

## **INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

### **ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

# **ESTÁGIO CURRICULAR EM PATOLOGIA VETERINÁRIA**

Aluno: Ana Carolina Mateus Soeiro

Orientador: Especialista Mário Maia-Matos – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador: Especialista Inês Carvalho – Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – DNAtech

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

Lisboa, 2023



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

## **ESTÁGIO CURRICULAR EM PATOLOGIA VETERINÁRIA**

Aluno:

Ana Carolina Mateus Soeiro

Orientador: Especialista Mário Maia-Matos – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Orientador: Especialista Inês Carvalho – Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias – DNAtech

Júri:

Presidente: Doutora Edna Soraia Ribeiro – Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa

Arguente: Doutor Rui Pedro Faísca – Instituto Gulbenkian de Ciência

Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

Lisboa, 2023



## Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa da minha vida e que nunca me deixaram desistir.

Aos professores do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais, por toda a aprendizagem transmitida, especialmente à Professora Doutora Edna Ribeiro, pela possibilidade de realizar este estágio, e ao Professor Mário Maia Matos pela orientação em todo o processo.

Agradeço, acima de tudo, à minha família, pelo contributo na minha formação académica, por me terem sempre acompanhado e por me incentivarem a dar o melhor de mim.

Ao meu namorado, Frederico, por toda a paciência, carinho e apoio incondicional demonstrados nesta etapa da minha vida

Por fim, ao Laboratório DNAtch, e a todos os técnicos que nele trabalham, por me terem recebido tão bem e por todo o conhecimento que me transmitiram durante o período de estágio. Um especial agradecimento à Dra. Inês Carvalho, pela orientação dentro do laboratório.



## **Resumo**

O presente relatório de estágio, tem por base um estágio curricular em patologia veterinária, realizado no laboratório de análises clínicas veterinárias DNAtch, em Lisboa, exercido no âmbito do Mestrado em Tecnologias Clínico-Laboratoriais da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa. A realização deste estágio permitiu consolidar e aplicar os conhecimentos adquiridos na componente teórica do mestrado, possibilitando vivenciar a rotina diária de um laboratório de análises clínicas veterinárias. Durante o estágio tive a oportunidade de contactar e executar diferentes técnicas nas áreas de Anatomia Patológica, Urinálise, Microbiologia e Hematologia. Para além disso, o estágio permitiu obter uma boa comunicação e integração na equipa do laboratório, assim como saber lidar no dia-a-dia de um laboratório de análises clínicas veterinárias. Este relatório dispõe ainda da realização de um projeto, que permitiu a implementação de um novo equipamento no laboratório, descrevendo todo o processo necessário para a sua validação.

Palavras-chave: Patologia Veterinária; Histopatologia; Urina tipo II; Urinálise; Microbiologia; Hematologia.

## **Abstract**

This report is based on a curricular internship in veterinary pathology, carried out at the DNAtch veterinary clinical analysis laboratory, in Lisbon, carried out within the scope of the master's degree in Clinical-Laboratory Technologies of the Lisbon Superior School of Health Technology. The completion of this internship allowed me to consolidate and apply the knowledge acquired in the theoretical component of the master's degree, making it possible to experience the daily routine of a veterinary clinical analysis laboratory. During the internship I had the opportunity to contact and perform different techniques in the areas of Pathological Anatomy, Urinalysis, Microbiology and Hematology. In addition, the internship allowed for good communication and integration in the laboratory team, as well as knowing how to deal with the day-to-day activities of a veterinary clinical analysis laboratory. This report also includes the realization of a project, which allowed the implementation of new equipment in the laboratory, describing the entire process necessary for its validation.

Keywords: Veterinary Pathology; Histopathology; Urine Type II; Urinalysis; Microbiology; Hematology.



# Índice geral

1. Caracterização da instituição .....	1
2. Receção de amostras .....	3
3. Histopatologia .....	5
Técnica histológica .....	5
Fixação .....	5
Macroscopia.....	6
Processamento .....	7
Inclusão.....	8
Microtomia.....	9
Coloração.....	9
Montagem .....	11
Extração de DNA.....	12
Imunohistoquímica.....	12
Recuperação antigénica.....	13
Técnica manual de imunohistoquímica.....	13
Desidratação e montagem .....	16
Controlo de qualidade .....	16
Estudo de caso I .....	17
Estudo de caso II .....	19
Estudo de caso III .....	20
4. Análise de urina tipo II .....	23
Características físicas.....	24
Cor .....	24
Odor .....	24
Turbidez .....	24
Sedimento macroscópico .....	25
Características químicas.....	25
Glucose.....	26
Bilirrubina .....	26
Corpos cetónicos.....	27
pH .....	27
Proteínas.....	27

Urobilinogénio .....	28
Nitritos.....	28
Eritrócitos .....	28
Leucócitos.....	29
Densidade urinária .....	29
Preparação da lâmina para visualização.....	30
Análise microscópica do sedimento urinário .....	30
Estudo de caso I .....	32
Estudo de caso II .....	34
5. Microbiologia .....	35
Colheita .....	36
Transporte e conservação .....	36
Bacteriologia.....	37
Exame cultural .....	38
Exame microscópico – Coloração de Gram.....	41
Identificação manual .....	41
Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (automático) .....	42
Urocultura – Cultura de urina .....	43
Hemocultura – Cultura de sangue .....	45
Coprocultura – Cultura de fezes .....	46
Cultura de líquidos biológicos.....	46
Cultura de aeróbios.....	47
Cultura de anaeróbios.....	47
Estudo de caso I .....	47
Estudo de caso II.....	48
Micologia .....	49
Estudo de caso III.....	51
Parasitologia.....	51
Estudo de caso IV .....	53
6. Hematologia.....	55
Sangue .....	55
Colheita de amostras.....	55
Equipamentos.....	56
Hematopoiese.....	56

Hemograma.....	57
Eritrograma .....	57
Reticulócitos.....	59
Leucograma .....	59
Plaquetograma.....	60
Esfregaço de sangue periférico .....	61
Coloração Diff-Quick .....	61
Alterações na série vermelha.....	62
Alterações no tamanho e cor.....	62
Alterações na forma .....	63
Inclusões eritrocitárias e alterações na distribuição eritrocitária .....	64
Alterações na série branca .....	65
Alterações nas plaquetas.....	67
Hemostase .....	67
Determinação do Tempo de Protrombina.....	68
Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada .....	68
Determinação do Tempo de Trombina .....	68
Determinação do Fibrinogénio.....	68
Determinação dos D-Dímeros .....	69
Caso de estudo I.....	69
7. Protejo.....	71
Introdução.....	71
Objetivos.....	71
Materiais e métodos.....	72
Resultados.....	73
Discussão e conclusão .....	74
8. Referências bibliográficas .....	77
9. Anexos .....	81
10. Apêndices .....	101



## Índice de tabelas

Tabela 2.1 Sistema de identificação de amostras biológicas. ....	3
Tabela 3.1 Colorações histoquímicas especiais. ....	11
Tabela 3.2 Anticorpos.....	14
Tabela 5.1 Procedimento de colheita para diferentes tipos de amostras em microbiologia. .	36
Tabela 5.2 Descrição de diferentes meios de cultura utilizados em bacteriologia. ....	39
Tabela 5.3 Descrição de características de algumas bactérias responsáveis por infeções em animais.....	42
Tabela 5.4 Cartas de identificação e sensibilidade utilizadas no laboratório através do analisador VITEK® 2 Compact da Biomérieux. ....	43
Tabela 5.5 Classificação da avaliação semiquantitativa de uroculturas.....	44
Tabela 5.6 Valorização de resultados no processamento de uroculturas. ....	44
Tabela 5.7 Descrição dos meios de cultura utilizados em micologia.....	50
Tabela 6.1 Parâmetros hematológicos e respetivas metodologias usadas pelo aparelho Sysmex XN-1000. ....	56
Tabela 6.2 Alterações na forma dos eritrócitos, características e significado diagnóstico.....	63
Tabela 6.3 Alterações na fórmula leucocitária e principais causas. ....	66
Tabela 6.4 Alterações associadas ao aumento e diminuição do número de plaquetas e possíveis causas. ....	67
Tabela 10.1: Células presentes no sedimento urinário. ....	101
Tabela 10.2: Cristais presentes no sedimento urinário. ....	102
Tabela 10.3: Cilindros presentes no sedimento urinário. ....	105
Tabela 10.4 Organismos presentes no sedimento urinário.....	106
Tabela 10.5 Outros achados e artefactos (contaminantes) presentes no sedimento urinário. ....	107
Tabela 10.6 Descrição dos parasitas fecais mais comuns em animais.....	109
Tabela 10.7 Escalas qualitativas para a comparação de resultados, nos parâmetros da bilirrubina, corpos cetónicos, urobilinogénio e nitritos. ....	111
Tabela 10.8 Escalas qualitativas e semiquantitativas para a comparação de resultados, nos parâmetros das proteínas e da glucose.....	112



## Índice de figuras

Figura 3.1 A e B – Retalho cutâneo; C e D – Testículo.....	7
Figura 3.2 A – Imunomarcação pelo CD117 (400x), apresenta uma marcação membranar. B – Imunomarcação pelo Ki67 (400x), apresenta uma expressão de rácio 5.....	18
Figura 3.3 A – Imunomarcação pelo CD117 (400x), apresenta uma marcação membranar. B – Imunomarcação pelo Ki67 (400x), apresenta uma expressão de rácio menor que 1. ....	19
Figura 3.4 A – Imunomarcação pelo MUM-1 (400x). B – Imunomarcação pelo Pax-5 (200x). C – Imunomarcação pelo CD3 (200x). ....	20
Figura 4.1 Tira reagente Multistix® 10 SG da Siemens Healthineers. ....	25
Figura 4.2 A – Cristais de estruvite (400x). B – Cristais de oxalato de cálcio dihidratado (400x). ....	31
Figura 4.3 A – Cristais de biurato de amónia e/ou xantina (400x). B – Cristais de cistina (400x). C – Cristais de bilirrubina (400x). ....	32
Figura 4.4 A – Aglomerados de bactérias no sedimento urinário não corado (400x). B – Bactérias (cocos) no sedimento urinário corado (1000x). ....	33
Figura 4.5 Cristais de ácido úrico (400x). ....	34
Figura 5.1 Formas básicas das bactérias. (a) cocos; (b) bacilos; (c) forma de espiral e arranjos celulares de bactérias.....	37
Figura 5.2 Representação esquemática da técnica de inoculação por (A) quadrantes e por (B) sementeira semi-quantitativa.....	39
Figura 5.3 Uroculturas positivas em meio CPSE. A – Escherichia coli; B – Enterococcus spp.; C – Klebsiella spp.; D – Staphylococcus pseudointermedius; E – Staphylococcus epidermidis; F – Proteus spp. ....	45
Figura 5.4 Cultura de Salmonella spp. em meio CHROMID® Salmonella Elite (A) e Hektoen agar (B) da Biomerieux.....	46
Figura 5.5 Cultura positiva de: Escherichia coli em meio MacConkey (A), Enterococcus spp. em meio CNA (B), Klebsiella spp. em meio MacConkey (C), Pseudomonas spp. em meio MacConkey (D) e Staphylococcus aureus em meio CNA (E). ....	47
Figura 5.6 A – Bactérias e leucócitos presentes no sedimento urinário (400x); B – Cultura com crescimento de Escherichia coli. ....	48
Figura 5.7 Cultura sem crescimento bacteriano no meio MacConkey, e com crescimento bacteriano no meio CNA. ....	49
Figura 5.8 A – Cultura de colónias de Candida Albicans. Lado esquerdo: meio cromogénico com colónias azuis de Candida Albicans. Lado direito: meio seletivo com colónias brancas de Candida Albicans. B – Cultura de colónias de Malassezia pachydermatis.....	51
Figura 5.9 Cultura de colónias de Malassezia pachydermatis em ambos os lados da placa.....	51

Figura 5.10 Oocistos de <i>Isospora</i> spp. (400x). .....	53
Figura 6.1 Diagrama que mostra a célula-mãe (pluripotente) e as linhagens celulares que dela se originam. As CFU são células progenitoras que perdem a pluripotencialidade e adquirem alta capacidade de proliferação, e podem ser diferenciadas como células linfóides (CFU-L), que dão origem aos linfócitos (células maduras), ou como células mielóides (CFU-GEMM), que originam os restantes tipos celulares. As células precursoras já estão comprometidas com uma linhagem específica, contudo ainda possuem alto poder de mitose, e por fim as células maduras possuem morfologia típica e atividade funcional diferenciada e não têm qualquer capacidade de divisão (ex: eritrócitos, neutrófilos). .....	57
Figura 6.2 A – Reticulócitos em canídeo. B – Reticulócitos em felídeo. Fonte: Harvey JW. <i>Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas</i> . .....	59
Figura 6.3 Ilustração de como executar um esfregaço de sangue periférico. (A) Uma gota de amostra de fluido é colocada numa lâmina de microscópio de vidro perto de uma extremidade, então uma lamela é deslizada para trás para entrar em contato com a frente da gota. (B) Quando a gota entra em contato com a lamela, a mesma espalha-se rapidamente ao longo da junção entre as duas. (C) e (D) A lamela é então deslizada suave e rapidamente para a frente ao longo da lâmina, produzindo uma mancha com uma cauda. (E) Esfregaço de sangue periférico. ....	61
Figura 6.4 Visualização microscópica de eritrócitos normocíticos e normocrómicos. ....	62
Figura 6.5 Presença de anisocitose. Fonte: Harvey JW. <i>Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas</i> . ....	62
Figura 6.6 A – Presença de Rouleaux em eritrócitos. B – Presença de Aglutinação em eritrócitos. Fonte: Harvey JW. <i>Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas</i> . ....	65
Figura 6.7 A – Visualização de um esfregaço que apresenta leucocitose. B – Visualização de um esfregaço que apresenta leucopenia. Fonte: Harvey JW. <i>Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas</i> . ....	65
Figura 6.8 Visualização do esfregaço sanguíneo, com confirmação de eosinofilia. ....	69
Figura 6.9 Boletim de análises de hematologia e imunologia. ....	70
Figura 7.1 Tira reagente AUTION Sticks 10EA da Arkray.....	72
Figura 7.2 Caracterização da população de 137 amostras por espécie, em percentagem. ..	73
Figura 7.3 Caracterização dos resultados, concordantes e não concordantes, entre as duas máquinas, tendo em conta cada parâmetro, em percentagem. ....	73
Figura 7.4 Comparação dos resultados concordantes e não concordantes obtidos, através de duas classificações diferentes, relativamente ao parâmetro pH, em percentagem. ....	74
Figura 10.1 Valores efetivos de pH e agrupamento por classificação.....	112

## Índice de anexos

Anexo 1 Protocolo de processamento histológico no programa de rotina.....	81
Anexo 2 Protocolo da coloração de rotina de hematoxilina-eosina.....	81
Anexo 3 Protocolo de coloração PAS.....	82
Anexo 4 Protocolo de coloração PERLS. ....	83
Anexo 5 Protocolo de coloração Van Gieson. ....	84
Anexo 6 Protocolo de coloração Vermelho do Congo.....	85
Anexo 7 Protocolo de coloração Fouchet Van Gieson.....	86
Anexo 8 Protocolo de coloração Rodanina.....	87
Anexo 9 Protocolo de coloração Giemsa.....	88
Anexo 10 Protocolo de coloração Giemsa modificado.....	89
Anexo 11 Protocolo de coloração Ziehl-Neelsen. ....	90
Anexo 12 Protocolo de extração de DNA de blocos de parafina.....	91
Anexo 13 Protocolo de imunohistoquímica.....	92
Anexo 14 Tabela de cores da tira reagente no exame químico de urina (Siemens Healthineers).....	93
Anexo 15 Procedimentos e princípios da coloração de Gram. A – Bactérias gram-positivas observadas sob óleo de imersão aparecem roxas. B - Bactérias gram-negativas observadas sob óleo de imersão aparecem rosas.....	94
Anexo 16 Protocolo de elaboração de meio cromogénico para deteção de Malassezia. ....	95
Anexo 17 Protocolo da técnica de flutuação fecal. ....	96
Anexo 18 Procedimento da preparação da técnica de sedimentação fecal utilizando o Biosepar Kit ParasiTrap® Sedimentation. ....	97
Anexo 19 Procedimento de teste de diagnóstico rápido in vitro para a deteção de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. da Coris Bioconcept Kit Crypto-Giardia Duo-Strip. ....	98
Anexo 20 Tabela 1. Intervalos de referência para valores hematológicos em animais domésticos. Fonte:Apêndice 1: Tabelas. Harvey JW. Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas. Elsevier, Inc.; 2012. 360 p.....	99
Anexo 21 Protocolo de coloração Diff-Quick. ....	99
Anexo 22 Tabela de cores da tira reagente no exame químico de urina (Arkray). ....	100



## Lista de abreviaturas

- μL – microlitro
- aPTT – tempo de tromboplastina parcial ativada
- CHGM – concentração de hemoglobina globular média
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- GN – bactérias gram-negativas
- GP – bactérias gram-positivas
- HCT – hematócrito
- HE – hematoxilina-eosina
- HGM – hemoglobina globular média
- HPF – ampliação de 400x (*high power field*)
- IHQ – imunohistoquímica
- ITU – infecções do trato urinário
- LPF – ampliação de 100x (*low power field*)
- MEC – matriz extracelular
- O<sub>2</sub> – oxigénio
- PAS – ácido periódico-reactivo de Shiff
- PBS – tampão fosfato-salino (*Phosphate-buffered saline*)
- PDW – índice de distribuição do tamanho das plaquetas
- PT – tempo de protrombina (PT)
- RDW – índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos
- TSA – teste de suscetibilidade aos antimicrobianos
- TT – tempo de trombina
- UPC – rácio proteína/creatinina na urina
- VGM – volume globular médio
- VPM – volume plaquetar médio



# 1. Caracterização da instituição

---

A DNAtch é um laboratório de análises clínicas veterinárias fundado em 2004 e tem como missão prestar um serviço diferenciador e de qualidade, que ajude as clínicas veterinárias e os médicos veterinários a chegarem rapidamente a um diagnóstico fiável e rigoroso.

Neste momento possui três polos de laboratórios espalhados pelo país, em Lisboa, no Porto e no Algarve.

Aliada sempre ao trabalho em equipa com o médico veterinário ou investigador científico, a DNAtch assenta nos valores de rapidez, qualidade, ética e profissionalismo, procurando otimizar os recursos e potenciar os resultados, assegurando a excelência das análises clínicas veterinárias e dos estudos realizados, bem como dos diagnósticos apresentados. Para além disso, assume um compromisso com a sociedade civil, comprometendo-se a utilizar os meios ao seu dispor para determinar e controlar doenças sistémicas que possam ter consequências negativas para a saúde pública.

A história da DNAtch começa com a área da Imunologia, passando em 2006 para outras especialidades como Citologia, Hematologia, Bioquímica e Endocrinologia. À diversidade de áreas juntou a qualidade do serviço, o que lhe permitiu trabalhar com grupos de investigação da indústria farmacêutica e com as mais prestigiadas instituições nacionais de investigação, como o Instituto Gulbenkian de Ciência, o Instituto de Medicina Molecular e o Instituto de Conservação da Natureza.

Atualmente presta serviços nas especialidades de Hematologia, Bioquímica, Hemóstase, Endocrinologia e Toxicologia, Imunologia, Microbiologia, Biologia Molecular, Histopatologia, Citologia, Radioimunoensaio e Alergologia, apresentando também uma forte componente de Investigação e Desenvolvimento.

A DNAtch foi fundada pela atual Administradora-Geral, Ângela Xufre, que lidera a empresa em conjunto com o Diretor-Executivo, Tiago Paiva, contando com mais de 50 profissionais dispersos pelos diversos departamentos dos três polos. No polo laboratorial de Lisboa o departamento técnico possui dezassete técnicos, quatro citologistas e quatro histopatologistas, todos eles focados no objetivo de garantir diagnósticos fiáveis aos médicos veterinários.

Apresentando foco na inovação e no desenvolvimento e com o objetivo de fortalecer a ligação entre a ciência e a veterinária, a DNAtch colabora com várias universidades do país, dando apoio a teses de doutoramento e de mestrado, e inserindo na sua equipa estagiários de diversas licenciaturas, contribuindo para a aprendizagem e formação de novos técnicos.



## 2. Receção de amostras

As amostras processadas no laboratório são enviadas por clínicas e hospitais veterinários e chegam ao mesmo através de estafetas ou por correio. Estas vêm acompanhadas de requisições, que referem todas as informações relativamente aos dados do animal, as análises pretendidas e dados clínicos importantes.

Na receção das amostras, tais são registadas com um número próprio interno a partir de um código de barras, composto pelo número interno de identificação do animal (ID) seguido do código específico de amostra (Tabela 2.1), por exemplo, uma amostra de urina, para realização de uma urocultura, será identificada como “U0”, enquanto uma amostra de sangue em tubo EDTA, para realização de um hemograma, será identificado como “H0”.

Após a inserção em sistema informático de todas as requisições, que inclui a criação de uma ficha onde constam as informações do animal e as análises pretendidas, são criadas listas de trabalho para cada área, que garantem o correto processamento de todas as amostras recebidas.

Tabela 2.1 Sistema de identificação de amostras biológicas.

ID	Análise	Tipo de amostra	Código específico de amostra	Exemplo
xxxx	Hematologia	Sangue: Tubo EDTA	H0	xxxxH0
xxxx	Bioquímica, Endocrinologia, Toxicologia, Alergologia, Imunologia	Sangue: Tubo seco; Tubo heparina; Tubo EDTA	S0	xxxxS0
xxxx	Coagulação	Sangue: Tubo de citrato	C0	xxxxC0
xxxx	Urianálise	Urina: Tubo seco; Contentor estéril; Seringa	U0	xxxxU0
xxxx	Coprologia	Fezes: Contentor estéril; Outros	F0	xxxxF0
xxxx	Microbiologia	Zaragatoa seca; Zaragatoa com meio; Contentor ou seringa com líquidos biológicos	Z0	xxxxZ0
xxxx	Cultura Dermatófitos	Pelos: Tubo seco; Contentor	P0	xxxxP0
xxxx	Biologia Molecular	Sangue: Tubo EDTA	H0	xxxxH0
xxxx	Citologia	Lâminas, Tubo seco/contentor/seringa com líquidos biológicos, Tubo EDTA com sangue	L0	xxxxL0
xxxx	Histopatologia	Biópsias: Contentor	B0	xxxxB0



## 3. Histopatologia

---

Na generalidade, a histopatologia estuda os efeitos, causas e mecanismos estruturais e funcionais de uma patologia com o objetivo final de diagnóstico, terapêutica ou investigação. Mais concretamente, a histologia é o estudo dos tecidos do corpo e de como estes tecidos se organizam para constituir órgãos. Há quatro tecidos fundamentais: tecido epitelial, tecido conjuntivo, tecido muscular e tecido nervoso. Os tecidos são constituídos por células e por matriz extracelular (MEC). Cada um dos tecidos fundamentais é formado por vários tipos de células características daquele tecido e por associações e arranjos característicos entre as células e MEC. Estas associações são, geralmente, muito particulares e facilitam o reconhecimento dos vários subtipos de tecidos.<sup>1</sup>

O pequeno tamanho das células e dos componentes da MEC torna a histologia dependente do uso de microscópios. O procedimento mais usado no estudo de tecidos ao microscópio consiste na preparação de cortes histológicos. No microscópio óptico a imagem forma-se após um feixe de luz atravessar uma estrutura. No entanto, na maioria dos casos, os tecidos e órgãos são espessos e não permitem a passagem adequada de luz para formação de uma imagem.<sup>1</sup> Posto isto, antes de serem observados ao microscópio os tecidos e órgãos devem ser submetidos a um conjunto de procedimentos, designados de técnica histológica.

### Técnica histológica

A técnica histológica representa o conjunto de procedimentos realizados desde a chegada de uma amostra ao laboratório até à sua visualização microscópica. A técnica histológica é composta pelas seguintes etapas: fixação, macroscopia, processamento, inclusão, microtomia, coloração e montagem.<sup>2</sup> No laboratório, esta técnica é realizada diariamente com a finalidade de obtenção de lâminas coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) que são enviadas aos histopatologistas para análise.

#### Fixação

A fixação das peças histológicas é de extrema importância. Esta fase não só evita a digestão dos tecidos por enzimas presentes nas próprias células (autólise), como por bactérias (putrefação). Outras finalidades da fixação são o endurecimento dos fragmentos, a preservação, em grande parte, da estrutura e composição celular dos tecidos, de modo a conservar o aspeto *in vivo*, bem como ajuda na penetração dos reagentes utilizados durante a técnica histológica.<sup>1,3</sup>

A fixação pode ser feita por métodos químicos ou, menos frequentemente, por métodos físicos. Na fixação química os tecidos são imersos em soluções de agentes desnaturantes ou de agentes que estabilizam as moléculas formando pontes com moléculas vizinhas. Estas soluções são chamadas de fixadores. Uma vez que demora algum tempo para que o fixador se difunda de maneira completa pelo interior dos fragmentos, estes geralmente devem ser cortados em fragmentos menores antes de serem imersos no fixador. Desta maneira é facilitada a penetração do fixador no fragmento e é garantida uma melhor preservação da sua estrutura.<sup>1</sup> No laboratório é utilizado como solução fixadora o formaldeído a 10% tamponado.

O objetivo final da fixação consiste no pressuposto de que o tecido visto ao microscópio seja o mais semelhante possível ao seu estado *in vivo*. Contudo, uma boa fixação depende de vários fatores, como as características do tecido, a espessura das peças e a relação do volume da amostra pelo volume de fixador.<sup>3</sup> As amostras devem ser inseridas num volume de formol de pelo menos 4 vezes o volume da amostra, sendo 10 vezes o ideal para uma boa fixação.

## Macroscopia

A macroscopia é realizada dentro de uma *hotte*, com o auxílio de diversos materiais, nomeadamente tábua, bases descartáveis que absorvem a formalina, lápis, material cortante, pinças, cassetes e um gravador.

Após consultar os dados do animal e as informações relativamente à amostra, nomeadamente a número de contentores enviados e a região exata de onde foi extraída a amostra, é iniciada a gravação da descrição da amostra.

Na descrição é referido o tipo de peça (retalho cutâneo, tumorectomia, esplenectomia, cadeia mamária, etc.), as estruturas constituintes, as dimensões (comprimento x largura x profundidade), qual o tipo de alteração visível na peça (nódulo, estrutura quística, área hemorrágica, etc.) e é exposto o aspeto da alteração (dimensão, cor, consistência e conteúdo). Em seguida são cortados fragmentos representativos das zonas com lesão mencionando se os limites são bem delimitados e a distância entre a lesão e a margem cirúrgica mais próxima. Os fragmentos selecionados são colocados em cassetes devidamente identificadas. A descrição acaba com o registo do número de cassetes, fragmentos e se existe reserva da amostra. Posteriormente, a gravação é passada por escrito em formato digital.

Quando se trata de biópsias, estas são incluídas na totalidade, sendo indicados os dois maiores eixos, e neste caso são usadas cassetes com uma malha mais fina para não existir perda de amostra. No caso de peças cirúrgicas, uma vez que são amostras de maior complexidade exigem uma descrição detalhada e a análise cuidada e requerem a escolha dos fragmentos a analisar.

As cassetes com amostras rijas, devido à presença de cálcio, precisam de passar por mais uma etapa antes do processamento, designada descalcificação. São exemplos de amostras que necessitam de descalcificação órgãos de consistência pétreia, como osso, dente e unha e tecidos calcificados por alterações patológicas, como tumores mamários. No laboratório é utilizado o descalcificador RDO que utiliza o ácido clorídrico na sua ação. Os agentes ácidos formam com o cálcio combinações solúveis em água, levando à dissolução dos sais de cálcio após a realização de lavagens em água corrente. Contudo, a descalcificação acarreta alguns problemas, nomeadamente a alteração das afinidades tintoriais, a destruição celular e o impedimento do estudo imunohistoquímico.

Após a macroscopia, os contentores com fragmentos restantes são armazenados como material de reserva e são guardados por o período de aproximadamente um mês.



Figura 3.1 A e B – Retalho cutâneo; C e D – Testículo.

De seguida, é apresentado um exemplo da descrição macroscópica de um retalho cutâneo (Figura 3.1 A e B): Recebido um contentor com uma amostra conservada em formalina. Trata-se de um nódulo subcutâneo no membro anterior direito. É um retalho cutâneo elíptico com 3 cm x 2 cm. Em secção observa-se nódulo subcutâneo branco, heterogéneo com focos congestivos que mede 1,5 cm x 0,7 cm e que dista 0,2 cm da margem lateral e 0,1 cm da margem profunda. Apresentando outro exemplo, neste caso da descrição macroscópica de um testículo (Figura 3.1 C e D): Recebido um contentor com uma amostra conservada em formalina. Trata-se de um testículo de dimensões aumentadas. É uma peça de orquiectomia disforme com 5,5 cm x 4,3 cm. Em secção o parênquima encontra-se ocupado por lesão necrosada heterogénea.

## Processamento

O processamento consiste na retirada de água do tecido e substituição por parafina, fazendo com que seja possível, posteriormente, incluir a amostra num bloco de parafina proporcionando o corte em fatias muito finas para observação no microscópio.<sup>3,4</sup> O processamento é dividido nas seguintes etapas: desidratação, diafanização e impregnação.

A desidratação consiste na retirada da água dos tecidos, uma vez que as substâncias usadas nas etapas seguintes não são miscíveis com água. Com essa finalidade, são utilizados

banhos em álcoois de forma crescente: álcool a 70%; seguido de álcool a 96%; e álcool a 100%. A diafanização irá substituir o álcool pelo xilol, pois a parafina não é miscível em álcool. O xilol torna-se um bom agente entre a parafina e o álcool, pois é solúvel em ambos. Quando os fragmentos de tecidos são embebidos no xilol, eles ficam transparentes ou translúcidos.<sup>1</sup> A impregnação é a última etapa do processamento, na qual é realizada a impregnação das amostras em parafina. Durante esta etapa é preciso existir uma temperatura ótima (56-60°C), na qual a parafina estará na sua fase líquida e o calor causa a evaporação do xilol, levando os espaços existentes dentro dos tecidos a ficarem preenchidos com parafina.<sup>3,5</sup>

No laboratório o processamento ocorre de maneira automática, sendo utilizado o equipamento *Thermo Scientific STP 120 Spin Tissue Processor*. Este equipamento possui um carrossel com 12 depósitos de reagente, e consegue processar até 120 cassetes de uma só vez. O programa utilizado no laboratório tem uma duração de aproximadamente 15 horas e é programado no final da tarde, com finalidade das amostras estarem processadas no começo do dia de trabalho da manhã seguinte. O protocolo utilizado está descrito no Anexo 1.

## Inclusão

No processamento o tecido foi penetrado por parafina, agora na inclusão a parafina irá envolver o exterior da peça, formando um bloco que será submetido à microtomia.<sup>3</sup> Esta etapa é realizada no equipamento *Thermo Scientific EC 350 Modular Tissue Embedding Center*. Este é constituído por uma placa quente e uma fria, um dispensador de parafina, um recipiente com parafina e um recipiente com moldes.

Após retirar as amostras do processador, as mesmas são colocadas no recipiente com parafina do aparelho de inclusão. De seguida, uma cassete de cada vez, são incluídas em parafina. Primeiramente, é feita a escolha do molde ideal, este será o que consegue acomodar toda a amostra sem que sobre muito espaço vazio nas laterais. Posteriormente, é dispensada parafina para dentro do molde, e os fragmentos, com auxílio de pinças, são acomodados no molde com a orientação correta. Os fragmentos precisam de estar o mais centrados e próximos possível, e para além disso, devem estar orientados de maneira a oferecer uma resistência crescente ao longo do corte no micrótomo. Depois, o molde é colocado na placa fria, e com auxílio das pinças a amostra é “calcada”, garantido que os fragmentos fiquem nivelados com o fundo. Por último, parte da cassete é sobreposta ao molde para que essa depois seja encaixada no micrótomo. Quando a parafina já estiver fria o molde é retirado e é removido o excesso de parafina das laterais dos blocos para que se consiga encaixar corretamente no micrótomo.

## Microtomia

A microtomia é a etapa onde são feitos cortes muito finos nos blocos de parafina (cortes histológicos) com o auxílio de um micrótomo.<sup>1</sup> No laboratório é utilizado o micrótomo *DiaPath Minot Galileo Semi Series 2*, onde a faca é fixa e o bloco desloca-se por movimento rotatório da manivela. Nesta etapa também é necessária uma cuba de banho-maria.

Primeiramente, o bloco é fixo no micrótomo e é selecionada uma espessura de 30 micra para o desbaste, ou seja, retirar o excesso de parafina até alcançar toda a superfície do tecido. Este passo danifica a faca do micrótomo, por isso após a sua conclusão a faca é trocada. Depois do desbaste é arrefecido o bloco numa placa fria com o objetivo de endurecer um pouco mais a parafina e facilitar o corte. O corte da amostra é realizado a 2,5 micra, para a maioria dos cortes histológicos. Após a obtenção de um corte representativo, este é colocado sobre água quente para eliminação de pregas e de seguida é “pescado” por uma lâmina já devidamente identificada. Por último, as lâminas são organizadas num suporte próprio e são colocadas numa estufa a 65°C durante 40 minutos para adesão e secagem dos cortes. Os blocos são guardados em caixas identificadas e ficam armazenadas por tempo indeterminado. Entre o corte de cada bloco é sempre travada a manivela e a faca do micrótomo, para segurança do técnico.

## Coloração

As técnicas de coloração que coram especificamente componentes das células e tecidos são denominadas técnicas histoquímicas de coloração. Estas técnicas são inestimáveis para a compreensão da estrutura e função celular e tecidual, e para fazer um diagnóstico em tecidos doentes.<sup>6</sup> Posto isto, para serem estudados ao microscópio, a maioria dos cortes histológicos devem ser corados, porque, com poucas exceções, os tecidos são incolores. Com esta finalidade foram desenvolvidos métodos de coloração que tornam evidentes os vários componentes dos tecidos, células e MEC.<sup>1</sup>

Para a coloração são utilizados corantes básicos que coram estruturas basófilas e corantes ácidos que coram estruturas acidófilas. Estas colorações caracterizam-se pelo seu modo de ação, o tempo e a cromatização.<sup>3</sup>

O primeiro passo para qualquer coloração é retirar a parafina e hidratar a lâmina para que os corantes possam atuar no corte. Para isso são realizados banhos sucessivos em xilol, álcool a 100%, álcool a 96%, álcool a 70% e por fim água.

### Coloração de rotina

A coloração de Hematoxilina-Eosina (HE) é a técnica mais comumente usada em histologia animal e patologia de rotina, uma vez que consiste numa técnica simples e que

permite a visualização das características estruturais gerais dos tecidos. O corante básico, hematoxilina, cora estruturas ácidas de azul-púrpura. Os núcleos, ribossomas e retículo endoplasmático granular possuem uma forte afinidade para este corante devido ao seu elevado conteúdo de DNA e RNA, respetivamente. Por outro lado, a eosina é um corante ácido que cora estruturas básicas de vermelho ou rosa. A maioria das proteínas citoplasmáticas é básica, e, portanto, o citoplasma geralmente cora-se de vermelho-rosado. Em geral, quando a técnica de coloração da HE é aplicada a células de animais, os núcleos coram-se de azul e o citoplasma cora-se de vermelho-rosado.<sup>3,5,6</sup>

No laboratório a coloração HE é feita de forma automática pelo aparelho *Thermo Scientific Slide Stainer HMS 70*, segundo protocolo presente no Anexo 2.

### Colorações especiais

Para além da coloração de rotina, diariamente são também feitos outros tipos de colorações histoquímicas, sendo realizadas a pedido do histopatologista como suporte ao diagnóstico, ou como parte de um painel específico pré-definido.

A avaliação geral do tecido hepático é baseada na análise histopatológica de lâminas coradas com HE, no entanto, existem várias colorações histoquímicas que permitem evidenciar ou identificar componentes celulares específicos, que nem sempre são confirmados apenas com esta coloração. Posto isto, de forma a garantir a maior rapidez e eficiência do diagnóstico da doença hepática, existe criado no laboratório um painel de colorações histoquímicas para biópsias hepáticas que permite identificar com maior precisão alterações arquiteturais e doenças metabólicas hepáticas, tal como processos de fibrose, alterações no depósito de glicogénio ou ainda na presença de ferro, amilóide, cobre ou pigmento biliar. Desta forma, é possível evitar a necessidade de pedidos posteriores em casos suspeitos, havendo a garantia da maior rapidez na saída dos resultados.

As gastropatias são bastante frequentes em cães e gatos e, a gastrite crónica é facilmente diagnosticada através da biopsia deste órgão. Histologicamente, este tipo de inflamação está relacionado com uma resposta imunitária humoral e a presença de um infiltrado inflamatório composto por células mononucleares e agregados linfocitários. Na presença destes achados pode-se estar perante uma associação direta com a infeção por *Helicobacter pylori* ou outras espiroquetas relacionadas. A avaliação histológica das lesões gástricas é então um importante contributo para entender a patogenicidade desta infeção, no entanto estas bactérias não são facilmente visualizadas com a coloração HE de rotina. Para colmatar este facto, é realizada uma coloração especial em todas as biópsias gástricas recebidas, com o intuito de tentar identificar agentes bacterianos da família do *Helicobacter*.

Além das já mencionadas, existe ainda uma variedade de outras colorações histoquímicas que permitem a identificação de microrganismos e de estruturas e componentes intra e

extracelulares que não são evidenciados na coloração HE de rotina. São estas colorações que permitem a realização de diagnósticos diferenciais, bem como a confirmação de alterações suspeitas na coloração HE.

Para a maioria das colorações são realizados cortes de 2,5 micra, com exceção das colorações de Rodanina e Vermelho do Congo, nas quais os cortes apresentam 5 micra.

Na Tabela 3.1 estão apresentadas as colorações especiais realizadas no laboratório.

Tabela 3.1 Colorações histoquímicas especiais.

Coloração histoquímica	Tipo de amostra	Marcação histológica	Cores esperadas	Protocolo de coloração
Ácido periódico-reactivo de Schiff (PAS)	Biopsias hepáticas e cutâneas	Glicogénio e polissacarídeos	Glicogénio/mucinas/fungos: fúcsia Fundo: azul	Anexo 3
PERLS	Biópsias hepáticas	Ferro	Hemossiderina: azul	Anexo 4
Van Gieson	Biópsias hepáticas	Tecido conjuntivo	Fibras colagénio: vermelho Núcleo: azul Citoplasma: amarelo	Anexo 5
Vermelho do Congo	Biópsias hepáticas	Amilóide	Fibras amiloides: vermelho Fundo: laranja	Anexo 6
Fouchet Van Gieson	Biópsias hepáticas	Pigmento Biliar	Bilirrubina: verde Músculo e citoplasma: amarelo Colagénio: fúcsia	Anexo 7
Rodanina	Biópsias hepáticas	Cobre	Depósitos de cobre: laranja Núcleo azul	Anexo 8
Giemsa	Suspeita de mastocitoma	Grânulos citoplasmáticos dos mastócitos	Grânulos citoplasmáticos: azul	Anexo 9
Giemsa Modificado	Biópsias gástricas	Deteção de <i>Helicobacter pylori</i>	<i>Helicobacter spp.</i> : azul-escuro Fundo: azul	Anexo 10
Ziehl-Neelson	Suspeita de <i>Mycobacterium spp.</i> e <i>Nocardia spp.</i>	Bacilos álcool-ácido resistentes	Bacilos: vermelho Núcleos e fundo: azul	Anexo 11

## Montagem

Para proteção física e química dos tecidos corados a montagem das lâminas é a última etapa da sua preparação.<sup>4</sup> No laboratório é utilizado o meio de montagem *Entellan*, um meio hidrofóbico e com índice de refração igual ao vidro, que necessita da desidratação do tecido nas lâminas para sua utilização. Posto isto, em cada lâmina coloca-se duas gotas do meio de montagem e uma gota de xilol, em seguida é pressionada uma lamela por toda a lâmina com a ajuda de uma pinça. É necessário garantir que não existem bolhas entre a lâmina e a lamela, e de seguida é retirado o excesso de *Entellan* com um papel absorvente. As lâminas são colocadas ao ar para secar.

## Extração de DNA

Para além da produção de cortes histológicos em lâminas, os blocos de parafina também podem ser usados para extração de DNA com vista a análises de biologia molecular. Esta técnica é utilizada nos casos onde só existe amostra em forma de bloco histológico, de forma a evitar uma segunda colheita ao animal. De uma forma resumida, primeiramente é preciso desinfetar o micrótomo com álcool 70% e inserir uma nova faca, a fim de evitar contaminações cruzadas com a amostra. De seguida, são feitos cortes seriados para um eppendorf autoclavado. A amostra é então tratada com xilol e álcoois em percentagem decrescente a fim de retirar a parafina da amostra e hidratar a mesma. Após a retirada da parafina e hidratação do corte a amostra segue para o setor de biologia molecular onde os técnicos responsáveis continuam o protocolo para a extração de DNA. O protocolo detalhado encontra-se descrito no Anexo 12.

## Imunohistoquímica

Imunohistoquímica (IHQ) é a designação atribuída ao conjunto de metodologias que recorrem a anticorpos capazes de reconhecer e estabelecer ligação com constituintes tecidulares, maioritariamente proteínas, que se denominam antigénios. Esta conjugação permite identificar e localizar a presença de várias substâncias por intermédio da cor que é associada aos complexos antigénio-anticorpo entretanto formados.<sup>7</sup>

As amostras histológicas a utilizar em IHQ são submetidas a um conjunto de métodos realizados depois da sua remoção do organismo que procuram assegurar que as lâminas histológicas produzidas são de elevada qualidade.<sup>8,9</sup> Esses procedimentos físicos e químicos sucessivos são denominados técnica histológica, e contemplam todos os passos já descritos anteriormente.

Em suma, a IHQ permite a pesquisa de marcadores moleculares que são de grande importância para o diagnóstico histológico, especialmente na presença de neoplasias. No laboratório são utilizados um vasto número de anticorpos que, analisados em painel ou de forma isolada, permitem fornecer ao clínico importantes indicações sobre o diagnóstico, o prognóstico e a terapêutica de cada animal.

No laboratório é requisitado a realização da técnica de IHQ sempre que existe alguma suspeita por parte dos histopatologistas ou, por recomendação dos mesmos, existe um pedido de análise por parte dos clínicos. A partir do pedido são retirados do arquivo os blocos de parafina necessários para a realização da técnica de IHQ. Os cortes são aderidos a lâminas adesivadas carregadas positivamente, uma vez que o tecido tem carga negativa, o que contribui para uma maior adesão do corte à lâmina e reduz o risco de o mesmo saltar durante as lavagens da técnica. Para além disso, esta lâmina é mais hidrofóbica, fazendo com que os

reagentes aquosos cubram o corte de maneira mais homogênea. É realizada também uma nova lâmina de HE, que seguirá junto com as lâminas de IHQ para o histopatologista responsável pelo caso. No caso de lâminas de IHQ é sempre necessário adicionar um controlo, de forma a avaliar a execução da técnica, sendo utilizado um controlo tecidular externo positivo, ou seja, um tecido conhecido que contém o antigénio de interesse. Os controlos são provenientes de amostras antigas que tiveram uma marcação de forte intensidade para o antigénio em estudo. O protocolo completo da técnica de imunohistoquímica encontra-se detalhado no Anexo 13.

## Recuperação antigénica

Na técnica histológica, a etapa da fixação, realizada com formaldeído, tem um grande impacto na IHQ, uma vez que esse reagente provoca alterações conformacionais nos epitopos dos antigénios, criando uma rede proteica a sua volta, impedindo que ocorra a ligação do anticorpo ao antigénio. Posto isto, todas as lâminas destinadas a IHQ devem passar por um tratamento que consiga ultrapassar este obstáculo.

Na recuperação antigénica é possível recuperar os epitopos dos antigénios, através da quebra de ligações intermoleculares anteriormente induzidas pela formalina. Nesta etapa, é então utilizada a recuperação antigénica por altas temperaturas.

A recuperação antigénica por altas temperaturas atua acima do ponto de desnaturação da maior parte das proteínas, causando a quebra das ligações cruzadas e conseqüentemente a exposição dos epitopos dos antigénios.<sup>10,11</sup>

A recuperação antigénica é feita no equipamento *Thermo Scientific Lab Vision PT Module*, que possui dois recipientes onde são armazenadas as soluções tampão: TrisEDTA a ph 9 e Citrato a ph 6, e juntamente com o segundo ainda existe um contentor pequeno com solução tampão Dako a ph 6. O equipamento chega aos 90°C e a escolha de solução tampão e tempo de recuperação antigénica varia consoante as características de cada anticorpo (Tabela 3.2). Antes da recuperação as lâminas são hidratadas, passando por xilol, álcool a 100%, álcool a 96%, álcool a 70% e no fim água. Ao terminar o tempo da recuperação antigénica, as lâminas são sacudidas ao ar para arrefecerem, evitando o choque térmico, e submersas em água.

## Técnica manual de imunohistoquímica

Toda a técnica de imunohistoquímica ocorre de maneira manual num suporte com tampa com capacidade para 20 lâminas, onde é possível criar uma atmosfera húmida. Primeiramente é removido o excesso de água das lâminas e, de seguida, os cortes são delimitados por uma caneta hidrofóbica, para uma maior otimização de reagentes e prevenção de contaminação cruzada.

Entre os passos da técnica ocorrem lavagens com água destilada e tampão fosfato-salino (PBS – Phosphate-buffered saline), que removem o excesso de reagente, preservando a amostra tecidual e impedindo a formação de marcação de fundo.

### Bloqueio da peroxidase endógena

Antes da aplicação do anticorpo é preciso realizar a inibição de partículas endógenas. A peroxidase endógena existe naturalmente em tecidos com grande concentração de glóbulos vermelhos e pode ligar-se aos anticorpos da técnica, resultando numa marcação inespecífica e dificuldade na observação microscópica. Para o bloqueio é utilizado o *Peroxidase Block da Cell Marque*, que ao ser aplicado liga-se ao local ativo da enzima HRP formando um complexo enzima-substrato e inibindo sua atividade.<sup>10,11</sup>

As marcações inespecíficas podem surgir por diversas causas para além da atividade enzimática endógena, como interações hidrofóbicas, interações iónicas, anticorpos naturais, anticorpos contaminantes, difusão antigénica, reações cruzadas, fixação deficiente, tecido necrosado, lavagem ineficiente, entre outras.<sup>10</sup>

### Anticorpo primário

O anticorpo primário deve ser sensível o suficiente para minimizar a ocorrência de falsos negativos, mas ao mesmo tempo deve ser específico o suficiente para minimizar a ocorrência de falsos positivos e reações cruzadas.

No laboratório são utilizados anticorpos tanto monoclonais (reconhecem um epitopo do antígeno específico) como policlonais (reconhecem vários epitopos do mesmo antígeno), adquiridos na forma concentrada. A diluição dos anticorpos é feita com o *Diamond: Antibody Diluent da Cell Marque* que aumenta a estabilidade da diluição de anticorpos, sendo possível a utilização por um tempo mais prolongado. Na Tabela 3.2 encontram-se alguns dos anticorpos usados no laboratório.

Tabela 3.2 Anticorpos.

Anticorpo	Clone	Diluição	Recuperação Antigénica	Alvo	Tipo marcação	Controlo Positivo
CD117	YR145	1:200	15' pH9 Tris-EDTA	Mastócitos	Membranar/ Citoplasmática	Mastocitoma
Ki67	SP6	1:75	15' pH9 Tris-EDTA	Células em proliferação	Nuclear	Linfonodo
CD3	HM57	1:300	15' pH9 Tris-EDTA	Linfócitos T	Membranar	Linfonodo
PAX-5	24	1:400	15' pH9 Tris-EDTA	Linfócitos B	Nuclear	Linfonodo
CK AE1/AE3	AE1/AE3	1:400	10' pH6 Citrato	Citoqueratina	Citoplasmática	Pele
Vimentina	V9	1:200	10' pH9 Tris-EDTA	Células mesenquimais	Citoplasmática	Sarcoma
MUM-1	MRQ-43	1:50	15' pH9 Tris-EDTA	Plasmócitos	Citoplasmática /Nuclear	Plasmocitoma

Melan-A	A103	1:300	10' pH9 Tris-EDTA	Células melanocíticas	Citoplasmática	Melanoma
CD18	CA1.4E9	1:50	15' pH 6 Tampão DAKO	Histiócitos	Citoplasmática	Histiocitoma
NSE	BBS/NC/VI-H14	1:500	15' pH9 Tris-EDTA	Células de origem neural ou neuroendócrina	Citoplasmática	Cérebro
S100	Ab-8	1:150	15' pH6 Citrato	Células gliais e do sistema nervoso periférico	Citoplasmática / Nuclear	Melanoma
Iba-1	Policlonal	1:600	10' pH6 Citrato	Histiócitos	Citoplasmática	Histiocitoma
PIF	FIPV3-70	1:50	10' pH9 Tris-EDTA	Coronavírus felino	Citoplasmática	PIF

### Método de detecção

Uma vez formado o complexo antígeno-anticorpo é necessário um método de detecção desse complexo passível de visualização microscópica. Os métodos de detecção são divididos em métodos diretos, onde é utilizado somente um anticorpo primário já marcado que se liga ao antígeno, ou em métodos indiretos, onde primeiro é aplicado um anticorpo não conjugado seguido de um segundo anticorpo com marcador.<sup>10,12</sup>

Neste caso, o método utilizado foi o do polímero, que utiliza um esqueleto central de grandes dimensões, onde estão acopladas grandes quantidades de enzimas e anticorpos, permitindo que o método detecte quantidades mínimas de antígeno no tecido com uma marcação intensa.<sup>12</sup>

No laboratório o método de polímero aplicado baseia-se em dois passos. Após a incubação do anticorpo primário não conjugado, aplica-se o *HiDefDetection Amplifier*, que irá identificar o complexo no tecido e fazer a ligação com o polímero, e posteriormente, é aplicado o *HiDefDetection HRP Polymer Detector* que potencia a amplificação de sinal do complexo.

### Cromogéneo

O cromogéneo é o responsável pela visualização da marcação do complexo antígeno-anticorpo com cor. O DAB (3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloro) é o cromogéneo indicado quando é utilizado um método de detecção com enzima HRP. Este irá reagir com a enzima presente no polímero, oxidando e formando um precipitado castanho no local onde o antígeno está presente.<sup>11</sup>

No laboratório é utilizado o *DAB Substrate Kit da Cell Marque*, constituído pelo reagente e um diluente. A diluição (1 ml de diluente e 1 gota de substrato) é realizada sempre antes de se adicionar o cromogéneo, garantindo uma boa marcação. Este reagente contém um potencial carcinogéneo e deve ser sempre manipulado com luvas, bata e boas práticas laboratoriais.

## Contraste

A escolha do corante para contraste depende, principalmente, da cor do produto final da técnica de imunohistoquímica. É necessário que a contra-coloração tenha contraste o suficiente para se diferenciar do precipitado formado pelo cromogéneo, além de facilitar a avaliação da arquitetura geral do tecido.<sup>10,13</sup>

No laboratório é utilizado como contraste a Hematoxilina de Mayer. Com este corante é possível observar uma coloração nuclear azul contra o castanho resultante do precipitado do DAB, favorecendo a visualização do mesmo.

## Desidratação e montagem

Uma vez aplicado o contraste é necessário a desidratação das lâminas, onde é feito passagens das lâminas em álcool a 70%, álcool a 96%, álcool a 100% (2x) e xilol. A montagem das lâminas tem como finalidade a proteção física e química dos tecidos.<sup>10,13</sup>

A escolha do meio de montagem é dependente da compatibilidade química do meio com o cromogéneo e o contraste, uma vez que o DAB é um composto solúvel em água, o meio de montagem escolhido foi o *Entellan*. Para a montagem das lâminas, como as mesmas já estavam submersas em xilol, só é necessário adicionar uma gota do meio de montagem e pressionar uma lamela contra a lâmina com o auxílio de uma pinça. Mais uma vez é garantido a ausência de bolhas entre a lâmina e a lamela, e as lâminas são colocadas ao ar para secar.

## Controlo de qualidade

O controlo de qualidade deve acontecer durante todas as etapas da técnica histológica e posterior técnica IHQ, tendo sempre em atenção a qualidade da fixação, a manutenção de reagentes, a limpeza dos equipamentos e a organização das bancadas. No final da técnica de IHQ, as lâminas são sempre observadas ao microscópio antes do envio para o histopatologista. A partir da visualização da lâmina é possível a avaliação de toda a técnica, sendo importante a observação da preservação morfológica do tecido, da intensidade da marcação, a possível existência de marcação de fundo, que indica marcações inespecíficas, e a qualidade da coloração de contraste. Neste passo, são avaliados tanto o tecido de amostra como o tecido de controlo.

## Estudo de caso I

Foi recebido um contendor com uma peça cirúrgica conservada em formalina para realização de biópsia, pertencente a um canídeo do sexo feminino, de raça indeterminada, com 5 anos de idade.

Em macroscopia foi realizada a seguinte descrição: Trata-se de um nódulo perto da axila esquerda. É um retalho cutâneo que mede 5 cm x 2,5 cm e está centrado por lesão elevada alopecica de centro ulcerado com 0,8 cm x 0,8 cm. Em secção observa-se um nódulo dérmico branco que mede 1 cm x 0,7 cm e dista 1 cm da margem lateral e 0,6 cm da margem profunda.

Na microscopia foi descrito: Nódulo dérmico a subcutâneo composto pela proliferação de mastócitos dispostos em cordões celulares num estroma de colagénio. A atipia é baixa e as mitoses são raras. Observam-se eosinófilos. Margem lateral de 1cm e margem profunda de 0,6 cm.

A conclusão por parte do histopatologista foi de que se tratava de um mastocitoma cutâneo de grau II de Patnaik e baixo grau de Kiupel, sendo recomendado avaliação da expressão do C-KIT e o índice de proliferação celular pelo Ki67.

Os mastocitomas estão entre as neoplasias cutâneas mais frequentes em cães, representando entre 7% e 21% do total de tumores de pele (números variam consoante os estudos). A idade média de aparecimento é 8 anos, embora possam aparecer praticamente em qualquer idade. As localizações mais comuns são o flanco e o escroto. Quando presentes nas mucosas, estão geralmente associados a um comportamento mais agressivo. Muitas vezes os animais com mastocitomas desenvolvem complicações sistémicas devido à libertação de histamina e heparina por parte dos mastócitos, como úlceras gástricas.<sup>14</sup> Existem dois esquemas de classificação dos mastocitomas cutâneos em cães: A classificação de Patnaik com 3 graus sendo o grau I o menos agressivo e o grau III o mais agressivo e a classificação de Kiupel com dois graus (I-baixo grau e II-alto grau).

Neste estudo de caso, na caracterização imunocitoquímica do mastocitoma, foram utilizados os anticorpos CD117 e Ki67.

O CD117 é o marcador de referência de mastócitos e é a sua avaliação que permite conhecer o prognóstico dos mastocitomas, já que o padrão de marcação obtido está associado à mutação do proto-oncogene C-kit. Existem 3 padrões de expressão: padrão I – expressão predominantemente membranar; padrão II – expressão focal e ligeira no citoplasma dos mastócitos; padrão III – expressão de forma difusa no citoplasma dos mastócitos. Esta expressão pode ser classificada da seguinte maneira: Quanto maior a expressão membranar (padrão I), melhor o prognóstico, pois menos alterada está a célula. Os padrões II e III estão associados a maior risco de recidiva local e a um menor tempo de sobrevivência do animal, indicando um comportamento biológico mais maligno, e por isso pior

prognóstico. Os últimos estudos demonstram que os mastocitomas caninos com um padrão de expressão do tipo III tem estatisticamente maior tendência para recorrer e metastizar que os mastocitomas do padrão I.<sup>15</sup>

O Ki67 é um excelente marcador imunocitoquímico que permite determinar qual a fração de uma dada população celular que se encontra a proliferar. O rácio de células neoplásicas positivas ao ki67 por 100 células neoplásicas está correlacionada em alguns tumores com o comportamento clínico. Estudos com mastocitomas sugerem o rácio de 1,8 como o *cutoff* para diferenciar os mastocitomas negativamente associados à sobrevivência, ou seja, cães com mastocitomas com rácio de expressão inferior a 1,8 têm maior probabilidade de sobrevivência, enquanto que cães com mastocitomas com rácio de expressão superior ou igual a 1,8 têm menos probabilidade de sobrevivência.<sup>16</sup> Outros estudos com mastocitomas sugerem ainda que, um mastocitoma num cão com um rácio de 10,6 tem 8 vezes maior probabilidade de morrer do tumor do que um cão com um rácio mais baixo.<sup>17</sup>

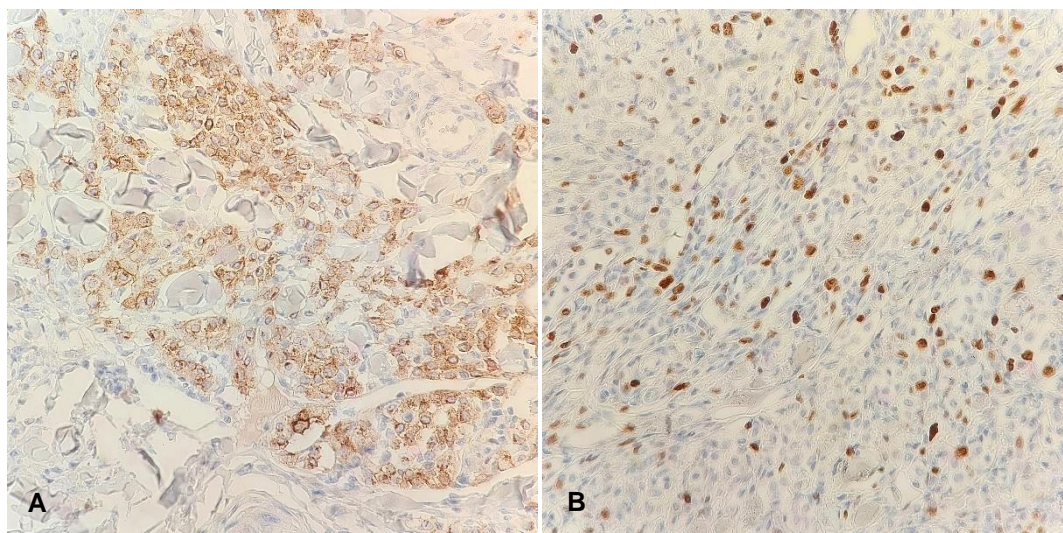


Figura 3.2 A – Imunomarcação pelo CD117 (400x), apresenta uma marcação membranar.  
B – Imunomarcação pelo Ki67 (400x), apresenta uma expressão de rácio 5.

Nos resultados, observa-se imunomarcação pelo c-Kit (CD117) (Figura 3.2 A), sendo que a maioria das células apresenta uma expressão membranar (C-Kit padrão 1). Relativamente ao Ki67 (Figura 3.2 B), o rácio de expressão é de 5.

Neste caso, apesar do CD117 ter uma expressão de padrão I, ou seja, expressão predominantemente membranar, o que seria indicativo de um melhor prognóstico, o Ki67 tem uma expressão elevada, o que se traduz numa taxa de proliferação celular mais elevada, o que seria compatível com uma probabilidade de sobrevivência mais reduzida e, portanto, um pior prognóstico. Assim sendo, é recomendado, ao clínico responsável, algum cuidado na monitorização do caso.

## Estudo de caso II

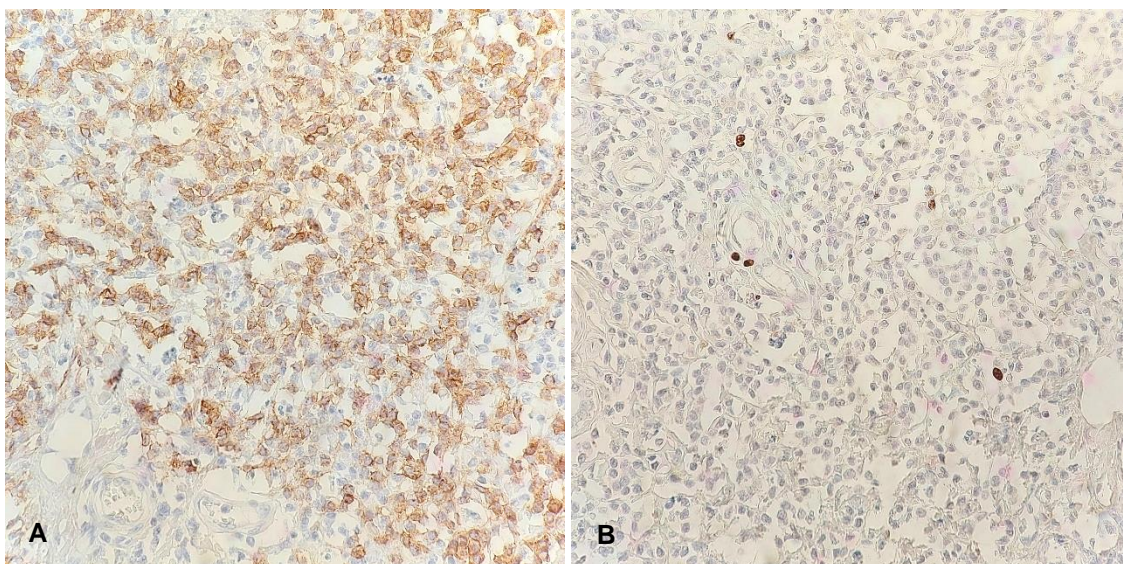
Foi recebido um contentor com uma amostra conservada em formalina para realização de biópsia, pertencente a um canídeo do sexo feminino, de raça indeterminada, com 10 anos de idade.

Em macroscopia foi realizada a seguinte descrição: Trata-se de um nódulo cutâneo entre M4 e M5. É uma porção de peça de mastectomia com 8 cm de comprimento e dois mamilos. Em secção entre os dois mamilos observa-se nódulo branco, heterogéneo e bem delimitado que mede 1 cm x 0,8 cm e que dista 0,5 cm das margens lateral e profunda. O linfonodo regional não foi detetado.

Na microscopia foi descrito: Nódulo subcutâneo bem demarcado composto pela proliferação em cordões de mastócitos num estroma de colagénio. A atipia é baixa e as mitoses são raras. Identificam-se vários eosinófilos. Margens de 0,5 cm.

A conclusão por parte do histopatologista foi de que se tratava de um mastocitoma subcutâneo de padrão circunscrito. No relatório ainda foi referido que nos mastocitomas subcutâneos a classificação de Patnaik e de Kiupel não se aplica, e que os mastocitomas subcutâneos são classificados em circunscritos, combinados e infiltrativos. Foi também indicado que cerca de 10 % podem ter um comportamento mais agressivo, recomendando-se a avaliação da expressão do C-KIT e o índice de proliferação celular pelo Ki67.

Na caracterização imunocitoquímica do mastocitoma foram utilizados os anticorpos CD117 e Ki67.



*Figura 3.3 A – Imunomarcção pelo CD117 (400x), apresenta uma marcação membranar.  
B – Imunomarcção pelo Ki67 (400x), apresenta uma expressão de rácio menor que 1.*

Nos resultados, observa-se imunomarcção pelo c-Kit (CD117) (Figura 3.3 A), sendo que a maioria das células apresenta uma expressão membranar (C-Kit padrão 1). Relativamente ao Ki67 (Figura 3.3 B), o rácio de expressão é menor que 1.

Neste caso temos um indicador de um bom prognóstico, o Ki67 tem uma expressão baixa (rácio de expressão inferior a 1,8), que se traduz numa baixa taxa de proliferação celular, e o CD117 tem uma expressão de padrão I, ou seja, expressão predominantemente membranar, o que indica um melhor prognóstico, pois menos alterada está a célula.

### Estudo de caso III

Foi recebido um contentor com uma peça cirúrgica conservada em formalina para realização de biópsia, pertencente a um canídeo do sexo masculino, de raça boxer, com 8 anos de idade.

Em macroscopia foi realizada a seguinte descrição: Trata-se de um nódulo cutâneo no lábio superior esquerdo. É um retalho cutâneo que mede 4 cm x 3 cm e está centrado por lesão elevada com 1 cm x 1 cm. Em secção observa-se nódulo branco heterogéneo de limites congestivos que mede 1,7 cm x 1,3 cm e dista 0,5 cm da margem lateral e 0,1 cm da margem profunda.

Na microscopia foi descrito: Retalho cutâneo no qual se observa lesão nodular dérmica a subcutânea composta pela proliferação em toalha de células redondas, suportadas por um estroma de colagénio. As células apresentam um núcleo redondo, central a excêntrico, por vezes com o nucléolo evidente e cromatina grumosa. Apresentam discreta quantidade de citoplasma acidófilo. As mitoses são raras. Margem lateral de 0,5 cm e margem profunda de 0,1 cm.

A conclusão por parte do histopatologista foi de que a imagem histológica seria compatível com um tumor de células redondas e sugeriu-se o estudo imunocitoquímico para se tentar aferir qual a população celular de origem.

Na caracterização imunocitoquímica foram utilizados os anticorpos MUM-1, que deteta plasmócitos, CD3 para linfócitos T e PAX-5 para linfócitos B.

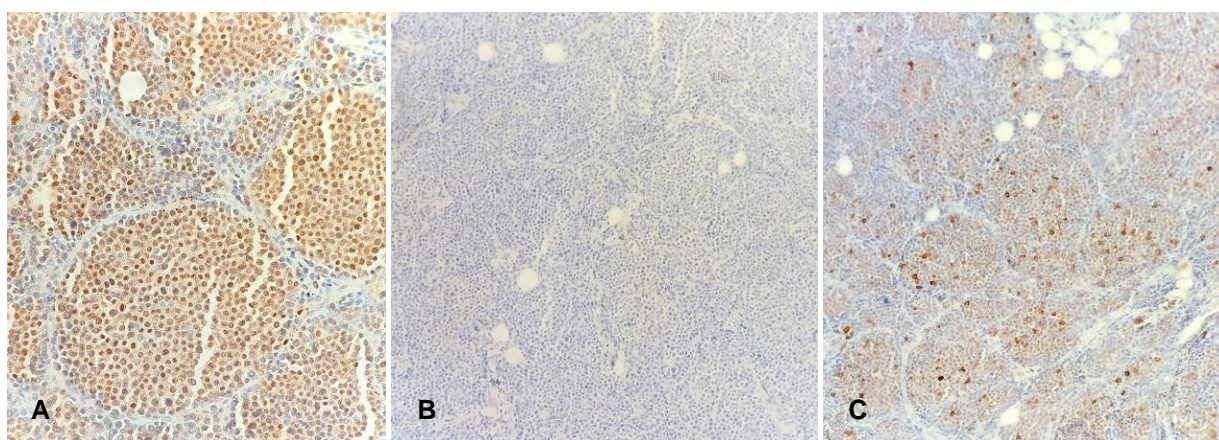


Figura 3.4 A – Imunomarcção pelo MUM-1 (400x). B – Imunomarcção pelo Pax-5 (200x). C – Imunomarcção pelo CD3 (200x).

Nos resultados, observa-se imunomarcção nuclear difusa na população celular neoplásica com o anticorpo MUM-1 (Figura 3.4 A), menos de 5% das células apresentam marcação com os anticorpos CD3 (Figura 3.4 C) e não se observa marcação com o anticorpo PAX-5 (Figura 3.4 B).

Tendo em conta estes dados, e a elevada marcação nuclear dos plasmócitos (Figura 3.4 A), os resultados suportam um diagnóstico de plasmocitoma.



## 4. Análise de urina tipo II

---

A análise de urina tipo II é um exame diagnóstico não invasivo e relativamente rápido, contudo de grande importância, não só para avaliar a função renal e vias urinárias, mas também porque permite adquirir uma grande quantidade de informações sobre o estado geral de saúde de um animal, podendo ser crucial para a identificação de diversas doenças metabólicas, permitindo assim intervenção e prevenção precoce.<sup>18</sup> Deste modo, a análise de urina tipo II deve ser considerada como parte essencial de toda investigação diagnóstica para animais doentes, em casos de doença sistêmica, na monitorização da resposta a tratamento e no rastreio de doenças do trato urinário, mas também como parte essencial do exame geral de bem-estar e deve ser realizada independentemente da idade do animal ou estado de saúde atual.<sup>19</sup>

A urina contém aproximadamente 96% de água e 4% de diversas substâncias provenientes da alimentação e do metabolismo normal do animal. Vários fatores podem influenciar a composição da urina, tais como, a dieta do animal, o estado nutricional, o nível de atividade física, o metabolismo orgânico, a função endócrina e/ou o estado da função renal. No caso de variáveis fisiológicas, como por exemplo, a dieta, esta pode influenciar o pH da urina e/ou a formação de cristais. Já variáveis introduzidas no animal, como por exemplo a administração de antimicrobianos, podem mascarar infecções do trato urinário.<sup>20</sup>

O método de colheita de urina e a posterior manipulação da amostra podem influenciar a interpretação dos resultados. Existem diferentes técnicas de colheita de urina, sendo as mais comuns a colheita livre e a cistocentese. Ambos os métodos têm as suas vantagens e desvantagens, sendo que na colheita livre a colheita de urina não apresenta riscos e qualquer pessoa a pode executar, contudo a amostra poderá estar contaminada, já na colheita por cistocentese é eliminado o risco de contaminação da amostra, mas é necessária uma pessoa qualificada para realizar o procedimento, bem como haver uma quantidade suficiente de urina na bexiga.<sup>21</sup> Apesar do método de colheita escolhido, de modo a obter um resultado analítico correto e fiável, devem ser preservadas, tanto quanto possível, todas as condições de assepsia, nomeadamente a utilização de frascos limpos e secos para a colheita da amostra, dando-se preferência à utilização de frascos estéreis descartáveis.

Após a colheita, a amostra deve ser entregue ao laboratório o mais rapidamente possível para ser analisada, sendo o recomendado entre uma e seis horas. Quando a amostra não puder ser analisada dentro deste prazo, deve ser refrigerada, não só para evitar o sobrecrecimento bacteriano, mas também para minimizar a evaporação de água e consequente concentração de sais.

A análise de urina tipo II é dividida em três etapas: análise das características físicas da urina; análise das características químicas da urina; e exame microscópico do sedimento urinário.

## **Características físicas**

À chegada ao laboratório, se a amostra tiver sido refrigerada, é conveniente deixá-la atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra deve ser suavemente misturada, invertendo-a várias vezes, e deve ser transferido 1,5 mL de urina para um tubo eppendorf. Nesta primeira etapa, são registadas as características físicas, sendo elas a cor, o odor, a turbidez e a presença ou ausência de sedimento macroscópico.

### **Cor**

É uma característica física de extrema importância, através da qual se pode ter uma ideia rápida do normal funcionamento do sistema urinário. A cor da urina é variável podendo apresentar diferentes tons de amarelo em condições normais, ou tons avermelhados na presença de patologias ou infeções, ou até mesmo tons alaranjados ou esverdeados. Dentro das urinas amarelas, o grau de hidratação do animal pode provocar uma mudança na cor da urina, ou seja, urinas amarelas-claras pressupõem animais bem hidratados, enquanto urinas amarelas-escuras indicam desidratação. As variações na cor da urina também podem ser o resultado da presença de diferentes componentes do sedimento urinário, urinas vermelhas pressupõem a presença de eritrócitos, já urinas brancas e leitosas podem conter lípidos ou leucócitos.

### **Odor**

A urina possui um cheiro característico e normal, denominado *Suis Generis*, que é próprio e diferente para cada espécie. Normalmente não apresenta um odor forte, mas o mesmo é afetado por diversos fatores, como a concentração de urina, a dieta do animal, a presença de infeção ou inflamação, ou até mesmo certas condições médicas, como é o caso de animais com diabetes, em que a sua urina poderá ter um cheiro doce ou frutado.

### **Turbidez**

A propriedade física da turbidez refere-se ao grau de clareza da urina e as amostras são descritas como transparentes, ligeiramente turvas ou turvas. A urina normal possui um aspeto transparente, e a turbidez geralmente está relacionada com a quantidade de constituintes insolúveis e material particulado na urina. A causa da turbidez geralmente é determinada pelo

exame microscópico do sedimento, mas pode estar associado com a presença de células (eritrócitos, leucócitos ou células epiteliais), bactérias, cristais ou detritos amorfos na urina.

### Sedimento macroscópico

A presença ou ausência de sedimento macroscópico também é registado. Esta característica está muitas vezes associada à presença de contaminantes externos, como por exemplo pelos ou fibras, contudo a abundância de cristais também poderá revelar a presença de sedimento macroscópico.

### Características químicas

Após o registo das características físicas da urina, deve ser executada uma análise química. Esta é realizada usando tiras de teste reativas (Figura 4.1), impregnadas com reagentes colorimétricos, ou seja, quando a tira é submersa na amostra, os diferentes parâmetros sofrem uma determinada reação química em contacto com a urina, que se traduz numa alteração da cor basal do parâmetro. A mudança na cor do reagente corresponde à presença da substância que a tira de teste foi projetada para detetar. A intensidade da mudança de cor é proporcional à concentração da substância que está a ser medida. Esta alteração na cor é interpretada consoante uma escala colorimétrica predefinida (Anexo 14). As técnicas colorimétricas podem ser avaliadas diretamente pelo técnico ou através de aparelhos de leitura automática, como o Clinitek Advantus ou o Clinitek Status da Siemens Healthineers. As urinas com uma cor natural muito intensa vão interferir na interpretação dos resultados, pois os parâmetros, para além da reação própria, também vão corar, pelo que os resultados podem não ser fiáveis. Nestes casos, recomenda-se realizar a prova com o sobrenadante após centrifugação da amostra.

Em geral, as tiras de urina são confiáveis para a medição do pH urinário, glucose, corpos cetónicos, bilirrubina e proteínas. Para a medição da densidade deve ser utilizado um refratómetro, e a quantificação dos leucócitos e eritrócitos deve ser feito através da visualização microscópica do sedimento urinário. As medições de nitritos e urobilinogénio não são normalmente relatadas na medicina veterinária, sendo o valor diagnóstico pobre.<sup>19</sup>

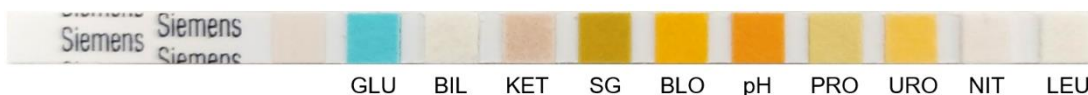


Figura 4.1 Tira reagente Multistix® 10 SG da Siemens Healthineers.

Legenda: GLU – Glucose; BIL – Bilirrubina; KET – Corpos cetónicos; SG – Densidade urinária; BLO – Eritrócitos; pH – pH; PRO – Proteínas; URO – Urobilinogénio; NIT – Nitritos; LEU - Leucócitos

## Glucose

A glucose é 100% reabsorvida pelos rins, portanto, normalmente não está presente na urina em quantidades detetadas por tiras reagentes.<sup>18,19</sup> A glucose é o único hidrato de carbono que pode ser avaliado pela tira reativa com uma sensibilidade elevada, a partir de 50-80mg/dL.

A presença permanente de glucose na urina (glicosúria) é sempre patológica, contudo deve ser interpretada em conjunto com o valor de glucose no sangue. A glucose aparece na urina quando os níveis sanguíneos excedem o limiar de reabsorção renal, sendo estes de 180 a 220 mg/dL para caninos e 200 a 280 mg/dL para felinos.<sup>18,19</sup>

As causas da glicosúria podem estar associadas a uma hiperglicemia persistente, como acontece na *diabetes mellitus*, contudo situações de stress, terapia com medicamentos que contêm dextrose, ou até mesmo a ingestão de refeições podem produzir uma hiperglicemia transitória. Quando existem distúrbios que produzem uma disfunção renal que resulta na diminuição da absorção de glucose, como acontece, por exemplo, no Síndrome de Fanconi, verifica-se uma glicosúria que não será acompanhada de hiperglicemia.<sup>18</sup>

Podem existir resultados falsos negativos com a presença de ácido ascórbico na urina e em urinas que contêm bactérias, devido à rápida metabolização da glucose. Reações falso-positivas podem ocorrer em amostras de urina contaminadas com agentes como formaldeído, cloreto, hipoclorito e peróxido de hidrogénio.

## Bilirrubina

Normalmente, a bilirrubina não está presente na urina da maioria dos animais domésticos, contudo devido ao baixo limiar renal para a mesma, pequenas quantidades podem estar presentes em cães e gatos saudáveis. A sensibilidade da tira reativa é de 0,02 a 0,1 mg/dL.

A bilirrubina é o produto final da degradação dos eritrócitos senescentes pelos macrófagos e a subsequente quebra da hemoglobina, resultando na liberação de bilirrubina não conjugada. Tanto no gato como no cão, a presença de bilirrubina na urina (bilirrubinúria) pode preceder a icterícia clínica e é um indicador precoce de aumento da destruição de eritrócitos, permitindo o diagnóstico precoce de doença hemolítica, diminuição da captação ou conjugação de bilirrubina ou diminuição da excreção de bilirrubina, indicando diversas disfunções hepáticas e/ou biliares. É possível confirmar a validade de uma reação positiva da tira por teste laboratorial para bilirrubina total na urina.<sup>18</sup>

No caso da bilirrubina, reações falso-negativas podem ocorrer em amostras envelhecidas ou processadas lentamente sob condições inadequadas de armazenamento, devido à exposição à luz direta, uma vez que a bilirrubina se degrada rapidamente na presença de luz

ultravioleta, ou em amostras que possuem altas concentrações de ácido ascórbico, que pode ser produzido através da administração de suplementação de vitamina C. <sup>22</sup>

## Corpos cetônicos

Os corpos cetônicos normalmente são excretados na urina em quantidades indetetáveis. A presença de corpos cetônicos na urina (cetonúria) deriva da alteração do uso do metabolismo dos hidratos de carbono para o uso do metabolismo lipídico, ou seja, é um sinal de que o organismo está a utilizar gordura para obter energia, em vez de usar glicose. Os corpos cetônicos primários produzidos são ácido acetoacético (20%), acetona (1%) e beta-hidroxibutirato (79%), sendo que a tira reativa é mais sensível ao ácido acetoacético do que à acetona e não detecta beta-hidroxibutirato, subestimando a quantidade de cetonas presentes na urina. <sup>18</sup>

O resultado positivo acontece, por exemplo, em situações de diabetes mellitus, quando acontece uma cetoacidose diabética.

Contudo, este método de detecção tem as suas limitações devido à falta de sensibilidade ao beta-hidroxibutirato, bem como à tendência de resultados falso-negativos quando níveis baixos de corpos cetônicos estão presentes na urina. Podem também existir resultados falso-positivos com o jejum prolongado, em urinas muito concentradas, ou com a administração de alguns medicamentos. <sup>18</sup>

## pH

O pH da urina é resultado do equilíbrio ácido-base total do corpo e pode ser influenciado pela dieta e pelo estado de saúde. <sup>23</sup>

Na generalidade, animais que consomem dietas à base de proteína animal (gatos, cães) têm urinas mais ácidas, em comparação com animais que consomem uma dieta à base de plantas ou vegetais (cavalos, ruminantes) cujo pH da urina é mais alcalino. <sup>18</sup>

A diminuição do pH também poderá dever-se a acidificantes da urina (vitamina C), acidose metabólica e/ou respiratória, diarreias/vômitos severos, febre e jejum prolongado, enquanto que o aumento do pH poderá dever-se a alcalificantes da urina (bicarbonato ou citrato potássico), alcalose metabólica e/ou respiratória, infeções urinárias (*Staphylococcus* spp. ou *Proteus* spp.) ou mesmo urinas mantidas a temperatura ambiente.

## Proteínas

O grau de mudança de cor da tira corresponde à concentração estimada de proteína presente, contudo a tira reativa é mais sensível à albumina do que a globulinas, hemoglobina, mioglobina, proteínas de Bence-Jones (cadeias leves de imunoglobina) e mucoproteínas. <sup>18</sup>

Muitas vezes, a presença persistente de proteínas na urina (proteinúria) é a primeira e única anormalidade observável em animais com doença renal, e geralmente, a mesma, vem acompanhada do aparecimento de cilindros no sedimento, bem como de hematúria macroscópica ou microscópica. Já a proteinúria funcional transitória pode ser encontrada em animais com febre alta ou após convulsões, stress, temperatura ambiental extrema ou exercício e, raramente tem significado clínico.

Podem existir resultados falso-positivos em urinas muito básicas, urinas com contaminantes, como desinfetantes ou metabólitos de drogas, e resultados falso-negativos em urinas muito diluídas, urinas muito ácidas e quando quantidades extremamente pequenas de proteína estão presentes urina.

Apesar da tira reativa ser indicativa da presença ou não de proteínas na urina, a medição quantitativa da concentração de proteína na urina é realizada através do analisador químico. O rácio proteína/creatinina na urina (UPC) tem maior sensibilidade para deteção de proteínas na urina do que a tira reativa.<sup>18</sup>

## Urobilinogénio

Este parâmetro possui um valor diagnóstico bastante pobre, e muitas das vezes o seu significado pode ser ignorado. O urobilinogénio é produzido no intestino grosso a partir da redução da bilirrubina biliar pelas bactérias e apenas uma mínima parte é excretada via renal.

A tira reativa é positiva com a hemólise, hemorragia hística, doença hepática, colangite e resolução de grandes hematomas. A ausência de urobilinogénio com bilirrubina positiva sugere obstrução biliar extra-hepática completa ou destruição da flora intestinal por antibióticos (sobredose). Podem existir resultados falso-positivos em urinas com pH elevado e aquando da utilização de alguns medicamentos (aspirina), e os resultados falso-negativos estão normalmente associados à idade da urina e à exposição solar, por degradação do urobilinogénio.

## Nitritos

Os nitritos são produzidos pelo catabolismo proteico e a lise celular, e o resultado positivo sugere a presença, na urina, de bactérias que reduzem o nitrato a nitrito. Os falso-positivos podem dever-se a urinas velhas ou colhidas de forma não asséptica, já os resultados falso-negativos podem ser derivados da utilização de antibióticos ou devido à presença de vitamina C na urina.

## Eritrócitos

No sedimento urinário é permitido uma certa quantidade de eritrócitos, contudo a presença de uma elevada quantidade de eritrócitos na urina (hematúria) sugere hemorragia, e pode

estar relacionada com inflamação, trauma, neoplasia, infecção, parasitismo ou coagulopatia, entre outros.<sup>18</sup>

A tira reativa é muito sensível à hemoglobina e consegue detetar valores a partir de 0,03 mg/dL, no entanto não diferencia entre eritrócitos, hemoglobina ou mioglobina. Poso isto, quando a tira reativa dá positivo, mas existe ausência de eritrócitos no sedimento microscópico, considera-se que existe a presença de hemoglobina/mioglobina na urina.

## Leucócitos

Tal como acontece com os eritrócitos, é aceitável uma certa quantidade de leucócitos na urina de animais saudáveis. A presença de elevadas quantidades de leucócitos na urina (piúria) sugere a presença de processos infecciosos e/ou inflamatórios. A sensibilidade da tira reativa é baixa, pelo que o resultado negativo não exclui a presença de células inflamatórias, e o mesmo deverá ser confirmado através da visualização do sedimento microscópico urinário.

## Densidade urinária

A densidade urinária é uma medida indireta da osmolaridade da urina, o seu valor está associado ao grau de hidratação do animal e é indicativo da capacidade dos rins para responder às variações na homeostase hídrica.

A densidade urinária é um componente da maioria dos sistemas de tiras de urina, no entanto, o uso de tiras para estimar a densidade urinária é considerado não confiável e não recomendado em animais domésticos. Clinicamente, um refratómetro padrão é comumente usado para medir o índice de refração da urina e fornecer uma estimativa da densidade da urina.<sup>19</sup>

Os intervalos de referência normais publicados para a densidade urinária são de 1,015 a 1,045 para cães e de 1,035 a 1,060 para gatos.<sup>18</sup>

A sua interpretação depende de vários fatores, como estado de hidratação, concentrações eletrolíticas, concentrações séricas de creatinina e nitrogénio ureico, administração de certos medicamentos (corticosteroides, diuréticos, antiepiléticos) e administração de fluidoterapia.<sup>18</sup> A densidade urinária normalmente não é alterada pelo tempo ou temperatura de armazenamento da amostra.<sup>24</sup>

Após terem sido registadas as características físicas e químicas da urina, é medida a densidade específica da amostra de urina usando um refratómetro. Deste modo, é colocada uma única gota de urina na superfície de vidro sob a tampa plástica, e enquanto o examinador está a olhar através da peça ocular, o refratómetro é posicionado numa fonte de luz, e a densidade é registada na interface claro/escuro da escala.

## Preparação da lâmina para visualização

Após o registo das características físicas e da análise química da urina, a mesma deve ser preparada para a visualização ao microscópio, seguindo o procedimento <sup>20,23</sup>:

- Centrifugar a amostra durante 5 minutos a 2500 rpm;
- Transferir parte do sobrenadante, dependendo do volume de urina no tubo, para outro tubo, usando uma pipeta ou decantando;
- Suspende o sedimento no sobrenadante restante;
- Transferir uma gota da suspensão para uma lâmina de microscópio de vidro limpa usando uma pipeta e colocar uma lamela de vidro sobre ela. Deve haver fluido suficiente para preencher a área sob a lamela, mas a lamela não deve flutuar;
- Examinar a lâmina imediatamente usando microscopia de luz de campo brilhante otimizada para contraste fechando o diafragma do condensador;
- Usando a objetiva de 10x (LPF, ampliação de 100x), visualizar pelo menos 2 bordas da área sob a lamela e observar a presença de cilindros e cristais. Usando a objetiva de 40x (HPF, ampliação de 400x), visualizar pelo menos 10 campos da área sob a lamela para identificar células (eritrócitos, leucócitos, células epiteliais), microrganismos (bactérias, leveduras, parasitas), espermatozoides e gotículas de gordura.

## Análise microscópica do sedimento urinário

Embora uma grande quantidade de informações possa ser obtida através da avaliação macroscópica e química de uma amostra de urina, um exame de urina não é considerado completo a menos que uma análise microscópica do sedimento urinário tenha sido realizada.

A avaliação do sedimento urinário pode fornecer ao clínico evidências de inflamação, infecção ou hemorragia no trato urinário por meio da identificação visual de leucócitos, bactérias ou eritrócitos, bem como alertar para a presença de diversas patologias renais ou possíveis neoplasias do trato urinário. Em alguns casos, também é importante para monitorizar a presença de cristais na urina (cristalúria) em pacientes com histórico de cálculos urinários.

A avaliação do sedimento é semiquantitativa, e os resultados são frequentemente relatados usando intervalos.<sup>19</sup> Enquanto os eritrócitos e leucócitos são quantificados segundo a escala definida pela *Cornell University College of Veterinary Medicine* <sup>25</sup> (ausentes; <5; 6-20; 21-100; >100/HPF), os restantes achados podem ser classificados como raros, discretos, moderados e abundantes.

No sedimento urinário podem ser vistos diferentes tipos celulares, nomeadamente células epiteliais transitórias, células epiteliais escamosas, células epiteliais renais, leucócitos e eritrócitos. As diferentes células possuem diferentes características morfológicas, bem como

diferentes significados clínicos, tal como descritas na Tabela 10.1. Amostras de urina de cães e gatos saudáveis podem conter um baixo número de células (<5 ou raras), de qualquer tipo, sendo que o aumento do número de células pode estar relacionado com inflamação ou infecção, no caso de aumento de leucócitos ou hemorragia, quando nos aparece um número elevado de eritrócitos.

No que toca à importância do diagnóstico, a identificação de um número elevado de células epiteliais com características atípicas na urina pode indicar uma neoplasia no sistema urinário, contudo a maioria das amostras de urina de animais com tumores de bexiga não contém número suficiente de células atípicas. Quando um número suficiente está presente e células atípicas são observadas, é melhor realizar uma citologia urinária, onde é feito um esfregaço seco ao ar do sedimento urinário e o mesmo é corado com qualquer um dos corantes do tipo Romanowsky, como por exemplo Diff-Quik.

A cristalúria é um achado frequente na urina de cães e gatos, e a mesma nem sempre prediz a presença de cálculos renais ou vice-versa. Os cristais de estruvite e oxalato de cálcio dihidratado (Figura 4.2) são cristais comuns e aparecem em urinas de animais saudáveis, sem que seja indicativo de algum distúrbio, já outros tipos de cristais como fosfato cálcico, biurato de amónia, ácido úrico ou bilirrubina (Figura 4.3), entre outros, podem indicar a presença de patologias hepáticas e/ou metabólicas. A administração de alguns medicamentos também pode levar ao aparecimento de cristais na urina, como por exemplo, cristais de xantina são comuns em cães medicados com alopurinol. Todos os cristais apresentam morfologia típica com características distintas, tal como descritas na Tabela 10.2.

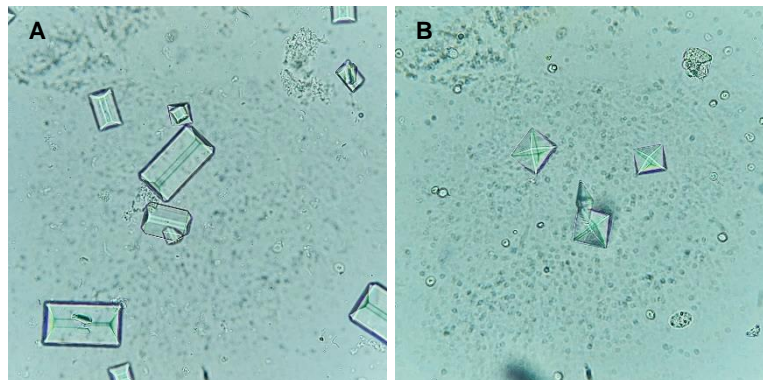


Figura 4.2 A – Cristais de estruvite (400x). B – Cristais de oxalato de cálcio dihidratado (400x).

Os cilindros são compostos por uma matriz mucoproteica que é secretada pelo epitélio tubular renal. Por serem formados dentro dos rins, os cilindros são considerados um indicador de doença renal. No entanto, menos de 1 a 2 cilindros por campo na urina concentrada pode ser normal em pacientes sem outros indicadores de doença renal. A excreção de cilindros pode ser intermitente, mesmo durante a doença ativa, e o número de cilindros observados nem sempre é um indicador do tipo, gravidade, reversibilidade ou irreversibilidade da doença. Independentemente disso, a presença de grande número de cilindros na avaliação do

sedimento urinário indica que há um processo patológico ativo a ocorrer nos rins. O cilindro base é o hialino, que é transparente, o qual pode envolver outros componentes, dando origem a outros tipos de cilindros, tais como: cilindro granuloso, que é composto por detritos celulares; cilindro lipídico, composto por gotículas lipídicas; cilindro epitelial, composto por células epiteliais renais; cilindro leucóide, composto por leucócitos; cilindro eritróide; composto por eritrócitos; cilindro céreo, cilindros hialinos desintegrados e consolidados nos túbulos; e cilindro misto, composto por vários tipos concomitantes. (Tabela 10.3)

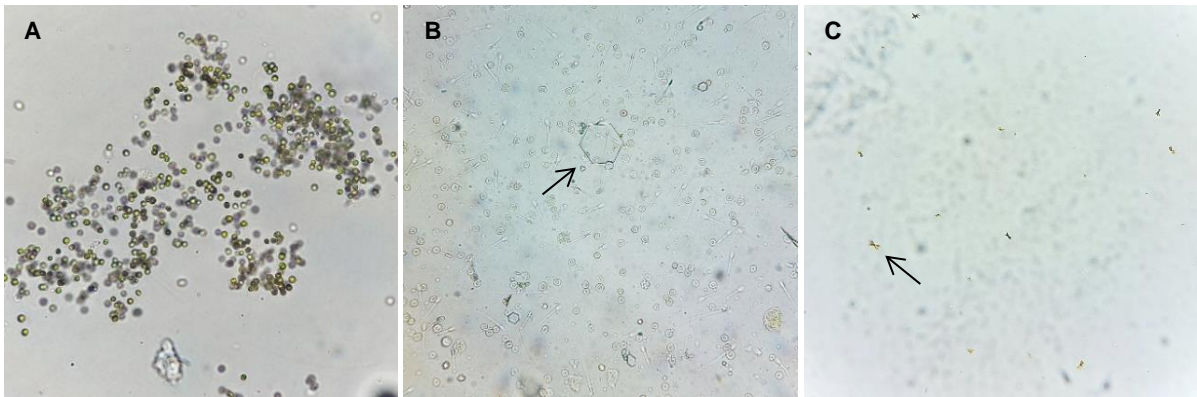


Figura 4.3 A – Cristais de biurato de amônia e/ou xantina (400x). B – Cristais de cistina (400x). C – Cristais de bilirrubina (400x).

No caso de animais saudáveis, a urina é estéril e, portanto, a presença de bactérias e outros organismos na urina nunca é um achado normal. Os clínicos devem considerar o método de colheita usado para ajudar a localizar a fonte da infecção e também avaliar se a contaminação pode ser provável. Por exemplo, a bacteriúria encontrada numa amostra de cistocentese estéril sugere infecção na bexiga (cistite) ou nos rins (pielonefrite), já uma hifa fúngica ou levedura encontrada numa amostra colheita de forma livre, será provavelmente um contaminante externo. Na Tabela 10.4 estão descritos outros organismos que poderão ser encontrados na urina, bem como a sua importância diagnóstica.

Por fim, na urina também podem ser encontrados outros achados, como pólen, associado a uma colheita livre, ou até mesmo gotículas lipídicas ou espermatozoides (Tabela 10.5).

## Estudo de caso I

Foi recebida uma amostra de urina em contentor estéril para análise de urina tipo II. Tratava-se de um felídeo do sexo feminino, da raça abissínio, com 6 anos de idade, sem sintomatologia e sem dados clínicos relevantes mencionados.

Começou-se por descrever as características físicas da urina, tratando-se uma urina amarela, ligeiramente turva, com odor normal e que não apresentava sedimento macroscópico.

Relativamente à bioquímica urinária, a tira detetou valores negativos para a maioria dos parâmetros, nomeadamente glucose, bilirrubina, corpos cetónicos, urobilinogénio e nitritos, contudo o valor das proteínas foi de 100 mg/dl. O valor do pH da amostra de urina foi 6,0 e a densidade medida no refratómetro foi 1,050. Tendo em conta os valores de referência para a espécie, todos os parâmetros estão dentro do intervalo.

Relativamente ao exame microscópico do sedimento não foram registados a presença de cilindros, cristais ou muco, contudo foram reconhecidas algumas células. Nomeadamente, foram identificados: <5/HPF de leucócitos e raras células epiteliais transicionais; e, tal como visualizado na Figura 4.4A, existe a presença de 21-100/HPF de eritrócitos e de algumas estruturas que poderiam ser consideradas bactérias.

Visto que a forma destes elementos foi considerada atípica, e de modo a comprovar se os mesmos seriam bactérias ou, porventura, cristais amorfos, decidiu realizar-se um esfregaço seco ao ar do sedimento urinário, corado com um corante do tipo Romanowsky, neste caso o Diff-Quik. Na análise da lâmina corada ao microscópio (Figura 4.4B), foram observados aglomerados de cocos, confirmando assim a suspeita da presença de bactérias no sedimento urinário microscópico.

Devido à ausência de resposta inflamatória, uma vez que não se verificou a presença de leucócitos no sedimento microscópico, poderíamos considerar a hipótese de que as bactérias visualizadas derivassem de possível contaminação, dado que não foi referido o método de colheita da urina. Contudo foi sugerida ao clínico responsável a realização da cultura da urina para despiste de infeção urinária.

Após a realização da urocultura, o resultado foi positivo, tendo sido isolado o microrganismo *Staphylococcus aureus*.

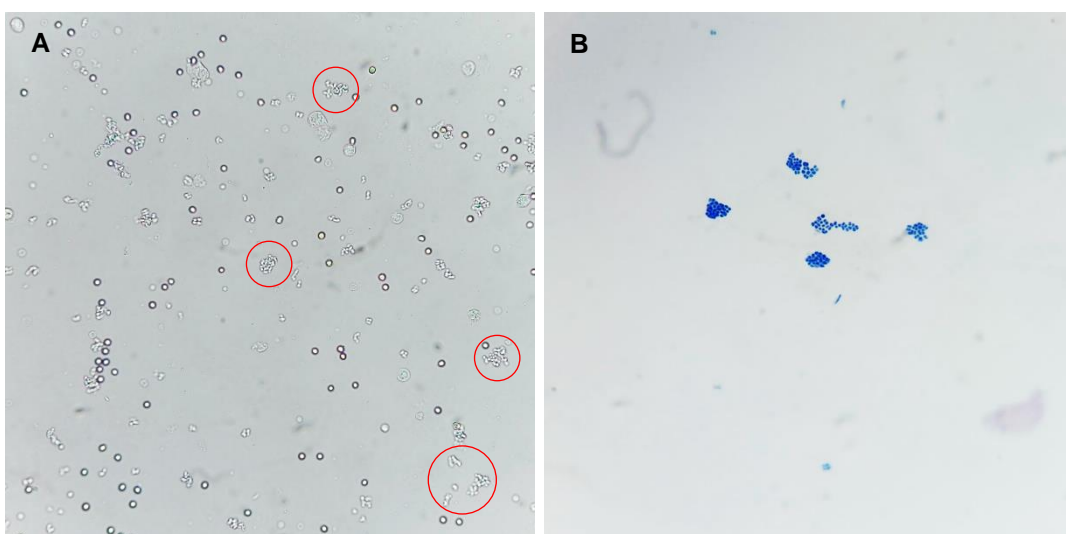


Figura 4.4 A – Aglomerados de bactérias no sedimento urinário não corado (400x).  
B – Bactérias (cocos) no sedimento urinário corado (1000x).

## Estudo de caso II

Foi recebida uma amostra de urina em contentor estéril para análise de urina tipo II. Tratava-se de um canídeo do sexo feminino, da raça dálmata, com 7 anos de idade, sem sintomatologia e sem dados clínicos relevantes mencionados.

Começou-se por descrever as características físicas da urina, tratando-se uma urina amarela, transparente, com odor normal e que não apresentava sedimento macroscópico.

Relativamente à bioquímica urinária, a tira detetou valores negativos para a maioria dos parâmetros, nomeadamente glucose, bilirrubina, corpos cetónicos, urobilinogénio e nitritos, contudo o valor das proteínas foi  $\geq 300$  mg/dl. O valor do pH da amostra de urina foi de 6,0 e a densidade medida no refratómetro foi 1,028. Tendo em conta os valores de referência para a espécie, todos os parâmetros, com exceção das proteínas, estão dentro do intervalo.

Relativamente ao exame microscópico do sedimento não foi registada a presença de células de qualquer tipo, cilindros, muco ou bactérias, contudo foram visualizadas algumas estruturas cristaloides.

Tal como observado na Figura 4.5, podemos identificar cristais amarelos com morfologia de losango com as extremidades arredondadas, tratando-se de cristais de ácido úrico. Estes cristais originam-se em urinas ácidas e estão associados a patologias metabólicas. Geralmente a sua presença é rara em urina de cães saudáveis, à exceção da raça dálmata, onde o seu achado é considerado frequente.

O ácido úrico é convertido em alantoína no fígado, que sendo mais solúvel que o ácido úrico não precipita na urina, mesmo em pH de urina mais baixo. Os cães da raça dálmata têm

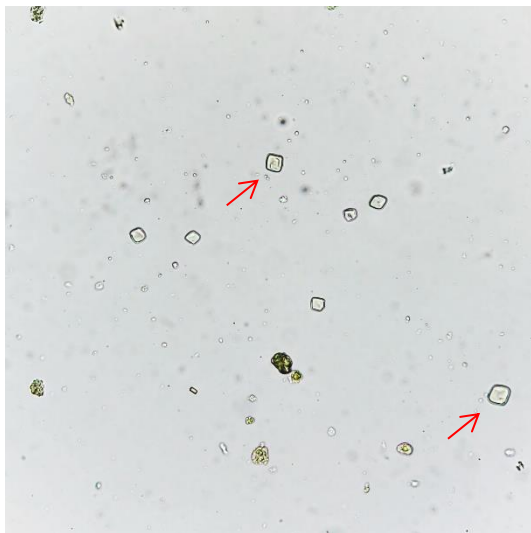


Figura 4.5 Cristais de ácido úrico (400x).

uma tendência hereditária para a formação de cristais de ácido úrico, devido a uma mutação genética (mutação autossómica recessiva no gene SLC2A9) que leva à incapacidade de metabolizar o ácido úrico corretamente, ou seja, o ácido úrico não consegue ser efetivamente transportado para os hepatócitos para que seja transformado em alantoína. Devido a esta condição, a concentração sérica de ácido úrico em dálmatas é elevada, o que causa o aumento da concentração do mesmo na urina e conseqüente formação de cristais de ácido úrico.<sup>26</sup>

## 5. Microbiologia

---

A microbiologia é a área da ciência que estuda a biologia de vários microrganismos, tais como bactérias, vírus, parasitas e fungos, investigando a estrutura, fisiologia, bioquímica, genética e ecologia desses microrganismos, bem como as interações entre eles e os seus hospedeiros. Mais precisamente, a microbiologia veterinária é a ciência que estuda os agentes infecciosos que afetam os animais.

Estes agentes são categorizados de acordo com suas associações ecológicas com os animais: (i) parasitismo, os parasitas vivem em associação permanente com os hospedeiros e à custa destes, ou seja estes são beneficiados e o hospedeiro é prejudicado; (ii) comensais são microrganismos que não causam danos discerníveis ao hospedeiro, ou seja estes são beneficiados mas o hospedeiro fica ileso (comensalismo); (iii) saprófitos normalmente habitam ambientes inanimados compartilhados com os animais; e (iv) simbiose, ou mutualismo, geralmente refere-se a associações reciprocamente benéficas entre organismos.<sup>27</sup>

O processo pelo qual os organismos se estabelecem num hospedeiro individual é chamado colonização ou infecção. O termo virulência é por vezes usado para expressar os graus de patogenicidade, muitas vezes relacionados com a gravidade da doença clínica e com a ocorrência de resultados deletérios (mortalidade ou dano tecidual).<sup>27</sup>

No caso de microrganismos patogénicos, nomeadamente parasitas, a infecção do hospedeiro causa doença, já no caso dos saprófitos, que colonizam o tecido do hospedeiro, apenas em condições favoráveis os mesmos causarão doença com dano tecidual. Relativamente aos microrganismos comensais e simbiotas, os mesmo não causarão doença. Contudo, alguns microrganismos variam os seus efeitos quando enquadrados em diferentes tecidos no mesmo hospedeiro, por exemplo a *Escherichia coli* é um microrganismo comensal do intestino, porém quando presente no trato urinário podem causar infeções graves. O mesmo poderá acontecer com outros microbiotas (microrganismos que coabitam com o hospedeiro) que detêm uma relação de simbiose com o hospedeiro. Quando ocorre a baixa de imunidade, barreiras físicas destruídas ou efeitos secundários relacionados à toma de fármacos, entre inúmeros fatores, um microbiota pode deixar de exercer os seus efeitos protetores, e passar a ser responsável por processos patológicos.<sup>27</sup>

A finalidade do diagnóstico microbiológico é detetar, identificar e caracterizar os agentes patogénicos presentes numa amostra biológica de um animal com suspeita de infecção, de modo a prescrever o tratamento adequado. Além disso, também pode ajudar a monitorizar a eficácia de um tratamento já em curso.

Dentro do setor da microbiologia, irão ser abordados os seguintes subsectores: bacteriologia, micologia e parasitologia.

## Colheita

O procedimento a adotar na altura da colheita é dependente do material biológico que se pretende recolher, contudo as condições de assepsia devem ser asseguradas de modo a prevenir contaminação externa da amostra. Na Tabela 5.1 estão descritos os procedimentos de colheita para diferentes tipos de amostra.

Algumas amostras manuseadas de forma incorreta levam a que as mesmas sejam inadequadas para análises de microbiologia, como é o caso de amostras em formalina, amostras com mais de 24h sem refrigeração, amostras em recipientes inadequados, zaragoas secas, entre outras.

*Tabela 5.1 Procedimento de colheita para diferentes tipos de amostras em microbiologia.*

<b>Amostra</b>	<b>Procedimento de colheita</b>
Urina (micção normal)	Desinfetar o animal, rejeitar o primeiro jato e colher diretamente para um recipiente estéril de boca larga com tampa de rosca.
Urina (cistocentese)	O animal deve ter a bexiga cheia; desinfetar a pele da região com uma solução antisséptica; com agulha e seringa estéril, puncionar a bexiga, aspirar e enviar diretamente a seringa utilizada devidamente fechada.
Fezes	Colher diretamente para um recipiente estéril de boca larga com tampa de rosca.
Exsudados	Passar a zaragatoa abrangendo a maior área infetada possível. Colocar em meio de transporte.
Exsudados purulentos	Lavar a área infetada utilizando soro fisiológico estéril. Passar a zaragatoa abrangendo a maior área infetada possível. Colocar em meio de transporte.
Líquidos orgânicos (LCR, Efusões, Sinovial)	Desinfetar a área a puncionar, aspirar com seringa estéril e enviar diretamente a seringa utilizada devidamente fechada. (Este procedimento assegura a viabilidade da cultura em aerobiose e anaerobiose.)
Lavagens (Traqueobrônquicas, Flush nasal, uterinas)	Lavagem com soro fisiológico. Envio em recipiente estéril de boca larga com tampa de rosca.
Sangue	Garrafas de Hemocultura: deve desinfetar a tampa da garrafa com álcool a 70% e deixar secar por evaporação. (Volume mínimo de sangue: 5 ml.)
Biópsias	Recipiente estéril e seco com tampa de rosca: Colher pequenos fragmentos com diâmetro não superior a 0,5 cm e juntar umas gotas de soro fisiológico estéril para não desidratar a amostra (não enviar em formalina).

## Transporte e conservação

As amostras devem ser transportadas para o laboratório imediatamente, de modo a assegurar a sobrevivência e isolamento dos microrganismos, uma vez que o laboratório de microbiologia trabalha basicamente em função da viabilidade dos microrganismos.

Nos casos em que a recolha é efetuada pelo laboratório, as amostras deverão ser mantidas à temperatura ambiente até chegarem ao laboratório. Caso a recolha não seja efetuada no mesmo dia, as amostras deverão ser mantidas a 4°C, de modo a garantir uma temperatura adequada à viabilidade dos microrganismos.

Quanto mais cedo a amostra for processada no laboratório de microbiologia, maior a probabilidade de obter resultados úteis. A desidratação (todos os microrganismos) e a exposição a uma atmosfera nociva (oxigênio para organismos anaeróbios) são os principais fatores que comprometem as amostras e levam a diagnósticos imprecisos. Por esta razão, é importante que a amostra seja mantida húmida e, sob condições atmosféricas compatíveis. A humidade é mantida colocando a amostra num meio de transporte composto de uma solução salina balanceada, geralmente utilizando uma matriz de gel. As zaragatoas devem ser sempre colocadas no meio de transporte, independentemente do tempo decorrido entre o processamento e a colheita.<sup>27</sup>

## Bacteriologia

Nos primórdios da biologia, os organismos vivos foram categorizados em dois reinos, *Plantae* (plantas) e *Animalia* (animais). À medida que a ciência progrediu, um terceiro reino, Protista, foi criado para incluir organismos microscópicos. Contudo, devido ao avanço da microscopia de luz e eletrónica, e com as descobertas e desenvolvimentos da biologia molecular, mais recentemente, três tipos celulares foram reconhecidos: dois pertencentes aos procariontes (bactérias e um novo tipo celular identificado como *Archaea*) e todos os outros (protozoários, fungos, plantas e animais) em eucariotas.<sup>27</sup>

As bactérias são organismos microscópicos unicelulares, ou seja, muito pequenos para serem vistos a olho nu, que pertencem ao domínio *Bacteria*. As bactérias são onipresentes na natureza, ou seja, são abundantes no solo, água, ar, plantas e animais. Para além disso, todas as superfícies corporais expostas, a pele e as membranas mucosas, de animais são colonizadas por bactérias.<sup>27</sup> As bactérias são organismos relativamente menos complexos e exibem características estruturais típicas de células procarióticas, nomeadamente são compostas por cápsula, parede celular, membrana celular, citoplasma (contendo material nuclear) e apêndices, como flagelos e pili. Estas multiplicam-se por fissão binária, e a informação genética essencial para a sobrevivência do organismo, o genoma central, geralmente, está contida num único cromossomo circular.<sup>28</sup>

As bactérias apresentam três formas básicas: esférica, chamadas cocos; em forma de bastonete, chamados bacilo; e em espiral.<sup>27</sup> Tal como é possível ver na Figura 5.1, os cocos podem ser únicos, unidos em pares (diplococos), em cadeias curtas ou longas (estreptococos) ou em aglomerados

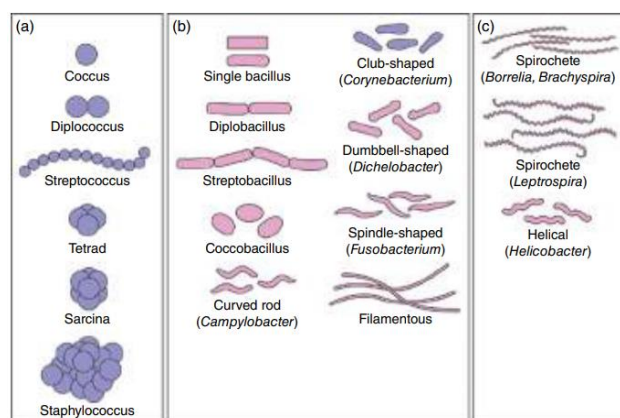


Figura 5.1 Formas básicas das bactérias. (a) cocos; (b) bacilos; (c) forma de espiral e arranjos celulares de bactérias.

Fonte: McVey S, Kennedy M, Chengappa M, Wilkes R. *Veterinary Microbiology*. 4ª Edição. Wiley Blackwell, editor. 2022.

(estafilococos). À semelhança dos cocos, os bacilos geralmente ocorrem como células individuais e alguns podem estar em pares (diplobacilos) ou em cadeias curtas ou longas (estreptobacilos). As espirais são em forma de haste e apresentam múltiplas torções.<sup>27</sup>

## Exame cultural

O exame cultural baseia-se na inoculação da amostra nos meios apropriados, considerando o tipo de amostra e a análise solicitada pelo veterinário. O objetivo da cultura *in vitro* consiste no crescimento e isolamento das bactérias, de modo a identificar a bactéria responsável pela possível infecção. As necessidades nutricionais e as condições ambientais condicionam o crescimento das diferentes bactérias, por isso é necessário adequar os meios de cultura aos requisitos das bactérias.<sup>29</sup>

## Meios de cultura

As bactérias requerem nutrientes para o crescimento, uma vez que são fundamentais para a sua função celular. Alguns nutrientes são necessários em grandes quantidades (macronutrientes), como carbono e nitrogénio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, sódio, outros em quantidades mínimas (micronutrientes), neste caso são vitaminas e metais (cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel, zinco, etc.). A maioria dos agentes patogénicos bacterianos crescem em meios de uso geral, como gelose sangue, no entanto alguns requerem nutrientes especiais ou específicos para um crescimento ideal e a essas bactérias são chamadas de nutricionalmente fastidiosas.<sup>27</sup>

Os meios de cultura podem ser divididos em várias categorias, nomeadamente meios de enriquecimento, meios seletivos e meios diferenciais. Os meios de enriquecimento ou nutritivos não seletivos são meios que promovem o crescimento generalizado de todos os microrganismos. Estes meios contêm nutrientes que suportam o crescimento da maioria dos organismos sem dar vantagem a nenhum organismo em especial. Os meios seletivos promovem o desenvolvimento de um grupo específico de microrganismo. Estes meios são constituídos por substâncias que inibem o crescimento das outras bactérias. Por último, os meios diferenciais permitem a distinção e identificação dos microrganismos com base nas características metabólicas específicas de cada bactéria. A composição destes meios inclui substâncias que evidenciam essas diferenças.<sup>29</sup>

Os meios cromogénicos são usados na enumeração e deteção de bactérias. Estes meios têm enzimas que reagem com vários tipos de microrganismos e a escolha do meio depende das características do microrganismo que se pretende isolar e/ou identificar. A vantagem destes meios relativamente à cultura tradicional é a diferenciação microbiana através de diferentes cores.<sup>29</sup>

Na Tabela 5.2 estão descritos os meios de cultura utilizados no laboratório.

Tabela 5.2 Descrição de diferentes meios de cultura utilizados em bacteriologia.

Nome	Descrição
Gelose chromID™ CPS® Elite	Meio cromogénico para o isolamento, contagem e identificação direta ou presuntiva de microrganismos que causam infeções do trato urinário. Sensibilidade de deteção e especificidade de coloração, para fácil leitura, mesmo em culturas mistas: - Colónias rosa a vermelho-escuro: <i>Escherichia coli</i> - Colónias castanho-claro a castanho-escuro: <i>Proteus spp.</i> - Colónias azul-turquesa: <i>Enterococcus spp.</i> - Colónias verde-acastanhado: <i>Klebsiella spp.</i> - Colónias pigmentadas: <i>Pseudomonas spp.</i> - Colónias violeta: <i>Streptococcus spp.</i> - Colónias amarelas: <i>Staphylococcus aureus</i> Incubação: 16/18 horas para <i>Escherichia coli</i>
MacConkey agar	Meio seletivo e diferencial para isolamento de bactérias gram-negativas. - Colónias rosa: <i>Escherichia coli</i> - Colónias transparentes: <i>Proteus spp.</i> Incubação: 24 horas
Columbia CNA agar + 5% sheep blood	Meio seletivo para isolamento de bactérias gram-positivas. - Colónias acinzentadas: <i>Enterococcus spp.</i> Incubação: 24 horas
CHROMID® Salmonella Elite	Meio cromogénico para isolamento seletivo e diferenciação de <i>Salmonella spp.</i> - Colónias rosa-claro a violeta: <i>Salmonella spp.</i> Incubação: 24 horas
Hektoen agar	Meio seletivo para isolamento e diferenciação de <i>Salmonella spp.</i> e <i>Shigella spp.</i> - Colónias verdes com o centro preto: <i>Salmonella spp.</i> - Colónias verdes sem o centro preto: <i>Shigella spp.</i> Incubação: 24 horas
Chocolate agar PolyViteX (PVX)	Meio para isolamento de bactérias fastidiosas. (Ex: <i>Neisseria spp.</i> ) Incubação: 24 horas

### Técnicas de inoculação

A inoculação dos meios de cultura pode ser realizada por várias técnicas. A técnica de inoculação por quadrante (Figura 5.2 A) é utilizada para a maioria das amostras biológicas em meios sólidos em placa. Esta técnica é feita com uma ansa, e permite obter colónias isoladas. As amostras de urina são inoculadas nos meios sólidos em placa pela técnica de sementeira semi-quantitativa (Figura 5.2 B). Esta inoculação é feita com uma ansa calibrada de 10µL, de modo a semi-quantificar o número de colónias obtidas. Para amostras recolhidas por zaragatoas utiliza-se a técnica de sementeira por espalhamento, que consiste em aplicar a zaragatoa no meio e semear em toda a superfície da placa.<sup>30</sup> Outras amostras, como o líquido cefalorraquidiano, realiza-se a inoculação por inundação, uma vez que os microrganismos estão presentes em quantidades reduzidas e devem ser sempre valorizados, os cateteres são inoculados diretamente sobre a superfície do meio através da técnica de sementeira por rolamento.

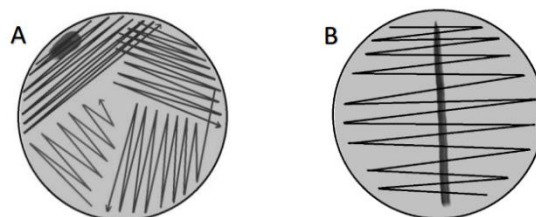


Figura 5.2 Representação esquemática da técnica de inoculação por (A) quadrantes e por (B) sementeira semi-quantitativa.

Adaptado: Tille P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13ª Edição. Elsevier Mosby, editor. 2014.

## Condições de incubação

Compreender os requisitos para o crescimento bacteriano ajuda a explicar o *habitat* em que as bactérias vivem e possibilita a otimização das condições ambientais para suportar o crescimento mais robusto de bactérias. Os quatro fatores ambientais mais críticos a serem considerados incluem disponibilidade de oxigênio ( $O_2$ ) e dióxido de carbono ( $CO_2$ ), temperatura, pH e teor de humidade do meio e da atmosfera.<sup>27,29</sup>

O  $O_2$  é um requisito crítico para muitas bactérias uma vez que dita o tipo de metabolismo que realizam para gerar energia para o crescimento. As bactérias variam na necessidade e tolerância ao oxigênio e são divididas em dois grandes grupos, bactérias aeróbias e bactérias anaeróbias. As bactérias aeróbias requerem  $O_2$  para crescer, utilizando o mesmo no seu metabolismo. As bactérias anaeróbias só conseguem crescer na ausência de  $O_2$ , dispensando o mesmo do seu metabolismo.<sup>27</sup> As bactérias podem ser estritamente aeróbias, contudo a maioria dos organismos aeróbicos clinicamente significativos são, na verdade, aeróbios facultativos, sendo capazes de crescer na presença ou ausência de  $O_2$ . As bactérias anaeróbias também podem ser microrganismos anaeróbios aerotolerantes, ou seja, não crescem na presença de  $O_2$ , mas sobrevivem à exposição ao mesmo por um período. A maioria dos anaeróbios de importância clínica são aerotolerantes.<sup>27</sup>

O  $CO_2$  é necessário para reações normais, como por exemplo, biossíntese de ácidos gordos e, portanto, é necessário para o crescimento das bactérias. Os níveis de  $CO_2$  no ar são suficientes para muitas bactérias. No entanto, algumas requerem níveis mais elevados para crescimento e são incubadas em estufas de 5% de  $CO_2$ .<sup>27</sup>

A temperatura é um importante fator ambiental que afeta o crescimento e a sobrevivência das bactérias. Geralmente, uma temperatura muito baixa ou muito alta inibe o crescimento das mesmas, uma vez que, provavelmente, existem temperaturas ótimas para reações metabólicas catalisadas por enzimas. As temperaturas mínima e máxima variam muito entre as bactérias, contudo a cultura da maioria das bactérias patogénicas deve ser feita entre os 35°C e 37°C, uma vez que se assemelha às temperaturas corporais de animais.<sup>27</sup>

Relativamente ao pH, cada espécie bacteriana tem requisitos mínimos, máximos e ótimos de pH. Os habitats bacterianos na natureza variam de condições extremamente ácidas a extremamente alcalinas. A maioria das bactérias patogénicas cresce melhor em pH neutro, com uma faixa de 6,8 a 7,2. Os meios preparados comercialmente são tamponados dentro dessa faixa, por isso raramente é necessário verificar seu o pH.<sup>27,29</sup>

Por fim, no que toca à humidade, a água é fornecida como um dos principais constituintes dos meios. No entanto, quando os meios são incubados nas temperaturas usadas para a cultura bacteriana, uma grande porção do conteúdo de água pode ser perdida por evaporação. A perda de água tem vários impactos nas culturas bacterianas e por isso medidas

como a tampa as placas de cultura para reter a humidade ou o uso de estufas humidificadas são utilizadas para garantir que os níveis de humidade apropriados sejam mantidos durante o período de incubação.<sup>29</sup>

## Exame microscópico – Coloração de Gram

O exame microscópico de preparações coradas permite precisar as características morfológicas das bactérias, nomeadamente a forma e afinidade para os corantes.<sup>30</sup> Este poderá ser útil para orientar o diagnóstico e direcionar os procedimentos do exame cultural.

Diferenças na estrutura e composição química das paredes celulares de espécies bacterianas são responsáveis pela variação na patogenicidade e influenciam outras características, incluindo propriedades de coloração. Com base na cor quando coradas pelo método de Gram, as bactérias podem ser divididas em dois grupos principais, gram-positivas (GP) e gram-negativas (GN), sendo, por isso, a coloração de Gram a principal coloração em bacteriologia, pois permite diferenciar as bactérias consoante a estrutura da parede celular.<sup>28</sup>

As bactérias GP coram de azul-roxo (Anexo 15A), a composição da parede celular das bactérias GP contém uma grande quantidade de peptidoglicano e ácidos teicóicos, o que confere resistência à descoloração do álcool-acetona e assim retém o corante violeta de cristal. Por outro lado, as bactérias GN, coram de rosa-vermelho (Anexo 15B), estas têm uma parede celular constituída por uma fina camada de peptidoglicano e uma bicamada lipídica, que na presença do agente descolorante fica fragilizada, e por isso, perdem o primeiro corante e coram com o corante de contraste (safranina ou fucsina). (Imagem explicativa no anexo) Além da resposta à coloração de Gram, esta técnica permite, também, classificar as bactérias consoante a morfologia (cocos, bacilos) e agrupamentos bacterianos (diplococos, estreptococos). Todas estas características são essenciais na identificação das bactérias.<sup>27,29</sup>

## Identificação manual

Após o período de incubação é feita a contagem e identificação das colónias presentes nas placas. Observar as principais características macroscópicas de uma colónia bacteriana é importante para qualquer identificação bacteriana. Os critérios frequentemente usados para caracterizar o crescimento bacteriano incluem os seguintes: tamanho da colónia, pigmentação, forma (inclui forma, elevação e margem da colónia), aparência da superfície (brilhante, opaca, seca, transparente), alterações no meio de cultura resultantes do crescimento bacteriano (tipo de hemólise), e odor (certas bactérias produzem odores distintos que podem ser úteis na identificação preliminar).<sup>29</sup>

Relativamente à microbiologia clínica humana, por exemplo nos Estados Unidos, são relatadas cerca de 530 espécies, no entanto 95% das identificações estão distribuídas em apenas 27 dessas espécies, sendo os principais microrganismos identificados a *Escherichia*

*coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*.<sup>29</sup> À semelhança da microbiologia humana, também os animais apresentam estas frequências.

Na Tabela 5.3 estão descritas algumas características gerais das bactérias com mais frequência em infecções nos animais.

Tabela 5.3 Descrição de características de algumas bactérias responsáveis por infecções em animais.

Bactéria	Família	Coloração Gram	Habitat	Meio cultura	Aparência
<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	GN	Trato intestinal	MacConkey	Colônias planas, secas e cor-de-rosa.
				CPS	Colônias rosa a vermelho-escuro.
<i>Klebsiella spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	GN	Nasofaringe; Trato gastrointestinal	MacConkey	Colônias mucóides cor-de-rosa.
				CPS	Colônias verde-acastanhado.
<i>Proteus spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	GN	Trato gastrointestinal	CPS	Colônias castanho-claro a castanho-escuro. Mau cheiro característico.
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	GN	Meio ambiente (solo, água, plantas)	MacConkey	Colônias irregulares e incolores.
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	GP	Nasofaringe; Pele; Colonizador da mucosa	CNA	Colônias redondas, lisas, brilhantes e opacas, de grande dimensão, brancas a cinzentas ou creme a amarelas.
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Enterococcaceae</i>	GP	Trato gastrointestinal	CNA	Colônias de pequena dimensão, acinzentadas.
				CPS	Colônias azul-turquesa.

### Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (automático)

A caracterização do microrganismo envolve a sua identificação e a sua resposta aos agentes antimicrobianos. Por isso, após a identificação do microrganismo, realiza-se o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA), que tem como finalidade determinar possíveis resistências do agente patogénico perante a ação do antimicrobiano. Deste modo, o TSA fornece informações cruciais para a escolha da terapêutica mais adequada à doença infecciosa diagnosticada.<sup>29</sup> A realização do TSA torna o uso de antibióticos mais responsável e assertivo, prevenindo o aparecimento de bactérias multirresistentes.

A identificação de microrganismos poderá ser feita por duas vias, através da utilização de meios cromogénicos para cada tipo de amostra, que permitem o isolamento e identificação do microrganismo e a valorização da infeção, ou através da utilização de um meio geral onde são selecionadas colónias morfologicamente diferentes. Estas são posteriormente inoculadas

em cartas com galerias API (analytical profile index) e cartas automatizadas para TSA, num aparelho automático.

O laboratório encontra-se equipado pelo aparelho *VITEK® 2 Compact* da *Biomérieux*. O seguinte aparelho é um analisador automático que proporciona a realização de teste de identificação de microrganismos patogénicos e TSA através de um inóculo preparado manualmente. O *VITEK® 2 Compact* tem capacidade para realizar as tarefas de inoculação, incubação e leitura de cartas de teste. As cartas de teste são constituídas por múltiplos poços que possuem no seu interior variadas substâncias bioquímicas e/ou antibióticos com diferentes concentrações.<sup>31</sup> As cartas de identificação e de TSA podem ser realizadas em simultâneo para a mesma amostra (Tabela 5.4). No entanto, antes de serem introduzidas as cartas na cassete e no analisador, é efetuada a preparação de uma suspensão de inóculo para cada amostra, segundo o procedimento de preparação e análise de cartas no analisador *VITEK® 2 Compact* da *Biomérieux* presente nos apêndices.

Tabela 5.4 Cartas de identificação e sensibilidade utilizadas no laboratório através do analisador *VITEK® 2 Compact* da *Biomérieux*.

Nome	Descrição
Carta VITEK® GN ID	Carta de identificação de bacilos GN.
Carta VITEK® GP ID	Carta de identificação de bactérias GP.
VITEK® AST-GN69	Carta de sensibilidade para organismos GN.
VITEK® AST-GP67	Carta de sensibilidade para organismos GP.
VITEK® AST-ST03	Carta de sensibilidade de bactérias GP, em particular <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Streptococcus beta-hemolítico</i> , e <i>Streptococcus viridans</i> .

Após a conclusão dos testes, os resultados obtidos pelo sistema automático são analisados a partir de um programa. O analisador dispõe de uma base de dados atualizada que identifica as várias espécies de microrganismos clinicamente revelantes e o TSA automatizado é obtido não só por categorias – Sensível, Intermediário ou Resistente – mas também com indicação da concentração inibitória mínima (MIC) de cada fármaco, permitindo a escolha de dosagens mais adequadas de cada agente antibacteriano para o tratamento do animal.

Algumas das vantagens da automatização na identificação e TSA de microrganismos são o impacto clínico, uma vez que garante resultados entre 24h e 36h, a reprodutibilidade inter-laboratorial, a diminuição de possíveis contaminações devido ao menor manuseamento e a diminuição de erros pré e pós analíticos, como por exemplo erros de inoculação e de interpretação de resultados, aumentando assim a segurança e confiabilidade dos resultados, eliminando a subjetividade das análises manuais.

## Urocultura – Cultura de urina

A função do trato urinário é produzir e processar a urina e esta é normalmente um fluido estéril. Frequentemente, as infeções do trato urinário (ITU) são caracterizadas como superiores ou inferiores com base na localização anatómica da infeção: o trato urinário inferior

abrange a bexiga e uretra, e o trato urinário superior engloba os ureteres e os rins. As infecções do trato urinário superior afetam os ureteres (ureterite) ou o parênquima renal (pielonefrite). As infecções do trato urinário inferior podem afetar a uretra (uretrite) e a bexiga (cistite). As ITU podem ser completamente assintomáticas, produzir sintomas leves (ex.: cistite) ou causar infecções com risco de vida (ex.: pielonefrite). As ITU são complicações importantes em animais com diabetes, doença renal e anomalias estruturais e neurológicas que interferem no fluxo urinário.<sup>29</sup>

O diagnóstico laboratorial de uma ITU baseia-se na realização de uma urocultura. Esta realiza-se pela técnica de sementeira semi-quantitativa, e para isolamento, identificação e contagem direta de colónias em amostras de urina o meio de eleição é o CPS. A inoculação é feita com uma ansa estéril calibrada de 10µL, e o meio é incubado overnight, a 37°C, numa atmosfera de aerobiose.

Após a incubação, as placas são observadas e avaliadas semi-quantitativamente, como descrito na Tabela 5.5, e no caso de uroculturas positivas é observada a morfologia das colónias, de modo a identificar o agente etiológico e, se adequado, realizar o TSA.

Tabela 5.5 Classificação da avaliação semiquantitativa de uroculturas.

Nº de colónias	Fator de multiplicação	Resultado
Sem crescimento	-	Negativo
1 a 10 UFC	$\times 10^3$	Entre $10^3$ e $10^4$ UFC/ml
10 a 100 UFC	$\times 10^3$	Entre $10^4$ e $10^5$ UFC/ml
$\geq 100$ UFC	$\times 10^3$	$\geq 10^5$ UFC/ml

A maioria das ITU têm como agente etiológico a *Escherichia coli* (Figura 5.3A), além de outros exemplos como *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.* e *Staphylococcus spp.* (Figura 5.3).

A valorização dos resultados deverá ter em conta uma série de parâmetros, tais como: método de colheita da urina, sintomatologia, observação microscópica do sedimento urinário e resultados de exames bacteriológicos anteriores.<sup>30</sup> Na Tabela 5.6 estão descritos os critérios de valorização aplicados no laboratório consoante o método de colheita da urina.

Tabela 5.6 Valorização de resultados no processamento de uroculturas.

<b>Métodos não invasivos (micção normal)</b>		
1 a 2 tipos de colónias	Se $\geq 10^4$	Identificação e TSA
Cultura mista que inclui 3 tipos de colónia	Se 1 tipo $\geq 10^5$	Identificação e TSA
<b>Métodos invasivos (cistocentese)</b>		
1 a 2 tipos de colónias	Se $\geq 10^3$	Identificação e TSA
Cultura mista que inclui 3 tipos de colónia	Se 1 tipo $\geq 10^4$	Identificação e TSA

O que complica a interpretação da urocultura é a crescente dificuldade em distinguir entre infeção e contaminação.<sup>29</sup> Existem diversas interferências durante o processamento das urinas que pode levar a resultados falso-positivos e falso-negativos, nomeadamente colheitas inadequadas, em recipientes não estéreis ou colheitas feitas do chão, demora no envio das amostras para o laboratório ou demora no processamento da amostra, o facto do animal estar

sob antibioterapia, ou até mesmo animais com sintomas como poliúria (urinar em excesso) e polidipsia (excessiva sensação de sede).

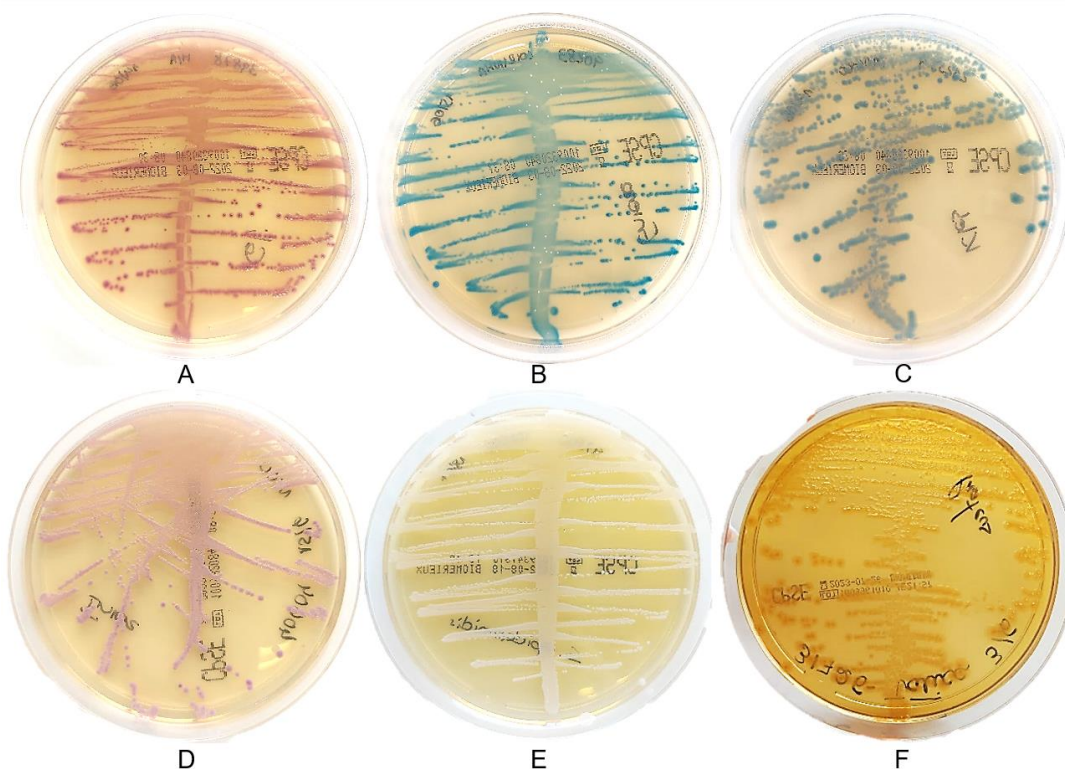


Figura 5.3 Uroculturas positivas em meio CPSE. A – *Escherichia coli*; B – *Enterococcus* spp.; C – *Klebsiella* spp.; D – *Staphylococcus pseudointermedius*; E – *Staphylococcus epidermidis*; F – *Proteus* spp.

## Hemocultura – Cultura de sangue

A presença de bactérias na corrente sanguínea, denomina-se de bacteriemia. As hemoculturas são cruciais para o diagnóstico de bacteriemia e identificação do agente patogênico.

Uma vez que o sangue é um líquido estéril, valoriza-se qualquer microrganismo isolado a partir de uma hemocultura. No momento da colheita podem ocorrer contaminações com microrganismos comensais da pele, então, é essencial que a colheita seja realizada de acordo com as recomendações ditadas no manual de boas práticas do laboratório. A colheita para uma hemocultura inicia-se com a desinfecção da pele no local da punção venosa, para evitar contaminações com a microbiota da pele. Os frascos contêm um meio de cultura, e deve ser respeitada a relação meio de cultura/volume de sangue, para aumentar a recuperação de microrganismos.

À chegada ao laboratório o frasco de hemocultura é colocado na estufa a 37°C, após 24h é realizada a primeira cultura em meio CNA, de seguida, a cada 24h é realizada uma cultura em meio CNA e em meio MacConkey, até um máximo de 3 culturas ou até a cultura apresentar

crescimento. Após um total de 4 culturas sem crescimento, o resultado do exame bacteriológico cultural ao sangue é considerado negativo.

### Coprocultura – Cultura de fezes

O trato gastrointestinal (GI) apresenta uma flora normal composta por uma grande variedade de microrganismos. Por essa razão, as fezes são um produto muito abundante em microrganismos, e por isso é difícil isolar o agente etiológico que causa a infecção. Como tal, utilizam-se meios seletivos para favorecer o crescimento das bactérias enteropatogênicas e impedir o crescimento de outras bactérias.<sup>29</sup>

O exame cultural de fezes consiste na pesquisa de *Salmonella spp.* e *Shigella spp.*, no qual as amostras de fezes são inoculadas nos meios Hektoen e Salmonella. Para a inoculação é necessário fazer uma diluição, colocando uma alíquota de fezes num 1ml de soro fisiológico estéril. Posteriormente, a sementeira é feita com uma ansa estéril calibrada de 10µL, e o meio é incubado *overnight*, a 37°C, numa atmosfera de aerobiose.

Uma vez que são utilizados meios seletivos e cromogénicos, a análise da presença ou ausência de bactérias patogénicas nas fezes é feita através da coloração específica das colónias, nos meios utilizados, por exemplo, a *Salmonella spp.* no meio de Salmonella irá apresentar colónias rosa-claro a violeta (Figura 5.4A), e no meio Hektoen irá apresentar colónias verdes com o centro preto (Figura 5.4B).

Tal como acontece nas uroculturas, também nas coproculturas podem ocorrer as mesmas interferências, tais como uma colheita inadequada, ou o atraso no processamento da amostra, levando a resultados pouco confiáveis.

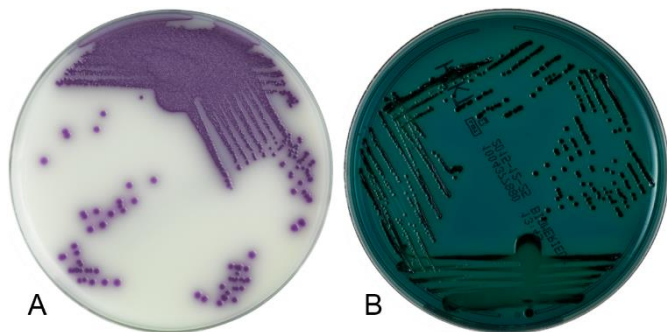


Figura 5.4 Cultura de *Samonella spp.* em meio CHROMID® *Salmonella Elite* (A) e Hektoen agar (B) da Biomerieux.

### Cultura de líquidos biológicos

Os líquidos, tais como líquido cefalorraquidiano, líquido pleural, líquido peritoneal, líquido sinovial, lavagens bronco-alveolar, aspirados pulmonares, entre outros, contidos nas cavidades corporais são normalmente estéreis, por isso o isolamento de qualquer microrganismo deve ser valorizado. As infeções nestes locais levam ao aumento da quantidade de líquido, e podem ser provocadas por uma grande variedade de microrganismos. A colheita destas amostras é realizada por aspiração em condições assépticas. Todas estas amostras são semeadas em meio MacConkey, meio CNA e meio PVX,

e são incubadas *overnight*, a 37°C, numa atmosfera de aerobiose ou anaerobiose, consoante a cultura requisitada.

## Cultura de aeróbios

Os exsudados auriculares, exsudados oculares, exsudados de feridas, exsudados profundos, entre outros, são semeados em meio MacConkey, meio CNA e alguns em meio PVX, e são incubados *overnight*, a 37°C, numa atmosfera de aerobiose.

A maioria dos agentes etiológicos presentes neste tipo de amostra de animais são *Escherichia coli*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.* e *Staphylococcus aureus* (Figura 5.5).

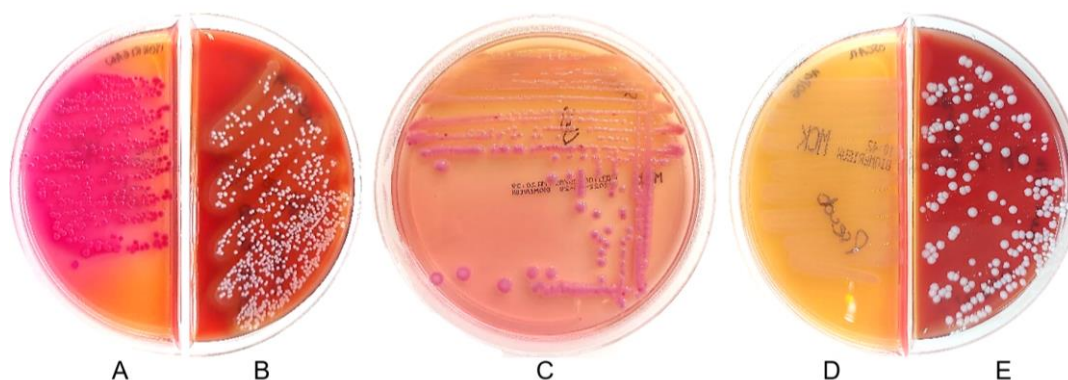


Figura 5.5 Cultura positiva de: *Escherichia coli* em meio MacConkey (A), *Enterococcus spp.* em meio CNA (B), *Klebsiella spp.* em meio MacConkey (C), *Pseudomonas spp.* em meio MacConkey (D) e *Staphylococcus aureus* em meio CNA (E).

## Cultura de anaeróbios

Para a cultura em meio de anaerobiose são utilizados os sacos *GENbag anaer* da *Biomérieux*. O GENbag consiste num saco hermético feito de plástico transparente, que, em conjunto com uma saqueta de alumínio, produz rapidamente a atmosfera apropriada para a cultura de bactérias que requerem uma atmosfera anaeróbica, ou seja, que requerem ausência de O<sub>2</sub>. Estas saquetas funcionam sem adição de água ou catalisador, e contêm diversos compostos químicos, que permitem a absorção de O<sub>2</sub>, dentro do saco.

Todas as culturas de anaeróbios são então semeadas em meio MacConkey e meio CNA, depois as placas são introduzidas nos sacos herméticos, juntamente com uma saqueta, que em seguida são devidamente selados. As placas são incubadas *overnight*, a 37°C, na atmosfera de anaerobiose.

## Estudo de caso I

Foi recebida uma amostra de urina numa seringa, colhida por cistocentese, para análise de urina tipo II e urocultura. Trata-se de um felídeo do sexo feminino, de raça indeterminada, com 14 anos de idade, sem dados clínicos mencionados.

Após a realização da análise microscópica do sedimento urinário, não foram registrados a presença cilindros, cristais ou muco, contudo foram reconhecidas algumas células. Nomeadamente, foram identificados <5/HPF de eritrócitos e raras células epiteliais transicionais, e tal como visualizado na Figura 5.6A, existe a presença de >100/HPF de leucócitos e abundantes estruturas consideradas bactérias.

Devido à presença de leucócitos em grande quantidade, demonstrando que o sistema imunitário poderá estar a tentar combater uma infeção, é esperado que se trate de um quadro de ITU e que a urocultura seja positiva.

Após a inoculação da urina em meio CPSE, e incubação de 24 horas a 37°C, podemos observar colónias rosa a vermelho-escuro na superfície da placa (Figura 5.6B). O microrganismo isolado através do exame bacteriológico cultural trata-se de *Escherichia coli*. A contagem de colónias foi de 10<sup>6</sup> UFC/mL. De seguida foi realizado o TSA, tendo o resultado dado como sensível a: Ampicilina, Amoxicilina+Ácido Clavulânico, Cefalexina, Cefalotina, Cefpodoxima, Cefovecina, Ceftiofur, Imipenem, Amicacina, Gentamicina, Neomicina, Enrofloxacina, Marbofloxacina, Pradofloxacina, Doxícilina, Tetraciclina, Nitrofurantoína, Cloranfenicol, Trimetoprim-Sulfametoxazol, Amoxicilina, Cefadroxil, Minociclina.

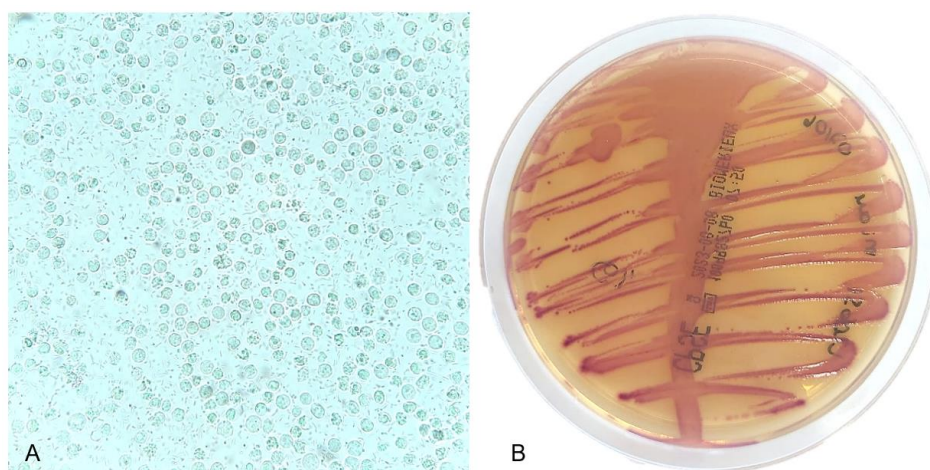


Figura 5.6 A – Bactérias e leucócitos presentes no sedimento urinário (400x); B – Cultura com crescimento de *Escherichia coli*.

## Estudo de caso II

Foi recebida uma amostra uma zaragatoa de um exsudado realizado numa laceração no abdómen para cultura de aeróbios e cultura de anaeróbios. Trata-se de um canídeo do sexo feminino, de raça King Charles Cavalier, com 5 anos de idade.

Para a cultura de anaeróbios, a zaragatoa foi semeada em meio MacConkey e em meio CNA, e as placas foram colocadas numa atmosfera de anaerobiose, e incubadas *overnight*, a 37°C.

Relativamente à cultura de aeróbios, a zaragatoa foi novamente semeada em meio MacConkey e em meio CNA, e estas placas foram incubadas *overnight*, a 37°C, numa atmosfera de aerobiose.

Após incubação de 48 horas 37°C, as placas colocadas em anaerobiose não apresentaram crescimento, sendo o resultado do exame bacteriológico cultural negativo para a cultura de anaeróbios.

No que toca à cultura de aeróbios, após 24 horas de incubação a 37°C, não observamos crescimento bacteriano no meio MacConkey, contudo no meio CNA podemos ver o crescimento de colónias de pequena dimensão e cor acinzentada (Figura 5.7). Devido à dificuldade de identificação tendo em conta apenas as características morfológicas das colónias, decidiu-se pela realização de uma carta de identificação e carta de TSA no VITEK® 2 Compact. A identificação automática, através da carta de identificação, reconheceu o microrganismo como sendo *Enterococcus spp.* O resultado do TSA foi o seguinte: Sensível para Penicilina G, Amoxicilina+Ácido Clavulânico, Nitrofurantoína, Cloranfenicol, Florfenicol, Amoxicilina, Ampicilina; Resistente para Cefovecina, Marbofloxacina, Minociclina; e, Intermédio para Enrofloxacina, Eritromicina, Doxiciclina.



Figura 5.7 Cultura sem crescimento bacteriano no meio MacConkey, e com crescimento bacteriano no meio CNA.

## Micologia

Os fungos são organismos eucariotas, constituídos por uma parede celular composta essencialmente por quitina e ergosterol. A classificação de um fungo como bolor ou levedura, é baseado na sua aparência microscópica no tecido ou em meios de cultura rotineiros (o estágio assexuado). Microscopicamente, se forem observadas estruturas hifais, o fungo é denominado bolor; se forem observadas estruturas de brotamento unicelular, o fungo é denominado levedura. Em meios de cultura de rotina, os bolores terão uma aparência “felpuda” ou lanosa, e uma levedura será semelhante a uma bactéria na sua morfologia e consistência colonial.<sup>27</sup>

O diagnóstico laboratorial de infeções fúngicas implica o isolamento e a identificação do fungo responsável pela patologia. A identificação do fungo é feita com base na observação macroscópica das colónias e, devem ser consideradas características, como a textura, pigmentação, tempo de crescimento, entre outras. Na Figura 5.7 estão descritos os meios de cultura utilizados no laboratório e a incubação dos meios é realizada por 24h/48h a 37°C.

Tabela 5.7 Descrição dos meios de cultura utilizados em micologia.

Nome	Descrição
Geloses chromID™ Candida / Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2	Gelose chromID™ Candida é um meio cromogénico para o isolamento seletivo de leveduras e identificação direta de <i>Candida albicans</i> . - Colónias azuis: <i>Candida albicans</i> . Gelose Sabouraud Gentamicina Cloranfenicol 2 é um meio que permite o isolamento seletivo de leveduras e bolores. - Colónias brancas cremosas a pastosas: <i>Candida albicans</i> .
CHROMagar™ Malassezia	Meio cromogénico elaborado no laboratório segundo o protocolo descrito no Anexo 16, para deteção de <i>Malassezia</i> spp. - Colónias cor-de-rosa a roxo: <i>Malassezia</i> spp.

Nas amostras de animais que chegam ao laboratório é frequente a presença de *Malassezia pachydermatis* e *Candida albicans* (Figura 5.8).

A *Malassezia* spp. está presente em baixo número na flora normal da pele (especialmente áreas húmidas, como dobras cutâneas, regiões interdigitais) e canal auditivo externo de animais. *Malassezia pachydermatis* desempenha um papel secundário, mas significativo, na otite externa e na dermatite numa variedade de animais, mas mais comumente em cães e, em menor grau, em gatos. O papel exato desempenhado por *Malassezia pachydermatis* permanece incerto, e o que faz com que a levedura mude de um comensal inofensivo para um que contribui para a doença é desconhecido. No entanto, acredita-se que a doença possa estar associada ao tratamento prolongado com antibióticos, imunossupressão, administração de glicocorticóides, bem como outras condições predisponentes.<sup>27,32</sup>

A correção da condição subjacente é o aspeto mais importante do tratamento da otite externa ou dermatite associada a *Malassezia pachydermatis*. Quase todas as preparações tópicas disponíveis comercialmente que contêm um agente antifúngico (nistatina, clotrimazol, miconazol, etc.) são eficazes no tratamento do componente fúngico da otite externa. Geralmente, champôs medicinais (por exemplo, miconazol + clorexidina), juntamente com a administração sistémica de antifúngicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol ou terbinafina) são eficazes na redução da influência de *Malassezia pachydermatis* sobre doenças dermatológicas.<sup>27,32</sup>

A *Candida* spp. é uma levedura parasita que habita a flora normal das membranas mucosas da maioria dos mamíferos e aves. No entanto, a *Candida albicans* pode invadir qualquer órgão do corpo e causar doença. As infeções localizadas em cães e gatos são caracterizadas por lesões ulcerativas que não cicatrizam nas mucosas oral, respiratória superior, gastrointestinal e/ou geniturinária. As infeções genitais equinas causam infertilidade, metrite e abortos.<sup>27,32</sup> A doença está ligada a inadequações imunológicas e hormonais, redução da resistência à colonização ou exposição intensiva de hospedeiros enfraquecidos ou tecidos vulneráveis, como por exemplo animais lactentes, diabéticos, animais em regime de antibióticos e esteroides, ou imunocomprometidos.

As infecções da córnea e cutâneas são geralmente tratadas com uma combinação de medicamentos antifúngicos sistêmicos e tópicos. A nistatina pode ser administrada na ração ou na água. A anfotericina B, itraconazol e miconazol. Fluconazol (preferencial) ou flucitosine é útil para o tratamento de cães ou gatos com candidíase do trato urinário inferior.<sup>27,32</sup>

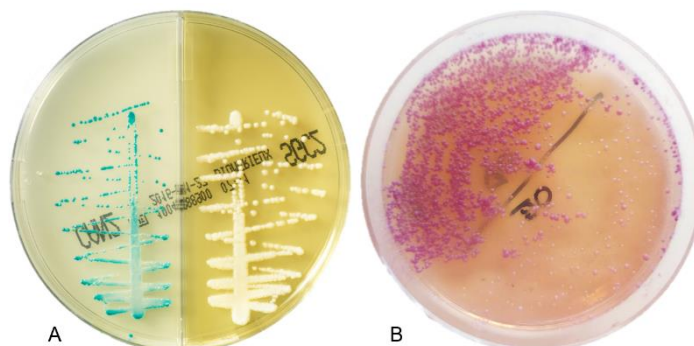


Figura 5.8 A – Cultura de colônias de *Candida Albicans*. Lado esquerdo: meio cromogénico com colônias azuis de *Candida Albicans*. Lado direito: meio seletivo com colônias brancas de *Candida Albicans*. B – Cultura de colônias de *Malassezia pachydermatis*.

### Estudo de caso III

Foi recebida uma amostra de um exsudado auricular em duas zaragatoas com meio (ouvido direito e ouvido esquerdo) para cultura de exsudado auricular e cultura de *Malassezia*. Tratava-se de um canídeo do sexo feminino, de raça indeterminada, com 3 anos de idade.

Após a sementeira das duas zaragatoas em meio MacConkey e em meio CNA para a cultura de aeróbios, realizou-se a sementeira no meio de *Malassezia*. Após incubação de 24 horas 37°C de todas as placas, os meios de MacConkey e CNA não apresentaram crescimento, sendo o resultado do exame bacteriológico cultural negativo, a placa de *Malassezia* apresentou crescimento para ambas as amostras recebidas (ouvido direito e ouvido esquerdo), tal como demonstra a Figura 5.9. O exame micológico cultural foi considerado positivo tendo sido isolado o microrganismo *Malassezia pachydermatis*.



Figura 5.9 Cultura de colônias de *Malassezia pachydermatis* em ambos os lados da placa.

### Parasitologia

Os parasitas fecais são importantes causadores de sintomatologia intestinal, sendo os principais causadores de diarreias crônicas. Cada parasita possui características morfológicas e biológicas distintas que permitem que técnicas eletivas sejam aplicadas para o seu diagnóstico.

A técnica mais comumente utilizada na medicina veterinária para o exame de fezes é a técnica de flutuação fecal, e baseia-se na capacidade que determinados ovos e cistos têm de flutuar numa solução saturada. Podem ser usadas muitas substâncias diferentes para fazer

soluções de flutuação, mas as mais populares na prática veterinária são as soluções salinas saturadas. Cloreto de sódio saturado, nitrato de sódio, e sulfato de magnésio são soluções baratas, fáceis de preparar e efetivas na flutuação de ovos de parasitas.<sup>33</sup> O protocolo da técnica de flutuação fecal está descrito no Anexo 17.

No caso de parasitas demasiado pesados, que não flutuam nas soluções de flutuação comuns, como ovos de trematóides e de alguns cestóides e nematóides, é utilizada a técnica de sedimentação fecal, segundo o protocolo presente no Anexo 18.<sup>33</sup>

A pesquisa de antigénio por imunocromatografia é uma técnica de maior sensibilidade e especificidade, contudo só permite a deteção do agente para o qual está a ser testado.

Para a interpretação dos resultados obtidos através da técnica de flutuação fecal deve ter-se conhecimento dos ciclos de vida destes organismos. A não observação de parasitas, cistos ou ovos não significa a sua ausência, mas sim que estes não foram observados na amostra enviada. Para aumentar a sensibilidade destes testes é recomendável que sejam enviadas amostras de três dias consecutivos. A visualização de apenas uma estrutura parasitária permite o diagnóstico laboratorial.

As técnicas de parasitologia fecal têm como objetivo a deteção de ovos, cistos e larvas em amostras de fezes e é realizada uma avaliação qualitativa através da observação microscópica. Por isso, é essencial o conhecimento morfológico das espécies de parasitas possíveis de causar infeção.<sup>29</sup>

Existem muitos pontos que devem ser lembrados no uso do microscópio para examinar preparações de parasitas. Primeiramente, o uso de lentes 10x no microscópio para examinar a lâmina. Deve iniciar-se numa extremidade e sistematicamente correr a lâmina inteira. O aumento de 40x é útil para evidenciar ou para procurar organismos pequenos como *Giardia spp.* De seguida, a maioria dos ovos de parasitas ou larvas tem pouca ou nenhuma cor, não sendo possível uma boa visualização do seu fundo. Para maximizar o contraste no campo e tornar as estruturas parasitárias mais visíveis, é importante manter alto contraste, e isto pode ser conseguido pela manutenção do condensador do microscópio numa posição baixa, ou reduzindo a abertura do diafragma e a intensidade da luz não deve ser alta. Por fim, quando estiver a ler a lâmina, é sempre bom mudar o foco para cima e para baixo, alternando também o plano de foco. Frequentemente, ovos de parasitas estarão em níveis ligeiramente diferentes que os cistos de protozoários ou oocistos, e uma leve manipulação do foco fino pode fazer as estruturas se tornarem mais visíveis.<sup>33</sup>

O *Cryptosporidium spp.* é um parasita protozoário que infeta uma gama alargada de vertebrados.<sup>29</sup> O diagnóstico de *Cryptosporidium spp.* é realizado através de pesquisa de antigénio por imunocromatografia, uma vez que os cistos são demasiado pequenos para serem detetados na técnica de flutuação fecal. A *Giardia spp.* é um parasita cosmopolita de

animais domésticos e de humanos, e é detetada na técnica de flutuação fecal, como cistos ou trofozoítos, ou utilizando pesquisa de antígeno por imunocromatografia.

A presença de *Cryptosporidium spp.* e *Giardia spp.* nas amostras de fezes é detetada através do teste de diagnóstico rápido in vitro da Coris Bioconcept Kit Crypto-Giardia Duo-Strip, o qual o protocolo está presente no Anexo 19.

Alguns dos parasitas que podem provocar infecções GI parasitárias são apresentados na Tabela 10.6.

### Estudo de caso IV

Foi recebida uma amostra de fezes em três contentores estéreis para análise de citologia de flutuação, ou seja, pesquisa de parasitas fecais. Tratava-se de um canídeo do sexo feminino, de raça indeterminada, com 3 meses de idade, sem sintomatologia mencionada.

Após a elaboração do protocolo da técnica de flutuação fecal, e após a avaliação microscópica (Figura 5.10) podemos verificar a presença de vários oocistos claros e transparentes e que apresentavam um ou dois esporocistos no interior. Posto isto, o resultado da pesquisa de parasitas fecais foi positivo, e a conclusão foi de que foram observados oocistos compatíveis com *Isospora spp.* nas fezes pela técnica da flutuação fecal.

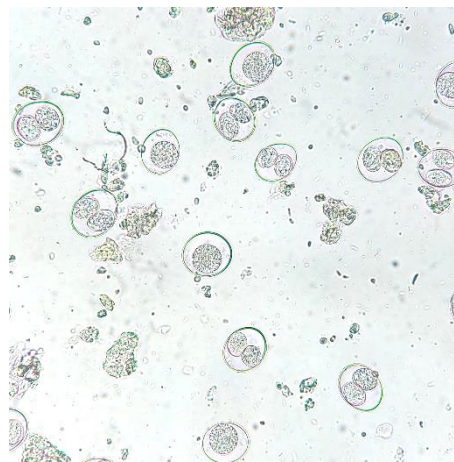


Figura 5.10 Oocistos de *Isospora spp.* (400x).



## 6. Hematologia

---

A hematologia é uma especialidade que se concentra no estudo, diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças relacionadas com o sangue, medula óssea e sistema linfático. Esta abrange uma ampla gama de condições e doenças, incluindo anemias, distúrbios de coagulação, doenças da medula óssea, doenças autoimunes que afetam o sangue e várias outras doenças hematológicas. A hematologia inclui análises de concentração, estrutura e função das células sanguíneas e seus precursores na medula óssea.<sup>34</sup>

### Sangue

O sangue é composto por células (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) que circulam dentro de um fluido chamado plasma. Os eritrócitos, hemácias ou glóbulos vermelhos são os mais numerosos, com vários milhões de eritrócitos por microlitro ( $\mu\text{L}$ ) de sangue em mamíferos. As plaquetas ou trombócitos são o próximo tipo de célula mais numerosa no sangue, com contagens de plaquetas tão baixas quanto  $100 \times 10^3/\mu\text{L}$  em cavalos saudáveis até várias centenas de milhares por  $\mu\text{L}$  noutras espécies de mamíferos. As contagens totais de leucócitos ou glóbulos brancos são muito mais baixas do que as contagens de eritrócitos e plaquetas, com contagens totais de leucócitos variando de cerca de  $5 \times 10^3/\mu\text{L}$  a cerca de  $16 \times 10^3/\mu\text{L}$  em mamíferos. A proporção de tipos de leucócitos presentes no sangue varia de acordo com a espécie, sendo os neutrófilos o tipo de leucócitos mais numerosos presentes no sangue de carnívoros e os linfócitos o tipo de leucócitos mais numerosos presentes no sangue de ruminantes e roedores. Na tabela presente no Anexo 20 estão descritos os valores de referência em hematologia, tendo em conta cada espécie de animal doméstico.

O plasma consiste principalmente em água, e contém cerca de 6 a 8 g/dL de proteínas plasmáticas e 1,5 a 2,0 g/dL de sais inorgânicos, lipídios, carboidratos, hormonas e vitaminas.<sup>35</sup>

### Colheita de amostras

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é o anticoagulante preferido para a realização do hemograma completo na maioria das espécies, uma vez que é essencial para estagnar a cascata de coagulação. Contudo o sangue de algumas aves e répteis sofre hemólise quando colhido em EDTA, nessas espécies, a heparina é frequentemente usada como anticoagulante.

A colheita de sangue diretamente para um tubo a vácuo é preferível à colheita de sangue por seringa e transferência para um tubo a vácuo. Este método reduz a aglomeração de plaquetas e a formação de coágulos nas amostras, pois mesmo pequenos coágulos tornam uma amostra inutilizável. As contagens de plaquetas são acentuadamente reduzidas e, às

vezes, pode ocorrer uma redução significativa no hematócrito (HCT) e também na contagem de leucócitos. Além disso, quando o tubo é preenchido com base no vácuo dentro do tubo, a proporção adequada de amostra para anticoagulante estará presente. O tamanho inadequado da amostra resulta na diminuição do HCT devido ao excesso de solução de EDTA.

As amostras devem ser enviadas para o laboratório o mais rápido possível, e os esfregaços sanguíneos devem ser feitos com a maior brevidade e rapidamente secos para minimizar as alterações morfológicas.<sup>35</sup>

Como já mencionado anteriormente, vários fatores podem levar a alterações nos valores do hemograma, nomeadamente durante a colheita, como a amostra ser colocada em recipientes inadequados, a razão anticoagulante/amostra ser a errada e ocorrer uma homogeneização incorreta da amostra.

## Equipamentos

Em termos de equipamentos, o laboratório é constituído por dois analisadores hematológicos (XN-1000™ da Sysmex e ADVIA® 120 da Siemens Healthineers) e um aparelho que avalia alguns parâmetros da hemostase (Sistema BCS®XP da Siemens Healthineers).

Para a realização de hemogramas, o mais utilizado é o aparelho XN-1000™ da Sysmex, que permite a aspiração da amostra de forma manual ou de forma automática. Este aparelho processa as amostras, de sangue total colhido em tubos com anticoagulante EDTA, em modo fechado, ou seja, não é necessária a remoção da tampa da amostra para esta ser processada. Este aparelho permite uma análise quantitativa e qualitativa. A contagem dos diferentes tipos de células é realizada em canais distintos, de modo a reduzir as interferências. Encontram-se descritos na Tabela 6.1 os diferentes parâmetros hematológicos e respetivas metodologias.

*Tabela 6.1 Parâmetros hematológicos e respetivas metodologias usadas pelo aparelho Sysmex XN-1000.*

<b>Parâmetros Hematológicos</b>	<b>Metodologia</b>
Eritrócitos; Plaquetas	Impedância com focagem hidrodinâmica
Concentração de Hemoglobina	Método de Sulfato Lauril de Sódio (SLS) de hemoglobina
Leucócitos; Plaquetas óticas; Reticulócitos; Células imaturas	Citometria de fluxo fluorescente

## Hematopoiese

A hematopoiese é o processo que envolve a formação, diferenciação e maturação das células sanguíneas. Estes processos são a única fonte responsável para a formação, renovação e desenvolvimento de células sanguíneas e responsável pela sua libertação para a circulação sanguínea. A hematopoiese ocorre na medula dos ossos e tem início com uma

célula-mãe pluripotente, que pode autorrenovar-se e dar origem a produção contínua e diária das células sanguíneas das várias linhas celulares (Figura 6.1).<sup>35,36</sup>

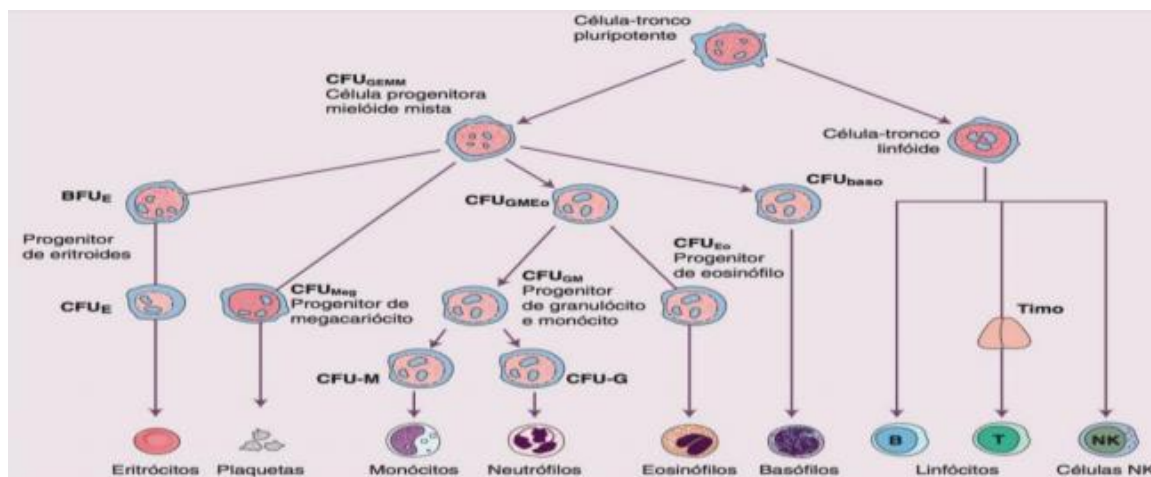


Figura 6.1 Diagrama que mostra a célula-mãe (pluripotente) e as linhagens celulares que dela se originam. As CFU são células progenitoras que perdem a pluripotencialidade e adquirem alta capacidade de proliferação, e podem ser diferenciadas como células linfóides (CFU-L), que dão origem aos linfócitos (células maduras), ou como células mielóides (CFU-GEMM), que originam os restantes tipos celulares. As células precursoras já estão comprometidas com uma linhagem específica, contudo ainda possuem alto poder de mitose, e por fim as células maduras possuem morfologia típica e atividade funcional diferenciada e não têm qualquer capacidade de divisão (ex: eritrócitos, neutrófilos).

## Hemograma

Os testes de laboratório são feitos por uma variedade de razões, e o hemograma é um dos parâmetros analíticos básicos de rotina mais frequentes e solicitados pelos veterinários. Testes de rastreio, como o hemograma completo, podem ser feitos em animais clinicamente normais, ou para examinar pacientes geriátricos ou até mesmo para identificar uma condição que pode tornar um animal um risco anestésico ou cirúrgico.<sup>35</sup>

O hemograma completo é realizado quando um animal doente é examinado pela primeira vez, especialmente se houver sinais sistêmicos de doença e um diagnóstico específico não for aparente na história e no exame físico. O hemograma completo pode ser realizado para confirmar um diagnóstico presuntivo, para auxiliar na determinação da gravidade de uma doença, para ajudar a formular um prognóstico e para monitorar a resposta à terapia. As decisões de solicitar exames de hematologia em animais são amplamente baseadas no custo do exame versus o benefício potencial do resultado para o animal.<sup>35</sup>

O hemograma fornece informações quantitativas e qualitativas sobre os elementos celulares, e é composto pelo eritrograma, leucograma e plaquetograma.

## Eritrograma

O eritrograma é um conjunto de diferentes análises da série vermelha que engloba a quantificação dos eritrócitos, concentração da hemoglobina e avaliação dos índices hematiméticos: volume globular médio (VGM), hemoglobina globular média (HGM) e

concentração de hemoglobina globular média (CHGM), assim como o índice de distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW).

### Contagem de Eritrócitos

Os eritrócitos são as células sanguíneas mais abundantes e mais numerosas no sangue. Na tabela presente no Anexo 20 estão descritos os valores de referência para os eritrócitos, consoante a espécie. Os eritrócitos têm a função de transportar O<sub>2</sub> ligado a hemoglobina dos pulmões para os tecidos.

### Concentração de Hemoglobina

A concentração de hemoglobina é particularmente conhecida como um biomarcador muito utilizado no diagnóstico de anemia. A concentração de hemoglobina é expressa em gramas por decilitro de sangue (g/dL). Considera-se anemia quando se verifica um valor de concentração de hemoglobina abaixo do valor de referência. Este parâmetro indica a capacidade de transporte de oxigênio por parte do eritrócito, e a sua diminuição indica anemias hipocrômicas. A lipemia e a presença de corpos de heinz podem levar ao aumento deste parâmetro.

### Hematócrito

O hematócrito (HCT) avalia a razão entre percentagem do volume ocupado pelos eritrócitos e o volume de sangue total. Este parâmetro é determinado automaticamente e é expresso em percentagem (%). Clinicamente, o HCT é útil na avaliação e monitorização de hemorragia aguda, e no auxílio do diagnóstico de anemias. O aumento do HCT pode estar relacionado com policitemia e desidratação, e a diminuição do HCT geralmente está relacionada com anemia ou excesso de hidratação.

### Volume Globular Médio

O VGM é o índice que indica o tamanho e volume dos eritrócitos, e é um parâmetro importante para distinguir anemias microcíticas, normocíticas e macrocíticas.

### Hemoglobina Globular Média

A HGM é o peso médio da hemoglobina de um eritrócito e deve ser diretamente proporcional ao VGM. Este parâmetro costuma estar aumentado quando estamos perante hemólise, e tem tendência a diminuir nos animais com anemias.

## Concentração de Hemoglobina Globular Média

A CHGM indica a concentração média de hemoglobina em cada eritrócito, e permite classificar as anemias em hipocrômicas ou normocrômicas. O seu aumento está associado a hemólise, e a diminuição geralmente está presente em animais com anemia.

## Distribuição do diâmetro dos eritrócitos

O RDW é um índice de anisocitose eritrocitária, fornecendo indicação acerca da variação de tamanho dos glóbulos vermelhos e é expresso em percentagem (%). É particularmente útil no diagnóstico diferencial entre anemias.

## Reticulócitos

Os reticulócitos são células precursoras dos eritrócitos, anucleados e contêm RNA ribossômico (rRNA). Têm esta designação por ser possível visualizar, por microscopia ótica, a malha reticular de rRNA, pela coloração de azul de cresil brilhante (Figura 6.2).

Valores alterados de reticulócitos na corrente sanguínea são um bom indicador da funcionalidade da medula óssea e da eficácia da sua resposta à anemia, permitindo distinguir situações de anemia regenerativa ou não regenerativa. A reticulocitose (elevado número de reticulócitos) está associada a uma anemia de causa periférica ou regenerativa e a reticulocitopenia (baixo número de reticulócitos) está associada a uma anemia de causa medular ou não-regenerativa.<sup>35</sup>

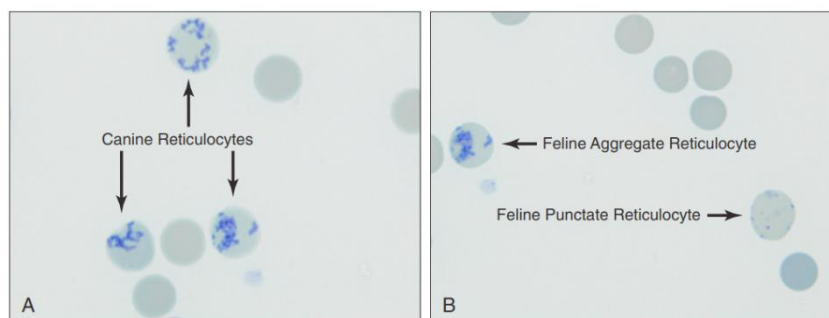


Figura 6.2 A – Reticulócitos em canídeo. B – Reticulócitos em felídeo.  
Fonte: Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

## Leucograma

Os leucócitos são células que estão envolvidas na proteção do organismo contra agentes infecciosos, em doenças neoplásicas, na fagocitose e na produção de anticorpos. O leucograma permite fazer uma avaliação da série leucocitária através da contagem absoluta de leucócitos e de uma contagem diferencial dos mesmos. Através do estudo dos leucócitos podem ser diagnosticadas alterações patológicas e fisiológicas.<sup>35</sup>

## Contagem Total de Leucócitos

A quantificação total de leucócitos base-se na determinação dos 5 tipos de população leucocitária (neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos) e é expressa em número de células por litro de sangue. Cada população de leucócitos apresenta uma função específica, podendo agir de forma independente, mas também podem cooperar com outras células. Por outro lado, quaisquer alterações na quantificação de leucócitos podem surgir por diversas razões.<sup>35</sup>

## Contagem Diferencial de Leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos consiste na determinação de vários parâmetros como, o número de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e células imaturas ou atípicas no sangue. Um aumento ou diminuição na contagem de leucócitos pode ser observada em várias situações, tais como benignas ou malignas. Para se confirmar é preciso fazer avaliação morfológica e contagem diferencial da população celular que se encontra alterada (leucocitose ou leucopenia). Na fórmula leucocitária os resultados são expressos tanto em valores de percentagem (%) assim como em valores absolutos por litro de sangue de cada tipo de população.<sup>35</sup>

## Plaquetograma

As plaquetas são fragmentos celulares do citoplasma dos megacariócitos que constituem uma rede altamente ramificada, cuja função fundamental assenta na formação de um tampão mecânico na manutenção e reparação dos vasos sanguíneos durante a resposta ao mecanismo hemostático para estancar a hemorragia em zonas de lesão.

O plaquetograma baseia-se na contagem total de plaquetas e permite essencialmente fazer uma avaliação quantitativa. O Plaquetograma engloba os seguintes parâmetros: contagem de plaquetas, volume plaquetar médio (VPM) e o índice de distribuição do tamanho das plaquetas (PDW).

A contagem de plaquetas é expressa em número de plaquetas por microlitro de sangue total.

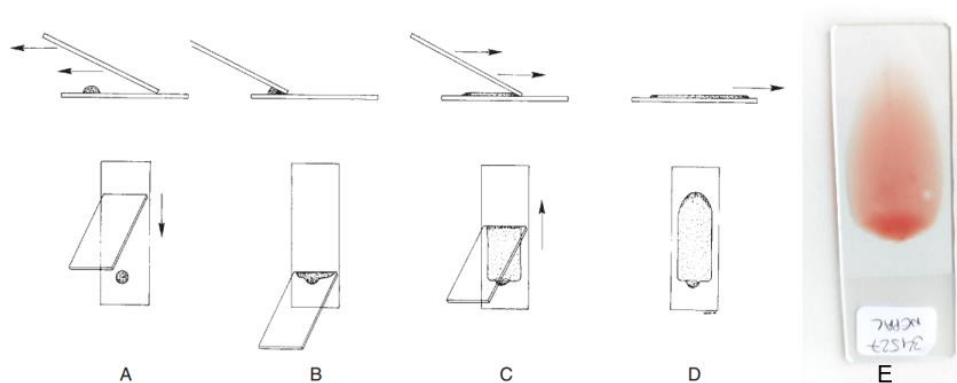
O VPM representa o volume médio de cada plaqueta na amostra. Verifica-se a existência de uma relação proporcionalmente inversa entre o número total de plaquetas e o tamanho. Este parâmetro encontra-se aumentado em condições em que há aumento do consumo ou destruição plaquetar, e diminuído quando há uma falha na produção de plaquetas pela medula óssea.

O PDW representa a heterogeneidade de volumes das plaquetas presentes numa dada amostra, é definido como índice de anisocitose.

## Esfregaço de sangue periférico

Um esfregaço é uma leve camada de matéria orgânica sobre uma lâmina de vidro formando uma fina película, para posterior coloração e observação microscópica. A amostra utilizada para a execução do esfregaço de sangue periférico é o sangue, sendo a lâmina devidamente identificada, é posteriormente corada com a Coloração Diff-Quick.<sup>37</sup> A técnica de realização de um esfregaço de sangue periférico é demonstrada na Figura 6.3.

O esfregaço de sangue periférico é solicitado pelo técnico quando, por exemplo, suspeitam de uma falsa trombocitopenia devido à presença de agregados plaquetários, ou em situações em que se desconfia que a máquina de hemogramas pode ter sobrestimado ou subestimado algumas populações de leucócitos.



*Figura 6.3 Ilustração de como executar um esfregaço de sangue periférico. (A) Uma gota de amostra de fluido é colocada numa lâmina de microscópio de vidro perto de uma extremidade, então uma lamela é deslizada para trás para entrar em contato com a frente da gota. (B) Quando a gota entra em contato com a lamela, a mesma espalha-se rapidamente ao longo da junção entre as duas. (C) e (D) A lamela é então deslizada suave e rapidamente para a frente ao longo da lâmina, produzindo uma mancha com uma cauda. (E) Esfregaço de sangue periférico.*

Para observação microscópica do esfregaço de sangue periférico é essencial proceder à sua observação com uma objetiva de 10x, de modo, a avaliar se as células se encontram distribuídas de igual forma ao longo do esfregaço e posteriormente com uma objetiva de 40x. Observa-se a série vermelha, branca e plaquetas, assim como a contagem de leucócitos e eritroblastos. Na objetiva de imersão de 100x é possível observar com mais pormenor o conteúdo celular.

## Coloração Diff-Quick

A coloração Diff-Quick é a mais utilizada na citologia veterinária. É uma variante da coloração de Romanowsky que possui uma técnica simples, com rapidez de execução, disponibilidade comercial grande e capacidade de coloração permanente. As lâminas apresentam detalhe nuclear médio e excelente detalhe citoplasmático.<sup>38</sup>

A Coloração Diff-Quick é efetuada com metanol, que essencialmente tem como objetivo a fixação do esfregaço, e com eosina e azul de metileno, que têm a capacidade de corar as estruturas celulares. A eosina, como corante ácido, cora os componentes com propriedades basófilas de rosa-alaranjado e o azul metileno, como corante básico, cora as estruturas com propriedades acidófilas de azul-arroxeadado. Num esfregaço de sangue periférico podemos então encontrar os eritrócitos corados de rosa, as plaquetas de azul, os linfócitos e os monócitos com o núcleo azul-violeta e o citoplasma azul, os neutrófilos com o núcleo azul-escuro e o citoplasma rosa-pálido, os eosinófilos com núcleo azul, o citoplasma rosa-pálido e os grânulos volumosos a vermelho, e os basófilos com núcleo azul-escuro e as granulações volumosas de azul-escuro.<sup>38</sup> O protocolo de coloração Diff-Quick está descrito no Anexo 21.

## Alterações na série vermelha

Os eritrócitos normais são células sem núcleo, à exceção dos eritrócitos de aves, répteis e peixes que são nucleados, e caracterizam-se por apresentarem forma de disco bicôncavo. Nos eritrócitos normais de um animal saudável, a cor varia do rosa a vermelho, e é refletida pelo conteúdo de hemoglobina, com uma zona pálida que ocupa 1/3 da área, representando a sua biconcavidade. Na Figura 6.4 podemos ver eritrócitos normais (normocítico e normocrómicos).



Figura 6.4 Visualização microscópica de eritrócitos normocíticos e normocrómicos.  
Fonte: Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

## Alterações no tamanho e cor

Um glóbulo vermelho completamente maduro, que contem hemoglobina normal, o seu tamanho médio aproximado é de 7,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em cães, e de 5,8  $\mu\text{m}$  de diâmetro, em gatos (normocítico). Quando ocorre o aumento da grande variação e distribuição do tamanho dos eritrócitos, estamos perante uma anisocitose (Figura 6.5). Quando se verifica a diminuição do diâmetro dos eritrócitos estamos perante uma microcitose (eritrócitos microcíticos), e quando ocorre o aumento do diâmetro dos eritrócitos é chamada macrocitose (eritrócitos macrocíticos).

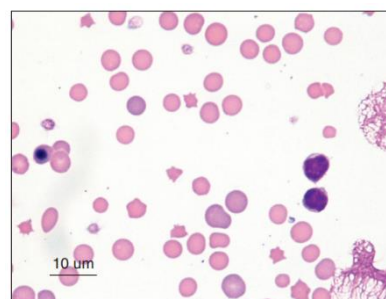


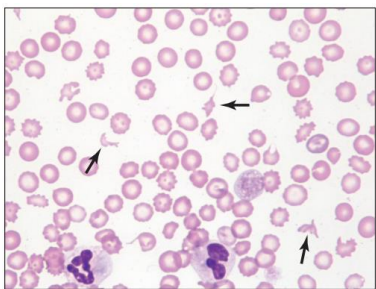
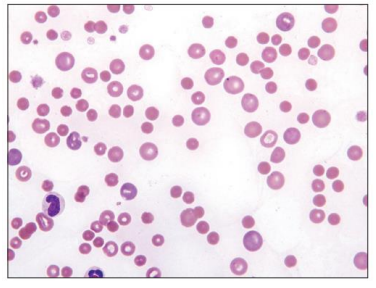
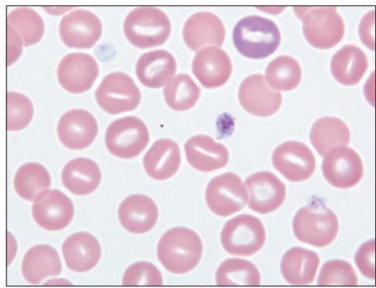
Figura 6.5 Presença de anisocitose. Fonte: Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

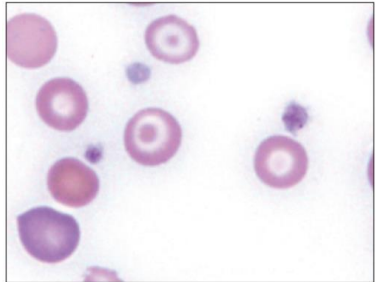
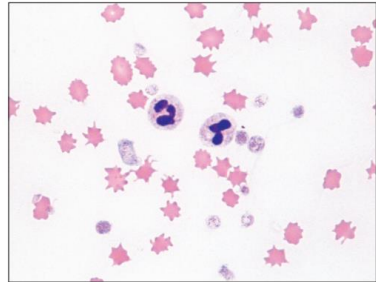
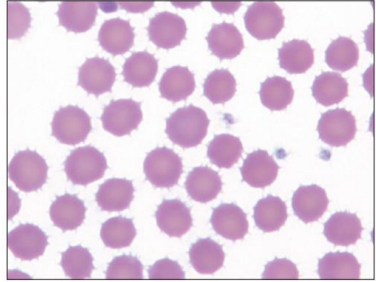
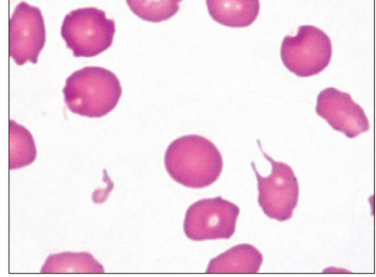
Relativamente à alteração da cor dos eritrócitos, podemos estar perante uma hipocromia, onde ocorre a diminuição do conteúdo de hemoglobina, por isso o aumento da área central do eritrócito, ou então uma hiperchromia, onde se verifica o oposto, aumento do conteúdo de hemoglobina e redução da área central. A policromasia refere-se à presença de diferentes tonalidades na cor dos eritrócitos.

## Alterações na forma

A poiquilocitose é a presença de diferentes formas de eritrócitos. Estas alterações surgem de diversos fatores que podem estar eventualmente associados a patologias, com alteração da membrana do eritrócito (física, química ou biológica), ou ainda podem surgir de alterações na produção e libertação de células anormais a nível da médula óssea.<sup>39</sup> Na Tabela 6.2 estão descritas as diferentes formas presentes nos eritrócitos, bem como o seu significado diagnóstico.

Tabela 6.2 Alterações na forma dos eritrócitos, características e significado diagnóstico.

<b>Eritrócitos</b>	<b>Características</b>	<b>Significado diagnóstico</b>
<p>Esquizócitos</p> 	<p>Os esquizócitos são fragmentos de eritrócitos. São mais pequenos que os eritrócitos normais e muitas vezes irregulares com extremidades pontiagudas.</p>	<p>Anemia hemolítica CID (Coagulação intravascular disseminada) Mielofibrose Vasculite Glomerulonefrite Hemangiossarcoma doença cardíaca Anemia por deficiência de ferro</p>
<p>Esferócitos</p> 	<p>Os esferócitos são pequenos eritrócitos com menos de dois terços do diâmetro dos eritrócitos normais, com coloração intensa e sem palidez central, pelo que não apresentam biconcavidade.</p>	<p>Anemia imunomediada Hemoparasitas Anemia hemolítica de corpos de Heinz Envenenamento (picadas de cobra e picadas de abelha) Toxicidade de zinco Microangiopatia Linfoma Hemangiossarcoma</p>
<p>Estomatócito</p> 	<p>Os estomatócitos são eritrócitos maduros de tamanho e cor normais, mas com uma área oval ou em forma de estoma (boca) de palidez central.</p>	<p>Desidratação dos eritrócitos Estomatocitose hereditária</p>

<p style="text-align: center;">Leptócitos</p> 	<p>Os leptócitos são eritrócitos finos e podem aparecer como células-alvo ou células dobradas.</p>	<p>Anemia por deficiência de ferro Anemia diseritropoiética congênita (CDA) Doença hepática Síndrome nefrótica Consumo cebola Esplenectomia Hipotireoidismo</p>
<p style="text-align: center;">Acantócitos</p> 	<p>Os acantócitos são eritrócitos com múltiplas projeções irregulares espaçadas aleatoriamente.</p>	<p>Distúrbios hepáticos, esplênicos ou renais Hemangioma Hemangiossarcoma Linfoma CID (Coagulação intravascular disseminada)</p>
<p style="text-align: center;">Equinócitos</p> 	<p>Os equinócitos são eritrócitos espiculados com projeções igualmente espaçadas em toda a sua superfície.</p>	<p>Uremia Hipotireoidismo Glomerulonefrite Neoplasia Toxicidade da doxorubicina Envenenamento (picadas de cobra e abelhas)</p>
<p style="text-align: center;">Queratócitos</p> 	<p>Os queratócitos são eritrócitos com vesículas simples ou múltiplas, intactas ou rompidas.</p>	<p>Anemia por deficiência de ferro Hemangiossarcoma Mielodisplasia Toxicidade da doxorubicina CID (Coagulação intravascular disseminada) Doença hepática</p>

### Inclusões eritrocitárias e alterações na distribuição eritrocitária

Os glóbulos vermelhos podem apresentar inclusões devido à presença de microrganismos no seu interior, ou de precursores remanescentes do material nuclear ou de mitocôndrias. Os corpos de Howell Jolly são restos nucleares e sugerem regeneração, e os Corpos de Heinz derivam da metahemoglobina.<sup>39</sup>

Nos achados eritrocitários também é possível observarem-se irregularidades na distribuição dos eritrócitos. Estes podem apresentar-se aglutinados ou empilhados. A Aglutinação (Figura 6.6 B) define-se pela aglomeração dos eritrócitos em grupos irregulares de células como resultado da ponte anticorpos/antigénio na superfície dos eritrócitos. Sugere

anemia imunomediada ou transfusões incompatíveis e não se dispersa quando diluído em NaCl. O Rouleaux (Figura 6.6 A) é a associação espontânea dos eritrócitos em pilhas. É normal nos equinos, e a sua formação é favorecida com o aumento de concentração proteica plasmática (fibrinogênio e imunoglobulinas), o que sugere gammopatia e inflamação. Dispersa-se quando diluído com NaCl.<sup>39</sup>

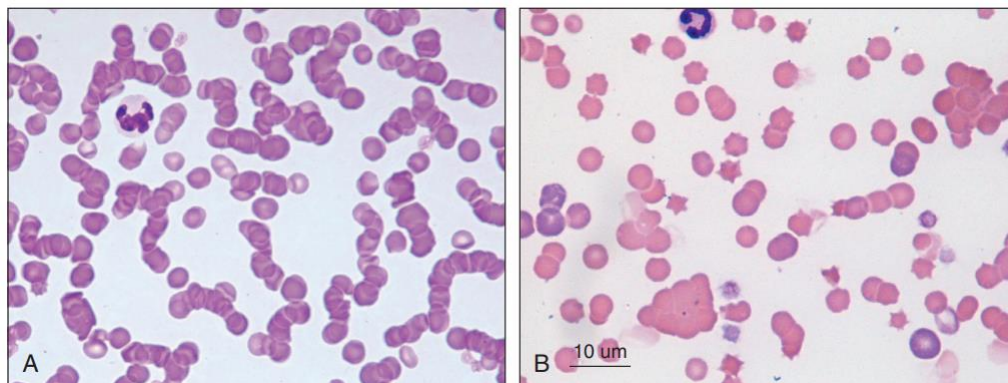


Figura 6.6 A – Presença de Rouleaux em eritrócitos. B – Presença de Aglutinação em eritrócitos.  
Fonte: Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

## Alterações na série branca

Os leucócitos ou glóbulos brancos são células sanguíneas mais complexas e de maior tamanho comparando com os eritrócitos normais do sangue periférico. Existem cinco populações diferentes: neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos.<sup>39</sup>

A leucocitose (Figura 6.7 A) é definida como a presença do aumento do número de leucócitos, que pode ser causada por um aumento no número de um tipo de célula ou uma combinação de tipos de células. O significado de uma leucocitose é baseado no grau de elevação, nos tipos celulares que constituem o aumento e na morfologia celular (normal, displásica, tóxica, neoplásica). O aumento do número de neutrófilos secundário à inflamação é a causa mais comum de leucocitose.<sup>39</sup>

A leucopenia (Figura 6.7 B) é definida como uma diminuição no número de leucócitos, que é mais frequentemente causada por uma diminuição no número de neutrófilos (neutropenia), pois os neutrófilos são os mais numerosos dos leucócitos do sangue periférico.<sup>39</sup>

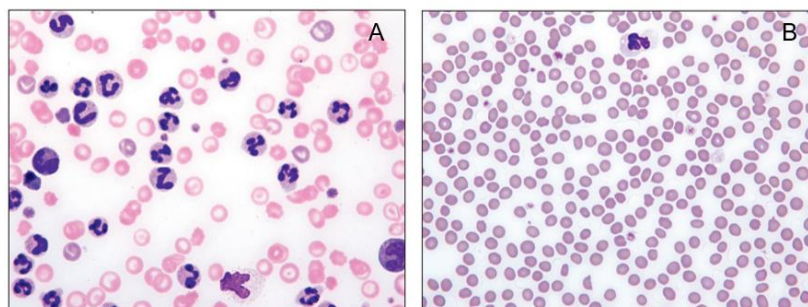
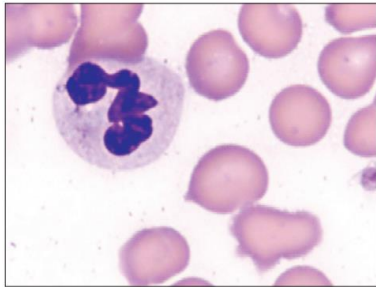
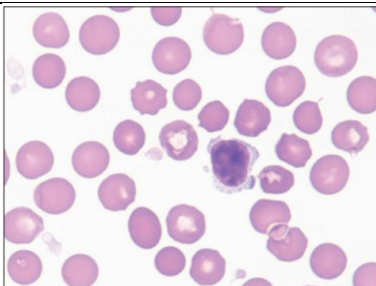
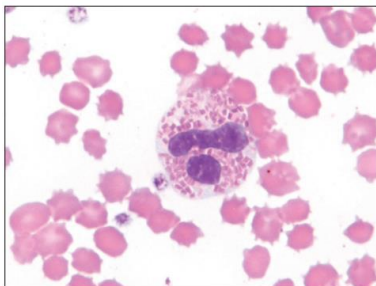
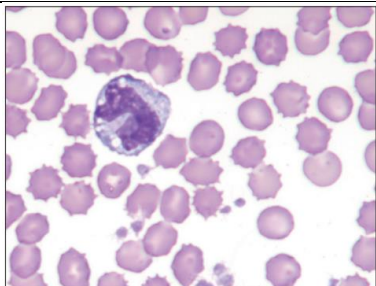
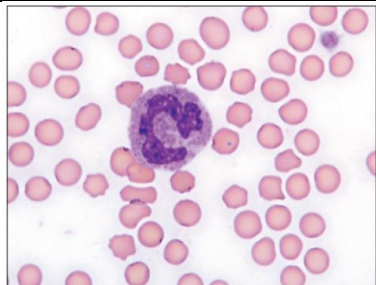


Figura 6.7 A – Visualização de um esfregaço que apresenta leucocitose. B – Visualização de um esfregaço que apresenta leucopenia. Fonte: Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*.

Na Tabela 6.3 estão descritas as principais alterações nos diferentes tipos de leucócitos, bem como as principais causas.

Tabela 6.3 Alterações na fórmula leucocitária e principais causas.

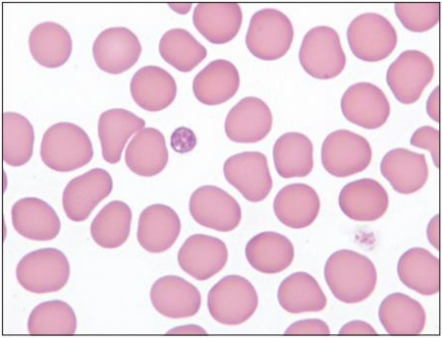
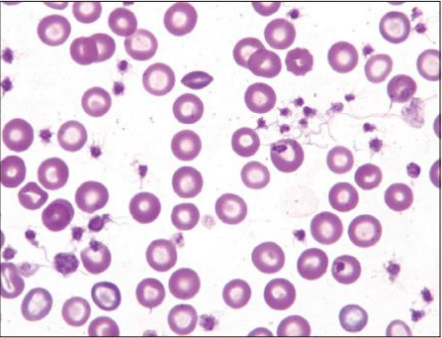
Imagem <sup>1</sup>	Alteração	Causas
	Neutrofilia (aumento dos neutrófilos)	Inflamação Infeção bacteriana e/ou viral Leucemia granulocítica crónica Destruição tecidual Excitação (libertação de epinefrina) Stress (libertação de glicocorticóides) Administração de esteróides
	Neutropenia (diminuição dos neutrófilos)	Infeção bacteriana avassaladora Parvovírus Panleucopenia Agentes quimioterápicos Necrose da medula óssea Supressão ou falha da medula óssea
	Linfocitose (aumento dos linfócitos)	Infeção viral Leucemia linfocítica crónica Estimulação imunológica crónica Excitação (libertação de epinefrina)
	Linfopenia (diminuição dos linfócitos)	Terapias imunossupressoras Hiperadrenocorticism Stress (libertação de glicocorticóides)
	Eosinofilia (aumento dos eosinófilos)	Processos alérgicos Infeções parasitárias Leucemia eosinofílica (rara)
	Monocitose (aumento dos monócitos)	Infeção viral Leucemia mielomonocítica Excesso de glicocorticóides endógenos ou exógenos (cão) Anemia hemolítica autoimune Após quimioterapia
	Basofilia (aumento dos basófilos)	Processos alérgicos Leucemia basofílica (extremamente rara)

<sup>1</sup>As imagens representam células normais.

## Alterações nas plaquetas

As plaquetas são fragmentos muito pequenos e redondos, e num esfregaço são observadas em relação à quantidade e ao tamanho. Os valores de referência que estão estabelecidos estão descritos na tabela no Anexo 20. É de extrema importância a avaliação das plaquetas num esfregaço de sangue periférico e deve ter-se em atenção o seu número, tamanho e morfologia e a possível presença de fenómenos como agregação plaquetária. Na Tabela 6.4 estão descritas algumas causas associadas a situações de trombocitopenia e trombocitose. Ao visualizar um esfregaço é importante perceber se existem agregados plaquetários, uma vez que isso diminuirá falsamente a estimativa de plaquetas, levando a um diagnóstico errado de trombocitopenia.

*Tabela 6.4 Alterações associadas ao aumento e diminuição do número de plaquetas e possíveis causas.*

Alteração	Causas
<p data-bbox="384 824 603 857">Trombocitopenia</p> 	<p data-bbox="810 824 1385 1171">As doenças que resultam na função plaquetária alterada podem ser tanto hereditárias (trombopatia de Basset Hound, síndrome de Chédiak-Higashi, hematopoiese cíclica em Grey Collies, trombostenia de Glanzmann dos Grandes Pirineus e Otterhounds) quanto adquiridas (drogas, toxinas, infeções, neoplasias, hiperglobulinemia).</p>
<p data-bbox="403 1216 584 1249">Trombocitose</p> 	<p data-bbox="810 1216 1385 1673">A trombocitose fisiológica (aumento da produção de plaquetas) é a causa mais comum de trombocitose, ocorrendo secundária a um processo reativo (ou seja, inflamação, anemia por deficiência de ferro em cães, anemia por perda crónica de sangue). Se a contagem de plaquetas for persistentemente superior a 1.000.000 plaquetas/<math>\mu</math>L, deve considerar-se trombocitemia essencial e leucemia megacariocítica aguda, ambas neoplasias hemicas muito raras em cães e gatos.</p>

## Hemostase

Um hemograma é feito rotineiramente para estabelecer um banco de dados para avaliação do paciente, enquanto outros exames de hematologia podem ser feitos na tentativa de avaliar um problema específico. Exemplos de testes hematológicos mais específicos que enfocam um problema identificado durante a avaliação diagnóstica de um animal incluem por exemplo testes de coagulação.<sup>35</sup>

A hemostase é o resultado de um conjunto de processos bem regulados que tem como funções principais manter o sangue fluido e livre de coágulos e ativação de um tampão hemostático rápido e localizado. É necessário o funcionamento de três fatores: integridade dos vasos, presença de plaquetas e mecanismo de coagulação de sangue.<sup>35</sup>

Existem dois tipos de hemostasia, a hemostasia primária: após a lesão ocorrer no vaso sanguíneo, causando dano às células endoteliais, as plaquetas formam imediatamente um tampão plaquetário no local da lesão; e a hemostasia secundária: acontece quando os fatores de coagulação respondem (cascata de coagulação) para formar fibrina, fortalecendo assim o tampão plaquetário.<sup>35</sup>

As análises de hemóstase realizadas no laboratório são: determinação do tempo de protrombina (PT), determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT), determinação do tempo de trombina (TT), determinação do fibrinogénio e determinação dos D-Dímeros.

### Determinação do Tempo de Protrombina

O PT visa avaliar a via extrínseca da coagulação e monitorizar a terapêutica com anticoagulante oral. A via extrínseca da cascata de coagulação é avaliada através da medição do tempo que leva à formação do coágulo aquando da adição do reagente de tromboplastina (FT) e cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) ao plasma. Esta determinação é útil para identificar deficiências ou inibidores dos fatores VII, X, V, II e da concentração de fibrinogénio presente no plasma.

### Determinação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

O aPTT monitoriza os doentes que estão sob terapêutica e avalia a via intrínseca da coagulação. A determinação do aPTT é realizada através da medição do tempo de coagulação do plasma após a ativação dos fatores de contato, adição de fosfolípidos e cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), mas sem adição de tromboplastina tecidual e, portanto, indica a eficiência geral da via intrínseca e comum.

### Determinação do Tempo de Trombina

O TT visa a medição do tempo que leva à formação do coágulo aquando da adição da trombina ao plasma, sendo este resultado afetado pela concentração e função do fibrinogénio e pela presença de substâncias inibidoras.

### Determinação do Fibrinogénio

O fibrinogénio é uma glicoproteína sintetizada a nível hepático. O fibrinogénio é quantificado pelo método de Clauss, que consiste numa diluição inicial do plasma onde irá ser

adicionado uma solução saturada em trombina, de modo que a formação de fibrina dependa exclusivamente da concentração de fibrinogênio plasmático, evitando alterações do tempo de coagulação do plasma.

## Determinação dos D-Dímeros

Os D-Dímeros são o produto resultante da degradação do coágulo de fibrina pela plasmina. A sua determinação visa auxiliar o diagnóstico de coagulação intravascular disseminada (CID), trombose venosa profunda (TVP) e tromboembolismo pulmonar (TPE), sendo que nestas patologias o valor encontra-se aumentado.

## Caso de estudo I

Foi recebida uma amostra de sangue em tubo EDTA para a realização de um hemograma. Tratava-se de um felídeo do sexo feminino, de raça europeu comum, com 12 anos de idade, e sem dados clínicos mencionados.

Foi então realizado o hemograma completo, e os resultados estão descritos na Figura 6.9. Relativamente ao eritrograma, os valores apresentavam-se todos dentro dos valores de referência. No que toca ao leucograma, os leucócitos apresentavam-se dentro dos valores de referência ( $12,6 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), contudo havia algumas alterações relativamente aos valores da fórmula leucocitária. Foi verificada a existência de linfopenia e eosinofilia, uma vez que os valores de linfócitos se encontravam abaixo do valor de referência ( $1,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e os valores dos eosinófilos se encontravam acima do valor de referência ( $5,0 \times 10^3/\text{mm}^3$ ), respetivamente. Foi também mencionada a existência de trombocitopenia, ou seja, a contagem de plaquetas encontrava-se abaixo do valor de referência ( $90 \times 10^3/\text{mm}^3$ ).

Perante esta situação, e de forma a confirmar a fórmula leucocitária e a veracidade da trombocitopenia, realizou-se um esfregaço de sangue periférico, de modo a confirmar as contagens.

Após visualização do esfregaço sanguíneo (Figura 6.8), a fórmula leucocitária foi confirmada, confirmando assim a existência de linfopenia e de eosinofilia. Também foi possível confirmar a trombocitopenia.

Uma vez que não havia indicação de nenhum tratamento em curso, nem nenhuma patologia diagnosticada, a linfopenia poderia estar associada à libertação de glicocorticoides

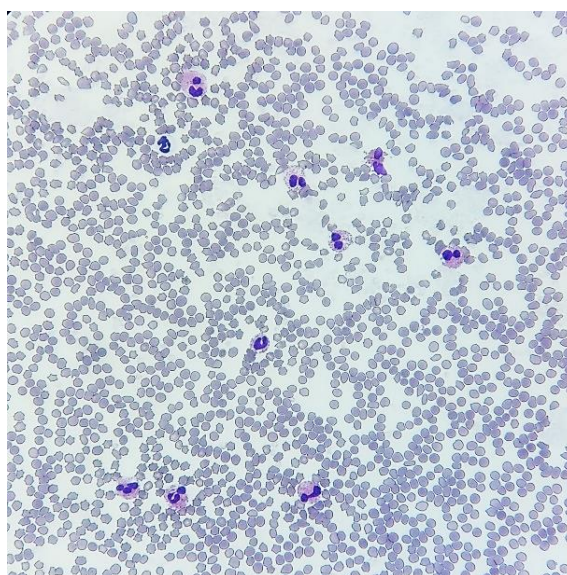


Figura 6.8 Visualização do esfregaço sanguíneo, com confirmação de eosinofilia.

devido a alguma situação de stress que o animal tenha sido colocado. A eosinofilia e a trombocitopenia poderiam estar associadas a algum processo infeccioso.

A pedido do clínico responsável, foi realizado a pesquisa de anticorpos para a *Haemobartonella*, um hemoparasita comum em gatos, que invade os eritrócitos e causa a sua destruição. O resultado da imunologia foi positivo para a presença de anticorpos anti-*Haemobartonella*.

Posto isto seria de esperar que o animal apresentasse também uma anemia, uma vez que esta bactéria causa a destruição dos eritrócitos, contudo o diagnóstico de uma infeção por hemoparasitas vai de encontro com a eosinofilia presente no hemograma, uma vez que esta é uma das causas mais frequentes de eosinofilia em gatos.

Análise	Resultado	Un.	Ref.	Histórico
<b>HEMATOLOGIA</b>				
<b>HEMOGRAMA</b>				
Eritrócitos	9,22	x10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup>	5,0 - 11,0	
Hemoglobina	12,7	g/dL	8,0 - 15,0	
Hematócrito	40,7	%	24,0 - 45,0	
V.G.M.	44,1	um <sup>3</sup>	39,0 - 52,0	
H.G.M.	13,8	pg	12,5 - 17,5	
C.H.G.M.	31,2	g/dL	30,0 - 37,0	
R.D.W.	17,1	%	17,0 - 23,0	
LEUCÓCITOS	12,6	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	5,5 - 19,5	
<b>Fórmula Leucocitária</b>				
Linfócitos	7,6 % 1,0 L	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	20,0-55,0	1,50- 7,00
Monócitos	0,9 % 0,1	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,0-14,0	0,00- 1,40
Neutrófilos	51,5 % 6,5	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	35,0-78,0	2,50-12,80
Eosinófilos	40,0 % 5,0 H	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	2,0-12,0	0,00- 1,50
Basófilos	0,0 % 0,0	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	0,0- 2,0	0,00- 0,50
<b>PLAQUETAS</b>				
MPV	90 L	x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	150 - 500	
MPV	19,9	µm <sup>3</sup>	5,0 - 20,0	
PCT	0,2	%	0,200 - 0,500	
PDW	55,3	%	46,3 - 80,0	
Linfopenia, Eosinofilia, Trombocitopenia.				
<b>Confirmação Manual</b>		Fórmula leucocitária confirmada através da observação microscópica do esfregaço sanguíneo. Confirma-se a trombocitopenia detetada pelo contador celular automático.		
<b>IMUNOLOGIA</b>				
<b>ANTICORPOS ANTI-HAEMOBARTONELLA</b>		Positivo	Critério de valorização >1/20	
Imunofluorescência Indireta (IFI)				
Titulação 1/20		Positivo		
Titulação 1/100		Positivo		

Figura 6.9 Boletim de análises de hematologia e imunologia.

### Introdução

Como já mencionado no capítulo 4, a análise de urina tipo II é um exame diagnóstico de grande importância, uma vez que pela avaliação das características físicas, composição química e sedimento urinário, consegue-se muitas informações clínicas importantes, não apenas sobre a função renal, mas também sobre o estado geral de saúde ou condição fisiológica de um animal.

Em particular, a composição química da urina varia amplamente tanto na saúde, quanto na doença e, é afetada por diversos fatores. Quando examinados adequadamente, os testes químicos na urina fornecem informações importantes sobre o mecanismo de vários distúrbios clínicos que, são detetados pela primeira vez por anomalias nos valores químicos urinários. Estes testes não devem ser interpretados isoladamente, e requerem conhecimento de informações clínicas importantes, como medicação, exame físico e serologia. Contudo, quando usados adequadamente e com conhecimento das suas limitações, a química da urina pode fornecer informações importantes sobre a fisiopatologia e o tratamento de uma ampla variedade de distúrbios e condições clínicas.<sup>40</sup>

A análise química à urina é realizada usando tiras de teste reativas, ou seja, após a tira entrar em contacto com a urina, ocorre a alteração da cor basal do parâmetro, o que corresponde à presença da substância a detetar. As alterações na cor são interpretadas consoante uma escala colorimétrica predefinida por cada casa comercial. As técnicas colorimétricas podem ser avaliadas diretamente pelo técnico ou através de aparelhos de leitura automática. Contudo, a avaliação direta por parte do técnico requer, para além da gestão de tempo, uma apreciação individual e comparativa de cada parâmetro da tira, o que aumenta a carga de trabalho realizado pelo próprio técnico. A automatização através de aparelhos de leitura melhora a eficiência do trabalho, uma vez que o dispositivo avalia automaticamente e de forma independente os resultados da medição.

### Objetivos

No decorrer do estágio foi realizado um projeto que consistiu na validação de resultados de um equipamento recém-adquirido para a análise da composição química da urina.

O objetivo passou por comparar os resultados da máquina utilizada pelo laboratório, com os resultados da nova máquina, de forma a validar os resultados da máquina recém-adquirida.

A comparação dos resultados entre as duas máquinas tinha como objetivo primário a validação do novo aparelho, mas secundariamente seria pertinente perceber se o novo aparelho apresentava resultados mais fiáveis em determinados parâmetros.

## Materiais e métodos

O aparelho utilizado, até ao momento, pelo laboratório, para a emissão de resultados relativos à composição química da urina era o *CLINITEK Advantus® urine chemistry analyzer* da *Siemens Healthineers*, com um processamento médio de 7 segundos por amostra, sendo capaz de processar até 500 testes por hora. A tira de teste utilizada foi a *Multistix® 10 SG* da *Siemens Healthineers* (Figura 4.1) que é composta por 10 parâmetros de análise, permitindo a deteção qualitativa e semiquantitativa dos parâmetros (Anexo 14).

O aparelho recém-adquirido era o *Aution IDaten AE-4070 semi-automatic urine analyzer* da *Arkray*, que possui um processamento médio de 7 segundos por amostra, sendo capaz de processar até 514 testes por hora. A tira de teste utilizada foi a *AUTION Sticks 10EA* da *Arkray* (Figura 7.1) que é composta também por 10 parâmetros de análise, permitindo, também, a deteção qualitativa e semiquantitativa dos parâmetros (Anexo 22).

Ambas as tiras de teste permitem detetar 10 parâmetros, contudo, uma vez que apenas 7 parâmetros são utilizados na emissão de resultados, no estudo foram somente comparados valores de: glucose, bilirrubina, corpos cetónicos, pH, proteínas, urobilinogénio e nitritos.

Foram usadas 137 amostras de urina, durante um período de 5 dias, sendo realizadas as tiras urinárias para ambos os aparelhos. Todas as amostras de urina apresentavam cor amarela, de forma a minimizar o impacto da cor alterada na medição colorimétrica dos parâmetros, uma vez que o aparelho *Arkray* permite realizar um ajuste aos valores obtidos nestes casos, e o aparelho *Siemens* não.



Figura 7.1 Tira reagente AUTION Sticks 10EA da Arkray.

Legenda: LEU – Leucócitos; NIT – Nitritos; KET – Corpos cetónicos; BLO – Eritrócitos; SG – Densidade urinária; pH – pH; URO – Urobilinogénio; BIL – Bilirrubina; PRO – Proteínas; GLU – Glucose.

Foi usado ainda o aparelho de bioquímica *DxC 700 AU chemistry analyzer* da *Beckman Coulter*, para realizar a medição quantitativa da concentração alguns parâmetros, como as proteínas e a glucose, na urina, de modo a comparar esses resultados com os valores obtidas através das tiras reagente, uma vez que este aparelho tem maior sensibilidade para deteção destes parâmetros.

Todos os resultados obtidos, através dos três aparelhos, foram inseridos numa tabela em Excel e, posteriormente, foi realizada uma análise descritiva para comparação dos mesmos.

Para a comparação dos resultados, entre os dois aparelhos, nos parâmetros da bilirrubina, corpos cetónicos, urobilinogénio e nitritos, foi usada uma escala qualitativa de valores (Tabela 10.7). Relativamente ao parâmetro de pH, foram utilizados os valores efetivos do valor de pH para comparação dos resultados entre os dois aparelhos, e posteriormente, estes foram convertidos para uma escala de classificação (Figura 10.1). Por último, para a comparação

dos resultados para os parâmetros das proteínas e da glucose, numa primeira etapa foram utilizados os resultados da escala qualitativa, e posteriormente para realizar a comparação dos mesmos, com os resultados quantitativos obtidos pelo aparelho de bioquímica, foram então usados os resultados semiquantitativos (Tabela 10.8).

## Resultados

Num universo de 137 amostras, 57% correspondem a canídeos (78 amostras), 42% a felídeos (58 amostras) e 1% a equídeos (1 amostra) (Figura 7.2).

No que toca à análise dos resultados obtidos em cada parâmetro, na maioria dos parâmetros, pelo menos 83% dos resultados obtidos foram concordantes entre as duas máquinas (Figura 7.3).

Caracterização das amostras por espécie (%)

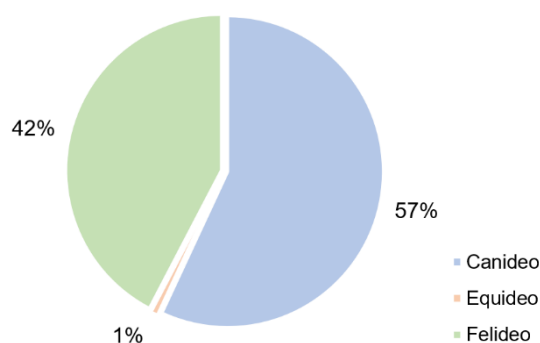


Figura 7.2 Caracterização da população de 137 amostras por espécie, em percentagem.

Caracterização dos resultados por parâmetro (%)

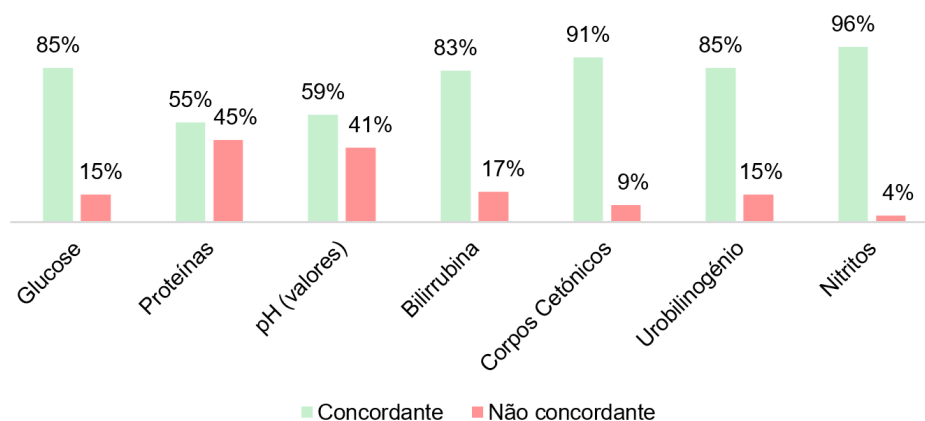


Figura 7.3 Caracterização dos resultados, concordantes e não concordantes, entre as duas máquinas, tendo em conta cada parâmetro, em percentagem.

Na bilirrubina, 83% dos resultados obtidos no aparelho *Arkray* foram de encontro com os resultados obtidos no aparelho *Siemens*, na glucose e no urobilinogénio, 85% dos resultados foram concordantes entre os dois aparelhos, 91% dos resultados obtidos para os corpos cetónicos foram concordantes e por fim, 96% dos resultados relativos aos nitritos foram

conformes entre o aparelho *Arkray* e o aparelho *Siemens*, sendo o parâmetro com mais percentagem de harmonização de resultados (Figura 7.3).

Relativamente aos resultados obtidos para os valores de pH, apenas 59% das amostras obtiveram resultados concordantes entre os dois aparelhos. Neste caso, a percentagem diz respeito à comparação de valores de pH efetivos (ex. 5, 6, 7, 8, 9), se estes valores forem convertidos em classificação – ácido, neutro e alcalino – a percentagem de resultados concordantes entre os dois aparelhos sobe para 82% (Figura 7.4).

Os resultados do parâmetro das proteínas foram os que demonstraram maior percentagem de resultados não concordantes (45%) e menor percentagem de resultados concordantes (55%) entre os dois aparelhos.

De forma a analisar melhor esta divergência de resultados entre as duas máquinas neste parâmetro, foi realizada a medição quantitativa da concentração de proteínas, nos 45% de amostras não concordantes, através do aparelho de bioquímica.

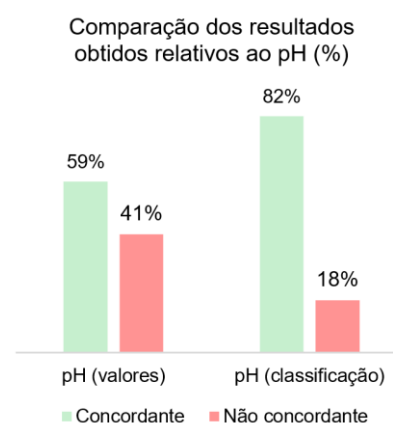
Num total de 62 amostras com resultados não concordantes (45%), obtidos entre os aparelhos da *Arkray* e da *Siemens*, para o parâmetro das proteínas, 84% das amostras analisadas no aparelho de bioquímica obtiveram

resultados mais aproximados do resultado obtido pelo aparelho *Arkray*. Por exemplo, uma amostra cujo resultado foi o seguinte: 100 mg/dL de proteínas no aparelho *Siemens*, 50 mg/dL no aparelho *Arkray*, e 48,2 mg/dL no aparelho de bioquímica, isto demonstra que o aparelho *Arkray* possui uma maior sensibilidade de deteção de proteínas, uma vez que o seu valor está mais aproximado do valor quantitativo obtido através da bioquímica.

Apesar de possuir uma percentagem de não concordantes muito inferior, mas visto se tratar de um parâmetro de extrema importância, testou-se também, no aparelho de bioquímica, os resultados não concordantes para o parâmetro da glucose (15%). Das 21 amostras não concordantes entre os dois aparelhos (15%), à semelhança do que acontece com as proteínas, o aparelho *Arkray* é mais sensível. Todas as 21 amostras (100%) têm resultados quantitativos mais aproximados dos resultados obtidos pelo aparelho *Arkray*.

## Discussão e conclusão

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que, em geral, o aparelho da *Arkray* apresenta uma concordância satisfatória na maioria dos parâmetros avaliados, sendo possível a validação do equipamento para emissão de resultados relativos à composição química da urina.



*Figura 7.4 Comparação dos resultados concordantes e não concordantes obtidos, através de duas classificações diferentes, relativamente ao parâmetro pH, em percentagem.*

Quando se analisam os parâmetros individualmente, a análise da bilirrubina, glucose, urobilinogénio, corpos cetónicos e nitritos apresentou uma alta taxa de concordância entre os aparelhos, variando de 83% a 96%. Isso indica que os resultados obtidos para esses parâmetros são consistentes entre os dois equipamentos.

Por outro lado, o parâmetro do pH apresentou uma taxa de concordância menor, com apenas 59% das amostras obtendo resultados concordantes entre os dois aparelhos. No entanto, quando se considera a classificação geral em ácido, neutro e alcalino, a taxa de concordância aumenta para 82%. Isso sugere que as diferenças observadas nos resultados de pH entre os aparelhos podem ser atribuídas à forma como os valores são interpretados e classificados, em vez de uma discrepância real nas medições das amostras e consequência efetiva nos resultados clínicos.

As proteínas urinárias são um parâmetro de grande relevância clínica, uma vez que a proteinúria é a primeira e única anormalidade observável em animais com doença renal precoce, sendo importante para a despistagem atempada de doenças renais. O estudo demonstrou que o parâmetro das proteínas foi o que apresentou a maior divergência entre os dois aparelhos, com 45% das amostras mostrando resultados não concordantes. No entanto, a medição quantitativa das concentrações de proteínas através do aparelho de bioquímica revelou que 84% das amostras não concordantes obtiveram resultados mais próximos dos obtidos pelo aparelho *Arkray*. Isso indica que o aparelho *Arkray* possui uma maior sensibilidade na deteção de proteínas em comparação com o aparelho *Siemens*.

Relativamente à glicosúria, a mesma é sempre patológica, por isso a sua deteção através da tira de urina, torna-se de extrema importância, uma vez que permite a despistagem de hiperglicemias persistentes, como acontece na *diabetes mellitus*, ou noutras disfunções renais relacionadas com a absorção de glucose. Posto isto, é imperativo afinar a sensibilidades dos aparelhos automáticos de leitura de tiras urinárias. Neste estudo, apesar de apenas 15% dos resultados serem não concordantes entre os dois aparelhos, foi possível reforçar que o aparelho *Arkray* é mais sensível na deteção de valores de glucose de urina, do que o aparelho *Siemens*, uma vez que os seus resultados estão mais próximos dos resultados obtidos pelo aparelho de bioquímica.

Com base nos resultados obtidos, pode concluir-se que o aparelho da *Arkray* demonstra uma concordância geral satisfatória na maioria dos parâmetros avaliados. Isso indica que, tal como o aparelho da *Siemens*, já previamente validado, este é adequado para a análise laboratorial dos parâmetros em questão.



## 8. Referências bibliográficas

1. Junqueiro LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 11ª Edição. Guanabara Koogan S.A., editor. 2008. 1–524 p.
2. Lopes C, Malhão F, Rocha E. *Curso de Técnicas Histológicas: Projeto Aprender a Conhecer o Ambiente Marinho de Portugal – BioMar PT*. 2016. 1–57 p.
3. Caputo L, Gitirana L, Manso P. *Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde: Capítulo 3 - Técnicas histológicas*. Fiocruz, editor. Vol. Volume 2. 2010.
4. Santos K, Junior F, Antonio E, Silva F, Silva K, Marinho K, et al. *Manual de Técnica Histológica de Rotina e de Colorações*. Universidade Federal de Pernambuco. 2021. p. 1–32.
5. Nunes C, Cinsa L. Princípios do processamento histológico de rotina. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*. 2016;Vol. 8:31–40.
6. Burkitt PR, Young B, Heath JW. *Wheater Histologia Funcional*. 3ª Edição. Guanabara Koogan S.A., editor. 1994. 1–409 p.
7. Polak J, Van Noorden S. *Introduction to Immunocytochemistry*. 3ª Edição. Oxford: Bios Scientific Publishers, editor. 2003. 1–176 p.
8. Carson F, Hladik C. *Histotechnology: A Self-Instructional Text*. American Society for Clinical Pathology, editor. Vol. 3ª Edição. Chicago; 2009. 1–400 p.
9. Orchard G, Nation B. *Histopathology*. Oxford University Press, editor. New York; 2012. 1–396 p.
10. Ferro A. *Imunohistoquímica*. Amadeu Borges Ferro. 2014. p. 1–146.
11. Dabbs D. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications*. 5ª Edição. Elsevier Health Sciences; 2019. 1–932 p.
12. Lopes C, Malhão F, Rocha E. *Curso de Técnicas Histológicas*. Porto; 2016. p. 1–58.
13. Garcia C. *Avaliação da técnica imunohistoquímica como método de deteção da apoptose a nível celular*. Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária de Viseu.; 2013.
14. Gross T, Ihrke P, Walder E, Affolter V. *Skin diseases of the dog and cat*. 2ª Edição. Blackwell Science, editor. 2005. 1–932 p.
15. Webster J, Yuzbasiyan-Gurkan V, Miller R, Kaneene J, Kiupel M. Cellular proliferation in canine cutaneous mast cell tumors: associations with c-KIT and its role in prognostication. *Vet Pathol*. 2007;44:298–308.
16. Maglennon GA, Murphy S, Adams V, Miller J, Smith K, Blunden A, et al. Association of Ki67 index with prognosis for intermediate-grade canine cutaneous mast cell tumours\*. *Vet Comp Oncol*. 2008;268–74.

17. Vascellari M, Giantin M, Capello K, Carminato A, Morello E, Vercelli A, et al. Expression of Ki67, BCL-2, and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumors: association with grading and prognosis. *Vet Pathol.* 2013;50:110–21.
18. Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. *Atlas of canine and feline urinalysis.* 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.
19. Piech TL, Wycislo KL. Importance of Urinalysis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2018 Mar 1;49:233–45.
20. Callens AJ, Bartges JW. Urinalysis. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice.* 2015 Jul 1;45:621–37.
21. Yadav SN, Ahmed N, Nath AJ, Mahanta D, Kalita MK. Urinalysis in dog and cat: A review. *Vet World.* 2020 Oct 1;13(10):2133–41.
22. Parrah JD, Moulvi BA, Gazi MohsinA, Makhdoomi DM, Athar H, Din MehrajU, et al. Importance of urinalysis in veterinary practice – A review. *Vet World.* 2013 Jul 4;640–6.
23. Sink CA, Weinstein NM. *Practical Veterinary Urinalysis.* 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2012. 169 p.
24. Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, Lekcharoensuk C, Ulrich LK, Carpenter KA. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 2003 Jan 1;222(2):176–9.
25. eClinPath: Cornell University College of Veterinary Medicine. Urinalysis: Cellular Constituents [Internet]. 2013-2020 [cited 2023 May 5] Available from: <https://www.eclinpath.com/urinalysis/cellular-constituents/>
26. Alford A, Furrow E, Borofsky M, Lulich J. Animal models of naturally occurring stone disease. *Nat Rev Urol.* 2020 Dec 6;17(12):691–705.
27. McVey S, Kennedy M, Chengappa M, Wilkes R. *Veterinary Microbiology.* 4ª Edição. Wiley Blackwell, editor. 2022. 1–856 p.
28. Quinn P, Markey B, Leonard F, FitzPatrick E, Fanning S. *Concise Review of Veterinary Microbiology.* 2ª Edição. Wiley Blackwell, editor. 2016. 1–197 p.
29. Tille P. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* 13ª Edição. Elsevier Mosby, editor. 2014. 1–1038 p.
30. Fonseca A, Sebastião C, Martins F, Ribeiro M, Calheiros I, Lito L, et al. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em bacteriologia. Instituto Nacional de Saúde - Dr. Ricardo Jorge; 2004. p. 1–192.
31. Sanders C, Peyret M, Moland ES, Cavalieri S, Shubert C, Thomson K, et al. Potential Impact of the VITEK 2 System and the Advanced Expert System on the Clinical Laboratory of a University-Based Hospital. *J Clin Microbiol.* 2001;39(7):2379–85.
32. Markey B, Leonard F, Archambault M, Cullinane A, MAguire D. *Clinical Veterinary Microbiology.* 2ª Edição. Elsevier Mosby, editor. 2013. 1–901 p.

33. Zajac A, Hahn N, Greiner E, Smith S. *Parasitologia Clínica Veterinária*. 6ª Edição. Editora Manole, editor. 1999.
34. Vajpayee N, Graham S, Sylva B. Basic Examination of Blood and Bone Marrow. In: Elsevier Inc., editor. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 23ª Edição. 2016. p. 509–35.
35. Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. Elsevier, Inc.; 2012. 360 p.
36. Brooks M, Harr K, Sellig D, Wardrop J, Weiss D. *Schalm's Veterinary Hematology*. 17ª Edição. John Wiley & Sons, editor. 2022.
37. Valenciano AC, Cowell RL. *Cowell And Tyler's Diagnostic Cytology And Hematology Of The Dog And Cat*. 5th Edition. Elsevier Inc.; 2020. 556 p.
38. Peleteiro M da C, Marcos R, Santos M, Correia J, Pissarra H, Carvalho T. *Atlas de Citologia Veterinária*. Vol. LIDEL. 2011. 1–324 p.
39. Valenciano AC, Cowell RL, Rizzi TE, Tyler RD. *Atlas of canine and feline peripheral blood smears*. 1st Edition. Elsevier Inc.; 2014. 281 p.
40. Palmer BF, Clegg DJ. The Use of Selected Urine Chemistries in the Diagnosis of Kidney Disorders. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2019;14(2):306–16.
41. Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and Financial Benefits of Rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J Clin Microbiol*. 1999;37(5):1415–8.



## 9. Anexos



### Protocolo Processamento Histológico Programa 1

Rotina

Passo	Reagente	Duração	Agitação
1	Formalina	1 h	1
2	Etanol 70º	20 min	1
3	Etanol 96º	30 min	1
4	Etanol 96º	40 min	1
5	Etanol Absoluto	1 h	1
6	Etanol Absoluto	1 h 15 min	1
7	Etanol Absoluto	2 h 20 min	1
8	Substituto Xilol	30 min	0
9	Substituto Xilol	1 h	0
10	Substituto Xilol	2 h 30 min	0
11	Parafina	1 h 20 min	2
12	Parafina	2 h 10 min	2
Total: +- 15 h			

*Anexo 1 Protocolo de processamento histológico no programa de rotina.*



### Protocolo Coloração Hematoxilina-Eosina

Coloração de Rotina

1. Xilol – 10 min
2. Álcool 100%
3. Álcool 96%
4. Álcool 70%
5. Água
6. Hematoxilina – 10 min
7. Água
8. Álcool clorídrico 1% - 10 segundos
9. Água corrente – 3 min
10. Álcool 70%
11. Eosina – 30 segundos
12. Álcool 96%
13. Álcool 100%
14. Álcool 100%
15. Xilol – 1 min

*Anexo 2 Protocolo da coloração de rotina de hematoxilina-eosina.*

Histoquímicas – Polissacarídeos, Mucinas e Glicogénio

**PAS – Periodic Acid Schiff**

**Biopsias hepáticas**

Protocolo:

1. Cortes 3-4  $\mu\text{m}$
2. Desparafinar e hidratar
3. Oxidação em Ácido Periódico 1% - 20 min
4. Lavar em água destilada
5. Incubar em reagente Schiff – 20 min (cortes ficam de cor rosa claro após este passo)
6. Lavar em água corrente – 5 min (cortes ficam rapidamente de cor rosa escura)
7. Contrastar com Hematoxilina – 1 min
8. Lavar em água corrente – 2 min
9. Desidratar rapidamente, clarificar e montar

Resultados:

Glicogénio, mucinas e membranas basais – fúcsia/ roxo

Fungos – fúcsia/ roxo

Fundo - azul

Teste para o Reagente de Schiff:

Colocar 10 mL de Formaldeído 37% num copo de vidro. Adicionar algumas gotas de reagente de Schiff. Se o reagente estiver viável a solução ficará de cor vermelho-roxo. Com um reagente deteriorado a reacção vai ocorrer lentamente e ficar azul arroxeadada.

*Anexo 3 Protocolo de coloração PAS.*

**Procedure**

Carrying out the Prussian blue reaction at 37 °C yields a sharper definition of the stain precipitates.

**Staining smear specimens in the staining cell**

The slides should be allowed to drip off well after the individual staining steps, as a measure to avoid any unnecessary cross-contamination of solutions.

The stated times should be adhered to in order to guarantee an optimal staining result.

Slide with fixed, air-dried smear	
Staining solution (mixed 1+1 from reagents 1 and 2)	20 min
Distilled water	rinse
Reagent 3 (nuclear fast red solution)	5 min
Distilled water	rinse
Air-dry (e.g. over night or at 50 °C in the drying cabinet)	
If necessary mount with aqueous mounting agent (e.g. Aquatex®) and cover glass.	

*Anexo 4 Protocolo de coloração PERLS.*

## Histoquímicas – Tecido Conjuntivo

### **Van Gieson**

#### Biopsias hepáticas e Outros

#### Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar
2. Hematoxilina de Weigert (ver notas técnicas) – 10 min
3. Água corrente – 10 min
4. Água destilada – 10 min
5. Solução Picrofucsina Van Gieson – 3 min
6. Lavagem rápida em água destilada
7. Desidratar em álcool 95º e 100º (o álcool a 70º diferencia a picrofucsina)
8. Clarificar e montar

#### Notas Técnicas:

##### **Hematoxilina de Weigert:**

Juntar a solução A e B em partes iguais

(a mistura deve ter uma cor roxa e deve ser descartada se tiver outra tonalidade, como castanho, após a sua utilização. De preferência deve ser realizada extemporaneamente.)

#### Resultados:

Núcleos	azul a negra
Citoplasma e eritrócitos	amarelo
Fibras de colagénio (tecido conjuntivo)	vermelho brilhante
Músculo liso e estriado	amarelo
Membranas basais	vermelhos

*Anexo 5 Protocolo de coloração Van Gieson.*

Histoquímicas – Amilóide  
**Vermelho do Congo**  
Biopsias hepáticas

Protocolo:

1. Cortes 6-7  $\mu\text{m}$  (a espessura do corte é muito importante!)
2. Desparafinar e hidratar
3. Solução de Vermelho do Congo - 30 min
4. Passagem em água destilada
5. Diferenciar em Solução Alcoólica de Hidróxido de Potássio (aproximadamente 10 segundos)
6. Lavar em água
7. Desidratar, clarificar e montar

Preparação das Soluções:

**Solução Vermelho do Congo 0,5%**

Vermelho do Congo	0,5 g
Etanol 50%	100 mL

**Solução Hidróxido de Potássio 0,2%**

Hidróxido de Potássio	0,2 g
Etanol 80%	100 mL

Resultados:

Amilóide, tecido elástico, grânulos eosinofílicas      vermelho  
Fundo      alaranjado  
(O amiloide surge de cor verde-maçã no microscópio de luz polarizada.)

*Anexo 6 Protocolo de coloração Vermelho do Congo.*

Histoquímicas – Pigmento biliar  
**Fouchet Van Gieson/ Hall's Bilirubin Stain**  
Biopsias hepáticas

Protocolo:

1. Cortes 3-4  $\mu\text{m}$
2. Desparafinar e hidratar
3. Reagente Fouchet – 10 min
4. Passagem em água destilada
5. Solução Van Gieson – 3 min
6. Passagem rápida em água destilada
7. Desidratar rapidamente, clarificar e montar (ou deixar secar ao ar)

Preparação Reagente Fouchet:

Ácido tricloroacético 25%      25 mL

Cloreto Férrico 60%          5 mL

Água destilada                20 mL

Nota: fazer a coloração a fresco e descartar após o uso. Solução corrosiva.

Resultados:

- Pigmento biliar – verde
- Músculo e citoplasma – amarelo
- Colagénio – fúcsia

Controlo:

Ducto biliar obstruído

Soluções Stock:

Ácido Tricloroacético Aquoso 25% (SOLUÇÃO MUITO CORROSIVA)

Cloreto Férrico Aquoso 60%

*Anexo 7 Protocolo de coloração Fouchet Van Gieson.*

Histoquímicas – Cobre  
**Rodanina/ Wilson's Disease Stain**  
 Biopsias hepáticas

Protocolo:

1. Cortes 4-5 µm
2. Desparafinar e hidratar até à água destilada
3. Solução de Trabalho da Rodanina: incubação no microondas, potência máxima
  - a. Incubar durante 1 min no total fazendo paragens a cada vez que a solução entrar em ebulição. Repor volume com água destilada a cada paragem
  - b. Deixar as lâminas incubarem na solução durante 10 min
4. Água destilada – lavagem com vigor
5. Água destilada – 3 x 3 min
6. Contraste com Hematoxilina – 1 min
7. Azular em água corrente – 1 min
8. Desidratar, clarificar e montar

Resultados:

Depósitos de cobre – castanho avermelhado a laranja  
 Núcleos – azul  
 Pigmento biliar - verde

Preparação das Soluções

**Solução stock**

5-p-dimethylaminobenzylidene rodanina      0,2 g  
 Etanol Absoluto                                      100 mL

Notas: Agitar e armazenar refrigerada. A solução é estável durante 3 meses.

**Solução de trabalho**

Solução Stock Rodanina                              10 mL  
 Água destilada    40 mL

Notas: Agitar a solução stock e filtrar em papel de filtro para fazer a medição. Fazer nova solução a cada utilização e descartar após o uso.

Controlo:

Fígado fetal, positivo conhecido.

*Anexo 8 Protocolo de coloração Rodanina.*

## Histoquímicas – Mastocitoma

### **Giemsa**

#### Protocolo:

1. Cortes 3-4  $\mu\text{m}$
2. Desparafinar e hidratar
3. Incubar na solução de trabalho Giemsa 1% - 30 min
4. Lavar em água destilada
5. Diferenciar com Ácido Acético Aquoso 0,5% (ver notas técnicas)
6. Desidratar rapidamente
7. Clarificar e montar

#### Preparação das Soluções:

##### **Solução de Trabalho Giemsa 1%**

Solução Stock Giemsa    0,5 mL

Água destilada            50 mL

Nota: Esta solução deve ser preparada a cada utilização e descartada após o uso.

A solução Giemsa é muito estável com o tempo, o prazo de validade é pouco importante.

#### Preparação das Soluções:

A diferenciação varia de acordo com os tecidos e a temperatura, mas geralmente é alcançada em 30 segundos. A diferenciação remove a componente azul da coloração e aumenta a intensidade da componente rosa.

#### Resultados:

Grânulos citoplasmáticos	azul
Colagénio, músculo e osso	rosa claro
Microorganismos, fungos e parasitas	azul/ roxo
Pigmentos	verde
Núcleos	azul escuro/ violeta
Eritrócitos	rosa salmão
Citoplasma	escala de azul claro

*Anexo 9 Protocolo de coloração Giemsa.*

Histoquímicas – *Helicobacter pylori*

## **Giemsa**

### **Biopsias gástricas**

#### Protocolo:

1. Cortes 3-4  $\mu\text{m}$
2. Desparafinar e hidratar
3. Incubar na solução de trabalho Giemsa 2% - 30 min
4. Lavar em água corrente – 3 min
5. Desidratar rapidamente
6. Clarificar e montar

#### Preparação das Soluções:

##### **Solução de Trabalho Giemsa 2%**

Solução Stock Giemsa 1 mL

Água destilada 49 mL

Nota: Esta solução deve ser preparada a cada utilização e descartada após o uso.

A solução Giemsa é muito estável com o tempo, o prazo de validade é pouco importante.

#### Resultados:

*Helicobacter pylori* azul escuro

Fundo azul

*Anexo 10 Protocolo de coloração Giemsa modificado.*

Histoquímicas – Bactérias ácido-álcool resistentes  
**Ziehl-Neelsen**  
**Mycobaterium e Nocardia**

Protocolo:

1. Cortes 3-4  $\mu\text{m}$
2. Desparafinar e hidratar
3. Carbol-fucsina – 30 min TA
4. Água corrente – 2 min
5. Diferenciação com Álcool Clorídrico – 30 seg (fazer controlo ocular)
6. Água corrente – 30 seg
7. Contrastar com solução de trabalho de Azul de metileno – 20 seg (1 ml de água destilada + 1 gota de azul de metileno de Loefflers)
8. Lavar em água destilada
9. Desidratar/ Deixar secar ao ar e montar

Resultados:

Bacilos ácido-álcool resistentes – vermelho  
Núcleos - azul  
Fundo - azul

*Anexo 11 Protocolo de coloração Ziehl-Neelsen.*

Biologia Molecular

**Extracção de DNA de Blocos de Parafina**

1. Desinfectar o micrótomo e agulha histológica com álcool 70°
2. Colocar uma superfície nova da faca
3. Fazer quatro cortes seriados de 10 µm
4. Colocar os cortes num *ependorf* autoclavado
5. Adicionar 1 ml de Xilol, homogeneizar no vortex e incubar 5 minutos à TA
6. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos
7. Decantar o sobrenadante
8. Repetir os passos 5, 6 e 7
9. Adicionar 1 ml de Etanol Absoluto, homogeneizar
10. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos
11. Decantar o sobrenadante
12. Repetir os passos 9, 10 e 11 (se necessário retirar o excesso de álcool com pipeta)
13. Adicionar 1 ml de álcool 70°, homogeneizar
14. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 minutos
15. Decantar o sobrenadante
16. Sacudir num toalhete para retirar os resíduos de álcool. Deixar secar totalmente (deixar a tampa aberta durante algumas horas)
17. Adicionar 300 µl de tampão de lise com 30 µl de Proteinase K
18. Proceder à disrupção mecânica do *pellet* caso se encontre compacto (com auxílio de uma ponta de pipeta)
19. Incubar no banho seco *overnight* a 55° C
20. Concluir a extração no aparelho automático MAgCore HF16

*Anexo 12 Protocolo de extração de DNA de blocos de parafina.*

Protocolo




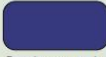
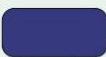

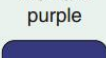
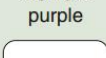
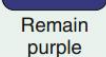
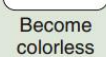
**Imunohistoquímica – Kit Cell Marque**

1. Cortes 3-4 µm em lâmina adesivada
2. Adesão *overnight* na estufa 37°
3. Xilol – 15 minutos
4. Hidratação nos álcoois
5. Água
6. Recuperação Antigénica no Módulo PT (ver lista de Ac)
7. Arrefecimento à temperatura ambiente
8. Água
9. Caneta hidrofóbica
10. Peroxidase Block – 10 min
11. Lavar em água
12. Anticorpo primário (ver lista de Ac) – 30 min
13. Lavar em PBS – 3 x 5 min
14. Amplifier (1) – 10 min
15. Lavar em PBS – 3 x 5 min
16. Polymer (2) – 10 min
17. Lavar em PBS – 3 x 5 min
18. DAB (1 mL de diluente + 1 gota de DAB) – 7 min
19. Absorver excedente com lixívia
20. Enxaguar em água
21. Contraste com Hematoxilina – 1 min
22. Água corrente – 3 min
23. Desidratar, clarificar e montar

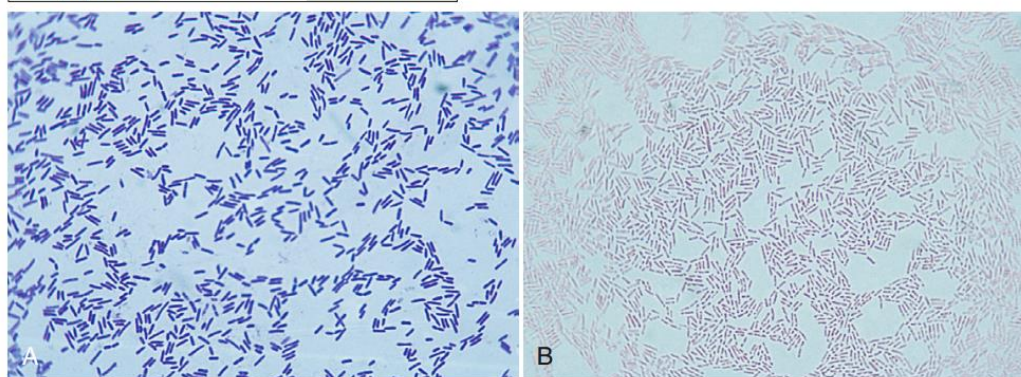
*Anexo 13 Protocolo de imunohistoquímica.*

TESTS AND READING TIME								
<b>LEU</b>	<b>LEUKOCYTES</b>	Negative		Trace	Small +	Moderate ++	Large +++	
	2 minutes							
<b>NIT</b>	<b>NITRITE</b>	Negative						Positive (any degree of uniform pink color)
	60 seconds							
<b>URO</b>	<b>UROBILINOGEN</b>	Normal		mg/dL URINE (1 mg = approx. 1 EU)				
	60 seconds	0.2	1		2	4	8	
<b>PRO</b>	<b>PROTEIN</b>	Negative	Trace	mg/dL	30 +	100 ++	300 +++	2000 or more ++++
	60 seconds							
<b>pH</b>	<b>pH</b>	5.0	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5
	60 seconds							
<b>BLO</b>	<b>BLOOD</b>	Negative	Non-hemolyzed Trace	Moderate	Hemolyzed Trace	Small +	Moderate ++	Large +++
	60 seconds							
<b>SG</b>	<b>SPECIFIC GRAVITY</b>	1.000	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025	1.030
	45 seconds							
<b>KET</b>	<b>KETONE</b>	Negative	mg/dL	Trace 5	Small 15	Moderate 40	80	Large 160
	40 seconds							
<b>BIL</b>	<b>BILIRUBIN</b>	Negative				Small +	Moderate ++	Large +++
	30 seconds							
<b>GLU</b>	<b>GLUCOSE</b>	Negative	g/dL (%)	1/10 (ir.)	1/4	1/2	1	2 or more
	30 seconds		mg/dL	100	250	500	1000	2000 or more

Anexo 14 Tabela de cores da tira reagente no exame químico de urina (Siemens Healthineers).  
 Fonte: <https://learn.parallax.com/support/reference/urinalysis-test-strip-color-chart>

Gram+ bacteria	Steps for staining	Gram- bacteria
1  Cells on slide		
2  Stain purple	Primary stain (crystal violet)	 Stain purple
3  Remain purple	Mordant (Gram's iodine)	 Remain purple
4  Remain purple	Decolorizer, (alcohol and/or acetone)	 Become colorless
5  Remain purple	Counterstain (safranin)	 Stain pink

- 1 Fix material on slide with methanol or heat. If slide is heat fixed, allow it to cool to the touch before applying stain.
- 2 Flood slide with crystal violet (*purple*) and allow it to remain on the surface without drying for 10 to 30 seconds. Rinse the slide with tap water, shaking off all excess.
- 3 Flood the slide with iodine to increase affinity of crystal violet and allow it to remain on the surface without drying for twice as long as the crystal violet was in contact with the slide surface (20 seconds of iodine for 10 seconds of crystal violet, for example). Rinse with tap water, shaking off all excess.
- 4 Flood the slide with decolorizer for 10 seconds or less (optimal decolorization depends on chemical used) and rinse off immediately with tap water. Repeat this procedure until the blue dye no longer runs off the slide with the decolorizer. Thicker smears require more prolonged decolorizing. Rinse with tap water and shake off excess.
- 5 Flood the slide with counterstain and allow it to remain on the surface without drying for 30 seconds. Rinse with tap water and gently blot the slide dry with paper towels or bibulous paper or air dry. For delicate smears, such as certain body fluids, air drying is the best method.
- 6 Examine microscopically under an oil immersion lens at 1000x for phagocytes, bacteria, and another cellular material.



Anexo 15 Procedimentos e princípios da coloração de Gram. A – Bactérias gram-positivas observadas sob óleo de imersão aparecem roxas. B - Bactérias gram-negativas observadas sob óleo de imersão aparecem rosas.

Fonte: Figure 6-3. Tille P. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 13a Edição. Elsevier Mosby, editor. 2014. 1–1038 p.

**CHROMagar™ Malassezia:**



Preparação do meio:

- Adicionar lentamente 28,15g de meio em pó (chromagar malassezia) em 500ml de água autoclavada.
- Adicionar 3,96ml de glicerol e 5,45ml de Tween 40.
- Mexer até o meio ficar bem espesso.
- Aquecer e deixar ferver (100°C), utilizando um micro-ondas, enquanto se mexe regularmente, até o meio ficar translúcido.

Preparação da placa:

- Deixar arrefecer em banho-maria a 45-50°C, enquanto se mexe delicadamente.
- Despejar o meio em placas de petri estéreis.
- Deixar solidificar e secar.

Armazenamento:

- Armazenar no escuro antes de usar.
- As placas de meio preparadas podem ser mantidas durante um dia a temperatura ambiente.
- As placas podem ser armazenadas até um mês sob refrigeração (2-8°C) se devidamente preparadas e protegido da luz e desidratação.

*Anexo 16 Protocolo de elaboração de meio cromogénico para deteção de Malassezia.*

## Técnica de Flutuação Fecal



### Material:

- Amostra fecal
- Um copo de flutuação por cada caso
- Solução saturada de Sulfato de Magnésio
- Lâmina
- Lamela

### Protocolo:

1. Retirar um copo de flutuação por cada caso a realizar
2. Identificar a tampa do copo e uma lâmina de vidro com o número de tubo, nome do animal e número de amostras enviadas (1x, 2x, 3x, etc.)
3. Remover a peça azul do copo de flutuação;
4. Adicionar solução saturada de Sulfato de Magnésio até metade do copo;
5. Adicionar amostra de fezes, que deve ser representativa de todas as amostras enviadas de cada animal. A quantidade de amostra indicada é a equivalente ao interior do cilindro existente no final da peça azul;
6. Introduzir a peça azul novamente no copo e girá-la com vigor de modo a homogeneizar corretamente a solução. Encaixar devidamente;
7. Preencher o volume total do copo com a solução saturada utilizada;
8. Pousar a lâmina identificada no topo do copo (garantindo que a solução fica em contacto com a lâmina);
9. Deixar repousar durante pelo menos 30 minutos;
10. Levantar a lâmina, justapor a lamela e observar diretamente ao microscópio.

*Anexo 17 Protocolo da técnica de flutuação fecal.*

# USER MANUAL FOR PARASITRAP® AF/SAF/ECO/BAILENGER SYSTEMS



The assembled system is rotated 180°

The filtered faecal suspension is centrifuged for 5 min. at 1000 g

If you have not shaker, shake it by hand for 30 sec.

**GENERAL NOTES**

Processing with small size centrifuge and quality control.

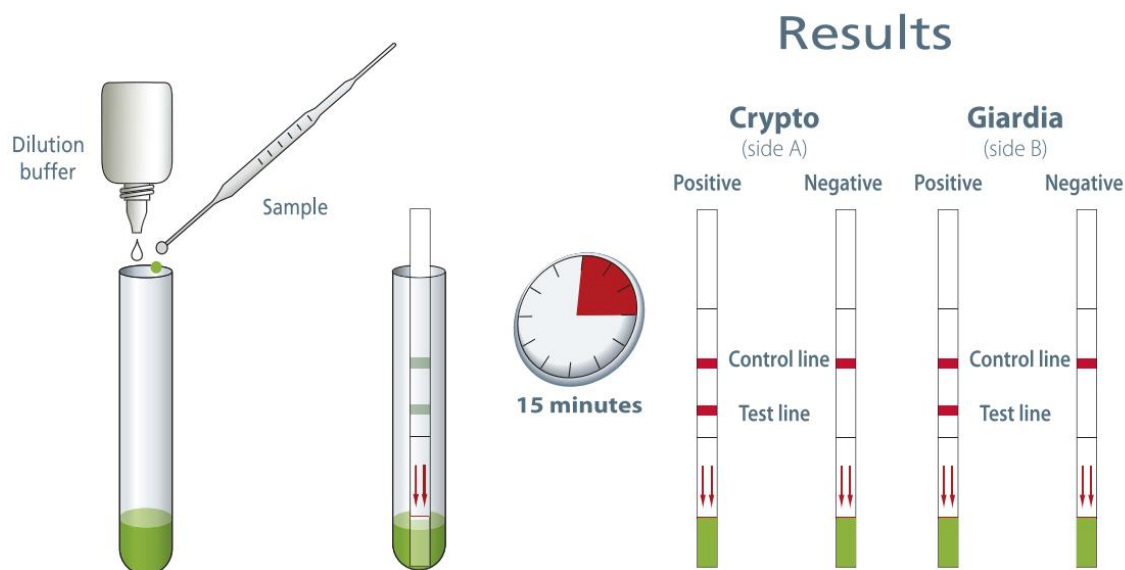
Use the additional screw cap instead of connected system with tube I and filter piece.

Further processing steps as above 9-13.

- The better the faecal suspension (steps 3, and 4) the better the results.
- Condition for a successful examination is that the sample has to be fresh as possible.
- Enhance your chance for successful examination:
  - Take samples from different parts of faecal material
  - Examine sample from different days
  - Two examinations are better than one
- Samples processed by two different diagnostic methods - flotation and sedimentation increasing qualitative and quantitative the number of detected parasites.
- Use cover glass min. size 24x36 mm (up to 24x60). Examine the cover-slip on the slide systematically and thoroughly.

For diagnosis usually 1-3 drops of concentrated stool suspension dilution per slide will be sufficient.

Anexo 18 Procedimento da preparação da técnica de sedimentação fecal utilizando o Biosepar Kit ParasiTrap® Sedimentation.



#### PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DO ESPÉCIME:

1. Junte 14 gotas da solução tampão de diluição a um tubo de ensaio.
2. Mergulhe uma ansa contendo a amostra de fezes no tubo de ensaio. **O rácio de diluição terá de ser de cerca de 4% p/v.** Para as amostras líquidas, colha 2 ansas de 10 µl; para as amostras sólidas, colha 1 ansa.
3. Elimine a ansa de amostragem.
4. Agite a preparação no vórtex para homogeneizar. Toda a amostra de fezes terá de ficar em suspensão na solução.
5. Mergulhe a fita-teste sensibilizada no sentido indicado pela seta vermelha.

Deixe-a reagir durante 15 minutos. Os resultados positivos poderão ser registados mais cedo, no momento em que as linhas de teste e de controlo ficarem visíveis.

*Anexo 19 Procedimento de teste de diagnóstico rápido in vitro para a deteção de Giardia spp. e Cryptosporidium spp. da Coris Bioconcept Kit Crypto-Giardia Duo-Strip.*

TABLE 1

Reference Intervals for Hematology Values in Domestic Animals							
Test	Units	Dogs <sup>a</sup> (N = 130)	Cats <sup>a</sup> (N = 45)	Horses <sup>a</sup> (N = 70)	Cows <sup>b</sup> (58)	Pigs <sup>c</sup> (99)	Goats <sup>d</sup> (NR)
Hematocrit	%	40-56	34-51	30-44	22-32	34-44	22-38
RBC	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5.7-8.3	7.4-10.4	6.6-11.0	5.1-7.6	6.4-8.4	8.0-18.0
Hemoglobin	g/dL	14-20	11-16	11-16	8-12	10-14	8-12
MCV	fL	64-74	42-52	38-51	38-50	49-59	16-25
MCH	pg	22-26	13-17	13-19	14-18	NR	5.2-8.0
MCHC	g/dL	33-38	30-33	35-39	36-39	29-33	30-36
RDW	(%)	11-14	13-16	16-21	16-20	15-24	NR
Reticulocytes	$\times 10^3/\mu\text{L}$	8-65	8-57	0	0	NR	0
Platelets	$\times 10^3/\mu\text{L}$	134-396	160-502	100-308	193-637	211-887	300-600
MPV	fL	10-15	10-22	5.9-9.9	4.5-7.5	NR	NR
Icterus index <sup>e</sup>	Units	<5	<5	5-20	2-15	<5	2-5
Plasma protein <sup>e</sup>	g/dL	6.0-8.0	6.2-8.0	6.0-8.0	7.0-8.5	6.0-8.0	6.0-7.5
Fibrinogen <sup>e</sup>	mg/dL	100-400	100-300	100-400	300-700	100-500	100-400
Total leukocytes	$\times 10^3/\mu\text{L}$	5.0-13.0	5.4-15.4	5.6-11.6	4.9-12.0	15.6-38.9	4.0-13.0
Bands	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0-0.3	0-0.3	0-0.1	Rare	NR	Rare
Neutrophils	$\times 10^3/\mu\text{L}$	2.7-8.9	2.3-9.8	2.6-6.7	1.8-6.3	3.0-17.4	1.2-7.2
Lymphocytes	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.9-3.4	0.9-5.5	1.1-5.7	1.6-5.6	7.7-20.4	2.0-9.0
Monocytes	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.1-0.8	0-0.8	0-0.7	0-0.8	0.6-3.4	0-0.6
Eosinophils	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0.1-1.3	0-1.8	0-0.6	0-0.9	0.1-2.3	0.1-0.7
Basophils	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0-0.1	0-0.2	0-0.2	0-0.3	0.1-0.3	0-0.1

RBC, red blood cell count; MCV, mean cell volume; MCH, mean cell hemoglobin; MCHC, mean cell hemoglobin concentration; RDW, red blood cell distribution width; MPV, mean platelet volume; NR, not reported.

<sup>a</sup>Data from adult dogs, cats, and horses were determined at the University of Florida College of Veterinary Medicine. Total leukocyte counts, erythrocyte parameters, and platelet values were measured from healthy adult animals of both sexes and various breeds using an Advia 120 hematology analyzer. Greyhounds and other sighthounds were excluded. Thoroughbred and quarter horses in equal numbers accounted for about 90% of the hot-blooded horses studied. Reticulocyte counts represent the minimum and maximum values measured from 58 dogs and 41 cats. The Advia 120 counts primarily aggregate reticulocytes in cats. These automated platelet counts are lower than reference values reported for manual platelet counts in dogs ( $200-500 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) and cats ( $300-800 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Leukocyte differential counts were performed manually by classifying 200 leukocytes in each stained blood film.

<sup>b</sup>Measurements from bovine leukemia virus-negative adult dairy cows in mid-lactation were performed using an Advia 120 hematology analyzer and manual differential leukocyte counts. (From George JW, Snipes J, Lane VM. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol.* 2010;39:138-148.)

<sup>c</sup>Measurements from crossbred grower pigs weighing between 30 and 50 kg were performed using an Advia 2120 hematology analyzer. (From Klem TB, Bleken E, Morberg H, Thoresen SI, Framstad T. Hematologic and biochemical reference intervals for Norwegian crossbred grower pigs. *Vet Clin Pathol.* 2010;39:221-226.)

<sup>d</sup>The goat population sampled and hematology analyzer(s) used were not given. The hematocrits were determined using microhematocrit tubes and leukocyte differential counts were determined by examining stained blood films. (From Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.)

<sup>e</sup>Total protein, fibrinogen, and icterus index values were determined using manual methods. (From Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology*, 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.)

Anexo 20 Tabela 1. Intervalos de referência para valores hematológicos em animais domésticos. Fonte: Apêndice 1: Tabelas. Harvey JW. *Veterinary Hematology: A Diagnostic Guide and Color Atlas*. Elsevier, Inc.; 2012. 360 p.

#### Protocolo de coloração Diff-Quick



- Metanol – 4 min
- Sacudir o excesso em papel absorvente
- Eosina – 4 min
- Sacudir o excesso em papel absorvente
- Azul B – 4 min
- Lavagem em água corrente
- Deixar as lâminas secar ao ar

Anexo 21 Protocolo de coloração Diff-Quick.

Anexos

Item / Time	Test results interpretation					
Glucose 60 sec	normal (mg/dL)	± (50)	1+ (100)	2+ (200)	3+ (500)	4+ (1000)
Protein 60 sec	neg. (mg/dL)	± (15)	1+ (30)	2+ (100)	3+ (300)	4+ (1000)
Bilirubin 60 sec	neg. (mg/dL)		1+ (0.5)	2+ (2)	3+ (6)	4+ (OVER)
Urobilinogen 60 sec	normal (mg/dL)		1+ (2)	2+ (4)	3+ (8)	4+ (OVER)
pH 60 sec	5	6	7	8	9	
Specific Gravity 60 sec	1.000	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025 1.030
Blood 60 sec	neg. (mg/dL)	Hemolysis ± (0.03)	1+ (0.06)	2+ (0.2)	3+ (1.0)	Non Hemolysis 1+ 2+
Ketones 60 sec	neg. (mg/dL)	±	1+ (15)	2+ (40)	3+ (80)	4+ (150)
Nitrite 60 sec	neg.		1+	2+		
Leukocytes 90 sec	neg. (Leu/μL)	25	75	250	500	
Calibration Pad	Reagent strips for urinalysis only. Do not freeze. Replace and tighten cap after opening. Read package insert carefully for use. MADE IN JAPAN					

Anexo 22 Tabela de cores da tira reagente no exame químico de urina (Arkray).

## 10. Apêndices

Tabela 10.1: Células presentes no sedimento urinário.

Fonte: Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. Atlas of canine and feline urinalysis. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.

	<b>Características distintas</b>	<b>Importância no diagnóstico</b>	<b>Próximos passos</b>
<b>Células epiteliais transicionais</b>	São células próprias do epitélio da bexiga, costumam ser grandes e de morfologia alongada ou arredondadas, contêm um núcleo redondo e centrado, e o citoplasma é granular. Podem estar presentes individualmente ou em aglomerados. As células de transição são tipicamente duas a quatro vezes maiores que os leucócitos.	Amostras de urina de cães e gatos saudáveis geralmente contêm um baixo número de células epiteliais de transição. Uma concentração elevada destas células poderá sugerir inflamação (infeciosa, como Pielonefrite, ou não infecciosa), neoplasia ou irritação química.	Se as células epiteliais parecerem anormais ou estiverem aumentadas em número, deve realizar-se uma citologia urinária. A revisão do historial clínico do animal, sinais clínicos, química clínica, hematologia, urina tipo II e urocultura devem ser realizadas para evidência de Pielonefrite.
<b>Células epiteliais escamosas</b>	São células de tamanho grande e com morfologias poliédricas ou angulares, contêm um núcleo pequeno e redondo.	As células epiteliais escamosas superficiais geralmente são um achado incidental e não têm significância diagnóstica, pois ocorrem devido à contaminação da uretra, vagina ou pele. Um grande número de células pode ocasionalmente estar associado à metaplasia escamosa da próstata canina, resultante de uma fonte exógena de estrogénio ou de um tumor testicular secretor de estrogénio.	Se um grande número de células epiteliais escamosas for observado na urina de um cão macho, é necessário rever o historial clínico, os achados físicos e o trabalho laboratorial hematológico para determinar se existe alguma evidência de tumor testicular ou exposição a estrogénio exógeno.
<b>Células epiteliais tubulares renais</b>	São células pequenas (ligeiramente maiores que um neutrófilo) que são tipicamente redondas com um núcleo grande redondo. As células tubulares renais de gatos e cães diabéticos frequentemente contêm muitos glóbulos de gordura.	Podem ser encontradas no sedimento urinário de animais normais em baixo número. Números moderados a elevados de células tubulares renais sugerem lesão tubular renal aguda.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos achados do exame físico, do hemograma completo, do perfil bioquímico e dos resultados de exame de urina para evidência de doença renal aguda.
<b>Leucócitos</b>	A maioria dos leucócitos observados na urina são neutrófilos. São células esféricas e incolores com citoplasma escasso de aparência granulada; ocasionalmente, a forma lobulada do núcleo pode ser discernida, podem aparecer em agregados, mas normalmente são células individuais. São maiores que os eritrócitos e geralmente menores que as células de transição.	Podem ser visualizados em número baixo em urinas de cães e gatos saudáveis. O aumento do número de leucócitos na urina indica inflamação (infeciosa ou não infecciosa) do trato urinário ou contaminação do trato genital. A agregação de leucócitos pode ser observada com inflamação crónica e ocorre mais frequentemente com infeções bacterianas.	Deve fazer-se uma busca criteriosa de bactérias: no entanto, nem sempre as bactérias são encontradas microscopicamente, mesmo quando uma infeção bacteriana é a causa da inflamação. Recomendações adicionais incluem: investigação do sistema urinário para o local da inflamação; revisão de perfis hematológicos e químicos para evidência de efeito inflamatório sistémico; cultura e sensibilidade da urina para auxiliar no diagnóstico e orientar a terapêutica.

<p><b>Eritrócitos</b></p>	<p>Em geral, os eritrócitos são discos pequenos, pálidos, redondos e bicôncavos que não possuem núcleo. Na urina concentrada, serão menores e muitas vezes parecerão enrugados devido à perda de água das hemácias para o ambiente hipertônico da urina. Os eritrócitos enrugados aparecem pálidos e esféricos com projeções irregulares na superfície. Na urina hipotônica, os eritrócitos incham e podem sofrer lise. Os eritrócitos inchados aparecem como eritrócitos normais, apenas maiores, e não bicôncavos. Os eritrócitos que sofreram lise podem aparecer como círculos fracos e incolores.</p>	<p>Podem ser visualizados em número baixo em urinas de cães e gatos saudáveis. Hematúria indica hemorragia no sistema urinário.</p>	<p>Aconselha-se a revisão do historial clínico do animal e dos achados do exame físico para caracterizar melhor a micção e a hematúria associada, bem como para estabelecer se existe alguma evidência de coagulopatia. Investigação adicional do sistema urinário, incluindo diagnóstico por imagem, pode ser indicada para determinar o local da hemorragia. O perfil hematológico deve ser examinado para determinar a extensão da hemorragia, identificar qualquer evidência de inflamação sistêmica e avaliar o número de plaquetas.</p>
---------------------------	--	---	---

Tabela 10.2: Cristais presentes no sedimento urinário.

Fonte: Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. Atlas of canine and feline urinalysis. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.

	<b>Características distintas</b>	<b>Importância no diagnóstico</b>	<b>Próximos passos</b>
<p><b>Estruvite<sup>1</sup></b></p>	<p>São prismas incolores e a morfologia típica é a da tampa do “sarcófago” ou do “ataúde.</p>	<p>São frequentes nos cães e gatos e formam-se normalmente em urinas básicas a neutras.</p>	<p>Descartar fatores predisponentes à sua formação, tais como, infecção bacteriana, baixo volume de urina, urina alcalina e/ou níveis elevados de magnésio na dieta. Aconselha-se a revisão do historial clínico, bem como dos achados clínicos para qualquer evidência de formação de cristais. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta projetada para a dissolução ou prevenção dos cristais.</p>
<p><b>Oxalato Cálcico<sup>1</sup></b></p>	<p>Os cristais de oxalato cálcico dihidratado são incolores e têm morfologia de envelope ou quadrado com uma “cruz” no interior. Os cristais de oxalato cálcico monohidratado são translúcidos e podem ser alongados, planos, ter forma de fuso, oval, barril ou haltere. Ambos podem variar muito em tamanho.</p>	<p>São frequentes nos cães e gatos e formam-se normalmente em urinas ácidas. A produção pode encontrar-se aumentada quando ocorre a ingestão de algumas plantas tóxicas ou quando ocorre intoxicação por ingestão de etilenoglicol, sendo esta a principal causa de aparecimento de cristais de oxalato cálcico monohidratado na urina.</p>	<p>Rever o historial clínico, os achados clínicos e os resultados da química clínica para despistar evidências de toxicidade do etilenoglicol. Se a mesma não se verificar pode justificar-se a verificação de outras causas predisponentes para a formação, nomeadamente hipercalcemia, hipercalcúria, aumento de oxalatos na dieta e urina ácida. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta projetada para a dissolução ou prevenção dos cristais.</p>
<p><b>Fosfato Cálcico<sup>1</sup></b></p>	<p>São cristais incolores e a morfologia pode variar</p>	<p>Podem aparecer, raramente, em urinas ácidas ou básicas no cão.</p>	<p>Aconselha-se a revisão do historial clínico, bem como dos achados</p>

	entre agulhas finas e longas, pauzinhos isolados ou agregados.	Podem ser vistos em associação com condições que promovem hipercalemiúria e/ou hiperfosfatúria. No cão, tais condições incluem Hiperparatireoidismo, Hiperadrenocorticismo, Hipercalemiúria Idiopática e Acidose Tubular Renal Distal.	clínicos e perfil bioquímico para evidências de formação de cristais. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta rica em fibras e evitar dietas com alto teor de sódio. Pode ser aconselhável eliminar ou limitar a administração de medicamentos que aumentam a excreção de cálcio.
<b>Urato/Biurato de amônia<sup>1</sup></b>	São cristais com uma coloração castanha-amarelada, que aparecem isolados ou em agregados, com morfologia arredondada, podendo parecer esferas de superfície lisa ou projetando espículas longas e irregulares.	São raros em urinas de cães e gatos saudáveis, à exceção dos cães da raça Dálmata e Bulldog Inglês, onde são bastante frequentes. Podem aparecer em qualquer pH, contudo são mais frequentes em urinas básicas. Costumam estar associados a patologias hepáticas e distúrbios metabólicos, especialmente anomalias vasculares hepáticas ou urolitíase.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos achados clínicos para qualquer evidência de formação de cristais, bem como a realização de exames complementares (radiografias). Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta projetada para a dissolução ou prevenção dos cristais.
<b>Ácido Úrico<sup>1</sup></b>	São cristais amarelos ou amarelos-acastanhados, com morfologia de “diamante” ou “losango”, com anéis concêntricos, podendo aparecer isolados ou em agregados.	São raros em urinas de cães e gatos saudáveis, à exceção da raça Dálmata, onde são frequentes. Normalmente originam-se em urinas ácidas, e estão associados a patologias metabólicas.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, bem como dos achados clínicos para qualquer evidência de formação de cristais. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta projetada para a dissolução ou prevenção dos cristais.
<b>Cistina<sup>1</sup></b>	São cristais incolores, planos e hexagonais, podendo aparecer em camadas.	São incomuns em cães e gatos e podem aparecer em urinas ácidas ou neutras. A presença de cistina na urina sugere um defeito hereditário no metabolismo da cistina, defeito comum nos cães de raça Bull Mastiff, Bulldog inglês, Dachshund e Chihuahua.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, bem como dos achados clínicos para qualquer evidência de formação de cristais. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e orientar a alimentação com uma dieta projetada para a dissolução ou prevenção dos cristais. Deve considerar-se a realização de um teste genético e, no caso de um macho afetado, determinar se a castração pode ser benéfica para reduzir a excreção de cistina na urina, além de prevenir a transmissão desse distúrbio genético.
<b>Xantina<sup>1</sup></b>	São cristais castanhos ou castanhos-amarelados, de morfologia arredondada e com estrias concêntricas ou radiadas, com variados tamanhos. Geralmente apresentam uma forma amorfa, o que dificulta a sua identificação. Nestes casos pode	Originam-se em urinas ácidas e concentradas, e pode ocorrer secundariamente à administração de alopurinol em cães. Nas raças Cavalier King Charles Spaniels e Dachshunds, os cristais são observados como resultado de um provável erro inato do metabolismo das purinas (congénito). Nos gatos são observados como resultado	Investigar a administração de alopurinol, sobretudo em cães. Se o paciente não tiver histórico de administração de alopurinol, investigue a possibilidade de uma condição hereditária ou congénita. Considere iniciar medidas para aumentar a ingestão de água do animal e, em animais com administração de alopurinol, orientar a alimentação com uma dieta pobre em purinas, a fim de reduzir o

	recorrer-se à espectroscopia de infravermelho ou a cromatografia líquida de alta pressão.	de um defeito familiar ou congênito na atividade da xantina oxidase.	potencial desenvolvimento de cristais de xantina.
<b>Tirosina e Leucina<sup>2</sup></b>	Os cristais de tirosina assemelham-se a agulhas, e apresentam-se individualmente, em aglomerados ou em feixes. Os cristais de leucina são estruturas redondas castanhas-amareladas, com estrias radiais.	São muito raros em cães e gatos. Em humanos, a insuficiência hepática grave, na qual o metabolismo dos aminoácidos é prejudicado, tem sido associada à formação de cristais de tirosina e leucina.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos achados clínicos, da química clínica e dos resultados hematológicos para qualquer evidência de doença hepática.
<b>Bilirrubina<sup>2</sup></b>	São cristais amarelos ou dourados, com morfologia de agulha, e podem apresentar-se isolados ou em agregados.	Originam-se em urinas ácidas. Um ocasional cristal pode ser observado no sedimento urinário de cães normais com urina altamente concentrada. Números moderados a elevados de cristais sugerem doença biliar hepática ou pós-hepática.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos sinais clínicos, da química clínica e dos resultados hematológicos para qualquer evidência de doença hepatobiliar.
<b>Colesterol<sup>2</sup></b>	São cristais transparentes, que aparecem como placas grandes, retangulares e planas.	São raros em cães e gatos, e podem aparecer em urinas ácidas e neutras. Embora cristais de colesterol possam ser observados em cães clinicamente normais, pode haver uma possível associação com Síndrome Nefrótica.	Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos sinais clínicos, e dos resultados da química clínica para qualquer evidência de Síndrome Nefrótica.
<b>Cianurato de Melamina<sup>2</sup></b>	São cristais castanhos a castanho-amarelados, pequenos e redondos, com estrias radiantes a partir do centro.	Cristais de melamina, quando precipitados em combinação com ácido cianúrico, podem indicar potencial toxicidade e insuficiência renal aguda, como registado em casos anteriores nos quais foram ingeridos alimentos para animais de estimação contaminados com melamina/ácido cianúrico.	Além de realizar uma urianálise completa, o histórico do paciente (incluindo histórico alimentar), sinais clínicos, química clínica e resultados de hematologia devem ser revistos para evidência de doença renal aguda e potencial exposição à toxina.
<b>Sulfonamidas<sup>3</sup></b>	Podem aparecer uma variedade de cristais com diferentes morfologias, nomeadamente agulhas castanhas em feixes ou rosetas, glóbulos com estrias radiais, cristais ovais transparentes com saliências.	A formação de cristais de sulfonamidas está geralmente associada com sobredosagem de sulfonamida.	Quando um medicamento à base de sulfonamidas estiver a ser administrado, e ocorrer o aparecimento de cristais na urina, o regime de dosagem deve ser revisto.
<b>Ampicilina<sup>3</sup></b>	Os cristais ocorrem como agulhas ou prismas longos e finos.	Sem significado além da associação com a administração de ampicilina.	Nada solicitado.
<b>Meios de Contraste Radiológicos<sup>3</sup></b>	São cristais longos, incolores, pontiagudos, semelhantes a agulhas contendo diatrizoato de sódio ou placas retangulares planas	Sem significado além da associação com a administração de em meio de contraste radiopaco.	Nada solicitado.

	contendo diatrizoato de meglumina.		
--	------------------------------------	--	--

<sup>1</sup>Cristais associados à formação de cálculos urinários

<sup>2</sup>Cristais não tipicamente associados à formação de cálculos urinários

<sup>3</sup>Cristais induzidos por drogas

**Tabela 10.3: Cilindros presentes no sedimento urinário.**

Fonte: Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. Atlas of canine and feline urinalysis. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.

	<b>Características distintas</b>	<b>Importância no diagnóstico</b>	<b>Próximos passos</b>
<b>Cilindros Hialinos</b>	Pálidos, incolores, semitransparentes, com uma extremidade arredondada e outra que gradualmente afinila em cauda.	Podem ser encontrados números muito baixos em amostras de urinas concentradas, e números baixos a elevados em diversos distúrbios fisiológicos, como febre, exercícios extenuantes, diuréticos e congestão passiva e em distúrbios patológicos, como a Síndrome Nefrótica.	Juntamente com o historial clínico e exame físico, a avaliação das concentrações de proteínas na urina e no sangue ajuda a distinguir condições patológicas de condições fisiológicas. Condições patológicas: aumento substancial na concentração de proteínas na urina; possível diminuição na concentração de proteínas no sangue. Condições fisiológicas: nenhum ou leves aumentos na concentração de proteína na urina; concentrações normais de proteína no sangue.
<b>Cilindros Epiteliais</b>	Compostos por células epiteliais renais. Estas células são maiores que os leucócitos e têm um núcleo central grande e redondo.	Achado raro na urina, e quando aparecem sugerem Lesão Renal Aguda. Algumas causas incluem toxinas renais, infartos, isquemia e nefrite aguda.	Investigar Doença Renal Aguda.
<b>Cilindros Eritróides</b>	Compostos por alguns a muitos eritrócitos de aspeto alaranjado ou amarelado.	Achado raro na urina e são sempre patológicos, indicando hemorragia, por exemplo, trauma renal ou nefrite/ glomerulonefrite hemorrágica.	Investigar trauma renal ou doença renal.
<b>Cilindros Leucóides</b>	Compostos por alguns a muitos leucócitos, geralmente neutrófilos.	Achado raro na urina, e o aparecimento é causado por inflamação, sendo vistos em animais com distúrbios que causam Nefrite Intersticial, mas são mais comuns em casos com Pielonefrite Aguda.	Investigar doença renal; considerar urocultura.
<b>Cilindros Granulosos</b>	Compostos por detritos celulares, fragmentos celulares de necrose ou degeneração das células renais. Os grânulos podem variar em tamanho e forma, e são opacos, podendo aparecer entre cinza, amarelo e preto.	Em animais domésticos, estes são o tipo mais comum encontrado na urina, e indicam uma Lesão Renal Aguda recente. Podem ser observados quando: ocorre a lise das células renais e os fragmentos celulares são incorporados na matriz mucoprotéica; as células renais são descamadas intactas, contudo as mesmas envelhecem antes do cilindro ser libertado na urina; as proteínas passam pelo glomérulo e são incorporadas na matriz mucoprotéica dando uma aparência granular.	Investigar para doença renal recente ou ativa, revendo o historial clínico, os achados do exame físico e os resultados de procedimentos diagnósticos adicionais, como hemograma, perfil bioquímico e imagem do trato urinário. A urocultura também deve ser considerada, especialmente se forem identificados sinais clínicos sugestivos de infeção.

<b>Cilindros Céreos</b>	São cilindros hialinos desintegrados e consolidados nos túbulos renais, sendo mais espessos e densos que estes. São muito frágeis e têm uma aparência homogênea, podendo ser incolores, cinza ou amarelo claro.	Achado incomum na urina, e pode ocorrer devido à degeneração contínua de elementos celulares presos na matriz e retidos nos túbulos renais por um período prolongado de tempo após Lesão Renal Aguda ou nos estágios posteriores de uma Lesão Renal Crônica ativa.	Investigar doença renal, especialmente doença renal de longa duração.
<b>Cilindros Lipídicos</b>	Compostos por gotículas lipídicas, que podem variar em tamanho e ser transparentes ou amareladas.	São mais comuns em gatos e cães diabéticos, devido à presença de células tubulares renais gordurosas nestes animais. Quando ocorre a degeneração destas células, a gordura é incorporada no cilindro, tal como acontece com os detritos celulares, portanto estes cilindros devem ser interpretados da mesma forma que os cilindros granulados.	Investigar doença renal recente ou ativa.
<b>Cilindros Mistos</b>	Os cilindros mistos contêm componentes de mais de um tipo de cilindros.	A interpretação é a mesma do que para os cilindros com componentes individuais.	Investigar as potenciais causas de cada um dos componentes do cilindro misto.

Tabela 10.4 Organismos presentes no sedimento urinário.

Fonte: Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. Atlas of canine and feline urinalysis. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.

	<b>Características distintas</b>	<b>Importância no diagnóstico</b>	<b>Próximos passos</b>
<b>Bactérias</b>	Na urina não corada, as bactérias podem apresentar-se sob a forma de bastonetes e cocos, sendo os últimos mais difíceis de diferenciar de detritos amorfos. Geralmente, as bactérias possuem movimento.	Normalmente, a urina na bexiga é estéril. A presença de grande número de bactérias na urina fresca colhida por cistocentese é sugestiva de infecção do trato urinário. Habitualmente, há um aumento correspondente nos leucócitos (piúria) presentes no sedimento urinário junto com as bactérias. Números elevados de bactérias sem piúria sugerem contaminação bacteriana. No entanto, ocasionalmente, infecções bacterianas podem ocorrer com poucos leucócitos presentes, especialmente em animais diabéticos ou imunossuprimidos.	A urocultura deve ser realizada sempre que existe uma indicação de possível infecção urinária, contudo, em pacientes com condições predisponentes à infecção do trato urinário, como hiperadrenocorticismos, doença renal e <i>diabetes mellitus</i> , a mesma deve ser realizada periodicamente, mesmo quando bactérias e/ou células inflamatórias não são observadas no exame de sedimento urinário.
<b>Hifas fúngicas</b>	As hifas fúngicas podem apresentar ou não divisões entre segmentos e podem ou não ter estruturas terminais. As hifas poderão assemelhar-se a bactérias filamentosas, contudo estas últimas são geralmente menores em diâmetro.	As hifas são frequentemente consideradas contaminantes. Infecções fúngicas do trato urinário são incomuns, porém <i>Candida spp.</i> é o mais frequentemente relatado.	Repita o exame de urina com uma amostra de urina fresca e confirme a presença de organismos fúngicos. Envie uma amostra de urina obtida adequadamente para cultura de fungos. Aconselha-se a revisão do historial clínico, dos achados do exame físico, do hemograma completo, do perfil bioquímico e dos resultados de exame de urina para caracterizar quaisquer fatores predisponentes.

<b>Leveduras</b>	As leveduras são pequenas e redondas, e geralmente são mais variáveis em tamanho e mais refrativas do que os eritrócitos.	As leveduras são geralmente consideradas artefactos. Raramente, um organismo micótico sistêmico patogênico, como <i>Blastomyces spp.</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> ou <i>Candida spp.</i> coloniza o trato urinário ou genital e pode ser encontrado na urina.	O mesmo que para hifas fúngicas.
<b><i>Dioctophyma renale spp.</i></b>	Os ovos de <i>Dioctophyma renale</i> são ovais e têm casca grossa. Hematúria e/ou piúria também podem ser observadas no sedimento urinário de cães infetados.	Raramente, os cães podem ser parasitados com <i>Dioctophyma renale</i> através do consumo de peixes infetados. Após a ingestão, as larvas de penetram no duodeno e migram até o rim, onde amadurecem. A detecção de ovos de <i>Dioctophyma renale</i> na urina indica que uma fêmea grávida está presente no trato urinário do animal.	Estudos de imagem (radiografia, ultrassonografia, ressonância magnética) são úteis para determinar a localização do parasita. A nefrectomia é frequentemente recomendada se um rim estiver envolvido.
<b><i>Capillaria spp.</i></b>	Os ovos de <i>Capillaria spp.</i> são incolores e ovais, com uma superfície levemente pontiaguda e opérculos bipolares. Hematúria e piúria podem ser observados no sedimento urinário de cães ou gatos infetados. <i>Capillaria spp.</i> adulta pode ser encontrada no sedimento urinário. São pequenos parasitas filiformes, amarelados, com 13 a 60 mm de comprimento.	Encontrar ovos ou adultos de <i>Capillaria spp.</i> indica infecção, e esta é geralmente encontrada na bexiga. Embora a maioria dos cães e gatos seja assintomática, alguns podem apresentar polaciúria, incontinência urinária e micção inadequada. São transmitidas aos seus respectivos hospedeiros pela ingestão de minhocas que contêm as larvas de primeiro estágio. As larvas migram do intestino para a bexiga urinária, onde são incorporadas no epitélio da bexiga urinária.	Avaliar a condição do animal infetado de acordo com os sinais clínicos e tratar adequadamente. A maioria dos cães e gatos infetados é assintomática, e os ovos de <i>Capillaria spp.</i> são descobertos acidentalmente no sedimento urinário. Os tratamentos relatados incluem levamisol, fenbendazol, albendazol e ivermectina.
<b>Microfilária</b>	As microfilárias de <i>Dirofilaria immitis</i> são ocasionalmente encontradas no sedimento urinário. Têm 307–322 µm de comprimento e 6–7 µm de largura. As microfilárias têm uma extremidade posterior reta e uma extremidade anterior delgada.	Indica infecção por dirofilariose ( <i>heartworm infection</i> ).	Se desejado, o teste de antígeno de <i>Dirofilaria immitis</i> pode ser realizado para confirmar o diagnóstico. Avaliação adicional da condição do animal infetado deve ser realizada, incluindo hemograma, perfil bioquímico e radiografia torácica, seguida de tratamento adequado.

**Tabela 10.5 Outros achados e artefactos (contaminantes) presentes no sedimento urinário.**

Fonte: Rizzi TE, Valenciano A, Bowles M, Cowell R, Tyler R, DeNicola DB. Atlas of canine and feline urinalysis. 1st Edition. Wiley-Blackwell; 2017. 185 p.

	<b>Características distintas</b>	<b>Importância no diagnóstico</b>
<b>Pólen</b>	Os grãos de pólen são geralmente de forma redonda a oval e podem ter uma tonalidade amarela ou castanha.	Amostras de urina de colheita livre podem conter grãos de pólen que podem ser erradamente identificados como ovos de parasitas ou cristais bizarros.
<b>Esporos de fungos</b>	Os esporos de fungos são geralmente redondos ou ovais, podem ter uma tonalidade amarela ou acastanhada e às vezes podem ter septos internos.	Amostras de urina de colheita livre podem conter esporos fúngicos não patogênicos que podem ser erradamente identificados como ovos de parasitas ou cristais bizarros.

<b>Muco</b>	Os filamentos de muco são estruturas longas e finas com baixo índice de refração na urina não corada.	Os filamentos de muco podem ser erradamente identificados como cilindros granulares ou hialinos, <i>Capillaria spp.</i> adulta ou microfilárias. Avalie a urina do paciente em busca de outras evidências de inflamação do trato urinário para ajudar a confirmar que as estruturas observadas são provavelmente compostas de muco e avaliar a necessidade de procedimentos diagnósticos adicionais.
<b>Gotículas Lipídicas</b>	São estruturas esféricas brilhantes de tamanho variável com contornos externos suaves.	O sedimento urinário de gatos ou cães diabéticos geralmente contém gotículas lipídicas, provavelmente devido ao conteúdo lipídico das células renais.
<b>Espermatozoides</b>	Os espermatozoides têm cabeças ovais e caudas longas e finas.	Podem ser um achado acidental na urina de machos. Ocasionalmente, podem ser encontrados em amostras de urina de fêmeas após a reprodução.
<b>Bolhas de ar</b>	As bolhas de ar parecem círculos planos e não brilham.	As bolhas de ar ocorrem quando o ar fica preso entre a lamela e o sedimento de urina quando esta é colocada sobre a urina.
<b>Fibras</b>	São estruturas tipicamente lineares que podem ter margens variáveis.	São consideradas um achado acidental, resultante da contaminação da amostra de urina.

### **Procedimento de preparação e análise de cartas no analisador VITEK® 2 Compact da Biomérieu<sup>31,41</sup>:**

- A suspensão é preparada no tubo de ensaio utilizando uma solução salina estéril (NaCl 0,45%) juntamente com as respectivas colónias isoladas da amostra, de modo a obter a turvação requerida.

- A turvação é medida no aparelho *DensiCheck™* (da *Biomérieux*) e deve-se encontrar dentro dos valores específicos da escala de McFarland ().

- Para a aplicação do TSA, são retirados 145µL no caso de bactérias de GN e 280µL no caso de bactérias de GP da solução anteriormente preparada e verificada com a escala de McFarland para um novo tubo que também contém NaCl 0,45%, de modo a fazer a diluição necessária.

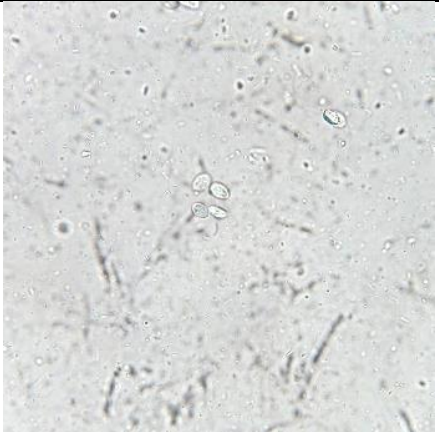
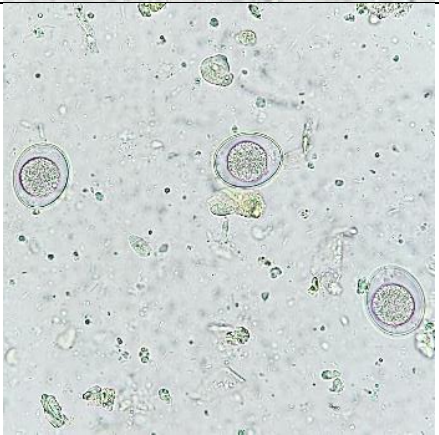
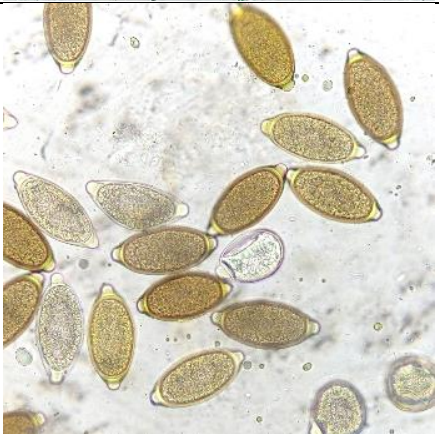

- Posteriormente, a cassete contendo as cartas é colocada na estação de enchimento para iniciar o ciclo de enchimento, em que os poços das cartas são inoculados automaticamente através da câmara de vácuo.




- De seguida, é transferida para a estação de introdução de forma a ocorrer o seu processamento, com leitura do código de barras de cada carta e respetiva cassete. Cada carta é colocada numa posição do carrocel onde ocorre o período de incubação e depois são transportadas para o sistema ótico de 15 em 15 minutos para ser efetuado a monitorização do crescimento e atividade dos microrganismos no interior dos poços.

- Portanto, o sistema ótico utiliza luz visível que faz a leitura de luz inicial do poço, isto é, antes da fase de crescimento do microrganismo e depois a cada 15 minutos mede a transmissão de luz dos poços, permitindo medir o crescimento do microrganismo pela quantidade de luz que é impedida de atravessar o poço.

- No final, quando os testes são concluídos o sistema ejeta as cartas.

Tabela 10.6 Descrição dos parasitas fecais mais comuns em animais.

Parasita	Descrição	Imagem (ampliação 400x)
<i>Giardia spp.</i>	É um protozoário microscópico. Os cistos têm forma elipsoidal, com a presença de corpos em formato de meia-lua no seu interior. Estão presentes em cães e gatos.	
<i>Isospora spp.</i>	É uma espécie de coccídeo. Os oocistos são muito claros e transparentes e apresentam um ou dois esporocistos no interior. Estão presentes em cães e gatos.	
<i>Capillaria spp. / Trichuris spp.</i>	São espécies de nematoides. Os ovos têm uma casca fina, castanha e um opérculo em cada extremidade do ovo. Os ovos de <i>Capillaria spp.</i> são geralmente mais pálidos e mais pequenos que os ovos de <i>Trichuris spp.</i>	
<i>Ancylostoma spp.</i>	É uma espécie de nematoide. Os ovos têm uma casca fina e transparente e possuem uma massa embrionária no interior com aspecto de mórula. Estão presentes em cães e gatos.	

<p><i>Toxocara spp.</i></p>	<p>É uma espécie de ascarídeo (nematoide). Os ovos têm uma casca espessa, rugosa e densa e contêm uma célula unitária. Estão presentes em cães e gatos.</p>	
<p><i>Strongyloides spp.</i></p>	<p>É uma espécie de larva intestinal. Apresenta uma curvatura, e pode ser diferenciada de <i>Aelurostrongylus spp.</i>, pela ausência de espícula no final da cauda. Estão presentes em cães e gatos.</p>	
<p><i>Aelurostrongylus spp.</i></p>	<p>É uma espécie de larva de parasitas pulmonares de gatos. Normalmente, são expelidos, por tosse, para a faringe, sendo então deglutidos, e podendo aparecer nas fezes. As larvas apresentam uma espícula no final da cauda.</p>	
<p><i>Parascaris spp.</i></p>	<p>É uma espécie de ascarídeo (nematoide). Os ovos têm uma casca espessa e contêm uma única célula. Estão presentes em equinos.</p>	



<p><i>Ascaridia spp.</i></p>	<p>É uma espécie de ascarídeo (nematóide). Os ovos são caracterizados por ter uma casca espessa, lisa e elipsoidal, composta por três camadas distintas. Estão presentes em aves.</p>	
<p><i>Eimeria spp.</i></p>	<p>É uma espécie de coccídeo. Os oocistos podem ser reconhecidos pelo seu aspeto granular. Estão presentes em aves e coelhos.</p>	

Tabela 10.7 Escalas qualitativas para a comparação de resultados, nos parâmetros da bilirrubina, corpos cetónicos, urobilinogénio e nitritos.

Tira	Parâmetro	Escala	Resultados				
Multistix® 10 SG da Siemens Healthineers	Bilirrubina	Qualitativa	Negativa	Baixa	Moderada	Elevada	
	Corpos cetónicos	Qualitativa	Negativo	Indícios	Baixo	Moderado	Elevado
	Urobilinogénio	Qualitativa	Normal			Elevado	
	Nitritos	Qualitativa	Negativo			Positivo	
AUTION Sticks 10EA da Arkray	Bilirrubina	Qualitativa	Negativa	Baixa	Moderada	Elevada	
	Corpos cetónicos	Qualitativa	Negativo	Indícios	Baixo	Moderado	Elevado
	Urobilinogénio	Qualitativa	Normal			Elevado	
	Nitritos	Qualitativa	Negativo			Positivo	

Tabela 10.8 Escalas qualitativas e semiquantitativas para a comparação de resultados, nos parâmetros das proteínas e da glicose.

Tira	Parâmetro	Escala	Resultados					
Multistix® 10 SG da Siemens Healthineers	Proteínas	Qualitativa	Negativo	+ -	1+	2+	3+	4+
		Semiquantitativa (mg/dL)	0	15	30	100	300	2000
	Glucose	Qualitativa	Negativo	+ -	+	++	+++	++++
		Semiquantitativa (mg/dL)	0	100	250	500	1000	2000
AUTION Sticks 10EA da Arkray	Proteínas	Qualitativa	Negativo	+ -	1+	2+	3+	4+
		Semiquantitativa (mg/dL)	0	15	30	100	300	1000
	Glucose	Qualitativa	Negativo	+ -	1+	2+	3+	4+
		Semiquantitativa (mg/dL)	0	50	100	200	500	1000

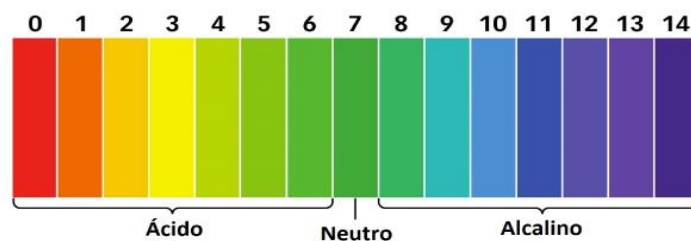


Figura 10.1 Valores efetivos de pH e agrupamento por classificação.