

QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE PROTEÍNA C REATIVA (PCR) EM CÃES COM ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO DAS FIO

QUANTIFICATION OF SEROLOGICAL LEVELS OF C REACTIVE PROTEIN (PCR) IN DOGS WITH HEMATOLOGICAL CHANGES TAKEN IN VETERINARY HOSPITAL FACULDADES INTEGRADAS DE OURINHOS (FIO) COLLEGE

ARAUJO, R.R¹; ALBANO H.N¹; ALMEIDA B.F.M²; LIMA, M.R.M.B²; BARROS, L.F²; GATTI, L. L¹.

¹Curso de Farmácia – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

²Laboratório Clínico, Hospital Veterinário – Faculdades Integradas de Ourinhos-FIO/FEMM

RESUMO

O sistema imunológico protege o animal ao processo infeccioso ou inflamatório produzindo uma série de proteínas inflamatórias agudas, com funções inespecífica, denominadas de proteínas de fase aguda, entre as quais pode-se citar a Proteína C-Reativa (PCR). O presente trabalho teve como objetivo investigar a correlação entre as alterações dos parâmetros hematológicos em cães e a presença de PCR na circulação sanguínea. Amostras de sangue de 17 cães atendidos em um Hospital Veterinário Universitário foram submetidas ao hemograma e à quantificação da PCR. Até o presente momento das análises realizadas somente duas amostras apresentaram alteração quanto ao nível sério da PCR, como resultados preliminares. As amostras estão sendo coletadas de acordo com a rotina Ambulatorial e Laboratoriais e serão submetidas as análises sorológicas, bem como correlação dos dados estatísticos e Hematológicos. Segundo dados da literatura a PCR não dispensa a realização do Hemograma para determinação dos processos inflamatórios, porém com a padronização da técnica e comprovação dos aumentos em animais a mesma pode ser utilizada como uma ferramenta que auxiliará o Médico Veterinário na determinação de processos inflamatórios.

Palavra-chave: Proteína C Reativa. Hemograma. Inflamação.

ABSTRACT

The immune system protects the animal to the infectious or inflammatory process producing a series of acute inflammatory proteins with nonspecific functions, called acute phase proteins, among which we can mention C-reactive protein (CRP). The present work aimed to investigate the correlation between changes in hematological parameters in dogs and the presence of CRP in the blood circulation. Blood samples from 19 dogs attended at a University Veterinary Hospital were submitted to blood counts and quantification of CRP. Up to the present moment of the analyzes performed only two samples showed alteration as to the serious level of the CRP, as preliminary results. Samples are being collected according to Outpatient Clinic and Laboratory and will be subjected to serological tests, as well as correlation of statistical and hematological data. According to literature data, the PCR does not dispense the Hemogram for the determination of the inflammatory processes, but with the standardization of the technique and confirmation of the increases in animals, it can be used as a tool that will assist the Veterinarian in the determination of inflammatory processes.

Keywords: C Reactive Protein. Blood Count. Inflammation.

INTRODUÇÃO

A resposta imunológica de fase aguda consiste em uma defesa do organismo, complexa e não específica que (mecanismos inatos), em geral, se desenvolve e termina rapidamente logo após alguma injúria tecidual (MURATA *et al.*, 2004). A origem desse mecanismo pode ser atribuída a uma resposta imunológica infecciosa,

neoplásica, ou traumática (MURATA *et al.*, 2004; CERÓN *et al.*, 2005). É considerada parte da resposta imune natural de defesa do organismo, responsável pela sobrevivência do hospedeiro durante a fase crítica e precoce, decorrente da exposição a diferentes microrganismos (PETERSEN *et al.*, 2004).

As alterações sistêmicas da fase aguda, no decorrer do processo inflamatório, incluem febre, elevação no número de leucócitos circulantes, alterações dos níveis de cortisol sanguíneos e variações nas concentrações plasmáticas, de um grupo de proteínas conhecidas como proteínas de fase aguda (MARTÍNEZ-SUBIELA *et al.*, 2001). As proteínas de fase aguda (PFA) são classificadas segundo suas características regulatórias positivas ou negativas, quando consideradas as concentrações detectadas na corrente sanguínea do organismo (MURATA *et al.*, 2004).

A Proteína C Reativa (PCR), sintetizada no fígado sob influência de citocinas como o fator de necrose para tumores (TNF), interferon- γ (INF- γ) e das interleucinas 1 (IL -1) e 6 (IL-6), que são produzidas por um grupo restrito de células, principalmente pelos macrófagos em resposta a estímulos externos (CERÓN *et al.*, 2005). A mesma foi descoberta no ano de 1930, recebendo tal denominação devido à reação que acontecia com o polissacarídeo – C dos pneumococos presentes na pneumonia pneumocócica, quando em fase aguda, a proteína se caracteriza pela capacidade de precipitação frente ao polissacarídeo C, isolado do pneumococo; está presente no soro, durante a evolução de diversos processos inflamatórios, em especial de caráter agudo (AGUIAR *et al.*, 2013).

A PCR tem um importante papel na interação entre a resposta imune intata e específica, atuando na opsonização, interação com receptores específicos da fagocitose, ativação da via clássica do complemento, síntese de citocinas e, por fim, atuando na regulação da resposta imunológica do hospedeiro (DU CLOS & MOLD, 2001).

No diagnóstico veterinário, a presença de processos inflamatório se confirma através da realização de um hemograma, o qual necessita, invariavelmente, de amostras coletadas adequadamente e que apresentem excelente padrão de qualidade, evitando-se, assim, a geração de resultados inconsistentes e duvidosos. Nesses casos, a utilização de outros biomarcadores do processo infeccioso e/ou inflamatório, mais rápidos, práticos e de reduzido custo, assumem um papel que poderia auxiliar o clínico para a elaboração tanto de um

diagnóstico, como para o prognóstico e monitoramento de terapias antimicrobianas em cães (EKERSALL & BELL, 2010). Até o presente momento, a literatura ainda é escassa e/ou inconsistente sobre a interação entre as alterações nos parâmetros hematológicos e a presença das PCR, principalmente da Proteína C-Reativa (BURTON *et al.*, 1994).

Atualmente, no Brasil, não há kits disponíveis específicos para a espécie canina passíveis de serem utilizados na detecção da Proteína C-Reativa e, considerando as dificuldades de importação desse tipo de material, seja pelas restrições alfandegárias e/ou pelo elevado custo, a utilização dessa ferramenta torna-se inviável, principalmente nas clínicas veterinárias do país. Na última década, a comunidade científica internacional, através de uma forte corrente, vem demonstrando a possibilidade da utilização de reagentes heterólogos, principalmente os utilizados para humanos, para a detecção da PCR em cães.

O presente trabalho tem como objetivo padronizar e avaliar a presença da PCR, por meio da técnica de aglutinação em látex e sua possível associação com alterações hematológicas em caninos, visando, assim, difundir a ideia da sua utilização como um método auxiliar na determinação de processos inflamatórios e monitoramento terapêutico.

MATERIAL E MÉTODOS

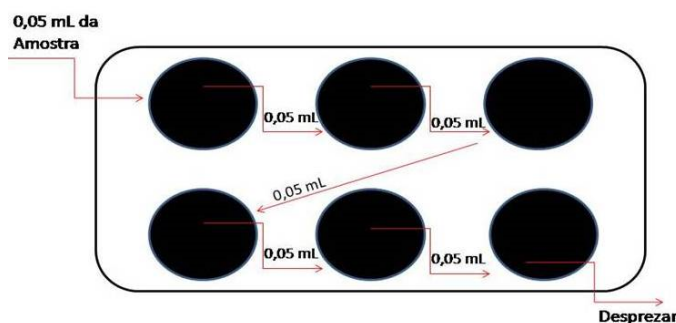
Estão sendo utilizadas amostras de soro provenientes da soroteca do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário das FIO, de animais com alterações Hematológicas no Leucograma, de acordo com a demanda de realização de exames hematológicos nestes cães e que apresentam alterações hematológicas de interesse, são avaliadas pelo médico veterinário responsável, os quais foram submetidos anteriormente a realização de Exames Laboratoriais à pedido do Médico Veterinário responsável. Na qual será realizada a pesquisa para detecção da Proteína C Reativa, utilizando a técnica de aglutinação em látex conforme descrição do fabricante (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda).

Procedimento Técnico

A detecção da Proteína C Reativa, será realizada através da técnica de aglutinação em látex conforme descrição do fabricante (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda), conforme protocolo abaixo :

- 1- **Prova qualitativa:** Inicialmente foi necessário deixar que o reagente e as amostras adquirissem temperatura ambiente;
- 2- Pipetado uma gota (0,05mL) da amostra e uma gota dos controles positivos e negativos (0,04mL) e adicionados nas delimitações da lâmina. Em seguida agitou-se o reagente Látex e adicionou-se uma gota (0,04mL) deste na amostra e nos controles, sendo homogeneizado a seguir com os bastões próprios do kit.
- 3- Agitado a lâmina manualmente por 2 minutos, e logo após foi realizada a leitura, onde foi constatado a presença de aglutinação das partículas do látex, a amostra sendo caracterizada como positiva e a não aglutinação, negativa.
- 4- **Prova quantitativa:** Posteriormente, as amostras que apresentaram positividade foram preparadas uma série de diluições do soro entre 1:2 e 1:128, numerando 7 tubos (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 e 1:128), a seguir acrescentar 0,05mL do tampão glicina em cada um deles, e 0,5mL da amostra no primeiro tubo, homogeneizando e transferindo desta diluição para o próximo tubo, e assim por diante desprezando a próxima alíquota (Figura 1).
- 5- Cada diluição foi testada conforme disposto pelo teste qualitativo.
- 6- O título é considerado como recíproca a maior diluição que apresentou reação positiva.

Figura 1. Esquema representativo da Diluição seriada do soro para determinar o título de PCR no soro.



RESULTADOS PARCIAIS

A detecção da PCR no soro de cães é um claro indicativo da presença de um processo infeccioso e ou inflamatório no animal. A cinética da PCR consiste em uma resposta intensa, rápida e principalmente de curta duração. Dependendo do estágio do processo infeccioso, o pico nos níveis da PCR no sangue pode ser observado juntamente com alterações hematológicas (leucocitoses e neutrofilias). Até o momento foram analisados sorologicamente 17 amostras de cães que apresentaram alterações leucocitárias de interesse laboratorial. Os testes foram realizados de acordo com protocolo acima e demonstrado o resultado na figura 1 abaixo.

Figura 1. Resultados da Reação de Aglutinação com Partículas de Látex para determinação de níveis alterados da PCR no soro. Amostras demonstradas nas setas apresentaram positividade para PCR aumentada no soro dos cães. Sensibilidade do teste 6,5 mg/dl



A partir das amostras positivas as mesmas foram tituladas, através de diluição seriada para demonstrar o título da PCR aumentada, sendo que foi observados, até o momento das 17 amostras selecionadas, somente 2 amostras positivas (10%), com uma titulação de 1:16 (104 mg/dl) e 1:2 (13mg/dl) respectivamente. As amostras estão sendo coletadas diariamente conforme rotina do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário das FIO, e as sorologias realizadas as quais posteriormente serão confrontadas com as alterações hematológicas observadas.

CONCLUSÃO

Segundo dados da literatura a PCR não dispensa a realização do Hemograma para determinação dos processos inflamatórios, porém com a padronização da técnica e comprovação dos aumentos em animais a mesma pode ser utilizada como uma ferramenta que auxiliará o Médico Veterinário na determinação de processos inflamatórios.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, F.J.B.; FERREIRA JUNIOR M.; SALES, M.M.; CRUZ NETO, M.L.; FONSECA, M. A.L.; SUMITA, M.N.; DUARTE, C.J.N.; LICHTENSTEIN, A.; DUARTE, S.J.A. Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** v.59, n.1, p.85-92, 2013.

BURTON, S.A.; HONOR, D.J, MACKENZIE, A.L.; ECKERSALL, P.D, MARKHAM, R.J, HORNEY, B.S. C-Reactive protein concentration in dogs with inflammatory leukograms. **American Journal of Veterinary Research**, v. 55, p. 613-618, 1994.

CERÓN, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MATÍNEZSUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.2, p. 85-99, 2005.

DU CLOS, T.W.; MOLD, C. The role of C-reactive protein in the resolution of bacterial infection. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.14, p.289–293, 2001.

ECKERSALL, P.D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **The Veterinary Journal**, v.185, p.23–27, 2010.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; PARRA, M.D.; CERON, J.J. Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. **Anales de Veterinaria de Murcia**, v.17, p. 99–116, 2001.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. **The Veterinary Journal**, v. 168, p. 28-40, 2004.

PETERSEN, H.H.; NIELSEN, J.P.; HEEGAARD, P.M.H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v.35, p. 163-187, 2004.