC, 2002-2003, Cary, NC, USA e SPSS for Windows, versão 10.0 SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, Illinois, USA. Todas as análises estatísticas foram realizadas pela comissão de pesquisa - Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4- RESULTADOS

4.1- Validação dos ensaios

4.1.1- Precisão e Estabilidade dos métodos para determinação do Fib plasmático

Três amostras de sangue foram quantificadas sucessivamente por sete vezes (intra-ensaio) e outras três amostras de forma intercalada com outras amostras (inter-ensaio) e os CV foram calculados (tabela 2). O método automatizado mostrou ser mais preciso do que o método de precipitação pelo calor, que apresentou CVs inaceitáveis para um ensaio laboratorial.

Tabela 2- Precisão do método de precipitação pelo calor e método automatizado para determinação do Fib plasmático canino em amostras com diferentes concentrações de Fib (n=3).

		Método de Precipitação pelo calor			Método Automatizado		
	Número de repetições	Média (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)	Média (mg/dl)	SD (mg/dl)	CV (%)
Intra-ensaio	7	400,00	276,89	64,09	161,43	5,41	3,35
	7	400,00	69,01	16,56	230,71	8,94	3,87
	7	266,67	78,08	28,33	442,71	6,05	1,37
Inter-ensaio	7	357,14	127,24	35,63	208,00	6,98	3,35
	7	371,43	170,43	45,89	332,43	5,26	1,58
	7	571,43	221,47	38,76	421,00	9,24	2,19

SD desvio padrão, CV coeficiente de variação.

Para determinação da estabilidade no tempo, três amostras com valores diferenciados foram analisadas com 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a coleta, sendo mantidas refrigeradas (4°C). Os CV observados foram de 37,16% e 68,31% (Figura 4.A) para o método de precipitação pelo calor e entre 6,28% e 19,24% (Figura 4.B) para o método automatizado, que novamente mostrou um desempenho mais favorável do que o outro teste.

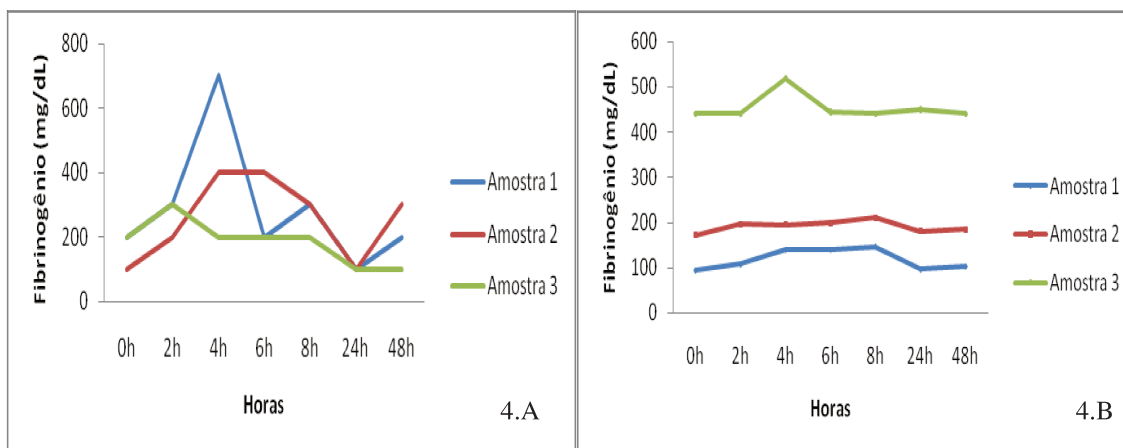


Figura 4- Estabilidade do teste para determinação do Fib canino realizada em amostras com diferentes concentrações de Fib (n=3) quando obtido pelo método de precipitação de calor (Figura 4.A) e pelo método automatizado (Figura 4.B).

4.1.2- Comparação dos métodos de determinação do Fib plasmático

Cento e dezessete amostras de sangue foram processadas e foi observada uma fraca concordância (ICC=0,475) entre os métodos de precipitação por calor e método de Clauss (Tabela 3).

Tabela 3- Valores de mediana (mínimo e máximo) de Fib plasmático de cães com e sem inflamação/infecção e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizado e manual (precipitação pelo calor) (n=117).

Métodos	Fib (g/dL)	ICC*	IC 95%
Automatizado	237,00 (75,00-826,00)	0,475	(31,20-60,90)
Manual	300,00 (100,00-1000,00)		

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.

ICC coeficiente de correlação intraclass, IC intervalo de confiança.

4.1.3- Validação do Método automatizado para determinação da VHS

Três amostras de sangue foram quantificadas sucessivamente por sete vezes (intra-ensaio) e outras três amostras de forma intercalada com outras amostras (inter-ensaio) e os CV foram calculados (tabela 4). A repetição do inter-ensaio com média 9,14 apresentou um resultado que colocaria a amostra como patológica, isto é VHS maior que 10 mm. Ou seja, esse nível de CV comprometeria o diagnóstico do animal classificando-o erroneamente como sadio ou saudável.

Tabela 4- Precisão do método automatizado para determinação da VHS de cães em amostras com diferentes valores de VHS (n=3).

	Número de repetições	Média (mm)	SD (mm)	CV (%)
Intra-ensaio	7	8,57	0,98	11,39
	7	72,71	4,39	6,03
	7	58,14	3,34	5,74
Inter-ensaio	7	9,14	1,57	17,21
	7	73,14	6,62	9,05
	7	61,71	5,47	8,86

SD desvio padrão, CV coeficiente de variação.

Para determinação da estabilidade no tempo três amostras com valores diferenciados foram analisadas com 0, 2, 4, 6, 8, 24 e 48 horas após a coleta sendo mantidas refrigeradas (4°C) e demonstraram CV entre 17,89% e 36,29% (Figura 5).

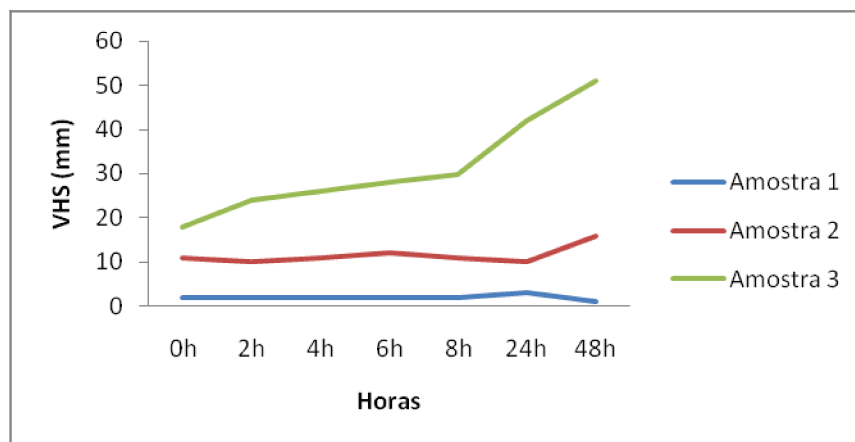


Figura 5- Estabilidade da VHS de cão obtida em amostras com diferentes valores de VHS (n=3) quando determinada pelo método automatizado.

A validação do método de Wintrobe não foi realizada devido à necessidade de maior quantidade amostra para realização de tais procedimentos.

4.1.4- Comparação entre os métodos de determinação do VHS

Cento e dezessete amostras de sangue foram processadas e foi observada uma fraca concordância (ICC=0,462) entre os métodos de Wintrobe e automatizado (Tabela 5).

Tabela 5- Valores de mediana (mínimo e máximo) de VHS de cães com e sem inflamação/infecção e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizado e manual (Wintrobe) (n=117).

Métodos	VHS (mm)	ICC*	IC 95%
Automatizado	25,00 (2,00-120,00)	0,462	(12,20-66,90)
Manual	14,00 (0,00-45,00)		

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.

VHS velocidade de hemossedimentação, ICC coeficiente de correlação intraclasses, IC intervalo de confiança.

4.1.5- Determinação da PCR pelo método automatizado

A determinação dos valores de PCR obtidos pelo equipamento hematológico automatizado Micros CRP 200 mostrou ser inadequada para amostras de sangue canino. Não houve leitura em nenhuma das amostras testadas, independentemente de serem provenientes de cães saudáveis ou doentes.

4.1.6- Validação do Hemograma

Contagem Global

Cento e dezessete amostras de sangue foram processadas em três diferentes equipamentos e foi observada uma forte concordância entre os métodos automatizados no que diz respeito às contagens globais do hemograma (Tabela 6).

Tabela 6- Valores de mediana (mínimo e máximo) da concentração de HGB, número de leucócitos totais e PLT de cães saudáveis e doentes e resultados das análises de concordância entre os métodos automatizados (n=117).

Métodos	AbcVet	Micros CRP 200	Pentra DX 120
HGB	13,75	12,50	13,70
(g/dL)	(7,00-19,40)	(6,40-18,20)	(6,80-18,40)
ICC*		0,892	
IC 95%		(69,4-94,9)	
PLT	210,0	194,0	208,5
(10 ³ /μL)	(18,5-900,0)	(6,5-934,0)	(1,5-995,0)
ICC*		0,962	
IC 95%		(94,3-97,4)	
Leucócitos	12,20	11,90	10,90
(10 ³ /μL)	(1,80-24,60)	(1,70-23,90)	(1,40-23,40)
ICC*		0,933	
IC 95%		(78,8-97,0)	

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.

HGB hemoglobina, PLT plaquetas, ICC coeficiente de correlação intraclass, IC intervalo de confiança.

Contagem diferencial de leucócitos

Cento e dezessete amostras de sangue foram submetidas à contagem diferencial leucocitária automatizadas e manual. Na tabela 7 encontram-se os valores das contagens dos métodos manuais (2 lâminas por animal/contadas 200 células pelo mesmo observador) e automatizados (AbcVet, Micros CRP 200 e Pentra DX 120). O diferencial de leucócitos realizado pela automação (ABCVet e Micros CRP 2000) classificou as células em 3 tipos: monócitos, linfócitos e granulócitos (compreende os bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos). O outro método automatizado (Pentra DX 120) e a contagem manual realizam o diferencial em 5 classes: monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

Tabela 7- Valores de mediana (mínimo e máximo) da contagem diferencial de leucócitos de cães com e sem inflamação/infecção determinados pelos três métodos automatizados e método manual (n=117).

Métodos	AbcVet	Micros CRP 200	Pentra DX 120	Manual
Linfócitos	41,50	43,70	20,40	20,00
%	(26,35-74,10)	(15,50-72,70)	(6,60-60,70)	(2,50-75,00)
Monócitos	17,70	26,40	5,75	6,00
%	(7,40-23,75)	(12,60-39,30)	(1,90-15,60)	(1,50-45,00)
Granulócitos	39,90	26,60	73,45	74,00
%	(18,50-57,80)	(5,50-59,20)	(36,40-86,70)	(24,50-93,00)
Neutrófilos	#	#	68,90	59,50
%			(35,80-85,20)	(18,50-86,00)
Eosinófilos	#	#	1,20	9,50
%			(0,40-22,10)	(0,00-37,50)
Basófilos	#	#	0,80	0,00
%			(0,10-4,15)	(0,00-8,00)

aparelho não realiza contagem diferencial em cinco partes.

Dessa forma, inicialmente a contagem diferencial dos leucócitos foi classificada em três tipos celulares: monócitos, linfócitos e granulócitos permitindo a análise de concordância entre as quatro técnicas. Foi observada uma fraca concordância entre as contagens de linfócitos ($ICC=0,226$), monócitos ($ICC=0,021$) e granulócitos ($ICC=0,083$) (Tabela 8).

Posteriormente, os leucócitos foram classificados em cinco tipos celulares: monócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos, permitindo a análise entre o método manual e um dos métodos automatizados (Pentra DX 120). Foi observada forte concordância entre as contagens de linfócitos ($ICC=0,733$) e granulócitos ($ICC=0,853$) (Figura 6.A e B); os demais leucócitos (monócitos, eosinófilos, neutrófilos e basófilos) apresentaram fraca concordância (Tabela 8).

Tabela 8- Resultados das análises de concordância entre os métodos manuais e automatizados na contagem diferencial de leucócitos (n=117).

Métodos		ICC*	IC 95% Limite Inferior	IC 95% Limite Superior
L I N	AbcVet X Micros X Pentra X Manual	0,226	3,50	42,40
	AbcVet X Micros	0,432	26,20	57,60
	AbcVet X Pentra	0,178	-6,80	48,30
	AbcVet X Manual	0,152	-8,20	40,30
	Micros X Pentra	0,157	-7,70	43,20
	Micros X Manual	0,156	-8,30	40,90
	Pentra X Manual	0,733	62,90	81,10
M O N	AbcVet X Micros X Pentra X Manual	0,021	-0,60	5,90
	AbcVet X Micros	0,135	-6,80	39,60
	AbcVet X Pentra	0,009	-1,70	4,50
	AbcVet X Manual	-0,003	-4,80	5,60
	Micros X Pentra	0,007	-1,10	3,40
	Micros X Manual	-0,006	-2,90	2,70
	Pentra X Manual	0,291	10,80	45,50
G R A	AbcVet X Micros X Pentra X Manual	0,083	-0,20	20,60
	AbcVet X Micros	0,285	-3,60	53,00
	AbcVet X Pentra	0,061	-3,70	22,80
	AbcVet X Manual	0,058	-4,50	20,90
	Micros X Pentra	0,031	-2,80	12,50
	Micros X Manual	0,034	-3,20	13,20
	Pentra X Manual	0,853	79,00	89,80
NEUT	Pentra X Manual	0,546	-0,70	78,60
EOS	Pentra X Manual	0,124	-6,50	31,50
BASO	Pentra X Manual	0,010	-11,90	15,00

* Valores de ICC acima de 0,70 são considerados como apresentando forte concordância.

LIN linfócitos, MON monócitos, GRA granulócitos, NEUT neutrófilos, EOS eosinófilos, BASO basófilos, ICC coeficiente de correlação intraclass, IC intervalo de confiança.

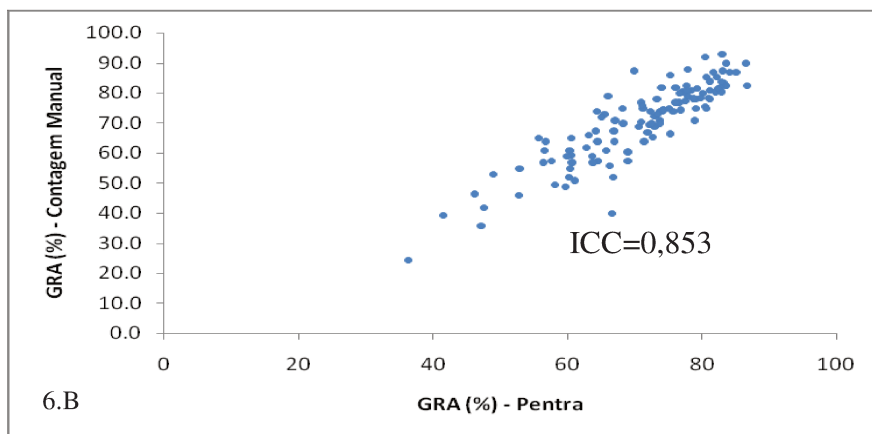
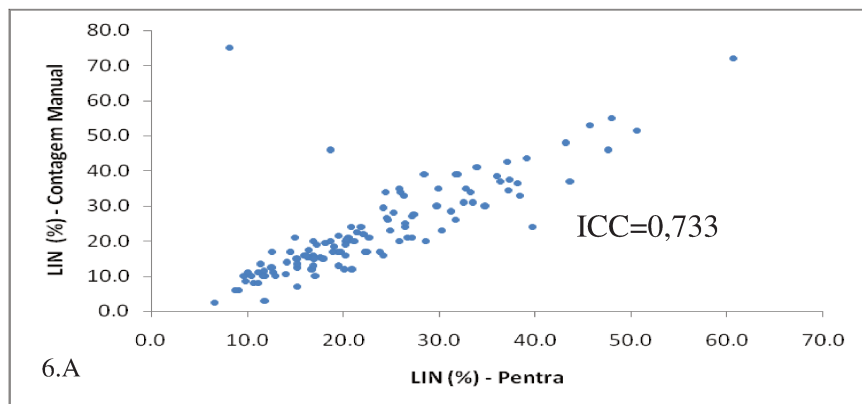


Figura 6- Correlações das contagens de LIN (A) e GRA (B) de cães com e sem inflamação/infecção obtidas no equipamento automatizado Pentra DX e pelo método manual (n=117).

Alarme da presença de desvio à esquerda

A tabela 9 mostra a frequência da presença de desvio à esquerda na contagem manual (definida como a presença de mais do que 300 bastonetes/ μ l; presença de metamielócitos e/ou mielócitos) e do alarme (*flag*) indicativo de desvio à esquerda liberado pelo método automatizado (Pentra DX 120).

Tabela 9- Frequência e porcentagem da presença de desvio à esquerda na contagem manual e automatizada de cães sadios e com processo inflamatório/infeccioso.

Grupo	Desvio à esquerda Manual*			Alarme Pentra DX 120		
	+	-	Total	+	-	Total
Controle	1	30	31	13	18	31
	3,23%	96,77%	100%	41,94%	58,06%	100%
Inflamação/Infecção	23	63	86	52	34	86
	26,74%	73,26%	100%	60,47%	39,53%	100%
Total	24	93	117	65	52	117

* p= 0,0054.

A presença de desvio à esquerda detectada pela técnica manual foi mais frequente no grupo de cães doentes do que nos animais sadios. Essa diferença não foi constatada pela emissão dos alarmes do sistema automatizado. Quando foi testada a acurácia da emissão dos alarmes em relação ao desvio à esquerda observado à microscopia, foram observadas sensibilidade de 79,17%, especificidade 50,54% e acurácia de 56,41%. A concordância entre os métodos, portanto, foi fraca (coeficiente kappa = 0,1818).

4.2- Avaliação dos parâmetros laboratoriais nos grupos controle e inflamatório/infeccioso

Foram estudados 117 cães adultos de ambos os sexos (66 fêmeas e 51 machos) e diferentes raças, divididos em dois grupos: controle sadio (n=31) e com suspeita clínica de inflamação/infecção (n=86) (Tabela 10). Desse último grupo, os prováveis diagnósticos foram: piometra (n=6), dermatopatia (n=6), hemoparasitose (n=32), vaginite (n=2), trauma (n=2), gastroenterites (n=2), verminose (n=2), uveíte (n=1), nefropatia (n=3), neoplasia (n=1), gangrena seca (n=1), cinomose (n=1), miíase (n=3), otite (n=1) e enfermidades associadas (n=22).

Tabela 10- Distribuição dos animais estudados de acordo com o sexo.

	Grupo controle		Grupo com processo inflamatório/infeccioso	
	(n = 31)		(n = 86)	
Sexo	N	%	N	%
Fêmea	12	38,71	54	62,79
Macho	19	61,29	32	37,21
Total	31	100	86	100

p=0,0751 (Teste Qui-quadrado)

Após a padronização e validação dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso, foram selecionados para o estudo comparativo entre os grupos os seguintes parâmetros: a contagem total de leucócitos realizada pelo contador automatizado veterinário (AbcVet); a presença de desvio à esquerda pelo método manual, a determinação automatizada do Fib e da VHS e as concentrações séricas da PCR e IL-6 obtidas pelo ELISA. Na tabela 11 encontram-se os resultados dessas determinações e da temperatura corporal dos animais controle e doentes.

Tabela 11- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos marcadores do processo inflamatório/infeccioso (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS e PCR) em cães sadios (n=31) e portadores de diversas doenças (n=86).

Condição Clínica	n	T °C	Leucócitos 10 ³ /μL	Fib mg/dl	VHS mm	PCR μg/mL
Controle	31					
Fêmea	12	38,35 (38,00-39,10)	11,38 (6,90-15,85)	247,00 (75,0-379,0)	2,00 (2,00-8,00)	1,36 (0,79-13,93)
Macho	19	39,00 (38,00-39,30)	10,45 (7,45-16,75)	203,00 (142,0-305,0)	2,00 (2,00-10,00)	1,41 (0,00-3,08)
Inflamação/ Infecção	86					
Cinomose	1	38,80	12,85	394,00	63,00	4,74
Dermatopatia	6	38,45 (38,20-38,80)	16,75 (9,65-21,35)	296,50 (196,00-361,00)	28,00 (15,00-101,00)	7,25 (2,43-11,22)
Gangrena Seca	1	38,60	11,85	227,00	2,00	2,94
Gastroenterite	2	38,35 (37,90-38,80)	9,23 (8,30-10,15)	442,00 (244,00-640,00)	46,00 (41,00-51,00)	68,32 (31,58-105,07)
Giardíase	1	38,50	16,30	175,00	11,00	5,19
Hemoparasitose	32	38,90 (38,30-40,10)	9,28 (1,80-16,90)	231,00 (127,00-406,00)	38,00 (2,00-120,00)	37,36 (0,02-98,11)
Míiase	3	39,00 (38,00-39,60)	11,3 (9,20-16,60)	214,00 (208,00-445,00)	49,00 (2,00-80,00)	5,84 (3,11-15,43)
Nefropatia	3	38,90 (38,70-39,00)	12,00 (11,35-22,80)	368,00 (253,00-442,00)	51,00 (12,00-76,00)	32,01 (27,54-59,44)
Neoplasia	1	38,90	16,20	442,00	76,00	59,44
Otite	1	38,70	23,75	235,00	18,00	3,99
Piometra	6	39,35 (38,30-40,00)	17,85 (9,35-23,70)	318,00 (201,00-826,00)	79,50 (25,00-120,00)	47,57 (0,00-174,62)
Trauma	2	39,40 (39,20-39,60)	21,30 (18,00-24,60)	507,50 (245,00-770,00)	55,50 (47,00-64,00)	99,23 (87,64-110,82)
Uveíte	1	38,50	10,40	211,00	27,00	22,03
Vaginite	2	38,85 (38,20-39,50)	12,90 (12,20-13,60)	236,50 (148,00-325,00)	26,00 (19,00-33,00)	13,71 (9,31-18,10)
Verminose	2	38,50 (38,10-38,90)	17,43 (17,20-17,65)	213,50 (210,00-217,00)	11,00 (2,00-20,00)	14,53 (11,70-17,35)
Enfermidades Associadas	22	38,90 (37,90-40,20)	14,43 (8,40-23,60)	217,50 (128,00-445,00)	38,50 (2,00-120,00)	39,92 (6,40-181,18)

T temperatura, Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa.

4.2.1- Frequência dos marcadores da resposta inflamatória nos grupos

A VHS automatizada foi o melhor marcador do processo inflamatório/infeccioso, seguida da PCR. Apresentaram positividade em 82,56% e 65,12% dos casos, respectivamente. Os demais marcadores foram positivos em menos de 50% dos animais (Tabela 12).

Tabela 12- Frequência da positividade dos marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) no grupo de cães com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Marcador	Frequência		IC 95%
	n	%	
Temperatura > 39,3°C	17	19,77	11,98-29,75
Leucócitos >17.000/ μ L	22	25,58	16,78-36,13
Fib > 5 g/L	3	3,49	0,73-9,86
VHS > 10 mm	71	82,56	72,87-89,90
PCR > 15 μ g/L	56	65,12	54,08-75,08
IL-6 > 47,08 μ g/mL	31	36,05	25,97-47,12
bastonetes > 300/ μ L e/ou outros granulócitos imaturos	23	26,74	17,77-37,38

Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6, IC intervalo de confiança.

Quando o grupo com processo inflamatório foi dividido em infecção (n=57) e inflamação (n=29) o grupo com inflamação apresentou maior frequência de positividade do que o grupo infeccioso (Tabela 13).

Tabela 13- Frequência dos marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) em cães nos grupos inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57).

Marcador	Infeccioso (n=57)		Inflamatório (n=29)	
	n	%	n	%
Temperatura > 39,3°C	10	17,54	7	24,14
Leucócitos >17.000/ μ L	11	19,30	11	37,93
Fib > 5 g/L	0	0,00	3	10,34
VHS > 10 mm	44	77,19	25	86,21
PCR > 15 μ g/L	32	56,14	25	86,21
IL-6 > 47,08 pg/mL	18	31,58	11	37,93
bastonetes > 300/ μ L e/ou outros granulócitos imaturos	10	17,54	11	37,93

Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6, IC intervalo de confiança.

4.2.2- Correlação entre os marcadores da resposta inflamatória

Os indicadores de inflamação foram correlacionados dois a dois e na grande maioria não houve correlação, exceto a VHS X PCR ($r=0,3470$ $p=0,0011$) e a VHS X Fib ($r=0,2371$ $p=0,0279$), que mostraram correlação significativa, embora fraca (Tabela 14).

Tabela 14- Valores de coeficiente de correlação e p entre os marcadores da resposta inflamatória (temperatura, contagem total de leucócitos, Fib, VHS, PCR, IL-6 e presença de desvio à esquerda) (n=117).

		IL-6	CRP	ESR	Fib	Leucócitos
Temperatura	r	0.0442	0.1425	0.0600	-0.0198	-0.0321
	p	0.6860	0.1906	0.5829	0.8566	0.7689
Leucócitos	r	-0.1710	0.0196	-0.0154	-0.0164	-
	p	0.1153	0.8578	0.8881	0.8810	-
Fib	r	0.0490	-0.0164	0.2371	-	-
	p	0.6542	0.8810	0.0279	-	-
ESR	r	0.1016	0.3470	-	-	-
	p	0.3521	0.0011	-	-	-
CRP	r	0.1889	-	-	-	-
	p	0.0815	-	-	-	-

Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6, IC intervalo de confiança.

4.2.3- Análise comparativa dos parâmetros entre os grupos controle e com processo inflamatório/infeccioso

Hemograma: Ao comparar a presença e a ausência do processo inflamatório/infeccioso observou-se diferença significativa entre os seguintes parâmetros: a concentração de HGB e o número de PLT foram superiores no grupo controle, enquanto a contagem total de leucócitos, número de basófilos e presença de desvio à esquerda apresentaram valores elevados no grupo de animais doentes (Tabela 15) (Figura 7.A – C).

Tabela 15- Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros relacionados ao hemograma entre os grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Parâmetros Analisados	Controle n = 31	Inflamatório/infeccioso n = 86	p
T	38,80	38,85	0,2121
°C	(38,00-39,30)	(37,90-40,20)	
HGB AbcVet	16,75	12,55	<0,0001
g/dL	(13,25-19,40)	(7,00-18,85)	
PLT AbcVet	289,00	174,00	<0,0001
10³/μL	(200,00-664,50)	(18,50-900,00)	
Leuc AbcVet	10,90	12,86	0,0450
10³/μL	(6,90-16,75)	(1,80-24,60)	
BAST Manual	56,00	121,30	0,0042
/μL	(0,00-327,00)	(0,00-4425,0)	
NEUT Manual	6888,00	6645,60	0,7763
/μL	(4054,50-10824,80)	(1188,00-16268,80)	
EOS Manual	855,30	1132,10	0,2980
/μL	(144,00-4089,00)	(0,00-7931,30)	
BASO Manual	0,00	0,00	0,0171
/μL	(0,00-167,50)	(0,00-751,50)	
LIN Manual	2295,00	2287,50	0,6061
/μL	(1268,80-4279,50)	(216,00-12525,00)	
MON Manual	654,00	766,50	0,0704
/μL	(246,00-1426,50)	(108,00-7605,00)	

Valores que apresentam $p \leq 0,005$ são estatisticamente diferentes segundo o teste de Mann Whitney.

T temperatura, Leuc contagem total de leucócitos, LIN linfócitos, MON monócitos, BAST bastonetes, NEUT neutrófilos, EOS eosinófilos, BASO basófilos, HGB hemoglobina, PLT plaquetas.

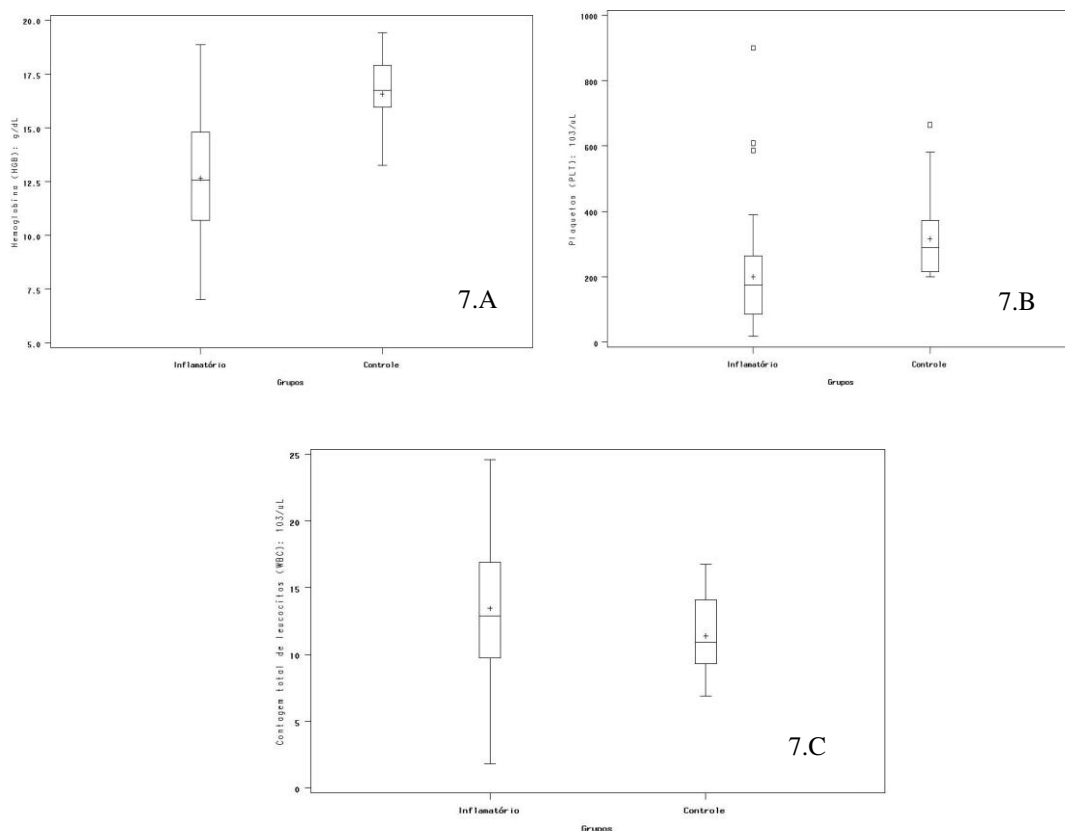


Figura 7- Box plot das determinações do hemograma: HGB (A), PLT (B) e contagem total de leucócitos (C) dos grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Quando os animais doentes foram divididos por sexo não houve diferença entre machos e fêmeas. Quanto ao grupo controle, as fêmeas mostraram valores significativamente reduzidos na temperatura corporal e dosagem de HGB, enquanto o valor mediano das PLT foi superior nas fêmeas quando comparadas aos machos (Tabela 16).

Tabela 16- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros relacionados ao hemograma em fêmeas e machos dos grupos controle e inflamatório.

Parâmetros	Controle			Inflamatório		
	FÊMEA	MACHO	p	FÊMEA	MACHO	p
	n = 12	n = 19		n = 54	n = 32	
T	38,35	39,00	0,0059	38,90	38,80	0,7505
°C	(38,00-39,10)	(38,00-39,30)		(37,90-40,10)	(38,00-40,20)	
HGB						
AbcVet	16,03	17,20	0,0366	12,10	12,55	0,9786
g/dL	(13,25-18,10)	(13,65-19,40)		(7,00-18,85)	(7,60-17,15)	
PLT						
AbcVet	363,50	237,50	0,0078	11,95	10,30	0,1263
10³/μL	(226,00-664,50)	(200,00-580,50)		(6,40-16,90)	(6,60-16,65)	
Leuc						
AbcVet	11,38	10,45	0,6554	12,30	13,55	0,6422
10³/μL	(6,90-15,85)	(7,45-16,75)		(4,90-24,60)	(1,80-23,75)	
BAST						
Manual	50,4	82,0	0,4410	121,3	126,3	0,4370
/μL	(0,0-158,5)	(0,0-327,0)		(0,0-4425,0)	(0,0-797,5)	
NEUT						
Manual	7143,50	6124,3	0,2735	6615,3	6969,4	0,8793
/μL	(4071,0-10824,8)	(4054,5-9483,0)		(2208,0-15642,0)	(1188,0-16268,8)	
EOS						
Manual	971,3	738,0	0,3509	869,5	1430,5	0,0831
/μL	(492,0-4089,0)	(144,0-4020,0)		(0,0-6713,5)	(72,0-7931,3)	
BASO						
Manual	0,0	0,0	0,4410	0,0	0,0	0,6680
/μL	(0,0-0,0)	(0,0-167,5)		(0,0-751,5)	(0,0-211,5)	
LIN						
Manual	2346,0	2244,0	0,6851	2157,1	2496,5	0,7410
/μL	(1394,0-4279,5)	(1268,8-3744,0)		(304,5-12525,0)	(216,0-10584,0)	
MON						
Manual	634,5	654,0	0,8711	776,3	766,5	0,9359
/μL	(246,0-1426,5)	(294,0-1152,0)		(207,0-7605,0)	(108,0-2118,0)	

Valores que apresentam $p \leq 0,005$ são estatisticamente diferentes segundo o teste de Mann Whitney.

T temperatura, Leuc contagem total de leucócitos, LIN linfócitos, MON monócitos, BAST bastonetes, NEUT neutrófilos, EOS eosinófilos, BASO basófilos, HGB hemoglobina, PLT plaquetas.

Marcadores da Resposta Inflamatória

Níveis superiores de VHS, PCR e IL-6 foram observados no grupo com inflamação/infecção quando comparados aos controles (Tabela 17) (Figura 8.A – D).

Tabela 17- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 dos animais entre os grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Métodos	Controle n = 31	Inflamatório/infeccioso n = 86	p
Fib Aut (g/dL)	209,00 (75,00-379,00)	241,50 (127,00-826,00)	0,0689
VHS Aut (mm)	2,00 (2,00-10,00)	38,50 (2,00-120,00)	<0,0001
PCR ELISA (µg/mL)	1,38 (0,00-13,93)	31,04 (0,00-181,18)	<0,0001
IL-6 ELISA (pg/mL)	0,00 (0,00-47,08)	21,12 (0,00-1238,29)	<0,0001

Aut automatizado, Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6.

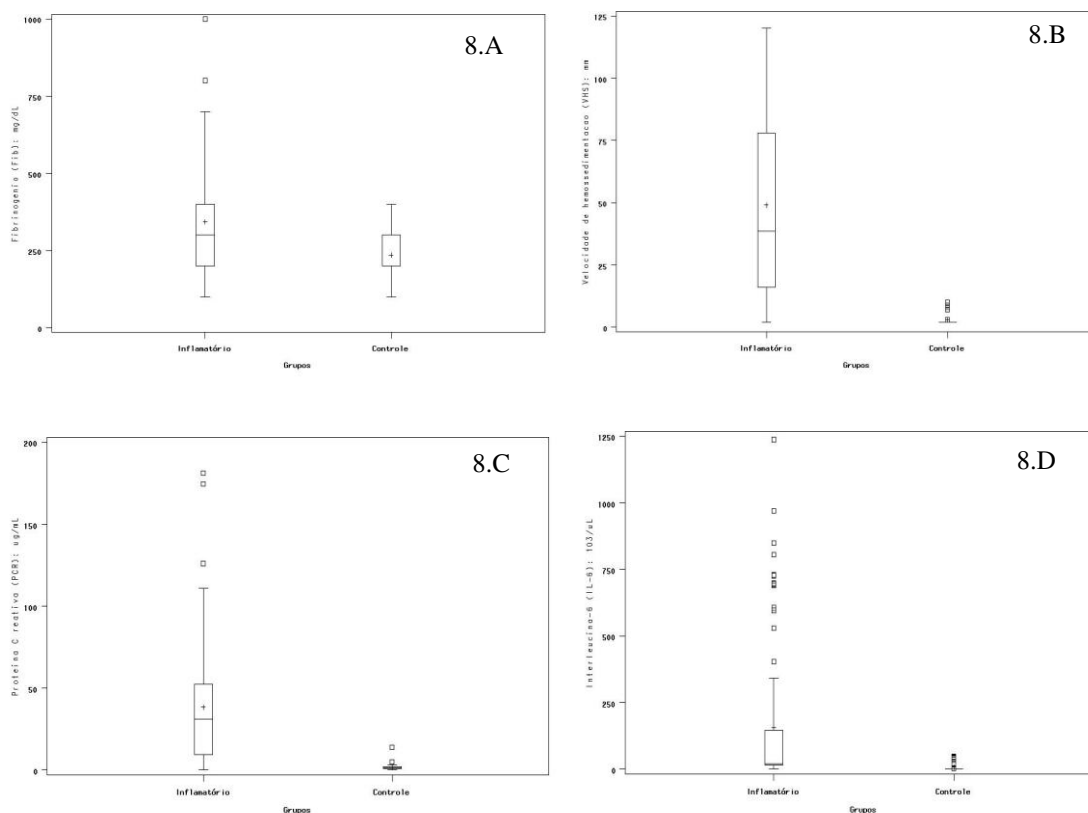


Figura 8- Box plot das determinações: Fib (A), VHS (B), PCR (C) e IL-6 (D) dos grupos controle (n=31) e com processo inflamatório/infeccioso (n=86).

Quando os cães doentes foram separados por sexo, não houve diferença nos valores dos marcadores inflamatórios (Tabela 18).

Tabela 18- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 em fêmeas e machos dos grupos controle e inflamatório/infeccioso.

Parâmetros	Controle			Inflamatório		
	FÊMEA n = 12	MACHO n = 19	p	FÊMEA n = 12	MACHO n = 19	p
Fib Aut (g/dL)	247,00 (75,00-379,00)	203,00 (142,00-305,00)	0,3203	259,50 (128,00-826,00)	231,00 (127,00-445,00)	0,264
VHS Aut (mm)	2,00 (2,00-8,00)	2,00 (2,00-10,00)	0,9558	38,00 (2,00-120,00)	48,50 (2,00-120,00)	0,7989
PCR ELISA (µg/mL)	1,36 (0,79-13,93)	1,41 (0,00-3,08)	0,3406	35,40 (0,00-181,18)	26,29 (0,54-98,11)	0,1516
IL-6 ELISA (pg/mL)	0,00 (0,00-44,10)	0,00 (0,00-47,08)	0,5242	21,12 (0,00-1238,29)	21,12 (0,00-606,04)	0,0706

Aut automatizado, Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6.

4.2.4- Análise comparativa dos parâmetros dos animais nos grupos inflamatório e infeccioso

Hemograma: Os animais doentes foram subdivididos em 2 subgrupos de acordo com a doença de base presumível em inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57). Ao comparar os resultados do hemograma observamos níveis superiores de leucócitos, granulócitos imaturos e maduros, e PLT nos animais com processo inflamatório, enquanto os valores de eosinófilos e HGB foram inferiores aos dos animais com infecção (Tabela 19) (Figura 9.A – C).

Tabela 19- Valores de mediana (mínimo e máximo) e comparações dos parâmetros relacionados ao hemograma entre os grupos com processo inflamatório (n=29) e com processo infeccioso (n=57).

Parâmetros	Processo Infeccioso n = 57	Processo Inflamatório n = 29	p
T	38,80	38,90	0,5858
°C	(38,00-40,20)	(37,90-40,00)	
HGB AbcVet	13,05	11,15	0,0258
g/dL	(7,00-18,60)	(7,55-18,85)	
PLT AbcVet	161,00	212,00	0,0315
10³/μL	(18,50-385,50)	(64,00-900,00)	
Leuc AbcVet	11,80	16,20	0,0034
10³/μL	(1,80-23,60)	(8,30-24,60)	
META Manual	0,00	0,00	0,1283
/μL	(0,00-72,50)	(0,00-354,00)	
BAST Manual	88,00	249,00	<0,0001
/μL	(0,00-797,50)	(0,00-4425,00)	
NEUT Manual	6520,50	8729,00	0,0016
/μL	(1188,00-16048,00)	(3818,00-16268,80)	
EOS Manual	1260,00	992,00	0,3128
/μL	(0,00-7931,30)	(101,50-6150,00)	
BASO Manual	0,00	0,00	0,9672
/μL	(0,00-552,00)	(0,00-751,50)	
LIN Manual	2295,00	2280,00	0,3398
/μL	(216,00-10584,00)	(304,50-12525,00)	
MON Manual	734,50	861,00	0,1069
/μL	(108,00-7605,00)	(272,00-4140,00)	

T temperatura, Leuc contagem total de leucócitos, LIN linfócitos, MON monócitos, META metamielócitos, BAST bastonetes, NEUT neutrófilos, EOS eosinófilos, BASO basófilos, HGB hemoglobina, PLT plaquetas.

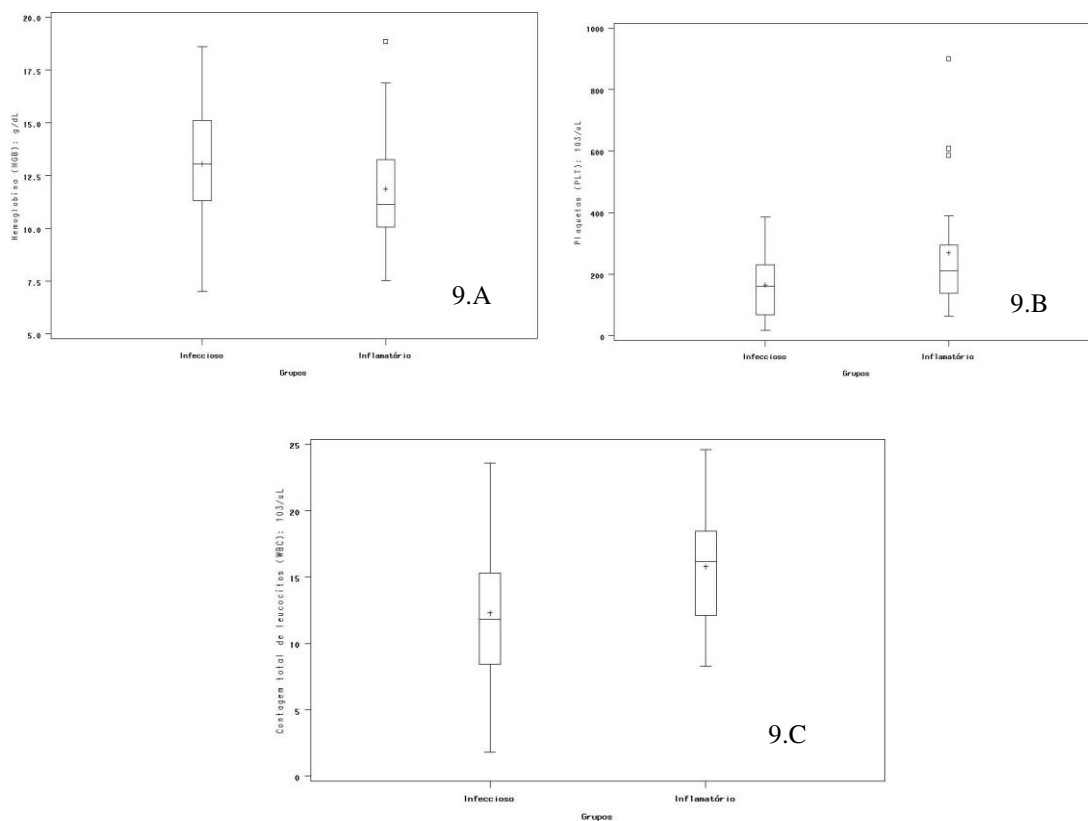


Figura 9- Box plot das determinações do hemograma: HGB (A), PLT (B) e contagem total de leucócitos (C) dos grupos com processo inflamatório e infeccioso.

Marcadores da Resposta Inflamatória

No grupo de animais com processo inflamatório os níveis de Fib e PCR foram superiores aos do grupo infeccioso, enquanto os valores de VHS e IL-6 foram semelhantes (Tabela 20) (Figura 10.A - C).

Tabela 20- Valores de mediana (mínimo e máximo) das determinações do Fib plasmático, VHS, PCR e IL-6 dos animais entre os grupos com processo inflamatório (n=29) e com processo infeccioso (n=57).

Métodos	Infeccioso n = 57	Inflamatório n = 29	p
Fib Aut (g/dL)	217,00 (127,00-445,00)	288,00 (148,00-826,00)	0,0004
VHS Aut (mm)	38,00 (2,00-120,00)	47,00 (2,00-120,00)	0,3417
PCR ELISA (µg/mL)	18,82 (0,02-99,29)	43,45 (0,00-181,18)	0,0171
IL-6 ELISA (pg/mL)	21,12 (0,00-1238,29)	21,12 (0,00-849,16)	0,7004

Aut automatizado, Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação, PCR proteína C reativa, IL-6 interleucina-6.

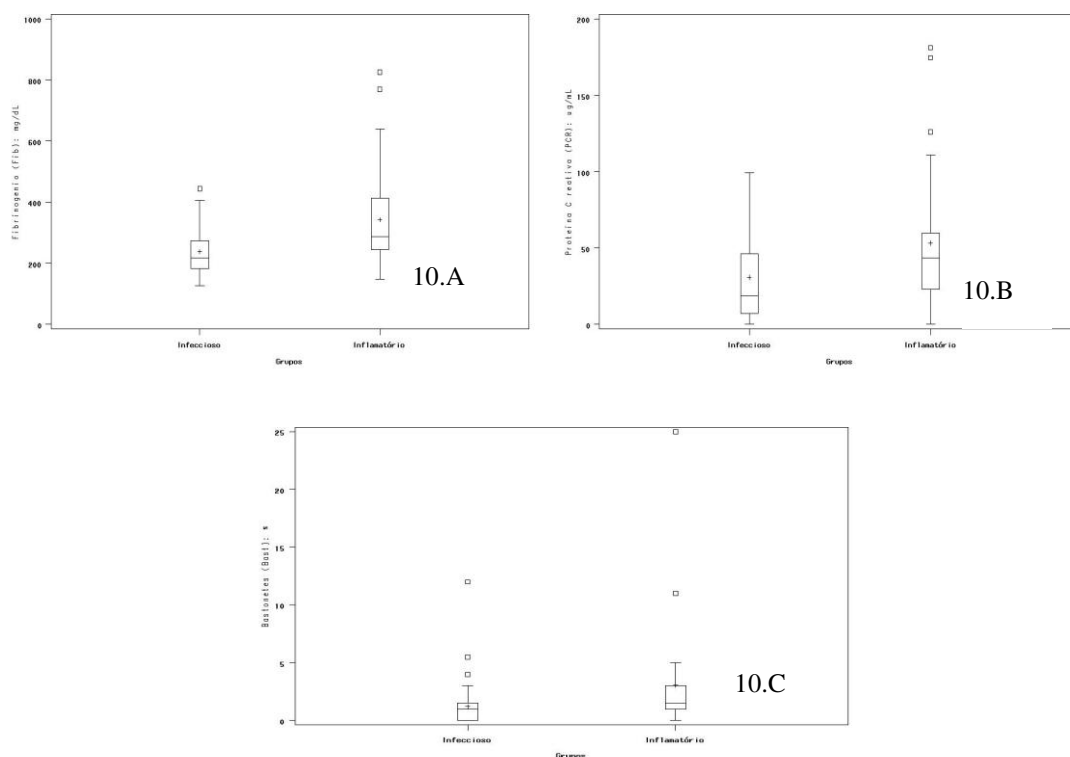


Figura 10- Box plot das determinações: Fib (A), PCR (B) e número de bastonetes (C) dos grupos com processo inflamatório (n=29) e infeccioso (n=57).

4.3- Análise Evolutiva dos animais com hemoparasitose (n = 12)

Em doze cães com suspeita clínica de hemoparasitose foi realizado o acompanhamento dos mesmos durante dois meses, com retornos a cada 3 semanas. Os cães receberam tratamento (doxiciclina dose de 10 mg/Kg via oral a cada 24 horas durante 21 dias) após a primeira coleta. Foram consideradas a contagem total de leucócitos, o número de PLT, a concentração de HGB, a determinação do Fib plasmático e VHS (Tabela 21 e Figura 11.A - E). Os animais apresentaram melhora no quadro clínico, isto é houve aumento no número de leucócitos, concentração de HGB e número de plaquetas entre a primeira e segunda coleta e entre a segunda e terceira coleta. A temperatura corpórea e a VHS diminuíram gradativamente, de acordo com a evolução do quadro.

Tabela 21- Valores de mediana (mínimo e máximo) dos parâmetros avaliados no grupo de hemoparasitose (n = 12) obtidos em 3 momentos de coleta.

	T °C	Leucócitos* 10 ³ /μL	HGB* g/dL	PLT* 10 ³ /μL	Fib g/dL	VHS* mm
Coleta						
1 ^a	39,3 (38,4-40,1)	8,05 (6,90-15,30)	11,43 (9,10-14,65)	78,00 (24,50-184,50)	231,00 (183,00-406,00)	57,50 (10,00-106,00)
2 ^a	39,0 (38,1-39,4)	14,80 (7,40-24,20)	13,85 (11,70-15,00)	234,75 (17,00-385,50)	202,50 (169,00-331,00)	32,00 (2,00-85,00)
3 ^a	38,9 (38,2-39,4)	15,45 (5,00-36,00)	13,25 (12,00-17,30)	215,75 (25,00-363,00)	212,00 (159,00-600,00)	30,50 (2,00-91,00)

Valores que apresentam $p \leq 0,005$ são estatisticamente diferentes segundo o teste de ANOVA.

T temperatura, HGB hemoglobina, PLT plaquetas, Fib fibrinogênio, VHS velocidade de hemossedimentação.

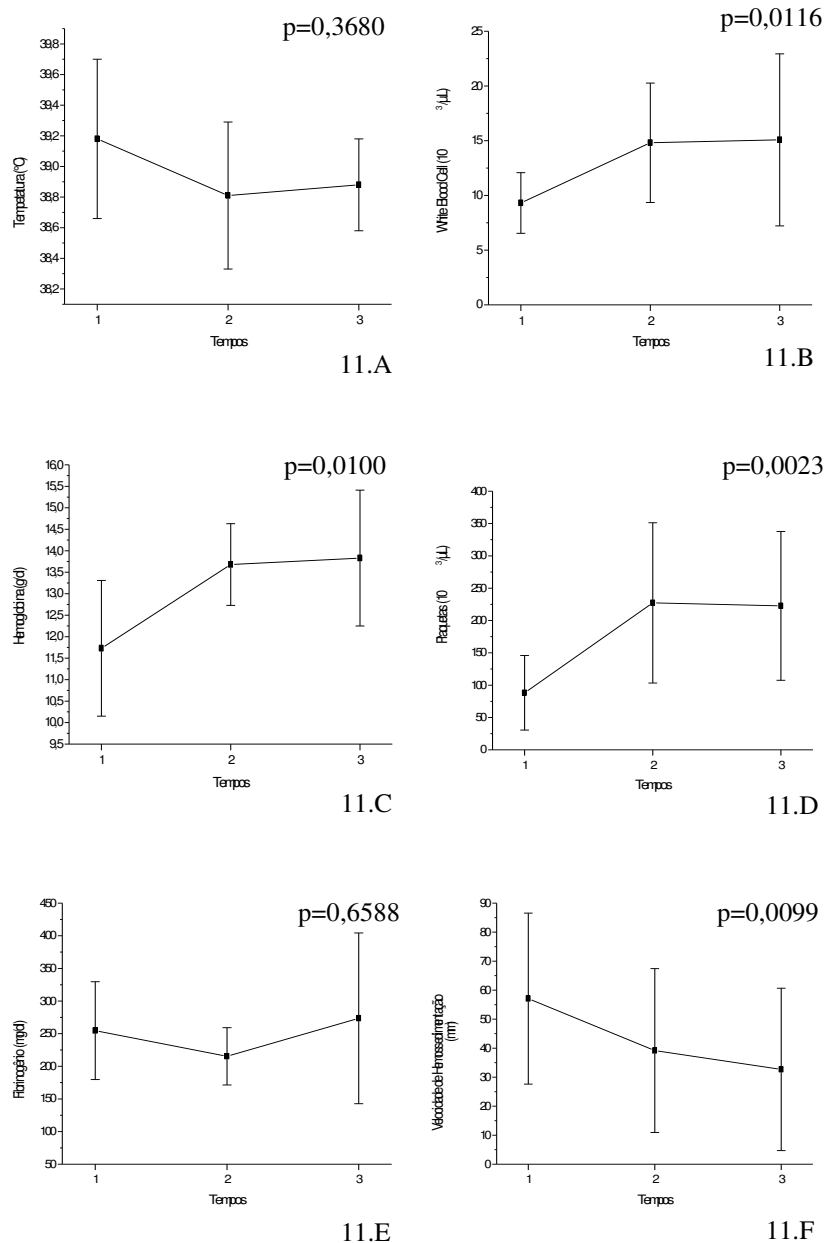


Figura 11- Valores médios e desvios padrões da temperatura (A), contagem total de leucócitos (B), dosagem de HGB (C), número de PLT (D), concentração de Fib (E) e determinação da VHS (F). Valores de p avaliados em 3 coletas.

5- DISCUSSÃO

O reconhecimento do processo inflamatório/infeccioso na clínica veterinária é de suma importância. Além da avaliação clínica, os procedimentos laboratoriais devem ser precisos, preferencialmente obtidos em curto espaço de tempo e de baixo custo. Nesse sentido, foi conduzido o presente trabalho com o objetivo de avaliar e propor algumas metodologias auxiliares ao diagnóstico em cães. Inicialmente foram avaliados os parâmetros propostos e em seguida os mesmos parâmetros num grupo de cães portadores de inflamação e/ou infecção. Quanto à determinação da Fib é sabido que os métodos de análise são baseados na sua capacidade de precipitar em temperaturas elevadas (55 a 58°C) e na sua função hemostática, em que ocorre a conversão do Fib em fibrina após a adição de solução rica em trombina (Millar *et. al.*, 1971). Na rotina laboratorial veterinária, a concentração de Fib é determinada pelo método de precipitação pelo calor (Kaneko e Smith, 1967; Jain, 1975a), conforme preconizado por Jain (1993b). Entretanto, na medicina humana a concentração do Fib é determinada pelo método de Clauss já disponível em equipamentos automatizados. Segundo Tamzali e colaboradores (2001) tais métodos não estimam exatamente o mesmo anárito. O método de precipitação pelo calor determina a quantidade de proteína precipitada em banho-maria à temperatura elevada, principalmente o Fib, independente de sua capacidade de coagular (Jensen *et al.*, 2000). O método de Clauss determina a atividade funcional do Fib, sendo que algumas substâncias podem interferir, tais como a presença dos fatores degradadores de Fib (Mischke *et. al.*, 2000). O método de Clauss é recomendado pelo Comitê Nacional para Padronização da Clínica Laboratorial como método padrão na medicina humana (Tamzali *et. al.*, 2001).

A precisão e estabilidade no tempo dos dois métodos foram analisadas no estudo. O método de precipitação pelo calor apresentou-se pouco preciso e pouco estável quando comparado ao método automatizado de Clauss. Foi observada fraca concordância entre os métodos, discordando de outros relatos. Em estudos realizados com eqüinos (Tamzali *et. al.*, 2001) e coelhos (Millar *et. al.*, 1971) o método de precipitação pelo calor e o método manual de Clauss apresentaram forte correlação.

A VHS, clássico indicador da atividade inflamatória, na rotina laboratorial veterinária é determinada principalmente pelo método de Wintrobe. Na medicina humana,

o método padrão é baseado na técnica descrita por Westergren em 1921 e definida pelo Comitê Internacional para Padronização em Hematologia em 1977 (revisado por Olshaker e Jerrard, 1997). Atualmente, encontram-se disponíveis aparelhos automatizados baseados em fotometria e capilaridade interrompida por análise da cinética, os quais oferecem rapidez e precisão na determinação da VHS (Plebani *et al.*, 1998, Romero *et al.*, 2003). Além disso, não é necessária a realização de diluição da amostra, pois permite o uso de amostras com EDTA possibilitando o uso do mesmo material coletado para realização do hemograma (De Jonge *et al.*, 2000). Testamos essa metodologia em sangue canino e observamos boa precisão na maioria dos ensaios, exceto nas amostras com valores abaixo de 10 mm onde os resultados não foram lineares. A estabilidade no tempo não foi ideal reforçando a recomendação de que a VHS deve ser realizada em até quatro horas após a coleta da amostra ou até 24 horas se o sangue for mantido a 4°C (Lewis *et al.*, 2006). Foi observada fraca concordância entre os métodos de Wintrobe e automatizado para determinação da VHS. Sabe-se que no método de Wintrobe, o valor de VHS final é corrigido de acordo com a VHS antecipada para o hematócrito da amostra (Jain, 1975a), tal cálculo não é realizado no método automatizado.

Na avaliação da determinação da PCR foi testado um equipamento já utilizado em humanos com bons resultados (Grotto *et al.*, 2002). Entretanto, não foi obtida leitura por esse método nas amostras caninas. A concentração sérica normal em cães geralmente é menor que 15 µg/mL quando realizada pelo ELISA (Otabe *et al.*, 1998) e sofre aumento acentuado em 24 horas após o dano tecidual (Hayashi *et al.*, 2001). Duas possibilidades são plausíveis: a primeira seria a sensibilidade do teste para dosagens muito reduzidas da PCR (0,02 a 0,7 µg/mL), a segunda seria a falha no reconhecimento da PCR do cão, uma vez que os anticorpos utilizados são específicos para humanos. Os valores de referência em cães saudáveis são variáveis. Existem relatos em que valores menores que 1 µg/mL devem ser interpretados com cautela, pois podem ser influenciados pelas condições analíticas (Yamamoto *et al.*, 1992; Yamashita *et al.*, 1994, , Otabe *et al.*, 1998, Martinez-Subiela *et al.*, 2004). Portanto, recomenda-se que cada laboratório estabeleça seus valores referenciais. Além disso, ensaios que utilizam anticorpos anti-PCR de diferentes espécies

(principalmente humano) têm sido descritos como uma alternativa (Cerón *et al.*, 2005), entretanto recomenda-se anticorpos espécie-específicos.

Segundo Caspi e colaboradores (1984) a PCR canina é semelhante a PCR humana, ambas são glicoproteínas, entretanto a PCR canina apresenta somente 2 subunidades glicosiladas. A reação antigênica cruzada entre as duas PCRs foi reportada em alguns estudos (Maudsley e Pepys, 1987; Fujise *et al.*, 1992; Yamamoto *et al.*, 1992), entretanto observa-se fraca reação entre as espécies.

Testamos, então um ELISA comercial para determinação da PCR canina disponível no mercado. Estudo realizado por Kjelgaard-Hansen e colaboradores (2003a) verificou a variação intra e inter-ensaio e a linearidade do ensaio. O ELISA comercial apresentou CVs entre 6,9 e 29%. Sabe-se que esses níveis de imprecisão encontrados são inaceitáveis para fins de diagnóstico e algumas medidas devem ser tomadas. O esclarecimento dado foi que os valores elevados de PCR canina encontrados no processo inflamatório agudo são de uma magnitude que parece diminuir as consequências dos CVs aumentados, isto é não comprometeu a sensibilidade diagnóstica do ensaio. Isso pode ser sustentado, pois o ensaio pode detectar alterações esperadas durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória espontânea (Kjelgaard-Hansen *et al.*, 2003a).

Além do VHS, PCR e Fib, foi testado também três sistemas hematológicos automatizados, sendo um veterinário e dois usados em análises sangüíneas humanas. Comparando as contagens globais (HGB, PLT e leucócitos) a correlação entre os três equipamentos foi boa, o que nos permite dizer que os três sistemas podem ser utilizados para a obtenção desses parâmetros. Em relação à contagem diferencial dos leucócitos os três métodos automatizados foram comparados com a contagem diferencial manual realizada à microscopia. A melhor correlação com a contagem manual foi encontrada nas contagens feitas por um dos equipamentos programados para análise de sangue humano e ajustado pelo operador para contagens caninas. Embora o AbcVet seja um equipamento dedicado à análise veterinária, o Pentra DX 120 possui uma tecnologia mais avançada para a identificação das células, o que explica o seu melhor desempenho. Esses dados denotam

uma limitação nas contagens diferenciais feitas pelo equipamento veterinário e sugerem a revisão microscópica dos esfregaços sangüíneos. O mesmo cuidado deve ser considerado no que diz respeito à possível presença de granulócitos imaturos (desvio à esquerda). A acurácia dos alarmes em detectar essa anormalidade foi abaixo do desejado, à custa principalmente de uma baixa especificidade do método automatizado.

A partir da validação dos métodos, foi realizada à análise da eficácia dos mesmos no reconhecimento do processo inflamatório/infeccioso em um grupo de cães que apresentava características clínicas sugestivas dessas anormalidades. Os parâmetros escolhidos foram: VHS automatizada, Fib pelo método de Clauss automatizado, PCR e IL-6 por ELISA, contagens globais do hemograma realizado pelo AbcVet e contagem diferencial de leucócitos manual.

Os mesmos parâmetros foram avaliados no grupo controle, onde observamos que o número de PLT foi inferior nos machos. As fêmeas apresentaram valores reduzidos de HGB quando comparados aos machos. Sabe-se que o valor de referência de HGB em mulheres é menor e pode ser influenciado pela gestação e menstruação. Entretanto, no estudo realizado foram excluídas fêmeas prenhes e/ou em cio. Esses dados exigem maiores investigações, pois a casuística foi pequena. Tais resultados devem ser melhores estudados num grupo maior de cães saudáveis.

A determinação do Fib, a VHS, a PCR e a IL-6 não apresentou diferença significativa entre os sexos concordando com outros dados da literatura (Yamamoto *et. al.*, 1993, Kajikawa *et. al.*, 1999, Kuribayashi *et. al.*, 2003).

Entre os parâmetros laboratoriais estudados, contagens superiores de leucócitos, monócitos e bastonetes foram superiores no grupo doente quando comparado ao controle, o que era esperado e está em concordância com a literatura. A leucocitose é um achado típico do processo inflamatório, principalmente em infecções bacterianas, entretanto algumas drogas podem causar leucopenia. Por outro lado, uma das respostas mais sensíveis a citocinas pró-inflamatórias, tal como a IL-1 é o aumento no número de neutrófilos maduros e imaturos na circulação (*Apud Hoshiya et. al.*, 2001a).

Além disso, a dosagem de HGB e a contagem de PLT foram inferiores nos animais doentes. A presença de anemia na doença inflamatória foi relatada em outros estudos com cães (Yamashita *et. al.*, 1994). Trabalhos experimentais em cães mostraram que os animais apresentaram quadro sistêmico caracterizado por: febre, leucocitose e discreta anemia (Yamashita *et. al.*, 1994). Feldman e colaboradores (1981) sugeriram que em cães a anemia por doença inflamatória pode ser causada por desordens no metabolismo do Fe, isto é diminuição na concentração sérica do Fe, na capacidade de ligação do Fe total (TIBC), na porcentagem de saturação da transferrina e no número de sideroblastos na medula óssea.

Quanto às PLT, é sabido que elas são componentes ativos na defesa antimicrobiana, na indução da inflamação e no reparo dos tecidos, além de sua participação na hemostasia. Algumas das ações das plaquetas incluem: ligação e internalização de patógenos com liberação de proteínas microbianas, interação com os leucócitos e células endoteliais auxiliando nos processos de “rolamento”, captura e transmigração dos glóbulos brancos, além da liberação de diversos fatores de crescimento celulares e quimiocinas (revisado por Klinger e Jelkmann, 2002). A presença de trombocitose e trombocitopenia vai depender da causa da inflamação/infecção. Infecções agudas virais estão associadas com trombocitopenia devido a uma megacariopoiese deficiente e aumento do consumo (Terata *et. al.*, 1966, Cole *et. al.*, 1998). Já as infecções crônicas ou doenças malignas frequentemente desenvolvem trombocitose reativa, associada com aumento de trombopoetina circulante (Estrov *et. al.*, 1995, Cerutti *et. al.*, 1997).

No grupo de cães doentes o valor da mediana da contagem de PLT foi inferior ao do grupo controle, o que é compreensível tratando-se de animais na fase aguda do processo inflamatório ou infeccioso. Quando os cães foram analisados em 2 grupos separados, aquele com predominância de infecção mostrou número de PLT significativamente menor do que o do grupo inflamatório, reforçando os conceitos descritos acima.

Quanto aos marcadores séricos/plasmáticos, em humanos a elevação dos valores de Fib está principalmente relacionada com a resposta inflamatória que acompanha a aterosclerose e repercussões cardíacas (Willerron, 2002, Lind, 2003). Em animais há relatos

de hiperfibrinogenemia em bovinos (EK, 1972, McSherry *et. al.*, 1970), eqüinos (Andrews *et. al.*, 1994) e em cães (Sutton e Johnstone, 1977, Schalm *et. al.*, 1970) com processo inflamatório agudo ou crônico. Somente 3,49% dos cães apresentou hiperfibrinogenemia, porém não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e doente. Separando os grupos em inflamatório e infeccioso, o grupo inflamatório mostrou níveis significativamente superiores. Há várias possibilidades que explicam a baixa eficácia da determinação do Fib. Primeiro, quando há demora na punção ou homogeneização do sangue, o Fib pode ser consumido parcialmente (Andrews *et al.* 1994). Segundo, a quantificação de Fib de algumas coletas podem ter sido realizadas em cães com processo inflamatório/infeccioso mais avançado quando os níveis já retornavam ao normal, já que o Fib em cães pode sofrer diminuição dentro de 24 a 48 horas após o episódio agudo (Schutze 2000). Segundo Cerón e colaboradores (2005) apesar do Fib ser facilmente determinado, ele não apresenta muito valor clínico no diagnóstico e monitoramento da inflamação, sendo então mais usado rotineiramente na avaliação de distúrbios hemostáticos.

Os animais saudáveis apresentaram concentração sérica de PCR entre 0 e 13,93 µg/mL. Estes valores são semelhantes com estudos reportados sobre níveis da concentração de PCR em cães normais (Yamamoto *et. al.*, 1992, Rikihisa *et. al.*, 1994, Yamamoto *et. al.*, 1994, Kjelgaard- Hansen *et. al.*, 2003b, Kuribayashi *et. al.*, 2003, Parra *et. al.*, 2005a, Ulutas *et. al.*, 2005, Parra *et. al.*, 2006a, Mischke *et. al.*, 2007, Veiga *et. al.*, 2008). Em cães a elevação na concentração da PCR tem sido reportada em muitas condições inflamatórias e infecciosas, tais como traumas, cirurgias, poliartrites, leptospirose, enterites bacterianas e hemorrágicas, parvovirose e hemoparasitoses (Eckersall, 2004). No estudo realizado foi observado aumento nos níveis séricos da PCR em 65,12% dos cães com inflamação/ infecção. Além disso, o grupo com processo inflamatório/infeccioso apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo de animais saudáveis. Os valores elevados de PCR em cães doentes foram reportados em outros estudos (Rikihisa *et. al.*, 1994, Martínez-Subiela *et. al.*, 2002, Parra *et. al.*, 2006a). Os cães com suspeita clínica de hemoparasitose (n=32) apresentaram valores de PCR entre 0,02 e 98,11 µg/mL, sendo significativamente diferentes que os cães normais, coincidindo com relatos anteriores em cães infectados por

Babesia sp (Matijatko *et. al.*, 2002, Ulutas *et. al.*, 2005, Matijatko *et. al.*, 2007) e *Ehrlichia* sp (Rikihisa *et. al.*, 1994, Parra *et. al.*, 2005a, Parra *et. al.*, 2006a). Nos animais cujo provável diagnóstico foi piometra (n=6) os níveis séricos de PCR foram observados entre 0,00 e 174,62 µg/mL. Resultados semelhantes foram relatados por Kjelgaard Hansen (2003b), Parra e colaboradores (2005a e 2006a). Embora o aumento na PCR ocorra rapidamente após estímulos inflamatórios e esteja relacionado com a extensão e severidade do processo inflamatório (Yamamoto *et. al.*, 1994; Otabe *et. al.*, 2000), na rotina diagnóstica o seu uso é bastante limitado, especialmente devido ao alto custo.

A VHS, por outro lado, embora seja um teste inespecífico, mostrou resultados interessantes que, associados ao baixo custo, rapidez e facilidade de execução, deve ser considerado na prática clínica. A elevação da VHS foi observada em 82,56% dos animais sendo o marcador do processo inflamatório mais sensível encontrado no estudo. Houve diferença significativa entre os animais saudáveis e doentes. Sabe-se que a VHS permanece elevada durante todo o processo inflamatório/infeccioso, pois é influenciada pela concentração das PFAs, como o Fib e a PCR (Schutze 2000). Entretanto, pode ser influenciada por outros fatores como a presença de anemia e mudanças morfológicas dos eritrócitos, o que não ocorre com a concentração das PFAs (Kaneko e Smith, 1967). Levando-se em conta esses interferentes, a VHS pode ser utilizada tanto para diagnóstico como para monitoramento do processo inflamatório/infeccioso (Lanzara *et. al.*, 2001). Cabe ressaltar a praticidade e precisão de sua determinação em sistema automatizado, que pode representar agilidade e melhora da qualidade dos resultados.

Os dados da literatura quanto à dosagem sérica de IL-6 em cães são escassos. Yamashita e colaboradores (1994) relataram em cães aumento da atividade sérica de algumas citocinas, como IL-6 e TNF α em células em cultura e essa elevação precedeu o aumento da concentração das PFAs. No grupo de cães doentes os níveis séricos de IL-6 foram mais elevados do que nos saudáveis, o que era esperado. Entretanto, somente 36% dos animais com inflamação apresentaram valores acima do normal. Esse dado pode ser explicado pela própria dinâmica de atuação da IL-6 durante a resposta aguda: ela é secretada por diversas células, como fagócitos mononucleares, células endoteliais

vasculares, fibroblastos, entre outras. A sua liberação em resposta a um agente infeccioso ou infusão de TNF (fator de necrose tumoral) é seguida do aumento de síntese pelos hepatócitos de várias proteínas plasmáticas (as PFAs). Assim, a principal ação da IL-6 no processo inflamatório/infeccioso é indutora, o que ocorre na fase mais precoce da agressão. A partir desse estágio, o que é mais evidente é o aumento das proteínas sintetizadas em resposta a IL-6, como a PCR e depois o Fib (Abbas e Lichtman, 2005).

No presente trabalho os cães foram selecionados para o estudo à medida que foram encaminhados por seus responsáveis, mas sem um controle preciso do tempo de início do processo ou duração precisa do mesmo. Assim, a baixa frequência do aumento da IL-6 pode ser decorrente da existência de animais em que a fase de ascensão da IL-6 já tinha sido substituída pela elevação das PFAs mais tardias.

O estudo acompanhou a evolução dos sinais clínicos e parâmetros laboratoriais de um grupo de cães com provável diagnóstico de hemoparasitose (n=12). Os animais foram submetido a três coletas num intervalo de 3 semanas. As hemoparasitoses apresentam alterações clínicas semelhantes que incluem febre, epistaxes, anemia e trombocitopenia podendo culminar em pancitopenia. Sabe-se que o agente etiológico dessa enfermidade não é somente a *Ehrlichia* sp, mas outros parasitas como o *Anaplasma* sp, *Babesia* sp e *Bartonella* sp o que dificulta a conduta clínica e o diagnóstico. Muitas vezes o cão pode apresentar infecções conjuntas, já que a transmissão ocorre pelo mesmo vetor, o carrapato (Breitschwerdt, 2007).

A Babesiose e a Erliquiose são as hemoparasitoses mais comuns encontradas nos cães. A primeira possui apresentação clínica bastante variável. O processo inflamatório sistêmico é a principal característica (Welzl *et. al.*, 2001). A doença pode ser clinicamente classificada em duas formas: não complicada caracterizada por palidez de mucosas, febre, anorexia, depressão e esplenomegalia (Taboada e Merchant, 1991) e complicada composta pelo desenvolvimento de falência renal e hepática, alterações neurológicas e respiratórias e choque (Lobetti *et. al.*, 2000). As reações de fase aguda em cães naturalmente infectados

por *Babesia spp* foram pouco descritas, mas observaram-se níveis aumentados de PFAs (Matijatko *et. al.*, 2002, Lobetti *et. al.*, 2000).

A Erliquiose é causada por bactérias intracelulares obrigatórias, várias espécies de *Erlichia* podem infectar os cães (Souza, 2006). A doença pode se apresentar com três fases: aguda, subclínica e crônica. Os sinais aparecem após um período de incubação de uma a três semanas. Entre as alterações clínicas encontram-se febre, depressão, dispnéia, anorexia, linfadenopatia e perda de peso. Os achados laboratoriais mais característicos são trombocitopenia, leucopenia e anemia (revisado por Rikihisa *et. al.*, 1994).

O quadro evolutivo observado no estudo foi característico, pois após a primeira coleta os animais foram submetidos a tratamento. Dessa forma, os cães apresentaram melhora do quadro clínico e laboratorial. Não foi possível realizar o acompanhamento da concentração sérica de PCR e IL-6, mas a primeira coleta apresentou valores elevados de ambos os marcadores da resposta inflamatória, concordando com outros estudos realizados com cães positivos para hemoparasitoses (Rikihisa *et. al.*, 1994, Matijatko *et. al.*, 2002, Ulutas *et. al.*, 2005).

6- CONCLUSÕES

- Novas metodologias foram testadas na avaliação da RFA em cães e os resultados mostraram que:

- A dosagem de Fib pelo método de precipitação pelo calor pode ser substituída pela obtida pelo método de Clauss automatizado;

- A determinação da VHS em equipamentos automatizados, comparada a técnica manual de Wintrobe, é mais rápida e apresenta resultados mais precisos;

- A contagem diferencial de leucócitos obtida pelos equipamentos hematológicos automatizados testados não substitui a contagem manual à microscopia.

- Avaliação dos marcadores inflamatórios:

- A determinação da VHS apresentou a melhor acurácia na detecção do processo inflamatório/infeccioso;

- Na análise global os níveis de IL-6, PCR e Fib foram superiores no grupo inflamatório/infeccioso, mas mostraram eficácia limitada na detecção individual de cães doentes;

- Cães com processo inflamatório mostraram uma resposta mais exacerbada, tanto nas determinações sorológicas/plasmáticas como nos parâmetros hematológicos, do que os cães com processo predominantemente infeccioso.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H. Citocinas. In: _ Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: 5ªed., Elsevier, 2005, cap. 11, p.251-282.
2. Andrews, D.A.; Reagan, W.J.; DeNicola, D.B. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. Continuing education for the practicing veterinarian 1994, 16(10):1349-1357.
3. Barton, B.E. Molecule of the month IL-6: Insights into novel biological activities. Clinical immunology and immunopathology 1997, 82(1): 16-20.
4. Baumann, H.; Gauldie, J. The acute phase response. Immunology Today 1994; 15(2): 74-80.
5. Breitschwerdt, E.B. Clinician's Causation and Infectious Diseases. Southern European Veterinary Conference (SEVC) and Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales (AVEPA). Barcelona, Espanha, 2007. Publisher: SEVC-AVEPA (www.sevc.info). Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 21-Oct-2007.
6. Bonagura, J.D. & Twedt, D.C. Kirk's Current veterinary therapy XIV. Philadelphia: 14ªed. Saunders, 2008, 1440p.
7. Caspi, D.; Baltz, M.L.; Snel, F.W.; Gruys, E.; Niv, D.; Batt, R.M.; Munn, E.A.; Buttress, N.; Bennett, D.; Pepys, M.B. Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. Immunology 1984, 53: 307-313.
8. Caspi, D.; Snel, F.W.; Batt, R.M.; Bennett, D.; Rutteman, G.R.; Hartman, E.G.; Baltz, M.L.; Gruys, E.; Pepys, M.B. C-reactive protein in dogs. American Journal of Veterinary Research 1987, 48: 919-21.

9. Cerón, J.J.; Eckersall, P.D.; Martínez-Subiela, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology* 2005, 34(2): 85-99.
10. Cheryk, L.A.; Hayes, M.A.; Gentry, P.A. Modulation of bovine platelet function by C-reactive protein. *Veterinary immunology and immunopathology* 1996, 52:27-36.
11. Cole, J.L.; Marzec, U.M.; Gunthel, C.J.; Karpatkin, S.; Worford, L.; Sundell, J.B.; Lennox, J.L.; Nichol, J.L.; Harker, L.A. Ineffective platelets production in thrombocytopenic human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 1998, 91:3239-3246.
12. Conner, J.G.; Eckersall, P.D.; Ferguson, J.; Douglas, T.A. Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science* 1988, 45: 107-110.
13. De Jonge, N.; Sewkaransing, I.; Slinger, J.; Rijdsdijk, J.J.M. Erythrocyte sedimentation rate by the Test-1 Analyzer. *Clinical Chemistry* 2000, 46(6): 881-882.
14. Dewhurst, E.C.; Crawford, E.; Cue, S.; Dodkin, S.; German, A.J.; Papasouliotis, K. Analysis of canine and feline haemograms using the Vet Scan HMT analyser. *J. Small Anim. Pract.* Oct 44(10):443-448, 2003.
15. Dunn, J.K. Febre e hipotermia. In: _ Tratado de Medicina de Pequenos Animais. 1ªed. São Paulo: Roca; 2001, cap.28, p.28-38.
16. Eckersall, P.D.; Conner, J.G.; Parton, H. A turbidimetric immunoassay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications* 1991, 15: 17-24.
17. Eckersall, P.D. Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Irish Veterinary Journal* 2000, 53(6): 307-311.

18. Eckersall, P.D. The time is right for acute phase protein assays. *The Veterinary Journal* 2004, 168: 3-5.
19. EK, N. The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cow with inflammatory conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* 1972, 13:174-184.
20. Estrov, Z.; Talpaz, M.; Mavligit, G.; Pazdur, R.; Greenberg, S.M.; Kurzrock, R. Elevated plasma thromboetic activity in patients with metastatic cancer-related thrombocytosis. *Am. J. Med.* 1995, 98:551-558.
21. Feldman, B.F.; Kaneko, J.J.; Farver, T.B. Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. *Am. J. Vet. Res.* 1981, 42(7):1109-1113.
22. Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5^a ed., Baltimore: Ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 1380p.
23. Fujise, H.; Takanami, H.; Yamamoto, M.; Ohta, I.; Yamamoto, s.; Fukase, T.; Naiki, M.; Akihama, S.; Ogawa, E.; Takahashi, R. Simple isolation of canine C-reactive protein (CRP) by phosphorylcholine (PC) affinity chromatography. *J. Vet. Med. Sci.* 1992, 54(1):165-167.
24. Gabay, C.; Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England Journal of Medicine* 1999; 11: 448-53.
25. Gotschlich, E.; Stetson, C.A. Immunologic cross-reaction among mammalian acute phase proteins. *J. Exp. Med.* 1960, 111:441.
26. Grotto, H.Z.W.; Borba, R.; Noronha, J.F.A.; Bertozzi, L.C. Measurement of C-reactive protein by Micros CRP: Its use in an Emergency Department. *Laboratory Hematology* 2002, 8: 17-21.

27. Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University Science*, 2005, 6B(11):1045-1056.
28. Gutiérrez, A.M.; Martínez-Subiela, S.; Eckersall, P.D.; Cerón, J.J. C-reactive protein qualification in porcine saliva: A minimally invasive test for pig health monitoring. *The Veterinary Journal* 2008b, doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.021 (acesso 21/03/08).
29. Gutiérrez, A.M.; Martínez-Subiela, S.; Montes, A.; Parra, M.D.; Cerón, J.J. C-reactive measurements in meat juice of pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008a, 122: 250-255.
30. Hameed, M.A.; Waqas, S. Physiological basis and clinical utility of erythrocyte sedimentation rate. *Pak. J. Med. Sci.* 2006, 22(2): 214-218.
31. Harr, K. E. Diagnosis of systemic inflammatory disease in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) [dissertation]. Florida: University of Florida, 2004.
32. Hayashi, S.; Jinbo, T.; Iguchi, K.; Shimizu, M.; Shimada, T.; Nomura, M.; Ishida, Y.; Yamamoto, S. A comparison of the concentration of C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary Research Communication* 2001; 25: 117-26.
33. Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H.M.; Müller-Newen, G.; Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signaling and its regulation. *Biochem. J.* 2003, 374: 1-20.
34. Hoshiya, T.; Watanabi, D.; Matsuoka, T.; Horiguchi, K.; Miki, Y.; Mizuguchi, H.; Ishii, T.; Nomura, N.; Nagashima, Y.; Okaniwa, A. Acute phase response in toxicity studies II. Findings in beagles dogs injected with endotoxin or subjected to single-dose toxicity studies. *The Journal of Toxicological Sciences* 2001a; 26(2): 95-102.
35. Hoshiya, T.; Watanabi, D.; Matsuoka, T.; Horiguchi, K.; Miki, Y.; Mizuguchi, H.; Ishii, T.; Nomura, N.; Nagashima, Y.; Okaniwa, A. Acute phase response in toxicity

studies II. Findings in beagles dogs injected with endotoxin or subjected to surgical operation. *The Journal of Toxicological Sciences* 2001b; 26(2): 103-09.

36. Hultén, C.; Tulamo, R.-M.; Suominen, M.M.; Burvall, K.; Marhaug, G.; Forsberg, M. A non-competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999, 68:267-281.
37. Jain, N.C. Interpretation of Leukocyte Parameters. In:___ *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: 5^aed. Lea & Febiger; 1993a, cap.18, p.295-306.
38. Jain, N.C. The plasma proteins, dysproteinemias and immune deficiency disorders. In:___ *Essentials of Veterinary Hematology*. Philadelphia: 5^aed. Lea & Febiger; 1993b, cap.21, p.349-380.
39. Jaye, D.L.; Waites, K.B. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 1997, 16(8):735-747.
40. Jensen, T.; Halvorsen, S.; Godal, H.C.; Sandset, P.M.; Skjønberg, O. H. Discrepancy between fibrinogen concentrations determined by clotting rate and clottability assays during the acute-phase reaction. *Thrombosis research* 2000, 100:397-403.
41. Kajikawa, T.; Furuta, A.; Onishi, T.; Tajima, T.; Sugii, S. Changes in concentration of serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999; 68: 91-8.
42. Kaneko, J.J.; Smith, R. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. *The California Veterinarian*. 1967 21(8):21-24.
43. Kaneko, J.J. Serum proteins and dysproteinemias. In:___ *Clinical Biochemistry of domestic animals*. New York: 5^aed. Academic Press; 1997, cap.5, p. 117-138.

44. Kenis, G.; Teunissen, C.; De Jongh, R.; Bosmans, E.; Steinbusch, H.; Maes. Stability of interleukin 6, soluble interleukin 6 receptor, interleukin 10 e CC16 in human serum. *Cytokine*, 2002, 19(5): 228-235.
45. Kjelgaard-Hansen, M.; Jensen, A.L.; Kristensen, A.T. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of C-reactive protein in canine serum. *J. Vet. Med. A* 2003a; 50:164-8.
46. Kjelgaard-Hansen, M.; Jensen, A.L.; Kristensen, A.T. Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Veterinary Clinical Pathology* 2003b; 32(2): 81-7.
47. Klinger, M.H.F.; Jelkmann, W. Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of interferon & cytokine research* 2002, 22:913-922.
48. Kuribayashi, T.; Shimada, T.; Matsumoto, M.; Kawato, K.; Honjyo, T.; Fukuyama, M.; Yamamoto, Y.; Yamamoto, S. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Exp. Anim.* 2003; 52(5): 387-90.
49. Laffan, M.A.; Manning, R.A. Investigation of haemostasis. In: Lewis, S.M.; Bain, B.J.; Bates, I. *Dacie and Lewis Practical*. 9^aed. London: Churchill Livingstone; 2001, cap.16, p.339-390.
50. Lanzara, G.A.; Provenza, J.R.; Bonfiglioli, R. Velocidade de hemossedimentação (VHS) de segunda hora: qual o seu valor? *Revista Brasileira de Reumatologia* 2001; 41(4): 237-41.
51. Lee, W.; Hsiao, H.; Wu, Y.; Lin, J.; Lee, Y.; Fung, H.; Chen, H.; Chen, Y.; Chu, R. Serum C-reactive protein in dairy herds. *The Canadian Journal of Veterinary Research* 2003, 67: 102-107. Leeuwen, M.A.V.; Rijswijk, M.H. Acute phase proteins

- in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillière's Clinical Rheumatology* 1994, 8(3): 531-552.
52. Lewis, S.M.; Bain, B.J.; Bates, I. *Dacie e Lewis Practical Hematology*. Nova Iorque: Churchill Livingstone, 9ªed., 2006, 736p.
53. Lind, L. Circulating markers of inflammation and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003, 169(2):203-214.
54. Lobetti, R.G.; Mohr, A.J.; Dipnaar, T.; Myburgh, E. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 2000, 71:38-42.
55. Marnell, L.; Mold, C.; Clos, T.W.D. C-reactive protein: Ligands, receptors and role in inflammation. *Clinical Immunology* 2005; 117: 104-11.
56. Martínez-Subiela, S.; Cerón, J.J. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Vet. Med.* 2005, 50(1): 39-46.
57. Martínez-Subiela, S.; Ginel, P.J.; Cerón, J.J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase protein in dogs. *Veterinary Record* 2004, 154: 814-817.
58. Martínez-Subiela, S.; Tecles, F.; Eckersall, P.D.; Cerón, J.J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *The Veterinary Record* 2002; 150(23): 241-4.
59. Martínez-Subiela, S.; Tecles, F.; Parra, M.D.; Cerón, J.J. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria*. (Murcia) 2001, 17: 99.
60. Matijatko, V.; Kucer, N.; Baric Rafaj, R.; Forsek, J.; Kis, I.; Potocnjak, D.; Razdorov, G.; Mrljak, V. CRP concentration in dogs with uncomplicated and

complicated babesiosis. In: Proceedings of the third European Colloquim on food safety an acute phase proteins, Doorn, 2002.

61. Matijatko, V.; Mrljak, V.; Kis, I.; Kucer, N.; Forsek, J.; Zivicnjak, T.; Romic, Z.; Simec, Z.; Cerón, J.J. Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Veterinary Parasitology* 2007, 144: 242-250.
62. Maudsley, S.; Pepys, M.B. Immunochemical cross-reactions between pentraxins of different species 1987, 62:17-22.
63. McGrotty, Y.L.; Knottenbelt, C.M.; Ramsey, I.K.; Reid, S.W.J.; Eckersall, P.D. Evaluation of a rapid assay for canine C-reactive protein. *The Veterinary Record* 2004; 154(7): 175-6.
64. McSherry, B.J.; Hourney, F.D.; deGroot, J.J. Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Canadian Journal Comparative Medicine* 1970, 34(7):191-197.
65. Millar, H.R.; Simpson, J.G.; Stalker, A.L. An evaluation of heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *Journal of Clinical Pathology* 1971, 24:827-830.
66. Mischke, R.; Menzel, D.; Wolling, H. Comparison of different methods to measure fibrinogen concentration in canine plasma with respect to their sensitivity towards the fibrinogen degradation products X, Y and D. *Haemostasis* 2000, 30:131-138.
67. Mischke, R.; Waterston, M.; Eckersall, P.D. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *The Veterinary Journal* 2007, 174:188-192.
68. Moshage, H. Cytokines and the hepatic acute phase response. *Journal of pathology* 1997, 181:257-266.
69. Murata, H.; Shimada, N.; Yoshioka, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal* 2004, 168: 28-40.

70. Naka, T.; Nishimoto, N.; Kishimoto, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis Res.* 2002, 4(suppl 3): S233-S242.
71. Ndung'u, J.M.; Eckersall, P.D.; Jennings, F.W. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Tropica* 1991, 49: 77-86.
72. Olshaker, J.S.; Jerrard, D.A. The erythrocyte sedimentation rate. *J. Emerg. Med.* 1997, 15: 869-74.
73. Onishi, T.; Shimizu, T.; Kajikawa, T. Simple and efficient purification of C-reactive protein from canine serum. *The Journal of Veterinary Medical Science* 1994, 22: 77-85.
74. Otabe, K.; Sugimoto, T.; Yamamoto, S. C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Lab. Anim.* 2000, 34: 434-38.
75. Otabe, K.; Sugimoto, T.; Jinbo, T.; Honda, M.; Kitao, S.; Hayashi, S.; Shimizu, M.; Yamamoto, S. Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Veterinary Research Communications* 1998; 22: 77-85.
76. Parra, M.D.; Tuomota, M.; Cabezas-Herrera, J.; Cerón, J.J. Use of time-resolved immunofluorometric assay for canine C-reactive protein in whole blood. *American Journal of Veterinary Research* 2005a, 66(1): 62-66.
77. Parra, M.D.; Väisänen, V.; Cerón, J.J. Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Veterinary Research* 2005b, 36: 117-129.
78. Parra, M.D.; Tuomota, M.; Cabezas-Herrera, J.; Cerón, J.J. Analytical and clinical validation of time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Veterinary Research Communications* 2006a, 30: 113-26.

79. Parra, M.D.; Fuentes, P.; Tecles, F.; Martínez-Subiela, S.; Martinez, J.S.; Muñoz, A.; Cerón, J.J. Porcine acute phase protein concentrations in different disease in field conditions. *J. Vet. Med. B* 2006b, 53: 488-493.
80. Pastor, J.; Cuenca, R.; Velarde, R.; Viñas, L.; Lavin, S. Evaluation of a hematology analyzer with canine and feline blood. *Vet. Clin. Pathol.* 26(3):138-147, 1997.
81. Pepys, M.B. e Baltz, M.L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxine) and seruma amyloid A protein. *Adv. Immunol.*, 1983, 34:141-212.
82. Pepys, M.B. e Hirschfield, G.M. C-reactive protein: a critical update. *The Journal of Clinical Investigation* 2003, 111(12): 1805-1811.
83. Plebani, M., Piva, E. Erythrocyte sedimentation rate Use of fresh blood for quality control. *Am. J. Clin. Pathol.* 2002, 117:621-626.
84. Plebani, M.; De Toni, S.; Sanzari, M.C.; Beranardi, D.; Stockreober, E. The TEST 1 automated system: a new method dor measuring the erythrocyte sedimentation rate. *American Journal of Clinical Pathology* 1998, 110: 334-340.
85. Rikihisa, Y.; Yamamoto, S.; Kwak, I.; Iqbal, Z.; Kociba, G.; Mott, J.; Chichanasiriwithaya, W. C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Erlichia canis*. *Journal of Clinical Microbiology* 1994; 32(4): 912-17.
86. Roleff, S.; Arndt, G.; Bottema, B.; Grabner, A.; Kohn, B. Clinical evaluation of the CA530-VET hematology analyzer for use in veterinary practice. *Vet. Clin. Pathol.* Jun 36(2):155-166, 2007.
87. Romano, M.; Sironi, M.; Toniatti, C.; Polentarutti, N.; Fruscella, P.; Ghezzi, P.; Faggioni, R.; Luini, W.; van Hinsbergh, V.; Sozzani, S.; Bussolino, F.; Poli, V.; Ciliberto, G.; Mantovani, A. Role of Il-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997, 6: 315-325.

88. Romero, A.; Munoz, M.; Ramirez, G. Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the test 1 ESR System with the ICSH reference method and the Sedisystem 15. *Clinical Chemistry Laboratory Medicine* 2003, 41: 232-237.
89. Santos, V.M.; Cunha, S.F.C.; Cunha, D.F. Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev. Ass. Méd. Brasil* 2000; 46(3): 232-6.
90. Schalm, O.W. Plasma protein: fibrinogen rations in disease in the dog and horse – Part II. *The California Veterinarian*. 1970, 24(4): 19-22.
91. Schalm, O.W.; Jain, N.C.; Carrol, E.J. *Veterinary Hematology*. 3^aed., Philadelphia: Lea & Febiger, p. 609; 1975.
92. Schalm, O.W.; Smith, R.; Kaneko, J.J. Plasma protein: fibrinogen rations in dogs, cattle and horses – Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. *The California Veterinarian*. 1970, 24(2): 09-10.
93. Schutze, A.E. Interpretation of canine leukocyte responses. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5^aed., Philadelphia: Lippincott Willian & Wilkins, 2000, cap. 55, p. 366-381.
94. Scott, K.D.; Oppenheim, J.J. Proinflammatory cytokines and immunity. In: Paul, W.E. *Fundamental Immunology*. 3^aed. New York: Raven Press; 1993, cap.21, p.801-836.
95. Shin, I.; Kim, H.; Nam, M.; Youn, H. Studies of cocktail therapy with multiple cytokines for neoplasia or infectious disease of the dog I. cDNA cloning of canine IL-3 and IL-6. *J. Vet. Sci.* 2001, 2(2): 115-120.
96. Silbernagl, S.; Lang, F. *Fisiopatologia Texto e Atlas*. Porto Alegre: Artmed, 1^aed., 2006, 406p.

97. Sorensen, N.S., Tegmeier, C., Andresen, L.O., Piñeiro, M., Toussaint, M.J.M., Campbell, F.M., Lampreave, F., Heegaard, P.M.H. The porcine acute phase response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006, 113: 157-168.
98. Souza, V.R.F. Avaliação clínica, morfológica, hematológica, bioquímica e biomolecular de cães naturalmente infectados por *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys*. http://bdtd.ufrj.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=85 Acesso: 04.02.2007.
99. Steel, D.M.; Whitehead, A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. 1994, 15(2):81-88.
100. Streetz, K.L.; Wüstefeld, T.; Klein, C.; Manns, M.P.; Trautwein, C. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cellular and Molecular Biology*. 2001, 47(4): 661-673.
101. Sutton, R.H.; Hobman, B. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *New Zealand Veterinary Journal*. 1975, 23(3): 21-27.
102. Sutton, R.H.; Johnstone, M. The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *The Journal of Small Animal Practice*. 1977, 18: 277-281.
103. Taboada, J.; Merchant, S.R. Babesiosis of companion animals and man. *Vet. Clin. North Am. Small Pract*. 1991, 21:103-123.
104. Tagata, K.; Yokohama, S.; Ginbo, T.; Honda, M.; Okimura, T.; Odakura, M.; Nomura, M.; Yamamoto, S. Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary Research Communication*, 1996, 20: 20-31.

105. Tamzali, Y.; Guelfi, J.F.; Braun, J.P. Plasma fibrinogen measurement in the horse: comparison of Millar's technique with a chronometric technique and the QBC-Vet Autoreader. *Research in Veterinary Science* 2001, 71:213-217.
106. Tecles, F.; Martínez-Subiela, S.; Petrucci, G.; Gutiérrez Panizo, C.; Cerón, J.J. Validation of a commercially available human immunoturbidimetric assay for haptoglobin determination in canine serum samples. *Veterinary research communications*, 2007a, 31: 23-36.
107. Tecles, F.; Fuentes, P.; Martínez-Subiela, S.; Parra, M.D.; Muñoz, A.; Cerón, J.J. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in Veterinary Science* 2007b, 83: 133-139.
108. Tecles, F.; Spiranelli, E.; Bonfanti, U.; Céron, J.J.; Paltrinieri, S. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Vet Intern Med.* 2005, 19(6): 865-70.
109. Terata, H.; Baldini, M.; Ebbe, S.; Madoff, M.A. Interaction of *Influenza* virus with blood platelets. *Blood* 1966, 28:213-228.
110. Tilet, W.S.; Francis, T. J. Serological reactions in pneumonia with a non-protein fraction of pneumococcus. *J. Exp. Med.* 1930, 52:561-571.
111. Thomas, J.S. Overview of plasma proteins. In: Feldman, B.F.; Zinkl, J.G.; Jain, N.C. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5thed. Philadelphia: Lippincott William & Wilkins; 2000, cap 134, p.891-898.
112. Ulutas, B.; Bayramli, G.; Ulutas, P.A.; Karagenc, T. Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. *Veterinary Clinical Pathology* 2005, 34(2): 144-147.
113. van Leeuwen, M.A.; van Rijswijk, M.H. Acute phase proteins in the monitoring of inflammatory disorders. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1994 Aug;8(3):531-552.

- 114.Veiga, A.P.M.; Price, C.A.; Oliveira, S.T.; Santos, A.P.; Campos, R.; Barbosa, P.R.; González, F.H.D. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008, 20:224-228.
- 115.Welzl, C.; Leisewitz, A.L.; Jacobson, L.S.; Vaughan-Scott, T.; Myburgh, E. Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2001, 72:158-162.
- 116.Willerson, J.T. Systemic and local inflammation in patients with unstable atherosclerotic plaques. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2002, 44(6):469-478.
- 117.Yamamoto, S.; Abe, N.; Santsuka, H.; Shida, T.; Kishida, K.; Kuwajima, S.; Yamada, M.; Morimatsu, M.; Naiki, M. Efficient preparation of monospécific anti-canine C-reactive protein serum and purification of canine C-reactive protein by affinity chromatography. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1993, 36(3): 293-301.
- 118.Yamamoto, S.; Tagata, K.; Nagahata, H.; Ishikawa, Y.; Morimatsu, M.; Naiki, M. Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1992, 30(4): 329-39.
- 119.Yamashita, K.; Fujinaga, T.; Miyamoto, T.; Magio, M.; Izumikawa, Y.; Kotani, T. Canine acute phase response: Relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *Journal Veterinary Medicine Science* 1994, 56: 487-492.

8- ANEXOS

Anexo 1: Grupo controle (n=31) - Resultados individuais (globais, valores de Fib, VHS, PCR e IL-6) dos cães saudáveis, separados por sexo.

N°	SEXO	T °C	AbcVet			Micros			Pentra			m	Aut	m	Aut	Aut	ELISA	ELISA	Manual Desvio à esquerda	Pentra FLAG
			Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	F mg/dL	F mg/dL	VHS mm	VHS mm	PCR µg/mL	PCR µg/mL	IL-6 pg/mL		
22	F	38,9	14,1	16	382	14,2	16,2	351,5	13,3	15,9	377,5	100	75	6	8	0	1	0	-	-
50	F	39	9,4	18,1	344,5	8,4	15,6	308	8,4	16,4	353	100	177	2	2	0	1,258	0	-	-
52	F	38,7	11,2	14,7	365,5	10	12,5	351	9,3	13,4	380,5	300	379	9	7	0	13,931	44,104	-	-
64	F	38,7	11,6	16	325	11	13,6	298	8,7	14,3	325	200	297	0	2	0	0,786	0	-	-
66	F	38,3	10,9	16,3	305,5	10,5	14,1	197	9,3	14,9	254	100	177	1	2	0	1,377	20,319	-	-
67	F	38,3	14,2	13,3	664,5	13,1	11,4	623	12,2	11,9	675	200	297	0	2	0	2,115	0	-	-
68	F	38,4	15,6	13,5	361,5	15,2	9,7	322	14,3	11,6	356,5	300	345	2	2	0	3,119	0	-	-
75	F	38,1	8,2	16,8	581,5	6,8	13,7	483	6,8	14,4	556	200	242	0	2	0	1,072	0	-	-
76	F	39,1	15,9	18,1	372,5	15,2	15	353	14,3	15,6	407	400	127	0	2	0	5,016	0	-	+
78	F	38	13,5	16,1	433	14,3	14,3	380	12,4	15,2	458	300	313	0	3	0	1,161	0	-	+
87	F	38	6,9	15,1	231	6,6	13	211	6,8	13,9	232	200	194	0	2	0	1,347	0	-	-
89	F	38,3	9,3	16,8	226	8,4	14,4	207	8,2	15,1	214,5	200	252	1	2	0	2,073	0	-	-
18	M	38,7	16,4	13,7	580,5	14,7	14,1	292,5	13,7	13,7	302,5	100	191	0	2	0	1,411	0	-	-
23	M	38,8	16,8	17,8	310,5	15,7	18,2	311,5	14,7	17,5	309,5	200	203	4	8	0	1,179	0	-	-
26	M	38,8	16,8	17	379,5	15,4	16,6	331	14,9	16,8	379	400	289	6	10	0	0,714	3,223	-	+
38	M	39	12,2	18,4	237,5	11,2	15,7	250	10,6	16,4	221,5	300	282	1	2	0	2,008	35,185	-	-
39	M	38,8	10,9	16,4	230	11,9	14	229	10,9	15,2	219	200	163	0	2	0	2,165	0	-	+
40	M	38,8	7,7	16,9	200	8,5	14,7	205	7,8	15,5	204	200	209	1	2	0	2,858	0	-	-
41	M	39,2	9,8	18,3	210	10,8	16	205	10,2	16,6	213	400	192	2	2	0	1,119	0	-	+
42	M	38,9	14,4	15,5	289	14	13,3	268	13,1	14,3	289	100	286	0	2	0	0,685	0	-	+
43	M	39,3	8,4	17,9	216	8,6	15,5	187	7,6	16,2	215	400	142	2	2	0	1,05	0	-	-
44	M	39,2	8,2	17,2	200	8,2	14,6	198	7,9	15,7	203	200	182	1	2	0	1,801	0	-	+
45	M	39,2	13,2	17,3	210	12	14,7	175	10,9	15,7	208,5	400	150	2	2	0	1,671	0	-	+
46	M	39	7,5	16,6	240,5	6,8	13,8	226	6,6	15,5	242	100	179	2	2	0	0,657	47,077	-	+
47	M	39,1	11,4	18,5	254,5	10,9	16,2	222	9,8	17,2	257,5	300	244	2	2	0	2,748	44,848	-	+
48	M	39,1	9,4	17,3	200	8,5	14,8	176	7,2	15,9	203,5	300	217	2	2	0	3,002	40,388	-	+
51	M	38,4	10,2	16	413,5	9,1	13,7	373	9	14,7	418	300	305	3	3	0	3,079	0	-	+
62	M	39	10,2	17,9	207	NR	NR	NR	8,4	16,2	207	300	257	2	2	0	0	0	-	-
65	M	39,1	8,1	16,6	200	6,9	12,7	176	7,5	15	208	200	153	0	2	0	1,606	0	-	-
74	M	38,5	11,5	19,4	270	10	16,5	240	9,9	17,4	314	200	165	0	2	0	0,822	0	-	-
82	M	38	10,5	14,9	371	9,7	12,4	351	9,6	13,7	389	100	237	6	9	0	0,765	0	-	+

Anexo 2: Grupo controle (n=31) - Resultados individuais (contagem diferencial de leucócitos) dos cães saudáveis, separados por sexo.

		Abc Vet				Micros				Pentra								Manual					
Nº	SEXO	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRAN	LIN	MON	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA			
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%			
22	F	39,65	13,80	46,55	33,60	23,50	42,90	22,45	4,25	50,75	22,10	0,45	73,30	17,00	5,00	0,00	49,00	29,00	0,00	78,00			
50	F	31,70	17,45	50,85	41,20	34,00	24,80	20,20	4,05	74,20	1,25	0,30	75,75	20,00	6,00	0,00	57,00	17,00	0,00	74,00			
52	F	30,50	17,10	52,40	49,70	29,90	20,40	20,80	5,40	70,40	2,60	0,80	73,80	24,00	5,00	0,50	61,50	9,00	0,00	71,00			
64	F	35,40	21,00	43,60	39,10	34,60	26,30	20,55	4,05	74,80	1,55	0,55	76,90	21,00	4,50	1,00	67,00	6,50	0,00	74,50			
66	F	36,50	20,70	42,80	56,30	30,20	13,50	16,85	5,65	74,80	1,50	1,20	77,50	16,00	6,50	0,50	68,00	9,00	0,00	77,50			
67	F	35,45	19,65	44,90	50,60	32,40	17,00	18,15	2,55	77,75	1,05	0,50	79,30	19,50	9,50	0,50	76,50	4,50	0,00	81,50			
68	F	35,90	17,85	46,20	57,60	26,90	15,50	24,55	3,50	70,15	1,15	0,65	71,95	26,50	6,50	1,00	60,50	5,50	0,00	67,00			
75	F	34,90	19,60	45,50	36,80	36,60	26,60	14,50	5,30	78,00	1,60	0,60	80,20	17,00	3,00	0,00	74,00	6,00	0,00	80,00			
76	F	42,60	18,00	39,40	41,50	25,70	32,80	27,20	5,75	64,60	1,45	1,00	67,05	27,00	9,00	1,00	55,00	8,00	0,00	64,00			
78	F	36,90	17,30	45,80	39,90	30,30	29,80	22,30	6,70	67,40	2,10	1,50	71,00	17,00	6,00	0,00	69,00	8,00	0,00	77,00			
87	F	32,50	15,90	51,60	41,00	29,50	29,50	26,70	7,75	62,60	1,10	1,85	65,55	21,00	6,00	0,00	59,00	14,00	0,00	73,00			
89	F	36,95	18,45	44,60	61,90	27,00	11,10	16,40	2,40	78,55	1,95	0,70	81,20	15,50	3,50	0,50	71,00	9,50	0,00	81,00			
18	M	40,15	17,75	42,10	35,15	30,55	34,30	15,00	5,95	68,35	9,90	0,80	79,05	21,00	4,00	0,00	58,00	17,00	0,00	75,00			
23	M	41,70	13,65	44,65	26,00	22,50	51,50	16,70	4,85	74,10	2,25	2,10	78,45	12,00	6,50	1,00	56,00	24,00	0,00	81,00			
26	M	44,90	14,25	40,85	30,40	24,40	45,20	20,45	5,85	71,30	1,90	0,50	73,70	20,00	6,00	1,00	49,00	24,00	1,00	74,00			
38	M	45,30	18,65	36,05	31,40	39,30	29,30	16,45	3,00	78,90	0,65	1,00	80,55	17,50	7,00	0,50	70,50	4,50	0,00	75,50			
39	M	59,00	17,80	23,20	57,20	26,50	16,30	33,30	6,35	59,15	0,50	0,70	60,35	34,00	5,00	3,00	51,00	7,00	0,00	61,00			
40	M	53,85	17,95	28,20	58,40	25,20	16,40	33,50	5,85	59,50	0,50	0,65	60,65	31,00	9,50	0,00	53,00	6,50	0,00	59,50			
41	M	49,50	15,10	35,40	51,40	27,70	20,90	38,40	4,75	55,20	0,45	1,20	56,85	33,00	3,00	0,00	62,00	2,00	0,00	64,00			
42	M	49,50	19,35	31,15	56,30	28,10	15,60	31,70	5,10	61,65	0,90	0,65	63,20	26,00	8,00	1,00	64,00	1,00	0,00	66,00			
43	M	41,40	17,90	40,70	43,70	28,90	27,40	27,15	4,55	65,60	0,90	1,80	68,30	21,00	9,00	0,00	62,00	8,00	0,00	70,00			
44	M	51,90	17,40	30,70	55,10	24,70	20,20	34,80	4,55	58,55	0,90	1,15	60,60	30,00	5,00	1,00	55,00	9,00	0,00	65,00			
45	M	46,30	19,10	34,60	63,80	25,50	10,70	23,80	4,95	69,30	0,75	1,20	71,25	17,00	8,00	1,00	68,00	6,00	0,00	75,00			
46	M	49,30	19,55	31,15	63,60	25,10	11,30	24,65	4,70	68,85	0,60	1,20	70,65	26,00	5,00	3,00	58,00	8,00	0,00	69,00			
47	M	51,20	18,60	30,20	61,40	25,10	13,50	27,35	5,75	65,40	0,45	1,05	66,90	27,50	5,00	1,00	60,50	6,00	0,00	67,50			
48	M	57,10	18,05	24,85	63,90	24,80	11,30	22,10	3,65	71,10	0,80	2,35	74,25	22,00	3,50	1,50	65,50	7,50	0,00	74,50			
51	M	32,50	16,10	51,40	39,80	29,80	30,40	21,85	5,90	70,85	1,05	0,35	72,25	24,00	6,50	1,00	57,00	11,50	0,00	69,50			
62	M	34,05	17,00	48,95	NR	NR	NR	15,25	5,65	76,65	0,55	1,90	79,10	12,50	10,00	0,00	60,00	18,00	0,00	78,00			
65	M	39,65	18,55	41,80	43,70	32,80	23,50	20,40	5,45	72,50	1,10	0,55	74,15	20,50	5,50	0,00	59,50	14,50	0,00	74,00			
74	M	34,00	17,90	48,10	27,80	31,00	41,20	14,50	4,35	79,60	0,95	0,60	81,15	17,00	5,00	0,00	62,00	16,00	0,00	78,00			
82	M	46,90	19,20	34,10	26,90	21,50	51,60	21,15	5,90	68,80	2,05	2,10	72,95	20,00	5,50	0,00	63,50	5,50	0,00	69,00			

Anexo 3: Grupo com processo inflamatório/infeccioso (n=86) - Resultados individuais (globais, valores de Fib, VHS, PCR e IL-6) dos cães , separados por sexo.

Nº	SEXO	T °C	AbcVet			Micros			Pentra			m	Aut	m	Aut	Aut	ELISA	ELISA	Manual Desvio à esquerda	Pentra FLAG
			Leuc 103/μL	HGB g/dL	PLT 103/μL	Leuc 103/μL	HGB g/dL	PLT 103/μL	Leuc 103/μL	HGB g/dL	PLT 103/μL	F mg/dL	F mg/dL	VHS mm	VHS mm	PCR μg/mL	PCR μg/mL	IL-6 pg/mL		
1a	F	38,5	16,3	14,8	245,0	15,8	15,6	230,5	14,6	15,1	253,0	100	175	19	11	0	5,190	11,153	+	+
3a	F	38,9	22,7	9,5	586,5	22,0	9,7	559,0	19,4	9,7	583,0	300	172	42	120	0	126,077	0,000	-	+
4a	F	38,2	12,2	11,5	159,5	13,3	11,9	149,0	11,6	11,7	171,0	800	325	17	33	0	18,103	0,000	-	+
6a	F	39,3	14,5	7,0	161,0	13,1	7,2	152,5	11,2	7,2	114,0	100	186	32	120	0	52,314	258,182	-	+
7a	F	38,7	12,1	12,9	283,0	13,0	13,5	251,0	9,7	13,1	215,5	200	282	25	26	0	6,368	322,308	-	-
9a	F	39,0	16,0	16,2	263,5	15,2	16,9	248,0	13,3	16,3	256,0	100	144	1	2	0	0,024	105,155	+	+
10a	F	39,5	16,9	13,0	178,0	17,6	13,6	168,0	15,5	13,4	147,5	400	247	35	34	0	54,337	11,153	-	+
13a	F	39,4	5,1	15,6	34,0	5,8	16,0	22,0	5,4	15,7	14,0	600	168	2	14	0	36,162	274,214	-	-
14a	F	38,5	8,8	11,5	138,0	8,4	11,8	113,5	7,9	11,6	120,5	500	345	12	26	0	53,344	695,402	-	-
16a	F	38,8	6,9	14,8	86,0	9,3	15,1	66,0	8,9	14,8	51,5	500	230	17	37	0	52,407	727,465	-	-
17a	F	38,5	10,4	12,6	272,5	9,6	12,9	251,5	8,6	12,7	215,5	100	211	21	27	0	22,031	11,153	+	-
19a	F	39,3	11,6	14,1	168,5	11,0	14,4	154,0	10,4	14,4	132,0	100	183	5	15	0	14,844	341,254	+	-
20a	F	39,4	21,0	9,7	103,5	21,4	10,1	94,0	19,2	10,0	97,0	300	286	36	60	0	47,544	44,603	+	+
21a	F	39,3	8,1	13,2	38,5	7,6	13,8	58,0	6,7	13,6	19,0	200	273	1	38	0	16,621	44,673	-	-
25a	F	38,7	7,7	12,0	184,5	8,3	12,2	169,0	7,8	12,0	175,5	200	187	33	62	0	39,295	11,153	+	-
27a	F	39,5	13,6	15,6	158,5	14,1	16,0	140,5	13,1	15,6	140,5	200	148	16	19	0	9,314	11,153	-	+
28a	F	39,1	16,9	14,6	144,5	17,4	14,9	103,0	15,7	14,5	105,0	300	201	28	53	0	0,000	21,115	-	-
30a	F	40,0	9,4	16,5	106,0	11,3	16,4	107,0	11,1	16,5	105,0	200	266	19	25	0	47,597	312,835	+	+
33a	F	39,0	4,9	12,1	39,5	4,9	12,5	15,0	4,5	12,4	16,0	200	273	40	83	0	15,920	970,122	-	-
34a	F	39,1	12,9	15,6	150,0	13,1	15,7	131,0	11,1	15,9	131,0	200	170	5	10	0	0,661	11,153	-	-
35a	F	38,9	12,1	11,0	285,0	10,2	9,3	257,5	9,5	10,2	305,0	400	288	1	25	0	63,395	0,000	-	+
36a	F	37,9	17,7	16,9	138,0	15,9	15,5	60,0	15,8	16,1	77,0	300	199	3	3	0	49,758	729,104	+	+
37a	F	38,5	9,8	8,2	70,0	NR	NR	NR	8,2	7,3	36,5	300	253	27	62	0	34,633	55,997	-	+

Nº	SEXO	T °C	AbcVet			Micros			Pentra			m	Aut	m	Aut	Aut	ELISA	ELISA	Manual Desvio à esquerda	Pentra FLAG
			Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	F mg/dL	F mg/dL	VHS mm	VHS mm	PCR µg/mL	PCR µg/mL	IL-6 pg/mL		
49a	F	38,3	17,3	7,6	295,0	14,6	6,4	316,0	13,2	6,8	340,5	400	350	32	99	0	29,654	21,115	+	+
54a	F	38,7	11,4	8,7	234,0	NR	NR	NR	11,3	8,0	194,0	400	368	33	120	0	48,113	806,165	-	-
58a	F	39,0	12,0	11,6	216,0	NR	NR	NR	11,2	10,7	215,0	700	413	6	12	0	32,013	849,158	-	-
61a	F	38,8	10,5	15,9	354,5	NR	NR	NR	9,3	14,5	347,5	300	286	16	18	0	42,346	698,317	-	-
63a	F	39,3	18,5	11,2	144,4	NR	NR	NR	17,7	10,4	114,5	1000	445	25	120	0	58,726	689,573	+	+
69a	F	38,4	21,4	13,1	385,5	17,7	11,1	368,0	16,6	12,0	405,0	400	361	32	44	0	8,164	14,797	+	+
70a	F	38,7	12,2	11,2	900,0	10,7	9,3	834,0	9,2	10,0	534,0	200	399	15	16	0	22,883	11,153	-	+
71a	F	38,3	12,8	10,7	132,0	NR	NR	NR	10,6	9,7	89,0	200	247	0	2	0	43,445	145,963	+	+
77a	F	38,0	12,4	11,0	900,0	12,6	9,4	934,0	12,2	10,0	995,0	400	432	24	29	0	28,490	21,115	-	+
79a	F	38,2	13,7	12,0	203,0	14,6	10,3	157,0	12,8	11,0	185,0	1000	357	44	101	0	6,329	21,115	-	+
80a	F	38,9	16,7	13,3	97,0	14,3	11,2	64,0	12,4	12,0	71,0	300	343	26	28	0	19,665	21,115	+	+
81a	F	38,5	13,1	15,1	67,5	12,6	12,9	38,0	10,9	13,7	41,0	1000	227	35	70	0	11,805	1238,29	-	-
83a	F	39,6	18,0	9,7	321,5	14,3	8,0	305,0	14,4	8,8	326,0	1000	770	32	64	0	87,638	596,299	+	+
84a	F	38,8	8,1	10,3	152,5	7,3	8,6	105,0	6,9	9,2	113,0	100	204	35	78	0	13,471	21,115	-	+
90a	F	38,6	11,9	18,9	222,0	10,7	16,0	184,0	10,2	16,5	227,0	200	227	2	2	0	2,944	21,115	-	+
92a	F	37,9	10,2	10,1	71,0	8,4	8,6	56,0	8,4	9,4	40,0	500	640	11	41	0	105,066	404,651	-	+
94a	F	40,0	7,2	14,7	27,5	6,3	12,8	16,0	5,9	13,6	16,5	200	266	22	28	0	38,550	21,115	-	-
95a	F	39,4	6,9	11,6	65,5	5,7	9,9	27,0	5,7	10,8	30,0	200	216	35	53	0	18,820	28,665	+	-
98a	F	39,4	23,7	10,4	204,0	21,3	8,8	191,0	19,5	9,4	190,0	1000	826	40	120	0	174,616	21,115	+	+
99a	F	38,3	13,9	11,2	56,5	12,1	9,1	28,0	11,5	10,2	26,5	500	168	13	25	0	97,824	21,115	-	+
100a	F	38,9	16,2	10,8	93,0	15,6	9,0	70,0	13,2	10,9	46,5	300	442	40	76	0	59,442	63,058	+	+
101a	F	39,3	11,0	11,3	175,0	11,3	9,7	157,0	10,3	11,7	152,0	200	270	45	80	0	84,112	21,115	-	-
102a	F	40,1	7,4	10,5	25,0	7,8	9,0	32,0	6,7	10,7	7,0	400	395	19	38	0	59,154	21,115	-	-
104a	F	38,6	17,0	12,0	64,0	17,2	10,3	66,0	15,1	12,1	34,0	400	295	43	106	0	181,181	21,115	+	+
107a	F	38,9	6,9	18,6	243,0	6,9	16,0	194,0	6,3	18,4	146,0	200	168	14	39	0	4,474	21,115	-	-
109a	F	38,9	23,2	12,2	330,5	23,0	10,2	293,0	21,2	12,1	299,5	300	128	36	99	0	87,849	21,115	-	+

Nº	SEXO	T °C	AbcVet			Micros			Pentra			m F mg/dL	Aut F mg/dL	m VHS mm	Aut VHS mm	Aut PCR µg/mL	ELISA PCR µg/mL	ELISA IL-6 pg/mL	Manual Desvio à esquerda	Pentra FLAG
			Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL									
110a	F	39,2	24,6	14,4	212,0	23,9	12,3	215,0	23,4	14,7	236,0	400	245	35	47	0	110,821	21,115	-	+
111a	F	38,5	19,8	13,9	219,0	19,2	12,0	226,0	18,0	14,2	223,0	400	196	13	21	0	2,425	21,115	-	+
112a	F	39,3	9,8	15,6	66,5	8,9	13,3	59,0	7,9	16,0	61,5	300	189	16	13	0	99,288	21,115	-	-
115a	F	39,2	11,8	15,1	195,5	11,9	13,7	186,0	11,4	15,4	202,0	100	140	34	65	0	13,036	21,115	+	+
117a	F	38,8	12,9	12,6	342,5	12,2	10,9	357,0	12,0	14,4	337,0	200	394	35	63	0	4,742	21,115	-	+
2a	M	39,0	14,5	10,0	69,0	15,8	10,3	42,5	10,8	10,2	32,0	600	298	36	97	0	25,041	11,153	+	+
5a	M	39,5	21,2	9,7	201,5	18,9	10,0	182,0	16,5	9,8	162,5	300	153	32	89	0	6,402	129,202	+	-
8a	M	38,4	10,4	13,6	131,0	NR	NR	NR	9,0	12,4	165,0	300	223	14	35	0	4,036	11,153	-	+
11a	M	38,8	19,1	13,4	228,5	17,7	11,5	219,5	17,1	12,5	258,5	500	186	5	2	0	31,867	11,153	-	+
12a	M	39,6	1,8	7,6	18,5	1,7	7,8	6,5	1,4	7,6	1,5	300	321	18	51	0	46,340	177,297	-	-
15a	M	38,8	9,9	16,6	173,0	10,0	16,7	158,0	9,3	16,7	164,0	300	239	3	5	0	0,543	11,153	-	-
24a	M	38,7	13,5	16,2	311,0	12,8	16,2	268,5	12,6	16,6	306,5	100	150	4	3	0	0,781	606,039	-	-
29a	M	38,9	22,8	12,6	333,0	19,4	12,7	292,0	17,6	12,6	337,0	300	253	42	51	0	27,541	0,000	-	+
31a	M	38,7	4,3	12,1	31,5	3,9	12,3	12,0	3,7	12,4	11,5	200	273	43	62	0	6,902	30,828	-	-
32a	M	38,8	8,3	9,9	175,5	9,3	10,0	176,0	7,2	9,9	142,0	100	244	39	51	0	31,576	313,564	-	-
53a	M	39,6	9,2	15,2	219,0	NR	NR	NR	8,7	14,3	249,0	600	214	32	49	0	15,432	11,153	-	+
55a	M	38,7	23,8	14,9	389,5	NR	NR	NR	18,4	13,6	411,0	500	235	1	18	0	3,991	222,476	-	+
56a	M	39,0	16,6	16,7	350,0	NR	NR	NR	15,9	15,5	380,0	300	208	0	2	0	5,836	0,000	-	+
57a	M	38,7	9,7	15,8	293,0	NR	NR	NR	9,1	14,1	296,0	200	258	13	15	0	11,220	0,000	-	+
59a	M	38,8	20,4	15,2	372,5	NR	NR	NR	15,1	14,1	372,5	400	335	13	15	0	8,250	11,153	+	+
60a	M	39,1	14,0	14,5	145,5	NR	NR	NR	11,9	13,0	112,0	300	208	37	48	0	30,495	529,987	-	+
72a	M	40,2	16,8	10,0	230,0	13,5	8,3	204,0	13,5	9,3	212,0	800	445	7	14	0	42,304	11,153	-	+
73a	M	38,0	11,3	12,6	312,5	10,4	10,6	305,0	9,7	11,4	332,5	500	445	25	80	0	3,105	11,153	-	+
85a	M	38,6	15,3	12,6	85,5	13,2	10,3	81,0	13,0	11,1	86,5	200	230	39	70	0	57,332	21,115	-	-
86a	M	38,5	8,5	8,9	18,5	7,3	7,4	10,0	6,9	8,1	5,5	200	237	34	120	0	50,286	21,115	-	-
88a	M	38,9	6,9	10,7	70,5	5,8	9,0	55,0	5,8	9,7	39,5	400	406	42	106	0	65,297	21,115	-	-

Nº	SEXO	T °C	AbcVet			Micros			Pentra			m	Aut	m	Aut	Aut	ELISA	ELISA	Manual Desvio à esquerda	Pentra FLAG
			Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	Leuc 103/µL	HGB g/dL	PLT 103/µL	F mg/dL	F mg/dL	VHS mm	VHS mm	PCR µg/mL	PCR µg/mL	IL-6 pg/mL		
91a	M	38,8	19,2	10,5	234,5	15,3	8,8	202,0	15,7	9,5	247,5	400	413	42	120	0	34,335	21,115	+	+
93a	M	38,3	13,7	10,8	230,5	12,4	9,2	223,0	11,3	9,7	246,0	200	153	0	2	0	40,017	21,115	-	+
96a	M	39,3	8,7	11,3	24,5	8,3	9,8	14,0	7,2	10,3	8,5	200	232	20	28	0	21,812	21,115	-	-
97a	M	38,4	13,3	9,1	105,0	13,8	7,8	88,0	12,7	8,2	84,0	400	194	19	10	0	98,106	50,475	-	+
103a	M	38,9	17,7	14,2	306,0	17,3	12,4	307,0	14,5	14,5	322,5	300	217	0	2	0	17,351	21,115	-	+
105a	M	38,6	14,7	12,4	72,0	18,3	10,4	47,0	16,6	12,6	37,0	100	127	26	120	0	42,561	78,996	-	+
106a	M	38,4	8,4	14,4	120,0	8,6	12,4	99,0	8,1	14,7	52,0	100	147	14	107	0	37,534	21,115	-	-
108a	M	38,1	17,2	16,1	214,0	17,9	13,9	207,0	16,3	16,2	218,0	100	210	11	20	0	11,702	21,115	-	+
113a	M	39,1	13,2	7,7	608,5	11,8	6,6	652,0	8,6	8,0	626,0	200	259	16	105	0	59,913	21,115	-	-
114a	M	39,3	11,3	13,8	104,5	11,0	12,0	133,0	9,8	13,9	90,0	100	183	44	94	0	84,809	47,958	-	-
116a	M	39,6	23,6	17,2	67,0	20,6	13,7	47,0	19,4	17,6	39,5	200	206	3	9	0	9,285	21,115	-	+

Anexo 4: Grupo com processo inflamatório/infeccioso (n = 86) - Resultados individuais (contagem diferencial de leucócitos) dos cães saudáveis.

N°	SEXO	ABC			Micros			Pentra						Manual							
		LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRA	LIN	MON	Meta	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1a	F	38,8	16,9	44,4	32,8	31,0	36,3	17,6	5,3	75,7	1,2	0,3	77,1	15,5	4,0	0,0	2,0	64,0	14,5	0,0	80,5
3a	F	41,9	18,3	39,8	48,1	29,7	22,3	22,7	6,2	69,8	1,0	0,4	71,2	21,0	3,0	0,0	1,0	63,5	11,0	0,5	76,0
4a	F	51,7	17,4	30,9	54,9	26,4	18,7	37,2	6,2	54,6	1,5	0,6	56,6	34,5	4,5	0,0	0,5	53,5	7,0	0,0	61,0
6a	F	39,7	21,8	38,6	52,9	28,6	18,6	15,2	5,1	77,7	1,6	0,6	79,8	15,0	6,5	0,0	1,5	63,0	12,5	1,5	78,5
7a	F	39,1	15,5	45,5	47,1	27,7	25,3	14,1	7,0	76,3	1,2	1,5	78,9	14,0	8,0	0,0	0,5	64,5	13,0	0,0	78,0
9a	F	39,1	14,5	46,5	31,9	26,3	41,8	14,1	5,3	58,7	19,0	3,0	80,7	10,5	4,0	0,0	2,0	61,0	22,5	0,0	85,5
10a	F	49,0	15,2	35,9	52,8	23,6	23,7	36,0	7,6	55,4	0,7	0,3	56,4	38,5	45,0	0,0	0,5	39,0	16,5	1,0	57,0
13a	F	70,8	9,0	20,2	39,3	27,0	33,8	28,7	6,2	62,7	2,0	0,5	65,2	20,0	8,0	0,0	2,0	54,0	15,0	1,0	72,0
14a	F	43,9	17,5	38,7	46,5	25,9	27,7	26,5	6,5	62,7	3,7	0,8	67,1	24,0	6,0	0,0	1,0	61,0	9,0	0,0	71,0
16a	F	74,1	7,4	18,5	63,8	21,0	15,2	48,1	4,4	45,5	0,7	1,5	47,6	55,0	3,0	0,0	0,0	32,0	10,0	0,0	42,0
17a	F	45,9	16,7	37,5	47,2	28,7	24,2	17,1	7,6	72,9	1,0	1,5	75,4	10,0	4,0	0,0	3,0	63,0	18,0	2,0	86,0
19a	F	50,2	14,4	35,4	31,6	27,7	40,8	16,9	7,1	59,0	15,7	1,5	76,1	13,0	5,0	0,0	3,0	50,0	27,0	2,0	82,0
20a	F	58,4	18,6	23,1	58,9	27,5	13,6	32,0	7,6	59,2	0,6	0,7	60,5	39,0	6,0	0,0	4,0	50,0	1,0	0,0	55,0
21a	F	42,5	19,8	37,8	22,1	23,4	54,5	9,7	6,2	82,2	1,6	0,4	84,2	10,0	3,0	0,0	1,0	81,0	5,0	0,0	87,0
25a	F	63,3	13,7	23,0	57,2	25,0	17,9	43,7	7,4	46,8	1,1	1,1	49,0	37,0	10,0	0,0	4,0	43,0	6,0	0,0	53,0
27a	F	60,6	10,5	28,9	49,4	24,6	26,1	34,0	5,4	53,3	6,7	0,8	60,7	41,0	2,0	0,0	0,0	39,0	18,0	0,0	57,0
28a	F	47,7	14,2	38,2	50,6	23,3	26,1	29,8	6,6	61,5	1,7	0,6	63,7	30,0	11,0	0,0	1,0	38,0	19,0	1,0	59,0
30a	F	66,8	8,9	24,3	51,5	23,4	25,1	39,8	4,5	45,8	9,1	0,8	55,7	24,0	10,0	1,0	11,0	48,0	6,0	0,0	65,0
33a	F	54,6	14,6	30,9	37,8	22,7	39,5	24,2	9,8	60,4	1,7	4,1	66,1	16,0	5,0	0,0	1,0	68,0	10,0	0,0	79,0

N°	SEXO	ABC			Micros			Pentra						Manual							
		LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRA	LIN	MON	Meta	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
34a	F	41,7	15,7	42,6	41,6	16,0	43,0	16,9	6,5	60,9	15,2	0,5	76,6	20,0	3,0	0,0	0,0	57,0	19,0	1,0	77,0
35a	F	36,9	20,5	42,6	40,1	33,4	26,6	19,8	4,1	70,0	5,7	0,5	76,1	17,0	6,0	0,0	1,0	71,0	5,0	0,0	77,0
36a	F	30,9	21,3	47,8	63,5	23,3	13,2	9,1	5,8	83,3	1,7	0,1	85,1	6,0	5,0	2,0	25,0	57,0	5,0	0,0	87,0
37a	F	58,5	15,4	26,2	NR	NR	NR	38,2	8,9	51,3	0,8	0,9	52,9	36,5	8,5	0,0	0,5	53,5	1,0	0,0	55,0
49a	F	47,3	19,0	33,8	72,7	21,8	5,5	10,4	7,6	80,0	1,0	1,1	82,1	10,0	8,5	1,0	4,5	75,0	1,0	0,0	80,5
54a	F	47,5	13,7	38,9	NR	NR	NR	47,7	6,1	44,0	0,9	1,4	46,3	46,0	7,5	0,0	0,5	43,5	2,5	0,0	46,5
58a	F	25,6	16,9	57,5	NR	NR	NR	10,1	6,7	81,4	1,1	0,7	83,2	11,0	5,5	0,0	1,5	80,0	1,5	0,5	83,5
61a	F	37,2	19,0	43,9	NR	NR	NR	21,4	6,0	70,2	1,1	1,4	72,6	22,5	7,5	0,0	0,5	63,0	6,5	0,0	70,0
63a	F	51,2	15,3	33,5	NR	NR	NR	45,7	7,0	44,9	1,6	0,8	47,2	53,0	11,0	0,0	2,0	33,0	1,0	0,0	36,0
69a	F	38,7	20,4	41,0	41,1	34,2	24,7	10,7	7,2	80,7	1,2	0,4	82,2	8,0	6,5	0,0	1,5	69,0	15,0	0,0	85,5
70a	F	40,4	21,4	38,2	51,0	30,4	18,6	11,2	8,2	77,8	1,7	1,2	80,7	11,0	14,0	0,0	1,0	69,0	5,0	0,0	75,0
71a	F	34,4	21,4	44,2	NR	NR	NR	9,8	7,1	80,7	1,8	0,6	83,1	8,5	4,0	0,0	3,0	82,5	2,0	0,0	87,5
77a	F	38,1	17,7	44,2	56,5	27,7	15,8	26,3	7,9	62,8	1,4	1,6	65,8	33,0	6,0	0,0	1,0	51,0	8,0	1,0	61,0
79a	F	47,8	18,0	34,2	60,8	25,4	13,8	37,4	5,1	55,4	0,9	1,5	57,7	37,5	5,0	0,0	0,0	55,0	2,5	0,0	57,5
80a	F	36,8	22,7	40,6	41,0	32,4	26,6	8,1	8,8	79,9	1,8	1,4	83,0	75,0	6,5	0,5	1,0	75,0	12,5	4,5	93,0
81a	F	35,2	14,5	50,4	37,1	23,4	39,5	20,2	5,5	71,7	0,7	1,9	74,3	19,0	6,5	0,0	0,0	50,5	24,0	0,0	74,5
83a	F	26,4	17,9	55,8	35,8	34,9	29,3	11,7	15,6	64,1	8,2	0,4	72,7	11,5	23,0	0,0	3,0	54,5	8,0	0,0	65,5
84a	F	38,0	20,2	41,9	31,0	25,9	43,1	15,2	7,1	75,4	1,0	1,4	77,7	13,5	4,0	0,0	1,0	70,5	11,0	0,0	82,5
90a	F	35,2	17,3	47,6	44,9	30,9	24,2	19,0	8,1	70,8	1,1	1,2	73,0	18,5	9,0	0,0	0,0	59,5	13,0	0,0	72,5
92a	F	48,9	23,8	27,4	56,3	33,8	9,9	11,8	7,7	78,2	1,5	0,8	80,5	3,0	4,0	0,0	5,0	86,0	1,0	0,0	92,0

N°	SEXO	ABC			Micros			Pentra						Manual							
		LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRA	LIN	MON	Meta	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
94a	F	33,9	17,5	48,7	25,9	20,6	53,5	19,5	7,1	70,6	1,7	1,3	73,5	17,0	10,0	0,0	0,0	65,0	8,0	0,0	73,0
95a	F	29,0	16,4	54,7	29,4	26,7	43,9	20,1	10,0	67,3	1,2	1,5	70,0	12,0	10,0	0,5	1,5	68,0	10,0	8,0	87,5
98a	F	28,5	18,1	53,4	47,5	27,6	24,9	18,7	6,2	68,4	6,2	0,6	75,1	20,0	4,5	0,5	4,0	66,0	4,5	0,5	75,0
99a	F	38,4	18,3	43,3	36,1	32,3	31,6	16,3	5,8	75,9	1,2	0,9	77,9	15,5	5,5	0,0	1,0	63,5	13,5	1,0	79,0
100a	F	45,0	20,5	34,6	51,4	29,3	19,3	19,6	8,2	69,7	1,3	1,3	72,3	13,0	12,0	1,0	5,0	66,0	3,0	0,0	74,0
101a	F	54,0	18,9	27,1	57,7	24,0	18,3	17,2	3,8	76,9	1,7	0,4	79,0	19,0	10,0	0,0	1,0	68,0	2,0	0,0	71,0
102a	F	41,2	14,5	44,3	44,3	15,8	39,9	25,3	7,9	65,2	0,7	1,0	66,9	28,0	20,0	0,0	1,0	51,0	0,0	0,0	52,0
104a	F	57,1	14,5	28,4	67,4	19,5	13,1	43,2	4,1	46,8	5,6	0,4	52,8	48,0	5,0	1,0	1,5	33,5	11,0	0,0	46,0
107a	F	33,3	18,5	48,2	29,2	14,6	56,2	19,0	2,3	73,0	3,6	2,2	78,8	17,0	5,0	0,0	1,0	64,5	11,5	1,0	78,0
109a	F	36,6	8,7	54,8	42,9	12,6	44,5	39,2	2,6	57,4	0,4	0,5	58,2	43,5	7,0	0,0	0,0	20,0	29,0	0,5	49,5
110a	F	31,8	10,4	57,8	33,7	18,3	48,0	31,7	3,7	61,6	2,7	0,3	64,6	39,0	3,5	0,0	1,0	31,0	25,0	0,5	57,5
111a	F	36,4	15,8	47,8	43,3	24,5	32,2	24,9	4,1	68,9	2,0	0,1	71,0	23,0	6,5	0,0	0,0	46,0	24,5	0,0	70,5
112a	F	29,5	16,4	54,2	34,0	24,3	41,7	16,0	3,1	79,3	0,8	0,9	81,0	16,0	5,5	0,0	0,5	51,0	26,5	0,5	78,5
115a	F	46,7	14,5	38,8	44,6	25,5	29,9	37,1	7,6	58,4	1,3	0,6	60,3	42,5	5,0	0,5	0,5	34,0	17,5	0,0	52,0
117a	F	44,4	20,3	35,3	33,4	32,0	34,6	20,2	6,0	71,5	1,5	0,8	73,8	16,0	14,0	0,0	1,0	65,0	4,0	0,0	70,0
2a	M	41,2	17,6	41,3	37,6	22,2	40,3	11,1	6,0	77,5	5,0	0,5	82,9	8,0	7,5	0,5	5,5	68,4	10,0	0,0	83,9
5a	M	39,9	15,4	44,8	39,2	19,9	41,0	12,5	4,0	82,6	0,7	0,3	83,6	12,5	5,0	0,0	1,5	42,5	37,5	1,0	82,5
8a	M	42,0	13,1	45,0	NR	NR	NR	30,3	5,3	61,7	1,0	1,9	64,5	23,0	3,0	0,0	1,5	64,5	8,0	0,0	74,0
11a	M	35,0	14,1	50,9	47,9	23,1	29,1	26,0	5,1	68,0	0,7	0,4	69,0	34,0	5,5	0,0	0,5	39,5	20,0	0,5	60,5
12a	M	49,2	18,7	32,2	44,0	30,7	25,3	20,9	5,1	68,5	2,9	2,7	74,0	12,0	6,0	0,0	12,0	66,0	4,0	0,0	82,0

N°	SEXO	ABC			Micros			Pentra						Manual							
		LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRA	LIN	MON	Meta	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
15a	M	40,5	14,1	45,5	42,5	22,6	35,0	25,9	6,0	64,0	3,2	1,1	68,2	20,0	5,0	0,0	0,0	42,0	33,0	0,0	75,0
24a	M	57,5	7,5	35,0	34,0	26,2	39,9	17,0	5,3	74,2	2,8	0,9	77,8	15,0	4,0	0,0	1,0	54,0	26,0	0,0	81,0
29a	M	41,5	17,0	41,5	34,7	26,7	38,6	11,9	5,4	81,1	1,5	0,3	82,8	10,0	8,0	0,0	0,0	59,0	23,0	0,0	82,0
31a	M	48,8	16,9	34,4	39,2	30,5	30,4	18,7	14,7	61,3	1,3	4,2	66,7	46,0	14,0	0,0	0,0	28,0	12,0	0,0	40,0
32a	M	48,9	16,4	34,8	48,7	16,4	35,0	25,9	7,9	53,7	9,5	3,1	66,3	35,0	9,0	0,0	3,0	46,0	7,0	0,0	56,0
53a	M	45,1	17,2	37,7	NR	NR	NR	32,6	4,6	61,1	1,2	0,5	62,8	31,0	7,0	0,0	1,0	47,0	12,0	2,0	62,0
55a	M	37,1	19,2	43,8	NR	NR	NR	12,7	6,1	78,2	1,0	2,1	81,2	11,0	5,0	0,0	1,0	68,5	14,0	0,5	84,0
56a	M	40,7	17,8	41,5	NR	NR	NR	24,4	6,6	66,3	1,2	1,5	69,0	34,0	8,5	0,0	1,5	47,5	8,5	0,0	57,5
57a	M	39,0	15,8	45,4	NR	NR	NR	30,0	6,3	61,5	0,8	1,6	63,8	35,0	8,0	0,0	1,0	40,0	16,0	0,0	57,0
59a	M	43,4	21,5	35,1	NR	NR	NR	11,7	5,2	79,5	1,9	1,5	82,9	10,0	9,5	0,0	2,0	67,5	11,0	0,0	80,5
60a	M	43,2	15,2	41,7	NR	NR	NR	32,8	6,1	59,4	0,7	1,1	61,2	35,0	14,0	0,0	0,0	37,0	13,5	0,5	51,0
72a	M	28,4	19,1	52,6	15,5	25,3	59,2	6,6	6,9	85,2	0,9	0,4	86,5	2,5	7,5	0,0	0,5	81,5	7,5	0,5	90,0
73a	M	46,5	17,3	36,2	39,2	26,5	34,3	28,5	11,9	58,1	1,0	0,8	59,8	39,0	12,0	0,0	0,0	38,0	11,0	0,0	49,0
85a	M	40,9	19,4	39,8	54,2	25,1	20,7	17,9	5,4	74,9	1,1	0,8	76,7	15,0	5,0	0,0	1,0	63,5	15,0	0,5	80,0
86a	M	49,4	20,2	30,5	46,2	33,7	20,1	13,0	5,0	79,0	1,9	0,9	81,8	10,0	3,0	0,0	2,0	72,0	12,5	0,5	87,0
88a	M	49,1	21,2	29,8	28,6	34,5	36,9	15,3	6,9	74,7	0,9	2,4	77,9	7,0	5,0	0,0	3,0	82,0	3,0	0,0	88,0
91a	M	30,1	19,1	50,9	24,4	35,9	39,7	8,7	7,7	82,4	0,9	0,5	83,7	6,0	4,0	0,0	3,0	73,0	14,0	0,0	90,0
93a	M	51,5	20,8	27,7	34,9	32,2	32,9	12,6	5,1	79,8	2,0	0,7	82,4	17,0	1,5	0,0	1,5	71,5	8,5	0,0	81,5
96a	M	39,0	16,3	44,8	40,3	18,9	40,8	26,5	9,3	62,4	0,8	1,1	64,3	25,0	7,5	0,0	2,5	57,0	7,5	0,5	67,5
97a	M	57,8	14,2	28,0	66,1	17,9	16,0	50,7	7,7	40,2	0,7	0,7	41,6	51,5	9,0	0,0	0,0	31,5	7,0	1,0	39,5

N°	SEXO	ABC			Micros			Pentra						Manual							
		LIN	MON	GRAN	LIN	MON	GRAN	LIN	MON	NEU	EOS	BAS	GRA	LIN	MON	Meta	Bast	NEU	EOS	BAS	GRA
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
103a	M	46,8	19,1	34,2	50,1	26,0	23,9	19,5	5,3	73,7	1,1	0,6	75,3	21,5	12,0	0,0	0,5	55,0	11,0	0,0	66,5
105a	M	66,8	11,4	21,8	65,7	17,7	16,6	60,7	2,9	35,8	0,4	0,2	36,4	72,0	3,5	0,0	0,0	18,5	6,0	0,0	24,5
106a	M	41,2	13,7	45,1	50,7	24,0	25,3	36,4	3,6	43,7	16,0	0,3	60,0	37,0	4,0	0,0	0,0	37,5	21,5	0,0	59,0
108a	M	36,6	16,8	46,6	45,7	27,3	27,0	31,3	4,2	62,3	1,9	0,3	64,5	28,5	7,5	0,0	0,0	54,0	10,0	0,0	64,0
113a	M	40,9	22,6	36,6	56,1	28,3	15,6	11,4	1,9	85,0	1,0	0,8	86,7	13,5	4,0	0,0	2,0	72,5	8,0	0,0	82,5
114a	M	48,0	18,6	33,5	32,8	22,7	44,5	24,2	4,4	68,8	1,3	1,3	71,4	29,5	6,5	0,0	0,0	58,0	6,0	0,0	64,0
116a	M	42,1	18,0	39,9	40,0	32,0	28,0	16,1	5,2	77,0	1,3	0,4	78,7	16,0	5,5	0,0	0,5	68,0	10,0	0,0	78,5

Anexo 5: Carta de aprovação de Comitê de Ética na Experimentação Animal (CEEA) – IB
– UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia

CEEA-IB-UNICAMP

Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA-IB-UNICAMP

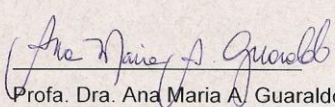
CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1104-1, sobre "AVALIAÇÃO DOS MARCADORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM CÃES (A DEFINIR)", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto / Juliana Falcato Vecina, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA)-IB-UNICAMP em reunião de 27 de setembro de 2006.

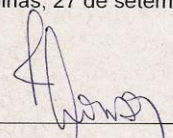
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1104-1, entitled "EVALUATION OF ACUTE INFLAMMATORY RESPONSE MARKERS IN DOGS", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - UNICAMP) on September 27, 2006.

Campinas, 27 de setembro de 2006.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA/IB – Unicamp Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil	Telefone: (19) 3521-6359 Telefax: (19) 3521-6356 E-mail: ceea@cemib.unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/institucional/ceea/index.htm
---	--

Anexo 6: Resumo expandido apresentado no 8º Congresso Paulista de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (CONPAVEPA) realizado de 17 a 19 de setembro de 2008 em São Paulo – SP.

Vecina J.F., Anjos B.L., Alvarenga E.C. & Grotto H.Z.W. 2008. **Avaliação dos marcadores da resposta inflamatória aguda em cães.** Pesquisa Veterinária Brasileira 28 (Supl.). Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Tessália Vieira de Camargo 126, Campinas, SP 13081-970, Brasil. E-mail: juvecina@fcm.unicamp.br

Introdução: A leucocitose, a presença de hipertermia e a elevação dos níveis séricos das proteínas de fase aguda (PFA), tais como proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio (Fib) têm sido usadas como indicadores de processos inflamatórios/infecciosos em diversas espécies animais (Martinez-Subiela et al. 2001, Harr 2004, Cerón et al. 2005). O Fib foi a primeira PFA a ser reconhecida. A determinação do Fib plasmático possui pouco valor para identificação dos processos inflamatórios em cães, diferentemente do que ocorre nas espécies bovina e equina (Schutze 2000). O valor de normalidade para o Fib plasmático em cães é compreendido entre 100 e 500mg/dl. Valores superiores podem indicar processo inflamatório. Recomenda-se o cálculo da relação proteína plasmática total e Fib (PPT:Fib) com o propósito de relacionar o aumento do Fib com hemoconcentração ou aumento da produção. A relação PPT:Fib menor que 10 indica processo inflamatório (Jain 1975). A velocidade de hemossedimentação (VHS) é um exame acessível, de baixo custo, rápido e pouco invasivo. Sua elevação é conseqüente ao aumento das PFA (Lanzara et al. 2001). O aumento da VHS em cães está relacionada com processos infecciosos agudos, inflamatórios localizados (pleurites, pericardites e peritonites), traumáticos (cirurgias em geral), neoplásicos, prenhes e nefropatias terminais (Jain 1975). Na rotina clínica os veterinários solicitam apenas o leucograma para avaliar os processos inflamatórios em cães. Quanto ao VHS muitos testes foram desenvolvidos, mas na rotina laboratorial veterinária o método de Wintrobe é o mais freqüentemente utilizado (Jain 1975). Atualmente já é possível a determinação do VHS em sistema semi ou totalmente automatizado, que fornece resultados

precisos e na metade do tempo da técnica manual (Romero et al. 2003). A concentração de Fib é determinada através do método de precipitação pelo calor (Kaneko & Smith 1967), como teste de triagem, que apresenta resultados pouco precisos.

Como a investigação da presença da inflamação/infecção em cães é realizada através da utilização de técnicas manuais, carentes de precisão e padronização na maioria dos laboratórios veterinários, o objetivo do estudo foi avaliar alguns indicadores do processo inflamatório através de novas técnicas e da utilização de sistemas automatizados, que possam ser utilizadas no diagnóstico, prognóstico e monitoramento da inflamação/infecção em cães e que possam ser incorporados aos protocolos nas clínicas e laboratórios veterinários.

Material e Métodos: Foram estudados 117 cães adultos de ambos os sexos e diferentes raças, divididos em dois grupos: controle sadio (n=32) e com suspeita clínica de inflamação/infecção (n=85), desses os prováveis diagnósticos foram: piometra (n=6), dermatopatia (n=6), hemoparasitose (n=29), vaginite (n=2), trauma (n=2), gastroenterites (n=2), verminose (n=5), uveíte (n=1), nefropatia (n=3), neoplasia (n=2), gangrena seca (n=1), cinomose (n=1), miíase (n=3), otite (n=1) e enfermidades associadas (n=21). Foram excluídos filhotes, gestantes, animais que estavam recebendo medicações prévias num período de 7 dias, e que não estavam em jejum. As amostras de sangue foram obtidas através de punção venosa usando seringas plásticas e agulhas descartáveis e transferidas para dois diferentes tubos a vácuo (um contendo EDTA e outro citrato). Os exames foram processados no dia da coleta. O hemograma foi realizado em contador automatizado (ABCVet, Horiba-ABX, França). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através da observação microscópica de esfregaços corados com May-Grüwald-Giemsa. Duzentas células foram contadas pelo mesmo observador. A determinação do Fib foi realizada através do método do método de Clauss automatizado (AMAX Destiny Plus Amilung, Alemanha) usando kit comercial (AMAX Trinity Biotech, Irlanda). A VHS foi determinada através do método automatizado baseado em fotometria e capilaridade interrompida por análise da cinética (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Itália). Os parâmetros clínicos e laboratoriais indicativos da

presença do processo inflamatório/infeccioso foram: presença de hipertermia ($>39,3^{\circ}\text{C}$) e/ou desvio à esquerda (mais do que 300 bastonetes/ μl ou presença de células da linhagem granulocítica anteriores aos bastonetes) e/ou hiperfibrinogenemia ($>500\text{mg/dl}$) e/ou VHS elevado ($>10\text{mm}$). Análises estatísticas foram realizadas utilizando teste de Mann-Whitney para comparação entre os métodos e o coeficiente de Spearman para correlacionar os dados. Nível de significância estatística foi $p\leq 0,05$.

Resultados e Discussão: Os valores de mediana, mínimo e máximo dos indicadores do processo inflamatório/infeccioso estão presentes na tabela 1. Não houve diferença significativa na contagem total de leucócitos (WBC) e na temperatura retal entre os dois grupos. A presença de desvio à esquerda foi observada em 27% dos animais com processo inflamatório/infeccioso. Os valores de Fib e VHS foram significativamente maiores nos cães com inflamação/infecção que nos cães saudáveis. Todos os métodos apresentaram 100% de especificidade (tabela 2). Entretanto, a VHS demonstrou melhor eficácia e sensibilidade quando comparada com os demais (90% e 70%, respectivamente). A baixa sensibilidade do desvio à esquerda pode ser explicada pela coleta do sangue feita em fases diferentes do processo inflamatório nos diversos animais. O leucograma inflamatório com desvio à esquerda característico (mais do que 300 bastonetes/ μl ou presença de células da linhagem granulocítica anteriores aos bastonetes) é evidente em 72 horas (Schutze 2000). Há várias possibilidades que explicam a baixa eficácia da determinação do Fib. Primeiro, quando há demora na punção ou homogeneização do sangue, o Fib pode ser consumido parcialmente (Andrews et al. 1994). Segundo, algumas coletas podem ter sido realizadas em cães com processo inflamatório/infeccioso avançado. O Fib em cães pode sofrer diminuição dentro de 24 a 48 horas, enquanto que a VHS permanece elevada durante todo o processo inflamatório/infeccioso, já que outras proteínas plasmáticas inflamatórias, como a PCR, também podem influenciar seus valores (Schutze 2000). Dessa forma, a VHS pode ser utilizada tanto para diagnóstico como para monitoramento do processo inflamatório/infeccioso (Lanzara et al. 2001). Nesse estudo foram utilizados equipamentos automatizados já consagrados na patologia clínica em humanos, mas pouco difundidos na Medicina Veterinária. As principais vantagens dos métodos automatizados são a rapidez e

precisão dos resultados proporcionando um diagnóstico seguro e a possibilidade de um tratamento adequado em curto espaço de tempo.

Referências bibliográficas: Andrews D.A., Reagan W.J., DeNicola D.B. 1994. Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. Continuing education for the practicing veterinarian; 16(10): 1349-1357. - Cerón J.J., Eckersall P.D., Martínez-Subiela S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. Vet. Clin. Path. 34(2): 85-99. - Harr K.E. 2004. Diagnosis of systemic inflammatory disease in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) [dissertation]. Florida: University of Florida. -. Martínez-Subiela S., Tecles F., Parra M.D., Cerón J.J. 2001. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. Anales de Veterinaria. (Murcia), 17: 99. - Jain N.C. 1975. The dog: Normal hematology with comments on response to disease, p.103-125. In: Schalm's Veterinary Hematology. Philadelphia: 3ªed. Lea & Febiger. - Kaneko J.J. 1997. Serum proteins and dysproteinemias, p. 117-138. In: Clinical Biochemistry of domestic animals. New York: 5ªed. Academic Press. - Kaneko J.J., Smith R. 1967. The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. The California Veterinarian, 21(8):21-24. - Lanzara G.A., Provenza J.R. 2001. Bonfiglioli, R. Velocidade de hemossedimentação (VHS) de segunda hora: qual o seu valor? Revista Brasileira de Reumatologia; 41(4): 237-41. - Romero A., Munoz M., Ramirez G. 2003. Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the test 1 ESR System with the ICSH reference method and the Sedisystem 15. Clinical Chemistry Laboratory Medicine, 41: 232-237. - Schutze A.E. 2000. Interpretation of canine leukocyte responses, p.366-381. In: Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. Schalm's Veterinary Hematology. 5ªed., Philadelphia: Lippincott Willian & Wilkins.

Termos de indexação: inflamação, resposta de fase aguda, proteínas de fase aguda, velocidade de hemossedimentação, fibrinogênio.

Tabela 1. Valores (mediana, mínimo e máximo) de temperatura retal, contagem total de leucócitos, fibrinogênio plasmático e velocidade de hemossedimentação dos grupos controle (n=32) e grupo com processo inflamatório/infeccioso (n=85)

Grupo	Temperatura °C	WBC ^a 10 ³ /μL	Fib ^b mg/dl	VHS ^c mm
Controle	38.9 (38.1-39.3)	11.30 (7.45-16.75)	205.5 ^d (75.0-379.0)	2 ^d (2-10)
Inflamação	38.3 (37.9-40.2)	12.80 (1.80-24.60)	244.0 ^d (127.0-826.0)	39 ^d (2-120)

^a Contagem total de leucócitos, ^b Fibrinogênio, ^c Velocidade de hemossedimentação, ^d Valores são estatisticamente diferentes (p≤0,05).

Tabela 2. Sensibilidade, especificidade e eficácia dos parâmetros clínico-laboratoriais: hipertermia, presença de desvio à esquerda, hiperfibrinogenemia e velocidade de hemossedimentação (VHS) elevada

	Sensibilidade	Especificidade	Eficácia
Hipertermia	32%	100%	40%
Presença de desvio à esquerda	42%	100%	47%
Hiperfibrinogenemia	8,6%	100%	30%
VHS elevada	70%	100%	90%

Anexo 7: Resumo apresentado no 20º International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) realizado de 28 de setembro a 02 de outubro de 2008 em Fortaleza - CE.

VALIDATION OF METHODS FOR DETECTING ACUTE PHASE RESPONSE IN DOGS. HOW NEW TECHNOLOGIES CAN HELP VETERINARY MEDICINE

Vecina¹ J.F., Alvarenga¹ E. C., Anjos¹ B.L., Grotto¹ H.Z.W.

1. Clinical Pathology Department, Medical Sciences Faculty, State University of Campinas, Campinas, Brazil.

E-mail:juvecina@fcm.unicamp.br

Background. The acute phase response is a defence mechanism after a tissue damage, infection, neoplastic or traumatic causes. Diagnosis is based on clinical and laboratory data, including leukogram and measurements of acute phase proteins in serum. Although those determinations are well standardized in human medicine there is a limited application in veterinary medicine, due to lack of precision of results, depending on the applied method. The aim of this study was to assess the accuracy and reliability of three parameters comparing methods used in veterinary routine with methods designed for use with human serum/ blood specimens.

Materials and Methods. One hundred and seventeen dogs were included in the study. Eighty- five with clinical findings associated with acute infection/inflammation processes and thirty-two clinically healthy dogs (control group). Leukogram analysis was performed by Pentra DX 120 automated counter (Horiba-ABX, France). A canine profile was selected by a threshold adjust. Automated differential leukocyte count was compared with microscopy observation in blood smears stained with May-Grünwald-Giemsa. Two hundred cells were counted by the same observer. Plasma fibrinogen was measured by refractometer after fibrinogen precipitation at 56-58°C and compared with automated Clauss method, using AMAX fibrinogen kit (Trinity Biotech, Ireland) and AMAX Destiny

Plus Amilung equipment (Germany). Erythrocyte sedimentation rate (ESR) was determined by manual Wintrobe method and compared with automated ESR method by photometry and interrupted capillarity (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Italy). Mann-Whitney test was used to compared methods and Spearman coefficient to correlate data. Intra and interbath assays were performed in order to analyse the precision of fibrinogen. Coefficient of variation (CV) was calculated for each assay.

Results. Intra-assay variation of manual fibrinogen test showed CV between 28.3 and 64.6%, whereas inter-assay ranged between 35.6 and 45.8%. Automated method showed CV between 1.3 and 3.8% for intra-assay and between 1.5 and 3.3% for inter-assay.

Table: Comparison between results obtained by manual and automated methods in control and disease groups. Mann-Whitney test and Spearman correlation coefficient

Parameter	control (n= 32)		Inflammation/infection process (n=85)	
	p value	correlation	p value	correlation
Lymphocyte counting	0.7220	r= 0.7899 p< 0.0001	0.6923	r= 0.8482 p< 0.0001
Monocyte counting	0.0328	r= 0.1589 p= 0.3850	0.7341	r= 0.3804 p= 0.0003
Granulocyte counting	0.9411	r= 0.8516 p< 0.0001	0.7887	r= 0.8826 p< 0.0001
Fibrinogen measurement	0.3337	r= 0.2258 p= 0.2138	0.3001	r= 0.4095 p= 0.0001
ESR determination	0.0020	r= 0.6043 p=0,0002	0.0000	r= 0.7846 p< 0.0001

Conclusions. Fibrinogen and ESR levels were significantly higher in dogs with inflammation/infection conditions than in healthy dogs. However, manual method was not reproducible and it is time-consuming when compared with automated method. ESR using

automated equipment showed good results and in a short period of time. According to our results there was no significant difference between lymphocyte and granulocyte counting obtained by Pentra DX automated counter and manual method. The main advantages of automated methods are the rapidity and precision of results. It can mean a faster diagnosis and the possibility of an early treatment. In conclusion, methods developed for human medicine can be adapted for veterinary medicine. A rigorous standardization is necessary before to implement those methods in a routine laboratory.

Anexo 8: Artigo submetido a Revista Científica: Veterinary Pathology

Title: An assessment of inflammation markers in dogs

Authors: Juliana Falcato Vecina, Bárbara Lima dos Anjos, Eliana da Costa
Alvarenga, Helena Zerlotti Wolf Grotto

Address for Correspondence:

Department of Clinical Pathology

Tessália Vieira de Camargo, 126

Caixa Postal 6111

13081-970 Campinas, SP, Brazil

Telephones:

(19) 3521.7064 - 3521.7387

E-mails:

juvecina@yahoo.com

grotto@fcm.unicamp.br

Running title: Inflammation markers in dogs

Abstract: The presence and activity of the acute-phase response can be identified by various markers. Speedy, accurate determination of these laboratory parameters can help early identification and monitoring of this process. In this study we investigated the effectiveness of hemogram, erythrocyte sedimentation rate, interleukin-6, C-reactive protein and fibrinogen measurements in dogs. Some of the measurements were obtained using methodologies that are already well established in human clinical pathology. A total of 117 adult dogs of different breeds were studied. These were divided into two groups: control animals (n=31) and sick animals (n=86). Total white blood cell count was obtained using an automated counter, and the differential count was performed on blood smears stained with May-Grüwald-Giemsa. Fibrinogen values and erythrocyte sedimentation rates were determined using automated methods, and C-reactive protein and interleukin-6 were measured with a commercially available species-specific ELISA kits. There was no difference in fibrinogen levels between the groups. Total leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein and interleukin-6 levels were higher in the sick dogs. Automated erythrocyte sedimentation rate was the best inflammatory marker, followed by C-reactive protein. Although earlier markers of inflammatory activity, C-reactive protein and interleukin-6 had a smaller number of abnormal results than erythrocyte sedimentation rate. The possibility of automating the measurement of erythrocyte sedimentation rate, together with the fact that this marker is cheaper, faster, more effective and more practical than the others examined in this study, suggests that measurement of this parameter can usefully be included in routine clinical veterinary practice.

Keywords: Inflammation, Acute-phase reaction, Dog, Erythrocyte sedimentation rate, Interleukin-6, Acute-phase proteins, C-reactive protein, Fibrinogen.

Leukocytosis, the presence of fever and an increase in the levels of acute phase proteins (APP) such as C-reactive protein (CRP) and fibrinogen (Fib) have been used as markers of inflammatory or infectious processes in various animal species.^{3,12,27} The total white blood cell (WBC) count in dogs ranges from 6,000 to 17,000/ μ L. An inflammatory leukogram generally has a total WBC count between 20,000 and 30,000/ μ L and is characterized by neutrophilia with a left shift (more than 300 band cells/ μ L and/or the presence of primitive granulocytic cells), which can only be observed after 72 hours. In the initial phase, a dog suffering from an inflammatory process may present with a typical physiological leukocytosis or stress leukocytosis induced by fear of blood collection or stress as a result of pain associated with the disease. In this phase increases in interleukin-6 (IL-6) and APP levels and erythrocyte sedimentation rate (ESR) can be observed, although changes in the leukogram are not yet apparent.⁴⁴ APP determination is considered to be a more reliable indicator of the systemic response to inflammatory/infectious processes than other findings such as fever, elevated ESR or the presence of leukocytosis with neutrophilia.^{2,18} APPs are normally present in low concentrations and cannot be detected in healthy animals. An increase in their concentration is proportional to the intensity of the aggression and tissue destruction.⁴¹ Hence, measurement of plasmatic levels of APPs can be used to diagnose and monitor inflammatory processes.^{18,49} ESR is a non-specific marker of

diseases that is very useful in clinical practice for monitoring inflammatory conditions, infection, trauma or malignant diseases.³⁸ Elevated ESR in dogs is related to acute infectious processes, localized inflammatory processes (pleuritis, pericarditis and peritonitis), traumatic processes (surgery in general), neoplastic processes, pregnancy and terminal kidney disease.¹⁶ Many tests to measure ESR have been developed, but the most commonly used method in veterinary practice is the Wintrobe method.¹⁵ ESR can now be measured by semi-automated or fully automated systems, which yield accurate results in half the time needed to take measurements manually.^{37,40} Fib was the first APP to be recognized as such.^{12,17,42-43} Unlike in cattle and horses, measurement of plasma Fib levels is of little value in identifying inflammatory processes in dogs.⁴⁴ The normal value for plasma Fib in dogs lies between 100 and 500mg/dL, and higher values can indicate an inflammatory process. It is recommended that the ratio of total plasma protein to Fib (TPP:Fib) be calculated, however, in order to relate the increase in Fib to hemoconcentration or increased Fib production. A TPP:Fib ratio of less than 10 indicates an inflammatory process.¹⁵ In veterinary laboratory practice, Fib concentration is determined by the heat precipitation method^{19,16} as advocated by Jain,¹⁷ using a previously calibrated clinical refractometer as a screening test. However, to obtain more accurate results the Clauss method must be used.²⁰ CRP was discovered by Tillett and Francis in 1930 in the circulatory system of patients infected by *Streptococcus pneumoniae* because of its ability to bind to pneumococcal C-polysaccharide.¹¹ CRP serum concentration is normally less than 15 µg/mL³³ and increases drastically within 24 hours of tissue damage,¹³ when it can reach values more than 100 times the normal figure.³⁵ Serum CRP measurement has proved

useful in determining whether acute inflammation is present,^{13,33} in evaluating the activity of the disease,^{32,34,55} and in making a prognosis for, and monitoring, the disease.²¹ Elevated CRP serum concentrations have been reported following surgical trauma;⁵⁵ *Trypanosoma brucei*,³² *Erlichia canis*³⁹ and *Leishmania infantum* infections;²⁸ pneumonia;⁵⁵ neoplasias; and illnesses not associated with inflammation (diabetes mellitus, liver failure, kidney failure and exocrine pancreatic insufficiency).⁴⁷ Activation of the acute inflammatory response is regulated mainly by IL-6, which is released in the circulatory system in most situations where homeostasis is altered, such as when endotoxemias, traumas and acute inflammation/infection are present. Along with other cytokines, such as tumor necrosis factor (TNF), IL-1, IL-8 and interferons, it induces the acute-phase response (APR).⁴⁵ In dogs, increased IL-6 and TNF activity was found to occur before an increase in CRP and α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AG) levels, and increased IL-1 serum activity was not detected.⁵⁴

Although speedy, accurate determination of various laboratory parameters can help early identification and monitoring of the inflammatory/infectious process, there are few reports comparing CRP and IL-6 levels in dogs with other markers of inflammatory processes, such as an increase in body temperature, abnormal total leukocyte count and a left shift in the differential leukocyte count.³¹ In light of the above, the aim of this study was to investigate the clinical usefulness as markers of inflammatory processes in dogs of IL-6, CRP, Fib and ESR (the former two determined using a commercial ELISA kit, and the latter two measured using methodologies that are well established in human medical

practice) and to compare them with other classical inflammation markers in an attempt to optimize diagnostic techniques.

Materials and Methods

The project complies with the Ethical Principles for Experiments on Animals adopted by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the Ethics Commission for Animal Experimentation (CEEa) of the Institute of Biology, Campinas State University.

A total of 117 adult dogs of different breeds and both sexes were studied. These were divided into two groups: control animals (n=31) and animals suspected, based on clinical findings, of having an inflammation/infection (n=86). The probable diagnoses of the group studied, based on clinical examination, were: pyometra (n=6), dermatopathy (n=6), parasitic infections of red blood cells (n=32), vaginitis (n=2), trauma (n=2), gastroenteritis (n=2), verminosis (n=3), uveitis (n=1), nephropathy (n=3), neoplasia (n=1), dry gangrene (n=1), distemper (n=1), myiasis (n=3), otitis (n=1) and more than one disease (n=22). Puppies, pregnant bitches and animals that had been receiving medication in the previous seven days or had not been fasting before the laboratory tests were excluded. All the dogs were examined physically and their case histories analyzed. Blood samples were obtained by venipuncture using plastic syringes and disposable needles and transferred to three vacuum tubes (one containing EDTA, one with sodium citrate and one dry tube containing clot activator and separation gel - Vacuette, Greiner Bio-One, Austria). The hemograms and the assays to determine ESR and Fib concentration were carried out on the same day the blood samples were

taken. The serum was separated by centrifugation (1,500g/5 minutes) and stored at -80°C for subsequent analysis. The clinical and laboratory parameters indicating the presence of an inflammatory/infectious process were: fever ($>39.3^{\circ}\text{C}$),⁶ and/or a left shift (more than 300 band cells/ μL or the presence of primitive granulocytic cells,^{15,44} and/or hyperfibrinogenemia ($>500\text{mg/dL}$),^{42-43,16} and/or elevated ESR ($>10\text{mm}$)¹⁵ and/or CRP $> 15\mu\text{g/mL}$.³³

The complete blood count (CBC) was obtained using an automatic blood cell counter (ABCVet, Horiba-ABX, France), and the differential WBC count was carried out by microscopic examination of blood smears stained with May-Grüwald-Giemsa. The slides were read by the same examiner, and two hundred cells were counted in each slide. Fib concentration was measured using the automated Clauss method (AMAX Destiny Plus Amilung, Germany) using a commercial kit (AMAX Trinity Biotech, Ireland). ESR was measured by the automated method based on photometry and interrupted capillarity and by kinetic analysis (MicroTest 1X, Alifax-SPA, Italy). These tests, which are routinely used in human medicine, had been previously validated for use with canine samples. Canine CRP and IL-6 were determined using commercial ELISA kits (Canine C-reactive protein ELISA kit, BD Biosciences, USA, and Quantikine Canine IL-6 Immunoassay, R & D Systems, USA, respectively).

For the statistical analysis, the Chi-square test was used to compare the proportions, and the Mann-Whitney test to compare continuous or ordinal measurements for two groups. The correlation between two different inflammatory markers was determined with the Spearman correlation coefficient. A significance level of 0.05 ($p \leq 0.05$) was used.

The following software was used: SAS System for Windows (Statistical Analysis System), version 9.1.3, Service Pack 3 - SAS Institute Inc., 2002-2003, Cary, NC, USA, and SPSS for Windows, version 10.0 SPSS Inc., 1989-1999, Chicago, Illinois, USA.

Results

Of the 31 dogs in the control group, 12 were female and 19 male, and of the 86 sick dogs, 54 were female and 32 male. There was no statistically significant difference in the distribution between the sexes in either of the groups studied ($p=0.0751$, Chi-square test). The body temperature and the values for the laboratory parameters measured in the 31 healthy dogs and 86 animals with a clinical suspicious of inflammation/infection are given in Table 1. It can be seen that hemoglobin (HBG) concentration and platelet (PLT) count were lower in the group with inflammation than in the control group (Table 1).

With the exception of Fib concentrations, all the values for the inflammatory markers were higher in the group of sick animals than in the control group. In the differential WBC count, both the number of band cells ($p<0,0032$) and the number of basophils ($p<0.0016$) were higher in the group with inflammation/infection. There was no difference in the counts for the other types of leukocytes.

Automated ESR was the best marker of inflammation and infection, followed by CRP. These yielded abnormal results in 82.56% and 65.12% of the sick dogs, respectively. The other markers yielded abnormal results in less than 50% of the animals (Table 2). Particularly notable was the

extremely low percentage of samples with abnormal Fib concentrations (3.49%) and WBC counts (around 25%) (Table 2).

The inflammation indicators were correlated pairwise, and the vast majority showed no correlation, with the exception of ESR x CRP ($r=0.3470$, $p=0.0011$) and ESR x Fib ($r=0.2371$, $p=0.0279$), for which there were significant, albeit weak, correlations (Table 3).

The sick animals were subdivided into two categories according to whether their clinical data suggested a predominantly inflammatory or infectious condition. The two groups — infectious and inflammatory — thus formed contained 57 and 29 dogs, respectively. The data for the two groups are shown in Table 4. With the exception of body temperature, ESR and IL-6, significant changes were observed in all the parameters for the group with a presumed inflammatory process. The PLT count was significantly lower in the group with a presumed infectious process.

Discussion

Recognizing an inflammatory/infectious process in clinical veterinary practice is of the utmost importance. A clinical assessment must be made, and the laboratory procedures used must be accurate and inexpensive, with a short turnaround time. In this study we evaluated various parameters and tested their efficiency. In the control group, the PLT count was lower in males than in females, as were HGB levels. These findings differ from those described in the literature, in which no mention is made of differences in reference values between male and female dogs.¹⁶ In humans, HGB levels in young women are known to be lower

and to be influenced by pregnancy and menstruation.²⁵ In the present study, as females that were pregnant and/or in heat were excluded, the hypothesis that these factors might have interfered with HGB levels was rejected. However, as the number of healthy dogs studied was low, these data should be confirmed by studying a larger population.

Of the laboratory parameters studied, total WBC count and basophil and band cell counts were higher in the group of sick dogs than in the control group, a finding that is in line with those described in the literature.⁴⁴ Leukocytosis is a typical finding in an inflammatory process, especially when the latter is associated with bacterial infection. One of the factors that stimulates leukocytosis is the response of leukocytes to the action of proinflammatory cytokines, such as IL-1, which leads to an increase in the number of mature and immature neutrophils in the circulatory system.¹⁴

In addition, HGB levels and PLT counts were lower in the sick animals. A finding of anemia in inflammatory diseases has been reported in other studies with dogs. Experimental studies in which the inflammatory process was induced in dogs by administering turpentine oil showed that the animals had systemic symptoms characterized by fever, leukocytosis and mild anemia.⁵⁴ Feldman et al¹⁰ suggested that anemia due to inflammatory disease in dogs may be caused by disordered iron metabolism, i.e., a reduction in serum iron concentration, total iron binding capacity (TIBC), transferrin saturation percentage and the number of sideroblasts in the bone marrow.

In addition to their involvement in hemostasis, PLTs are known to play an active role in antimicrobial defense, the induction of

inflammation and tissue repair. The functions of PLTs include binding and internalization of pathogens with the release of microbicidal proteins; interaction with leukocytes and endothelial cells, which helps with the rolling process; the arrest and transmigration of leukocytes; and the release of various cell growth factors and chemokines.²³ The presence or absence of thrombocytosis or thrombocytopenia will depend on the cause of the inflammation/infection. Acute viral infections are associated with thrombocytopenia because of impaired megakaryopoiesis and increased consumption.^{5,48} Chronic infections or malignant diseases, in contrast, frequently lead to reactive thrombocytosis associated with an increase in the amount of thrombopoietin in the blood stream.^{4,9}

In the present study, the median PLT count in the group of sick dogs was lower than in the control group, a finding which is understandable as the dogs were in the acute phase of the inflammatory or infectious process. When the dogs were analyzed in two separate groups, the group in which infection predominated had a significantly lower number of platelets than the inflammatory group, supporting the ideas discussed above.

With regard to the serum/plasma markers, elevated Fib values in humans are mainly related to the inflammatory response that accompanies atherosclerosis and consequent cardiovascular events.⁵³ In animals there are reports of hyperfibrinogenemia in cattle,^{8,29} horses¹ and dogs^{42-43,46} with an acute or chronic inflammatory process. In the present study, only 3.49% of the dogs had hyperfibrinogenemia, and no significant difference was observed between the control group and sick group. When the groups were separated into inflammatory and infectious animals, however, the

former were found to have significantly higher values. There are various possibilities that explain the poor performance of Fib. Firstly, when there is a delay in performing venipuncture or in homogenizing the blood, Fib may be partially consumed.¹ Secondly, Fib levels in dogs can fall within 24 to 48 hours of the end of the acute phase⁴⁴. As the exact length of time between the start of the inflammatory/infectious process and blood collection was not known, some dogs may have been in a more advanced phase of the disease, when Fib levels had returned to normal. According to Céron et al³, although Fib can be easily measured, it is of limited clinical value in the diagnosis and monitoring of inflammation and is mainly used in routine diagnosis of hemostatic disorders.

The healthy animals in this study had serum CRP levels between 0 and 13.93µg/mL. These values are in agreement with those reported in studies of CRP levels in healthy dogs.^{22,24,28,30,35-36,39,50-51,55-56} Elevated CRP serum levels have been reported in a large number of inflammatory and infectious conditions, such as trauma, surgery, polyarthrititis, leptospirosis, bacterial and hemorrhagic enteritis, parvovirus infection and parasitic infections of red blood cells.⁷ Increased serum CRP levels were observed in 65.12% of the dogs in this study with inflammation/infection. In addition, a significant difference was found between the two groups. Although an increase in CRP occurs very soon after the inflammatory stimulus and is related to the extent and severity of the inflammatory process,^{34,55} use of this parameter in routine diagnosis is quite limited, primarily because of its high cost.

ESR, on the other hand, although a non-specific test, yielded interesting results and should be considered for use in clinical practice

as it is inexpensive, fast and easy to use. Elevated ESR was observed in 82.56% of the sick animals and proved to be the most sensitive marker of inflammation in the study. The speed with which red blood cells stack to form rouleaux, which determines the ESR, is known to be influenced by the concentration of APPs in the circulatory system. An example of such an APP is Fib, synthesis of which is stimulated by CRP.⁴⁴ However, other factors, such as the presence of anemia and morphological changes in red blood cells, can exert a negative influence on ESR. If the possible interference of these factors is ignored, the erythrocyte sedimentation rate can be used both to diagnose and to monitor inflammatory/infectious processes.²⁶ It should be stressed that when an automated system is used, measurement of this parameter is both practical and accurate, resulting in a method that is not only fast but also yields better-quality results.

As expected, the levels of IL-6, which is an important inducer of APR, were more elevated in the group of sick dogs than in the healthy group. Nevertheless, only 36 % of the animals with inflammation had values that were higher than normal. There is limited data in the literature regarding measurement of serum IL-6 in dogs. Yamashita et al⁵⁴ reported increased serum activity of a number of cytokines, such as IL-6 and TNF α , in cell culture, and this increase preceded the increase in APP levels. As mentioned in relation to the measurement of CRP levels, IL-6 measurement in routine diagnosis is limited because of its high cost and the fact that commercial kits are not yet available in Brazil.

In conclusion, our data show that the response in dogs with an inflammatory process was more pronounced than that in dogs with a predominantly infectious process, irrespective of whether it was

determined by plasma/serum measurements or hematological parameters. In the overall analysis, IL-6, CRP and Fib levels were higher in the inflammatory/infectious group but were of limited effectiveness in detecting individual sick dogs. Measurement of ESR proved to be the most accurate method for detecting an inflammatory/infectious process.

Financial Support: This project was financed by the State of São Paulo Research Foundation (FAPESP), Brazil (Ref. nos. 07/56716-3 and n° 06/59251-9).

Acknowledgements: We wish to express our gratitude to Prof. Maria Marluce dos Santos Vilela for offering the use of her laboratory and to Thais Nitsh Mazzola and Marcos Ituo Okada for their technical assistance.

References

1. Andrews DA, Reagan WJ, DeNicola DB: Plasma fibrinogen in recognizing equine inflammatory disease. *Compend Contin Educ Vet* 16(10):1349-1357, 1994.
2. Bonagura JD, Twedt DC: *Kirk's Current veterinary therapy XIV*. 14th ed., 1440p. Saunders, Philadelphia, USA, 2008.
3. Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 34(2): 85-99, 2005.
4. Cerutti A, Custodi P, Duranti M, Noris P, Balduini CL: Thrombopoietin levels in patients with primary and reactive thrombocytosis. *Br. J. Haematol.* 99:281-284, 1997.

5. Cole JL, Marzec UM, Gunthel CJ, Karparkin S, Worford L, Sundell JB, Lennox JL, Nichol JL, Harker LA: Ineffective platelets production in thrombocytopenic human immunodeficiency virus-infected patients. *Blood* 91:3239-3246,1998.
6. Dun JK: Febre e hipotermia. In: *Tratado de Medicina de Pequenos Animais*, 1st ed., pp. 28-38. Roca, São Paulo, Brazil, 2001.
7. Eckersall PD: The time is right for acute phase protein assays. *Vet J* 168: 3-5, 2004.
8. EK N: The quantitative determination of fibrinogen in normal bovine plasma and in cow with inflammatory conditions. *Acta Vet Scand Suppl* 13:174-184, 1972.
9. Estrov Z, Talpaz M, Mavligit G, Pazdur R, Greenberg SM, Kurzrock R: Elevated plasma thromboetic activity in patients with metastatic cancer-related thrombocytosis. *Am J Med* 98:551-558, 1995.
10. Feldman BF, Kaneko JJ, Farver TB: Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. *Am J Vet Res* 42(7):1109-1113, 1981.
11. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ: Acute phase reaction and acute phase proteins. *JZUS* 6B(11):1045-1056, 2005.
12. Harr KE: Diagnosis of systemic inflammatory disease in manatees (*Trichechus manatus latirostris*) [dissertation]. Florida: University of Florida, 2004.
13. Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S: A comparison of the concentration of C-reactive protein

and α 1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. Vet Res Commun 25: 117-26, 2001.

14. Hoshiya T, Watanabi D, Matsuoka T, Horiguchi K, Miki Y, Mizuguchi H, Ishii T, Nomura N, Nagashima Y, Okaniwa A: Acute phase response in toxicity studies II. Findings in beagles dogs injected with endotoxin or subjected to single-dose toxicity studies. J Toxicol Sci 26(2): 95-102, 2001.

15. Jain NC: Hematologic Techniques. In: Schalm's Veterinary Hematology, 3rd ed., pp.20-86. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1975.

16. Jain NC: The dog: Normal hematology with comments on response to disease. In: Schalm's Veterinary Hematology. 3rd ed., pp.103-125, Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1975.

17. Jain NC: The plasma proteins, dysproteinemias and immune deficiency disorders. In: Essentials of Veterinary Hematology, 5th ed., pp.349-380. Lea & Febiger, Philadelphia, USA, 1993.

18. Kajikawa T, Furuta A, Onishi T, Tajima T, Sugii S: Changes in concentration of serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. Vet Immunol Immunopathol 68: 91-8, 1999.

19. Kaneko JJ, Smith R: The estimation of plasma fibrinogen and its clinical significance in the dog. Calif Vet 21(8):21-24, 1967.

20. Kaneko JJ: Serum proteins and dysproteinemias. In: Clinical Biochemistry of domestic animals. 5th ed., pp. 117-138. Academic Press, New York, USA, 1997.

21. Kjølgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT: Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for determination of C-reactive protein in canine serum. *J Vet Med A* 50:164-8, 2002.
22. Kjølgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT: Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol* 32(2): 81-7, 2003.
23. Klinger MHF, Jelkmann W: Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 22:913-922, 2002.
24. Kuribayashi T, Shimada T, Matsumoto M, Kawato K, Honjyo T, Fukuyama M, Yamamoto Y, Yamamoto S: Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Exp Anim* 52(5): 387-90, 2003.
25. Laffan MA, Manning RA: Investigation of haemostasis. In: Dacie and Lewis Practical Hematology. 9th ed., pp.339-390. Churchill Livingstone London, England, 2001.
26. Lanzara GA, Provenza JR, Bonfiglioli R: Velocidade de hemossedimentação (VHS) de segunda hora: qual o seu valor? *Rev Bras de Reumato* 41(4): 237-41, 2001.
27. Martínez-Subiela S, Tecles F, Parra M.D, Cerón JJ: Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones en medicina veterinaria. *Anales de Veterinaria Murcia* 17: 99, 2001.

28. Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ: Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec* 150(23): 241-4, 2002.
29. McSherry BJ, Hourney FD, deGroot JJ: Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can J Comp Med* 34(7):191-197, 1970.
30. Mischke R, Waterston M, Eckersall PD: Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *Vet J* 174:188-192, 2007.
31. Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H: C reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci* 70(2): 127-131, 2008.
32. Ndung'u JM, Eckersall PD, Jennings FW: Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop* 49: 77-86, 1991.
33. Otabe K, Sugimoto T, Jinbo T, Honda M, Kitao S, Hayashi S, Shimizu M, Yamamoto S: Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. *Vet Res Commun* 22: 77-85, 1998.
34. Otabe K, Sugimoto T, Yamamoto S: C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Lab Anim* 34: 434-38, 2000.
35. Parra MD, Tuomola M, Cabezas-Herrera J, Cerón JJ: Use of time-resolved immunofluorometric assay for canine C-reactive protein in whole blood. *Am J Vet Res* 66(1): 62-66, 2005.

36. Parra MD, Tuomota M, Cabezas-Herrera J, Cerón JJ: Analytical and clinical validation of time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Vet Res Commun* 30: 113-26, 2006.
37. Plebani M, De Toni S, Sanzari MC, Beranardi D, Stockreober E: The TEST 1 automated system: a new method for measuring the erythrocyte sedimentation rate. *Am J Clin Pathol* 110: 334-340, 1998.
38. Plebani M, Piva E: Erythrocyte sedimentation rate Use of fresh blood for quality control. *Am J Clin Pathol* 117:621-626, 2002.
39. Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G, Mott J, Chichanasiriwithaya W: C-reactive protein and α 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Erlichia canis*. *J Clin Microbiol* 32(4): 912-17, 1994.
40. Romero A, Munoz M, Ramirez G: Length of sedimentation reaction in blood: a comparison of the test 1 ESR System with the ICSH reference method and the Sedisystem 15. *Clin Chem Lab Med* 41: 232-237, 2003.
41. Santos VM, Cunha SFC, Cunha DF: Velocidade de sedimentação das hemácias: utilidade e limitações. *Rev. Ass. Méd. Brasil* 46(3): 232-6, 2000.
42. Schalm OW, Smith R, Kaneko JJ: Plasma protein: fibrinogen rations in dogs, cattle and horses - Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. *Calif Vet* 24(2): 09-10, 1970.
43. Schalm OW: Plasma protein: fibrinogen rations in disease in the dog and horse - Part II. *Calif Vet* 24(4): 19-22, 1970.

44. Schutze AE: Interpretation of canine leukocyte responses. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., p. 366-381. Lippincott Willian & Wilkins, Philadelphia, USA, 2000.
45. Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Manns MP, Trautwein C: Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. Cell Mol Biol 47(4): 661-673, 2001.
46. Sutton RH, Johnstone M: The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leukocyte and neutrophil counts. J Small Anim Pract 18: 277-281, 1977.
47. Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Céron JJ, Paltrinieri S: Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. Vet Intern Med 19(6): 865-70, 2005.
48. Terata H, Baldini M, Ebbe S, Madoff MA: Interaction of *Influenza* virus with blood platelets. Blood 28:213-228, 1966.
49. Thomas JS: Overview of plasma proteins. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed., pp.891-898. Lippincott Willian & Wilkins, Philadelphia, USA, 2000.
50. Ulutas B, Bayramli G, Ulutas PA, Karagenc T: Serum concentration of some acute phase proteins in naturally occurring canine babesiosis: a preliminary study. Vet Clin Pathol 34(2): 144-147, 2005.
51. Veiga APM, Price CA, Oliveira ST, Santos AP, Campos R, Barbosa PR, González FHD: Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. J Vet Diagn Invest 20:224-228, 2008.

52. Welzl C, Leisewitz AL, Jacobson LS, Vaughan-Scott T, Myburgh E:
Systemic inflammatory response syndrome and multiple-organ
damage/dysfunction in complicated canine babesiosis. J S Afr Vet Assoc
72:158-162, 2001.
53. Willerson JT: Systemic and local inflammation in patients with
unstable atherosclerotic plaques. Prog Cardiovasc Dis 44(6):469-478:
2002.
54. Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Magio M, Izumikawa Y, Kotani T:
Canine acute phase response: Relationship between serum cytokine activity
and acute phase protein in dogs. J Vet Med Sci 56: 487-492, 1994.
55. Yamamoto S, Abe N, Santsuka H, Shida T, Kishida K, Kuwajima S, Yamada
M, Morimatsu M, Naiki M: Efficient preparation of monospécific anti-
canine C-reactive protein serum and purification of canine C-reactive
protein by affinity chromatography. Vet Immunol Immunopathol 36(3): 293-
301, 1993.
56. Yamamoto S, Tagata K, Nagahata H, Ishikawa Y, Morimatsu M, Naiki M:
Isolation of canine C-reactive protein and characterization of its
properties. Vet Immunol Immunopathol 30(4): 329-39, 1992.

Table 1: Results for body temperature and the laboratory parameters measured in the control group (n=31) and the group with an inflammatory/infectious process (n=86).

	Control	Inflammation	p* value
T (°C)	38.8 (38.00-39.30)	38.85 (37.90-40.20)	0.2121
HGB (g/dL)	16.75 (13.25-19.40)	12.55 (7.0-18.85)	<0.0001
PLT (10³/μL)	289.0 (200.0-664.5)	174.0 (18.5-900.0)	<0.0001
WBC (10³/μL)	10.9 (6.90-16.75)	12.88 (1.80-24.60)	0.0450
Band cells (%)	0.5 (0.0-3.0)	1 (0.0-25.0)	0.0032
Fib (mg/dl)	209 (75-379)	242 (127-826)	0.0689
ESR (mm)	2 (2-10)	39 (2-120)	<0.0001
CRP (μg/mL)	1.377 (0.000-13.931)	31.036 (0.000-181.181)	<0.0001
IL-6 (pg/mL)	0.000 (0.000-0.000)	21.115 (0.000-1238.286)	<0.0001

* Values are statistically different (p≤0.005) between the groups.

Table 2: Frequency of abnormal results for inflammatory markers in the group of dogs with an inflammatory/infectious process.

Marker	Frequency		95% CI
	n	%	
Temperature	17	19.77	11.98-29.75
WBC	22	25.58	16.78-36.13
Fib	3	3.49	0.73-9.86
ESR	71	82.56	72.87-89.90
CRP	56	65.12	54.08-75.08
IL-6	31	36.05	25.97-47.12
Left shift	23	26.74	17.77-37.38

*95% CI (ideal CI > 70%)

Table 3: Correlation between inflammatory markers.

		IL-6	CRP	ESR	Fib	Leukocytes
Temperature	r	0.0442	0.1425	0.0600	-0.0198	-0.0321
	p	0.6860	0.1906	0.5829	0.8566	0.7689
Leukocytes	r	-0.1710	0.0196	-0.0154	-0.0164	-
	p	0.1153	0.8578	0.8881	0.8810	-
Fib	r	0.0490	-0.0164	0.2371	-	-
	p	0.6542	0.8810	0.0279	-	-
ESR	r	0.1016	0.3470	-	-	-
	p	0.3521	0.0011	-	-	-
CRP	r	0.1889	-	-	-	-
	p	0.0815	-	-	-	-

Table 4: Results for body temperature and laboratory parameters measured in the group with infection (n=57) and the group with inflammation (n=29).

Parameters	Infectious Process n = 57	Inflammatory Process n = 29	p
T (°C)	38.80 (38.00-40.20)	38.90 (37.90-40.00)	0.5858
HGB (g/dL)	13.05 (7.00-18.60)	11.15 (7.55-18.85)	0.0258
PLT (10³/μL)	161.00 (18.50-385.50)	212.00 (64.00-900.00)	0.0315
WBC (10³/μL)	11.80 (1.80-23.60)	16.20 (8.30-24.60)	0.0034
Band cells (%)	1.00 (0.00-12.00)	1.50 (0.00-25.00)	0.0020
Fib (mg/dL)	217.00 (127.00-445.00)	288.00 (148.00-826.00)	0.0004
ESR (mm)	38.00 (2.00-120.00)	47.00 (2.00-120.00)	0.3417
CRP (μg/mL)	18.82 (0.02-99.29)	43.45 (0.00-181.18)	0.0171
IL-6 (pg/mL)	21.12 (0.00-1238.29)	21.12 (0.00-849.16)	0.7004

* Values are statistically different ($p \leq 0.005$) between the groups.

T temperature, WBC total white blood cell count, Fib fibrinogen, ESR erythrocyte sedimentation rate, CRP C-reactive protein, IL-6 interleukin-6.