



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS PROFISSIONAL

**VALIDAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS E  
BIOQUÍMICOS ESTABELECIDOS PARA ESPÉCIE CANINA**

**NATÁLIA RODRIGUES MARQUES**

BELEM – PA

2020

**NATÁLIA RODRIGUES MARQUES**

**VALIDAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS E  
BIOQUÍMICOS ESTABELECIDOS PARA ESPÉCIE CANINA**

Artigo e nota técnica apresentados para a conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Vivina Barros Monteiro

BELÉM – PA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará  
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)  
autor(a)

---

M357v Marques, Natália  
Validação dos intervalos de referência hematológicos e  
bioquímicos estabelecidos para espécie canina / Natália  
Marques. — 2020.  
43 f.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Vivina Monteiro  
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em  
Análises Clínicas, Instituto de Ciências Biológicas,  
Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

1. Intervalos de referência. 2. Diagnóstico laboratorial.  
3. Validação. I. Título.

CDD 570

---

**NATÁLIA RODRIGUES MARQUES**

**VALIDAÇÃO DOS INTERVALOS DE REFERÊNCIA HEMATOLÓGICOS E  
BIOQUÍMICOS ESTABELECIDOS PARA ESPÉCIE CANINA**

Artigo e nota técnica apresentados para a conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas Profissional do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Orientador:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Vivina Monteiro  
ICB-UFPA

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália da Silva e Silva  
Instituto de Medicina Veterinária Campus Castanhal-UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cassia Mousinho Ribeiro  
ICB-UFPA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Joia de Mello  
ICB-UFPA

Belém, 28 de Fevereiro de 2020

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me dar o dom da vida, força e resignação nos momentos difíceis e saúde para viver.

Aos meus pais, pelo amor, carinho e compreensão que me foram dados, por todo o apoio, o incentivo, paciência e dedicação.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vivina Monteiro pela dedicação, carinho e paciência, e que mesmo com tantas atividades aceitou me orientar com muita cordialidade e competência.

À banca avaliadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Mousinho, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Joia e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Natália Silva por terem aceitado participar avaliando o meu trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Reis e Prof. Dr. Inácio Lemos, da Faculdade de Medicina Veterinária, pela compreensão e apoio durante o curso.

Ao Prof. Dr. Leonidas Olegário e Prof. Dr. Plácido Ramos do Instituto de Medicina Veterinária pelo incentivo no decorrer do curso.

Aos meus amigos do Instituto de Medicina Veterinária Adriana Dias, Bruna Antunes, Marcio Benício e Juciana Cardoso pelo incentivo, apoio e amizade.

Aos Meus amigos Veterinários Yaçã Capela e Yuri Borges pela ajuda nas pesquisas e coletas e pelo companheirismo de sempre.

Aos proprietários do Hotel Muvucão (Maurício Dantas e Etiene Chucre), Gleiciany Silva de Almeida, Rita Mousinho, Daniella Kaísa Bezerra e Marcus Garcia pela disponibilização dos animais para participação no estudo.

A Médica Veterinária Marina Brito por auxiliar na seleção e coleta de amostras dos animais.

Ao Laboratório de Análises Clínicas-Divisão Veterinária (LACVet) do Instituto de Ciências Biológicas da UFPA pela realização das análises bioquímicas e hematológicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas Profissional da UFPA pela oportunidade de cursar o mestrado e pelo apoio na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>9</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>10</b>
2.1 Local de Realização .....	10
2.2 Animais .....	10
2.3 Coleta das amostras .....	11
2.4 Análises hematológicas e bioquímicas.....	11
2.5 Protocolo de validação e determinação de intervalos de referência .....	12
2.6 Ética .....	14
<b>3 RESULTADOS .....</b>	<b>14</b>
<b>4 DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
ANEXO 1- Questionário aplicado para tutores dos animais .....	26
ANEXO 2 - Certificado de Autorização do CEUA-UFPA .....	29
ANEXO 3 - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	31
ANEXO 4 – Nota Técnica.....	33

## RESUMO

Os exames hematológicos e bioquímicos auxiliam no diagnóstico e prognóstico de várias doenças veterinárias. Para correta interpretação desses exames é indispensável que os intervalos de referência (IRs) estabelecidos para a espécie sejam comparados com os resultados dos pacientes. Dessa forma, é importante que esses intervalos sejam confiáveis e, de preferência, estabelecidos por cada laboratório. A determinação de IRs próprios é um processo demorado, trabalhoso e oneroso. Assim, uma alternativa é validar os já estabelecidos e disponíveis na literatura. A metodologia proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) já foi utilizada para cães, e a *American Society for Clinical Veterinary Pathology* (ASCPV) disponibiliza recomendações para orientar a determinação e validação de IRs para espécies animais. No Brasil os IRs hematológicos e bioquímicos utilizados rotineiramente para cães foram estabelecidos há bastante tempo em outras regiões geográficas e, provavelmente, não retratam a realidade atual. Assim, os objetivos do trabalho foram: validar IRs para hematologia e bioquímica sanguínea de cães criados na Amazônia Oriental e estabelecer, para os parâmetros não validados, novos IRs. Foram utilizadas amostras de 44 cães adultos clinicamente saudáveis, de diferentes raças e sexos. Para validação foi usada a metodologia proposta pelo CLSI e na determinação dos IRs dos parâmetros não validados utilizou-se metodologia estatística proposta pela ASCPV. Foram submetidos ao processo de validação um total de 25 parâmetros (13 hematológicos e 12 bioquímicos). Desse total, seis (24%) parâmetros não foram validados (Hemoglobina, CHGM, eosinófilos, linfócitos, albumina e GGT) e para estes foram estabelecidos novos intervalos. Para a maioria (76%) dos parâmetros hematológicos e bioquímicos os IRs estabelecidos previamente na literatura ainda são válidos para utilização em cães criados na Amazônia Oriental. Para os parâmetros não validados, apenas para eosinófilos e linfócitos recomendamos que outros trabalhos, com um número maior de animais, sejam realizados para confirmar os nossos resultados ou estabelecer novos IRs. Os IRs estabelecidos para hemoglobina, CHGM, albumina e GGT podem ser utilizados em substituição aos intervalos antigos.

**Palavras chave:** Intervalo de referência. Diagnóstico laboratorial. Validação.

## ABSTRACT

Hematological and biochemical help in the diagnostics and prognostics of many veterinary diseases and for their correct understanding it is essential that the reference ranges (IRs) established for the species be compared with the patients' results. In this way, it is important that these intervals be reliable and preferably established by each laboratory. The determination of own IRs is a time consuming, laborious and costly process, so, an alternative is to validate those already established and available in the literature. The methodology proposed by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) has already been used in dogs, and the American Society for Clinical Veterinary Pathology (ASCPV) provides recommendations to guide the determination and validation of IRs for animal species. In Brazil the hematological and biochemical IRs routinely used for dogs have been established for a long time in other geographical regions and probably do not reflect the current reality. Therefore, the objectives of the work were: to validate RTIs for hematology and blood biochemistry of dogs created in the Eastern Amazon and to establish, for the non-validated parameters, new RTIs. It was used samples of 44 clinically healthy adult dogs of different breeds and sexes. The methodology proposed by CLSI was used for validation and for the determination of the IRs for the non-validated parameters the statistical methodology proposed by ASCPV was used. A total of 25 parameters (13 hematological and 12 biochemical) were submitted to the validation process. Of this total, six (24%) parameters were not validated (Hemoglobin, CHGM, eosinophils, lymphocytes, albumin and GGT), which established new intervals. For most (76%) of the hematological and biochemical parameters the IRs previously established in the literature are still valid for use in dogs bred in Eastern Amazonia. For non-validated parameters, only for eosinophils and lymphocytes we recommend that other works, with a larger number of animals, are performed to confirm our results or establish new IRs. The IRs established for hemoglobin, CHGM, albumin and GGT can be used in place of the old ranges.

**Key words:** Reference interval. Laboratory diagnosis. Validation.

## 1 INTRODUÇÃO

O diagnóstico laboratorial é um instrumento útil na investigação de várias enfermidades, além de dar apoio e orientar nos resultados do tratamento. Tanto os exames hematológicos quanto os bioquímicos, auxiliam no diagnóstico e prognóstico de várias doenças veterinárias (RAHMAN, 2018).

A interpretação dos exames hematológicos e bioquímicos e deve levar em consideração a anamnese e os dados obtidos no exame clínico. Além disso, é indispensável que os intervalos de referência (IRs) estabelecidos para a espécie sejam comparados com os resultados dos pacientes (BIRGEL JÚNIOR et al. 2001, RUSSEL & ROUSSEL, 2007). O intervalo de referência é um recurso de fundamental importância no parecer médico e pode ser o meio mais utilizado para tomada de decisão na avaliação do paciente (GEORGE, et al. 2010).

Os Irs são determinados a partir de animais saudáveis, utilizando metodologias padronizadas, cálculos estatísticos e representam uma estimativa dentro da qual 95% dos indivíduos clinicamente sadios devem ser encontrados (GEORGE et al. 2010). Fatores ambientais, raça, idade, gênero, manejo, nutrição, e estado fisiológico são causas de variações nos Irs obtidos para cães e outras espécies animais. Dessa forma, os Irs podem variar muito e, segundo Friedrichs (2010), é importante estabelecer esses intervalos levando em consideração os aspectos fisiológicos, geográficos e analíticos.

No Brasil, os Irs para exames laboratoriais usados na medicina são, na maioria dos casos, baseados na bibliografia internacional, porém esses intervalos podem divergir em muitos pontos da realidade nacional (FERREIRA & ANDRIOLO 2008). Na veterinária essa divergência também ocorre, sendo importante estabelecer Irs que se aproximem da realidade nacional ou, preferencialmente, regional. Segundo Russel & Roussel (2007), há uma maior credibilidade quando um intervalo de referência é definido a partir de amostras originadas da população da qual o paciente faz parte.

Estipular Irs próprios é mais dispendioso para sua execução, além de ser mais trabalhoso e requerer a utilização de um número significativo de animais. A validação de intervalos já existentes é uma alternativa, necessitando para isso de apenas 20 amostras de animais saudáveis (FERREIRA & ANDRIOLO 2008, GEORGE et al. 2010, OZARDA 2016).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), possui uma norma padrão para validação de Irs. A metodologia proposta pelo CLSI já foi utilizada para cães (NIELSEN et al. 2010). A American Society for Clinical Veterinary Pathology (ASCVP) disponibiliza recomendações para orientar a determinação e validação de Irs para espécies animais (FRIEDRICHS et al. 2012). O regulamento proposto pela ASCVP foi utilizado recentemente para cães de raças variadas (CHUNG et al. 2016) e especificamente para raça Sheepdog (RUGGERONE et al. 2018).

No Brasil os Irs hematológicos e bioquímicos utilizados rotineiramente para cães foram estabelecidos há bastante tempo em outras regiões geográficas e, provavelmente, não retratam a realidade atual. Nesse contexto, os objetivos desse trabalho foram: validar Irs para o hemograma e exames bioquímicos de cães criados na Amazônia Oriental, além de estabelecer intervalos próprios para os parâmetros não validados.

## **2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Divisão Veterinária (LAC-Vet) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – Campus Belém.

### **2.2 Animais**

Para compor a população de referência, foram utilizados 44 animais adultos (com mais de um ano de idade) de diferentes raças (SRD, Golden Retriever, Shitzu, Jack Russell, Pinscher, Pastor Belga, Yorkshire, Border Collie, Dogue Alemão) e sexos, que não apresentavam sinais de doença nas duas semanas anteriores ou seguintes à coleta de amostras. Para conhecer o histórico clínico dos animais os tutores responderam um questionário (ANEXO 1) com perguntas sobre alimentação, cirurgias recentes, histórico de doenças, uso de medicações, esquema completo de vacinação e vermifugação em dia.

Foram excluídos do estudo animais gestantes ou que estivessem amamentando, com doença clínica em curso, com lesões aparentes, ou fazendo uso de medicações como hormônios ou promotores de crescimento, indutores enzimáticos (corticosteróides ou antiepilépticos), entre outras drogas que poderiam interferir nos exames hematológicos e bioquímicos de acordo com o estabelecido por Friedrichs et al. (2012).

### 2.3 Coleta das amostras

Para a coleta de sangue os animais foram contidos fisicamente e, quando necessário, foram utilizadas fcinheiras. O sangue foi coletado preferencialmente por punção da veia cefálica, utilizando seringas e agulhas descartáveis.

Para realização dos hemogramas foram coletadas amostras de sangue (3 mL) em tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Após as coletas todas as amostras foram refrigeradas e imediatamente remetidas ao LAC-Vet. Todos os animais estavam em jejum de 8 horas antes da coleta.

Para a realização das dosagens bioquímicas foram coletadas amostras (3ml) em tubos sem anticoagulante. As amostras foram imediatamente remetidas ao laboratório e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos.

### 2.4 Análises hematológicas e bioquímicas

O sangue total foi utilizado para a determinação do hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global de hemácias, índices hematimétricos (VGM, HGM e CHGM), contagem global de plaquetas e contagem global de leucócitos. Foi utilizado um equipamento automatizado Humancount 30 (In vitro Diagnóstico) calibrado para espécie canina.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com Leishman. Foram contados 100 leucócitos, os quais foram diferenciados em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos. Os resultados obtidos foram expressos em valores absolutos (células/  $\mu$ L de sangue).

Para a realização das dosagens bioquímicas os soros obtidos foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até realização das análises (média de 15 dias após a coleta) de colesterol, triglicerídeos, glicose, uréia, creatinina, albumina, globulinas e proteínas

totais. Foi determinada a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT). As dosagens bioquímicas foram realizadas empregando Kits comerciais da marca INTERTECK KATAL em equipamento automatizado CM 200 (WINER LAB) utilizando as metodologias descritas no quadro 1. Amostras hemolisadas, lipêmicas ou ictéricas não foram processadas.

Quadro 1- Método de análise dos parâmetros bioquímicos

<b>Parâmetros</b>	<b>Método</b>
Albumina	Colorimétrico
ALT	Cinético UV
AST	Cinético UV
Colesterol	Enzimático colorimétrico
Creatinina	Enzimático colorimétrico
Fosfatase alcalina	Cinético
GGT	Cinético
Glicose	Enzimático colorimétrico
Globulinas	Cálculo (Proteína total – Albumina)
Proteínas totais	Enzimático colorimétrico
Triglicérides	Enzimático colorimétrico
Uréia	Enzimático colorimétrico

## 2.5 Protocolo de validação e determinação de intervalos de referência

Foram utilizados para validação os intervalos estabelecidos por Jain (1993) e Kaneko (1997) para o hemograma e os exames bioquímicos, respectivamente. O procedimento de validação seguiu o protocolo do CLSI (NIELSEN et al. 2010).

Foram selecionados, aleatoriamente, 20 animais clinicamente saudáveis e suas amostras foram usadas para validação de cada parâmetro hematológico ou bioquímico (1ª amostragem). O parâmetro foi considerado validado quando apenas duas amostras estavam fora do intervalo de referência estabelecido, ou seja, 10% do total. Quando cinco ou mais amostras estivessem fora do intervalo de referência este era imediatamente rejeitado. Caso o número de amostras divergentes fosse de três a quatro, uma nova amostragem foi realizada (2ª amostragem), utilizando outros 20 animais saudáveis e suas amostras foram submetidas ao mesmo procedimento

aplicado (Figura 1). Quando, após a segunda amostragem, os resultados permaneceram rejeitados um novo intervalo de referência foi calculado para cada parâmetro.

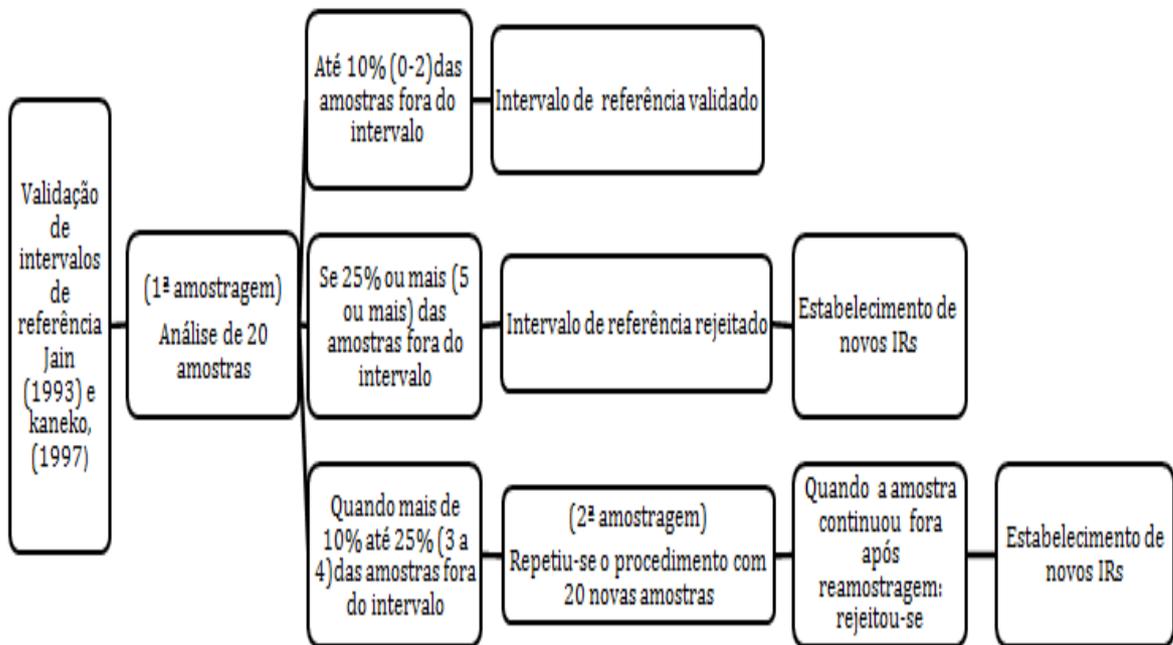


Figura.1. Procedimento de validação de intervalos de referência, adaptado de Nielsen et al. (2010).

Os IRs foram determinados usando o programa Excel com o suplemento Reference Value Advisor (versão 2.1). O software executa os cálculos de acordo com as recomendações do CLSI, conforme sugerido pelas diretrizes da ASCVP. Os IRs foram calculados usando um método não paramétrico que também calculou o intervalo de confiança (IC) de 90%, exceto quando o número de observações fosse menor de 40. Nesse caso, foi utilizado o método robusto com os dados transformados em Box - Cox, conforme recomendado pelo software. Estatística descritiva, testes de normalidade de acordo com o método de Anderson - Darling

com histogramas e Q - Q gráficos e transformação Box-Cox foram calculados. Para encontrar e remover outliers, foram utilizados os testes de Dixon - Reed e Tukey (Ruggerone et al. 2018).

## 2.6 ÉTICA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFGPA) recebendo o protocolo nº 1368140219 (ANEXO 2 ). Todos os tutores foram esclarecidos sobre os objetivos do projeto e assinaram um termo de consentimento (ANEXO 3) conforme exigido na Resolução Normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) nº 22 de 25 de junho de 2015.

## 3 RESULTADOS

Dos 44 cães utilizados no estudo 24 eram fêmeas e 20 machos de raças variadas. A idade dos cães variou entre um a nove anos ( $3,5 \pm 2,07$  anos).

Para os hemogramas foram descartadas duas amostras, uma por estar coagulada e outra pela detecção de microfilária no esfregaço sanguíneo. Para as análises bioquímicas três amostras hemolisadas foram descartadas e a amostra do animal com microfilária.

Foram submetidos ao processo de validação um total de 25 parâmetros (13 hematológicos e 12 bioquímicos). Desse total, 76% (19/25) dos intervalos foram validados e 24% (6/25) foram rejeitados.

Para os parâmetros hematológicos o número de observações fora dos IRs propostos por Jain (1993) está demonstrado na tabela 1. Com base nesses resultados, o método validou 69,2% (9/13) dos parâmetros. Os resultados obtidos para eosinófilos e hemoglobina foram rejeitados na primeira amostragem, com sete amostras fora do intervalo de referência. Os resultados de linfócitos e CHGM tiveram que ser submetidos a uma segunda amostragem e permaneceram não validados. Os demais parâmetros hematológicos foram validados no primeiro procedimento de amostragem. Para os quatro parâmetros não validados (CHGM, hemoglobina, linfócitos e eosinófilos) foram estabelecidos novos IRs (Tabela 3).

Tabela 1. Intervalos de referência (IRs) hematológicos estabelecidos por Jain (1993) para espécie canina e os resultados do procedimento de validação com o total de amostras utilizadas (n=20) e o total de amostras fora do intervalo de referência

Parâmetros	1ª amostragem	2ª amostragem	IRs Jain (1993)
Hemácia ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	2/20	-	5.5-8.5
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>7/20</b>	-	<b>12-18</b>
Hematócrito (%)	2/20	-	37-55
VCM (fl)	0/20	-	60-77
<b>CHGM (%)</b>	<b>3/20</b>	<b>4/20</b>	<b>32-36</b>
Leucócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0/20	-	6.0-17.0
Monócitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	2/20	-	0.15-1.35
<b>Linfócitos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>3/20</b>	<b>6/20</b>	<b>1.0 - 4.8</b>
Neut. Segm. ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1/20	-	3.0-11.5
Neut. Bast. ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0/20	-	0-0.30
<b>Eosinófilos (<math>\times 10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	<b>7/20</b>	-	<b>0.1-1.25</b>
Basófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0/20	-	Raros
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	2/20	-	200-500

OBS: Os valores em negrito indicam os parâmetros para os quais os IRs Jain (1993) foram rejeitados e o número de amostras que estavam fora do intervalo utilizado de acordo com a porcentagem estabelecida no protocolo; traços (-) indicam que as amostras não foram testadas na segunda amostragem

Para bioquímica foram validados 83,3% (10/12) dos parâmetros testados. Apenas dois (albumina e GGT) foram rejeitados na primeira amostragem, pois mais de cinco amostras estavam fora do intervalo de referência proposto por Kaneko (1997). Os resultados de proteína total e uréia tiveram que passar por uma segunda amostragem, pois três amostras ficaram fora do intervalo, e foram validados. Os demais parâmetros foram validados (tabela 2). Para albumina e GGT foram estabelecidos novos IRs que estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 2. Intervalos de referência (IRs) bioquímicos estabelecidos por Kaneko (1997) para espécie canina e o resultado do procedimento de validação com o total de amostras utilizadas (n=20) e o total fora do intervalo de referência

Parâmetros	1 <sup>a</sup> amostragem	2 <sup>a</sup> amostragem	IRs Kaneko (1997)
<b>Albumina (g/L)</b>	<b>9/20</b>	-	<b>26-33</b>
ALT (U/L)	0/20	-	0-102
AST (U/L)	1/20	-	0-66
Colesterol (mg/dl)	2/20	-	135-275
Creatinina (mg/dl)	0/20	-	0,5-1,5
Fosfatase alcalina(U/L)	2/20	-	0- 156
<b>GGT (U/L)</b>	<b>7/20</b>	-	<b>0- 10</b>
Glicose (mg/dl)	1/20	-	65-118
Globulinas (g/L)	2/20	-	27-44
Proteínas totais (g/L)	3/20	0/20	54-71
Triglicerídeos (mg/dl)	0/20	-	20-112
Uréia (mg/dl)	3/20	2/20	21-60

OBS: Os valores em negrito indicam os parâmetros para os quais os IRs Kaneko (1997) foram rejeitados e o número de amostras que estavam fora do intervalo utilizado de acordo com a porcentagem estabelecida no protocolo; traços (-) indicam que as amostras não foram testadas na segunda amostragem.

Tabela 3. Intervalos de referência (IRs) estabelecidos para os parâmetros não validados

Parâmetros	N	Média	Mediana	DP	Min.	Max.	outliers	IR (IC 90%)	IR (IC 90%)	Dist	Método
<b>Albumina (g/L)</b>	39	34	34	0,3	25	41	1	26 (24-29)	41 (39-42)	NG	Rob
<b>GGT (U/L)</b>	40	10,6	11	2,7	5	16	1	5 (5,0-6,0)	16 (15,0-16,0)	NG	NP
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	40	16,5	17	2,3	11,7	19,8	2	11,7 (11,7-12)	19,8 (19,3-19,8)	NG	NP
<b>CHGM (%)</b>	40	34,3	35,2	2,0	30	36	2	30 (30,2-30,5)	36 (36-36)	NG	NP
<b>Linfócitos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	39	3,81	3,70	1,39	1,44	7,37	3	1,5 (1,26-1,88)	7,0 (6,24-8,08)	NG	Rob
<b>Eosinófilos (x10<sup>3</sup>/μL)</b>	41	1,14	0,99	0,84	0,15	3,69	1	0,15 (0,15-0,27)	3,68 (2,65-3,69)	NG	NP

OBS: N = número de animais utilizados, DP= Desvio padrão, Min.= mínimo, Max= máximo, IR= intervalo de referência, IC= intervalo de confiança; Dist.= distribuição dos dados; NG= não gaussiana, Rob= método robusto; NP.= Não paramétrico.

## 4 DISCUSSÃO

Na prática veterinária o básico da interpretação dos exames laboratoriais é a comparação dos resultados do paciente com os IRs estabelecidos para a espécie. Dessa forma, os intervalos utilizados no laboratório devem ser confiáveis e representar a população atendida (Friedrichs et al. 2010). Apesar disso, a grande maioria dos laboratórios se preocupa apenas em empregar métodos de controle de qualidade da parte analítica e não dão a devida importância à validade dos IRs utilizados nos seus laudos (TATE et al. 2015).

Para cães os IRs estabelecidos por Jain (1993) e Kaneko (1997), são frequentemente utilizados nos laudos de exames. Esses intervalos foram estabelecidos há mais de 20 anos e podem não ser mais representativos da atual população canina. Assim, vários pesquisadores recomendam que cada laboratório estabeleça seus próprios IRs ou valide os que já estão disponíveis (FRIEDRICHS et al. 2010, TATE et al. 2015, OZZARDA, 2016).

O presente estudo utilizou o procedimento de validação proposto pelo CLSI e encontrou que, para a maioria dos resultados hematológicos e bioquímicos, os intervalos de Jain (1993) e Kaneko (1997) foram validados. Para os parâmetros não validados foram estabelecidos novos intervalos utilizando a metodologia estatística proposta para uso em grupos com poucos indivíduos (GEFFRÉ et al. 2011). Chang et al. (2016), utilizaram essa mesma metodologia para estabelecer o IRs com um N amostral de 38 cães de raças variadas, enquanto Nielsen et al. (2010) utilizaram 32 cães Bernese da Montanha.

Nas análises hematológicas o intervalo estabelecido para hemoglobina (11,7 a 19,8 g/dL) foi superior ao limite máximo estabelecido por Jain (1993) (12 a 18 g/dL). Na veterinária a interpretação da concentração de hemoglobina é semelhante a do hematócrito e, pelo fato de ser grosseiramente equivalente a este, não tem muita utilidade para interpretações clínicas. A maioria dos veterinários está mais familiarizada ou tem mais experiência em interpretar o hematócrito. Apesar dos nossos valores para Hb terem apresentado valores superiores ao limite máximo preconizados por Jain (1993) eles estão semelhantes aos valores de outros estudos que também encontraram resultados de hemoglobina mais elevados. Abella et al. (2011) estabeleceram o intervalo de 12,4 a 19,2 g/dl. Já Campora et al. (2011)

encontraram valores superiores aos do nosso trabalho (16,9 a 22,8 g/dL), assim como Lavoué et al. (2014) (12,8 a 20,6 g/dL).

Para a CHGM os valores foram inferiores ao limite mínimo (30 a 36%) quando comparados com os IRs de Jain (1993) (32 a 36%). Entretanto, apesar dos valores estarem inferiores eles são similares aos de outros trabalhos. Moritz et al. (2004) obtiveram intervalo de 31,6 a 34,3% e Serra et al. (2012) também observaram essa diminuição (30,8 a 35,5%), corroborando com o presente trabalho.

Os valores de eosinófilos ( $0,15$  a  $3,68 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) foram superiores aos limites mínimo e máximo estabelecidos por Jain (1993) ( $0,1$  a  $1,25 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), porém contagens mais elevadas que as de Jain (1993) já foram relatadas por Abella et al. (2011) ( $0,1$  a  $3,1 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) e por Lavoué et al. (2014) ( $0,3$  a  $3,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ). Os eosinófilos são glóbulos brancos e o seu aumento está associado à infecção por parasita helmíntico, assim como em processos alérgicos (DAVOINE & LACY 2014).

No presente trabalho todos os animais estavam com histórico de vermifugação em dia e sem relatos de ocorrência de doenças alérgicas, embora um processo de hipersensibilidade subclínica não possa ser totalmente descartado. Alguns animais do estudo eram da raça Golden Retriever, na qual já há estudos relatando a tendência destes animais em apresentarem a dermatite atópica canina (DAC), apesar de aparentar estar em uma condição saudável, e por esse motivo não foi detectada no questionário, essa pode ser uma possível causa da elevação dos valores de eosinófilos (ZUR et al. 2002, HARVEY et. al. 2019)

Embora o número de linfócitos do nosso estudo tenha sido superior aos limites mínimo e máximo de Jain (1993), ele está de acordo com Abella et al. (2011) que também encontrou valores mais elevados ( $1,1$  a  $5,3 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) que a referência padrão. Uma das possíveis causas dessa diferença no número de linfócitos seria a maior frequência de vacinações que os cães recebem atualmente, já que vários autores associam as imunizações como um fator importante para linfocitose (MEYER et al. 1992, BUSH, 1994, STRASSER et al. 2003). Além disso, não se pode descartar que o aumento dos linfócitos pode ter ocorrido como alteração pré-analítica causada por estresse no momento da coleta. Segundo THRALL et al. (2015), o aumento no número de linfócitos pode ocorrer em resposta à excitação, podendo ser observada contagens de até  $12 \times 10^3/\mu\text{L}$ .

Nas determinações bioquímicas o intervalo de referência obtido para albumina (26 a 41 g/L) foi superior ao limite máximo estabelecido por Kaneko (1997)

(26 a 33 g/L). Em trabalhos com a espécie canina foram determinados IRs semelhantes ao obtido no presente estudo. Para cães Bernese da Montanha os valores obtidos foram de 26 a 44 g/L (NIELSEN et al. 2010), enquanto Lavoué et al. (2013) encontraram o intervalo de 27 a 38 g/L para esse parâmetro bioquímico. Chang et al. (2016), utilizando cães de raças variadas, obtiveram um intervalo de 30 a 44 g/L.

Para que se mantenha uma produção normal de albumina é necessário que o estado nutricional esteja adequado, e a ingestão de proteínas é de fundamental importância (COOPER et al. 2009). O atual manejo alimentar de cães é baseado na utilização de rações comerciais que são formuladas para atender todas as necessidades nutricionais dos animais. Há vinte anos a alimentação de cães era baseada em alimentação caseira e a ingestão de proteínas poderia não ser a quantidade ideal e isso pode explicar as diferenças observadas. Gonzáles et al. (2001) encontraram menores valores de albumina em cães e atribuíram esse achado ao tipo de alimentação dos animais que era baseado em alimentação caseira. Segundo Chung et al. (2016), o manejo alimentar de cães pode influenciar nos resultados do IRs obtidos.

Para os resultados da atividade de GGT, observou-se um intervalo (5,0 a 16,0 U/L) superior aos limites mínimo e máximo previamente estabelecido (0 a 10 U/L) por Kaneko (1997). Outros autores encontraram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Lavoué et al. (2013) obtiveram o intervalo de <5 a 12,4 U/L, Nielsen et al. (2010) estabeleceu o intervalo de 0 a 12,2 U/L e Chang et al. (2016) também encontraram que a atividade da GGT (3 a 11 U/L) foi superior quando comparada com os IRs previamente estabelecidos. A elevação na atividade da GGT é geralmente atribuída a colestase, hepatopatias e indução por medicamentos (CHAPMAN & HOSTUTLER 2013). Os animais selecionados não estavam fazendo uso de medicações que pudessem influenciar na atividade dessa enzima. Além disso, outros parâmetros que indicam a possibilidade de doença hepatobiliar (AST, ALT e FA) estavam dentro dos IRs preconizados por Kaneko (1997).

Em relação aos resultados das análises hematológicas e bioquímicas as diferenças observadas entre os intervalos atuais e o proposto por Jain (1993) e Kaneko (1997) podem ser explicadas também pela variabilidade induzida pelo uso de instrumentação diferente, critérios de amostragem, fatores pré-analíticos, questões demográficas e genéticas (Nielsen et al. 2010, Campora et al. 2011).

Estudos já compararam o desempenho em diferentes analisadores e obtiveram resultados desiguais para as mesmas análises (MORITZ et al. 2004, FLATLAND et al. 2014). Além disso, a variação biológica intrínseca de cada indivíduo causa oscilações fisiológicas ao longo do tempo e podem contribuir para variações nos parâmetros analisados (WALTON 2012, BRAGA & PANTEGHINI, 2016). Já existem pesquisas que relatam a variação biológica em valores bioquímicos de cães e gatos (BARAL et al. 2014, RUAUX et al. 2014).

## **5 CONCLUSÃO**

Para a maioria dos parâmetros hematológicos e bioquímicos os IRs estabelecidos previamente na literatura ainda são válidos para utilização em cães criados na Amazônia Oriental. Para os parâmetros não validados, apenas para eosinófilos e linfócitos recomendamos que outros trabalhos, com um número maior de animais, sejam realizados para confirmar nossos achados ou estabelecer novos IRs. Os IRs estabelecidos para hemoglobina, CHGM, albumina e GGT podem ser utilizados em substituição aos intervalos antigos.

## REFERÊNCIAS

- ABELLA B.N., GEFFRÉ A., CONCORDET D., BRAUN J.P., TRUMEL C. 2011. Canine RI for the sysmex XT-2000iV hematology analyser. *Vet. Clin. Pathol.* 40(3):303-305.
- BARAL R.M., DHAND N.K., FREEMAN K.P., KROCKENBERGER M.B., GOVENDIR M. 2014. Biological variation and reference change values of feline plasma biochemistry analytes. *J. Feline Med. Surg.* 16: 317-325.
- BIRGEL JÚNIOR E.H., D'ANGELINO J.L., BENESI F.J., BIRGEL E.H. 2001. Valores de referência do leucograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:136-141.
- BRAGA F., PANTEGHINI M. 2016. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. *Crit Rev Clin Lab. Sci.* 53: 313-325.
- BUSH B.M. 1994. Interpretation of laboratory results for small animal clinics. Blackwell Scientific Publications. London, 515p.
- CAMPORA C., FREEMAN K.P., LEWIS F.I., GIBSON G., SACCHINI F., VAZQUEZ M.J.S. 2011. Determination of haematological reference intervals in healthy adult greyhounds. *Journal of Small Animal Practice.* 52: 301-309.
- CHUNG S.H., CHANG L.W., CHENG T.L., LIN C.J., WEN-YING CHEN W.Y., CHOU C.C. 2016. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. *Taiwan Veterinary Journal.* 42 (2): 53–67.
- CHAPMAN S.E., HOSTUTLER R.A. 2013. A Laboratory Diagnostic Approach to Hepatobiliary Disease in Small Animals. *Vet Clin Small Anim.* 43: 1209–1225.
- Cooper S.E., Wellman L.M., Carsillo E.M. 2009. Hyperalbuminemia associated with hepatocellular carcinoma in a dog. *Vet Clin Pathol. American Society for Veterinary Clinical Pathology.*; 38(4): 516–520.
- DAVOINE F., LACY P. 2014. Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. *Frontiers in Immunology.* 5: 1-17.
- FERREIRA C.E.S., ANDRIOLO A. 2008. Intervalo de referência no laboratório clínico. *J Bras Patol Med Lab.* 44 (1): 11-16.
- FLATLAND B., BREICKNER L.C., FRY M.M. 2014. Analytical performance of a dry chemistry analyzer designed for in-clinic use, *Vet. Clin. Pathol.* 43:206–217.
- FRIEDRICHS K.R. 2010. Reference intervals: an essential, expanding, and occasionally equivocal standard. *Vet. Clin. Path.* 39(2):131–132.
- FRIEDRICHS K.R., HARR K.E., FREEMAN K.P., SZLADOVITS B., WALTON R.M., BARNHART K.F., BLANCO-CHAVEZ J. 2012. ASVCP reference interval guidelines:

determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol.* 41:441-453.

GEORGE J.W., SNIPES J., LANE V.M. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol.* 39:138-148.

GEFFRE' A., CONCORDET D., BRAUN J.P., et al. 2011. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Vet Clin Pathol.* 40:107-112.

GONZÁLEZ F.H.D., CARVALHO V., MÖLLER V.A., 2001. Duarte F.R. Perfil Bioquímico Sanguíneo de Cães e Gatos na Cidade de Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS.* 29(1):1-6.

HARVEY, N.D., SHAW S.C.; CRAIGON, P.J., BLOTT S.C., ENGLAND G.C.W. 2019. Environmental risk factors for canine atopic dermatitis: A retrospective large-scale study in Labrador and golden retrievers. *Vet. Dermatol.* 30: 396 e119.

JAIN N.C. 1993. *Essentials of veterinary hematology.* Philadelphia: Lea & Febiger. 1344p.

KANECO JJ, HARVEY JW, BRUSS ML. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5.ed. California: Academic, 1997.

LAVOUÉ R., GEFFRE' A., BRAUN J.P., PEETERS D., TRUMEL C. 2013. Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. *Vet.Clin. Pathol.* 42(3): 346-359.

LAVOUÉ R., GEFFRE' A., BRAUN J.P., PEETERS D., GRANAT F., BOURGES-ABELLA N., TRUMEL C. 2014. Breed-specific hematologic reference intervals in healthy adultm Dogues de Bordeaux. *Vet Clin Pathology.* 43(3): 352–361,

MORITZ A., FICKENSCHER Y., MEYER K., FAILING K., WEISS D.J. 2004. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet. Clin. Path.* 33(1): 32-38.

MEYER D.J, COLES E.H., RICH L.J. 1992. *Veterinary laboratory medicine: interpretation and diagnosis.* Philadelphia: Saunders Company, 350p.

NIELSEN L., HANSEN M.K., JENSEN A.L., KRISTENSE A.T. 2010. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 39(1): 20-28.

OZARDA Y. 2016. Reference intervals: current status, recent developments and future Considerations. *Biochemia Medica.* 26(1):5–16.

RAHMAN M.K., ISLAM S., FERDOUS J., UDDIN M.H., HOSSAIN M.B., HASSAN M.M., ISLAM A. 2018. Determination of hematological and serum biochemical reference values for indigenous sheep (*Ovis aries*) in Dhaka and Chittagong Districts of Bangladesh. *Veterinary World.* 11(8): 1089-1093.

RUAUX C., CARNEY P.C., SUCHODOLSKI J.S., STEINER J.M. 2012. Estimates of biological variation in routinely measured biochemical analytes in clinically healthy dogs. *Vet. Clin. Pathol.* 41: 541-547.

RUGGERONE B., GIRALDI M., Paltrinieri S., Scarpa P. 2018. Hematologic and biochemical reference intervals in Shetland Sheepdogs. *Vet Clin Pathol.* 47:617-624.  
RUSSELL K.A., ROUSSEL A.J. 2007. Evaluation of the ruminal serum chemistry profile. *Vet. Clin. Food Anim. Pract.* 23: 403-426.

SERRA M., FREEMAN K.P., Campora C., Sacchini F. 2012. Canine reference intervals using the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Vet Clin. Pathol.* 41(2): 207–215.

STRASSER A., MAY B., TELTSCHER A., WISTRELA E., NIEDERMULLER H. 2003. Immune modulation following immunization with polyvalent vaccines in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94: 113-121.

TATE J.T., YEN T., JONES R.D.G. 2015. Transference and Validation of Reference Intervals. *Clinical Chemistry.* 61(8): 1012–1015.

THRALL M.A., WEISER G., ALISSON R.W., Campbell W.T. 2015. *Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária*. 2ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

WALTON R.M. 2012. Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. *Vet. Clin. Pathol.* 41: 175-181.

ZUR G., IHRKE P.J., WHITE S.D., KASS P.H. 2002. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology.* 13:89–102.

ANEXO 1- Questionário aplicado para tutores dos animais



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas

**Questionário – Aspectos sanitários dos cães de Belém e Região Metropolitana**

Dados do Tutor			
Nome:	Sexo:	Ocupação:	
Endereço:		E-mail:	
Dados do animal			
Nome:	Raça:	Sexo:	Idade:

- 1. Tipo de alimentação:** industrial ( ) caseira ( ) Mista ( ) petiscos ( )
- 2. Manejo alimentar:** 1 vez ao dia ( ) até 3 vezes ao dia ( ) à vontade ( )
- 3. Você leva seu animal ao veterinário?** nunca ( ) periodicamente ( )  
só quando adoecer ( )
- 4. Vacinação em dia?** sim ( ) não ( )
- 5. Quais vacinas:**  
\_\_\_\_\_
- 6. Onde vacina?** campanha ( ) Casa agropecuária( ) Clínica veterinária( )
- 7. Fez exames laboratoriais (hemograma, bioquímica, urinálise, parasitológico etc) nos últimos 60 dias?** sim ( ) não ( )
- 8. Se sim, quais?**  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 9. Caso tenha feito exames, o resultados estavam normais?** sim ( ) não ( )
- 10. Se não, quais as alterações observadas nos exames??**  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 11. Vermifugação recente?** Sim ( ) não ( )
- 12. Se sim, qual medicação usada? Há quanto tempo?**  
\_\_\_\_\_
- 13. Histórico de doenças nos últimos 60 dias?** sim ( ) não( )
- 14. Se sim, quais doenças?**  
\_\_\_\_\_
- 15. Uso de medicação recente?** sim ( ) não( )
- 16. Se sim, quais?**  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
- 17. Uso de medicação de uso contínuo** sim ( ) não( )
- 18. Se sim, quais?**

---

---

19. Faz uso de hormônios, promotores de crescimento ou corticoides? Sim ( ) não ( )

20. Histórico de convulsões? sim ( ) não( )

21. Micção normal? sim ( ) não( )

22. Se não descrever o problema

---

23. Defecação normal? sim ( ) não( )

24. Se não, descrever a alteração nas fezes \_\_\_\_\_

25. Presença de ectoparasitas? sim ( ) não( )

26. Se sim, quais?

---

27. O animal já passou por cirurgia recente? ( ) sim ( ) não

28. Se sim, quais e há quanto tempo?

---

29. Problemas de pele? sim ( ) não( )

30. Se sim, quais e qual o tratamento?

---

31. O animal tem acesso a rua? ( ) sim ( ) não

32. Tem contato com outros animais? ( ) sim ( ) não

ANEXO 2- Certificado de Autorização do CEUA-UFPA



**UFPA**  
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Validação dos intervalos de referência hematológicos e bioquímicos estabelecidos para espécie canina.", protocolada sob o CEUA nº 1368140219 (06/2019), sob a responsabilidade de **Maria Viviana Barros Monteiro e equipe; Natália Rodrigues Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 28/03/2019.

We certify that the proposal "Validation of established hematological and biochemical reference intervals for canine species.", utilizing 40 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1368140219 (06/2019), under the responsibility of **Maria Viviana Barros Monteiro and team; Natália Rodrigues Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 03/28/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2019** a **04/2021**

Área: **Medicina Veterinária**

Origem: **Não se aplica**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 10 anos**

N: **40**

Linhagem: **diversas**

Peso: **6 a 40 kg**

Local do experimento: **Laboratório de Análises Clínicas - Divisão Veterinária (LACVet). ICB/UFPA**

Belém, 28 de março de 2019

*M<sup>te</sup> Viviana B. Monteiro*

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

*Vanessa Jola de Mello*

Profa. Dra. Vanessa Jola de Mello

Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal do Pará

ANEXO 3- Termo de consentimento livre e esclarecido



Universidade Federal do Pará  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título da Pesquisa:** Validação dos intervalos de referência hematológicos e bioquímicos estabelecidos para espécie canina.

**Pesquisador Responsável:** Maria Vivina Barros Monteiro

**Participantes da equipe:** Rita de Cássia Mousinho Ribeiro, Natália Rodrigues Marques

O Sr.(Sra.) está sendo convidado(a) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade examinar os valores hematológicos e bioquímicos em cães saudáveis e a partir validar valores de referência já existentes. Ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador(a)/professor(a) realize a coleta de amostras de sangue preferencialmente por punção da veia cefálica, utilizando seringas e agulhas descartáveis, os animais serão contidos fisicamente e será necessário o uso de focinheiras. Após a coleta as amostras serão refrigeradas e imediatamente remetidas ao LAC-Vet para realização dos hemogramas e análises bioquímicas. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do(a) pesquisador(a)/professor(a). Se necessário, poderá entrar em contato com Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). A participação nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos princípios éticos no uso de animais, elaborados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sobre a utilização de animais em atividades educacionais e em experimentos que envolvam espécies definidas na Lei 11.794/20. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores/professor(a)(s) terão conhecimento dos dados. Esperamos que este estudo traga informações importantes sobre os valores de referência hematológicos e bioquímicos para cães de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para obtenção de diagnósticos precisos, o pesquisador/professor(a) se compromete a divulgar os resultados obtidos. O Sr.(Sra.) não vai contribuir financeiramente para participar deste projeto, ficando os custos por conta da pesquisa.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa. Preencher, por favor, os itens que se seguem:

### Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Este documento será assinado em duas vias, sendo que uma via ficará comigo e outra com o pesquisador

Identificação do(s) animal(is):

Nome: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Número de identificação: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Espécie: \_\_\_\_\_ Raça: \_\_\_\_\_

Nome do Tutor: \_\_\_\_\_ CPF/RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Tutor

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

ANEXO 4- Nota técnica

## NOTA TÉCNICA

<b>Assunto:</b>	Validação dos intervalos de referência para parâmetros bioquímicos sanguíneos de cães.
<b>Elaborado por:</b>	Natália Rodrigues Marques e Maria Vivina Barros Monteiro

### 1. INTRODUÇÃO

Os exames bioquímicos são ferramentas indispensáveis na investigação de doenças veterinárias. Os resultados anormais desses exames podem contribuir para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento terapêutico (TRALL, 2012; STOCKHAM & SCOTT, 2013). Além disso, o perfil bioquímico pode revelar doenças antes mesmo do aparecimento de sintomas e lesões (MUNDIN et al., 2007).

Na prática veterinária o básico da interpretação dos exames bioquímicos é a comparação dos resultados do paciente com os intervalos de referência (IRs) estabelecidos para a espécie. Assim, os intervalos utilizados devem ser confiáveis e representativos da população atendida (FRIEDRICHS et al., 2011). Porém, os laboratórios se preocupam em empregar métodos de controle de qualidade das fases pré-analítica e analítica, não dando a devida importância à validade dos IRs utilizados nos laudos (TATE et al., 2015).

Em humanos já foram identificadas variações em exames de pessoas saudáveis de diferentes regiões geográficas, principalmente por fatores genéticos, demográficos, nutricionais, analíticos e ambientais (FRIEDRICHS et al. 2010; ODHIAMBO et al., 2015). Na veterinária isso também ocorre, sendo importante estabelecer intervalos que se aproximem da realidade nacional, regional ou, preferencialmente, da população atendida pelo laboratório (CHUNG et al., 2016).

Estipular IRs próprios é mais dispendioso para sua execução, além de ser mais trabalhoso e requerer o uso de muitos animais. Assim, a validação de intervalos já existentes é uma alternativa, pois necessita apenas de 20 amostras de animais saudáveis (FERREIRA & ANDRIOLO, 2008; GEORGE et al., 2010; OZARDA, 2016). Abella et al. (2011), recomendam que a validação dos IRs já existentes para espécie canina seja realizada antes da sua utilização pelo laboratório.

A American Society for Clinical Veterinary Pathology (ASCV) possui uma norma padrão para validação de IRs veterinários (FRIEDRICHS et al., 2012). Essa metodologia já vem sendo utilizada, Chung et al. (2016) utilizou para cães de raças variadas e Ruggerone et al. (2018) aplicou especificamente para cães da raça Sheepdog.

Para cães os IRs mais utilizados para os parâmetros bioquímicos foram estabelecidos por Kaneko (1997) há mais de 20 anos e podem não ser mais representativos da atual população canina. Nesse contexto, os objetivos dessa nota técnica foram: descrever o procedimento de validação de IRs para exames bioquímicos de cães criados na Amazônia Oriental e estabelecer intervalos próprios para os parâmetros não validados.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Local de realização e aspectos éticos**

O trabalho foi realizado no Laboratório de Análises Clínicas Divisão Veterinária (LAC-Vet) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará – Campus Belém.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) recebendo o protocolo nº 1368140219. Os tutores assinaram um termo de consentimento para participação dos seus animais no trabalho.

### **2.2. Animais e coleta de amostras**

Foram utilizados 44 animais adultos de raças variadas (SRD, Golden Retriever, Shitzu, Jack Russell, Pinscher, Pastor Belga, Yorkshire, Border Collie, Dogue Alemão). Desse total, 24 eram fêmeas e 20 machos. A idade dos cães variou entre um a nove anos ( $3,5 \pm 2,07$  anos).

Foram incluídos no estudo animais clinicamente saudáveis que não apresentavam sinais de doença nas duas semanas anteriores ou seguintes à coleta de amostras. Para conhecer o histórico clínico dos animais foram aplicados questionários aos tutores com perguntas sobre alimentação, cirurgias recentes,

histórico de doenças, uso de medicações, esquema completo de vacinação e vermifugação em dia.

Foram excluídos do estudo animais gestantes ou que estivessem amamentando, com doença clínica em curso, com lesões aparentes, ou fazendo uso de medicações como hormônios ou promotores de crescimento, indutores enzimáticos (corticosteróides ou antiepilépticos), entre outras drogas que poderiam interferir nos exames hematológicos e bioquímicos de acordo com o estabelecido por Friedrichs et al. (2012).

Para a coleta de sangue os animais foram contidos fisicamente e o sangue foi coletado preferencialmente por punção da veia cefálica, utilizando seringas e agulhas descartáveis. Todos os animais estavam em jejum de oito horas antes da coleta.

Para a realização das dosagens bioquímicas foram coletadas amostras (3ml) em tubos sem anticoagulante. As amostras foram imediatamente remetidas ao laboratório e centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. Os soros obtidos foram congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até realização das dosagens de albumina, colesterol, triglicerídeos, creatinina, glicose, uréia, globulinas e proteínas totais. Foi determinada a atividade das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (FA) e gama glutamiltransferase (GGT).

As dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando Kits comerciais da marca INTERTECK KATAL em equipamento automatizado CM 200 (WINER LAB) utilizando as metodologias descritas no quadro 1. Amostras hemolisadas, lipêmicas ou ictericas não foram processadas.

**Quadro 1- Método de análise dos parâmetros bioquímicos**

<b>Parâmetros</b>	<b>Método</b>
Albumina	Colorimétrico
ALT	Cinético UV
AST	Cinético UV
Colesterol	Enzimático colorimétrico
Creatinina	Enzimático colorimétrico
Fosfatase alcalina	Cinético
GGT	Cinético
Glicose	Enzimático colorimétrico
Globulinas	Cálculo (Proteína total – Albumina)
Proteínas totais	Enzimático colorimétrico
Triglicerídeos	Enzimático colorimétrico
Uréia	Enzimático colorimétrico

## 2.4 Protocolo de validação e determinação de intervalos de referência

Foram utilizados para validação os intervalos estabelecidos por Kaneko (1997). O procedimento de validação seguiu o protocolo da American Society for Clinical Veterinary Pathology (ASCPV).

Foram selecionados, aleatoriamente, 20 animais clinicamente saudáveis e suas amostras foram usadas para validação de cada parâmetro bioquímico (1ª amostragem). O parâmetro foi considerado validado quando apenas duas amostras estavam fora do intervalo de referência estabelecido, ou seja, 10% do total. Quando cinco ou mais amostras estivessem fora do intervalo de referência este era imediatamente rejeitado. Caso o número de amostras divergentes fosse de três a quatro, uma nova amostragem foi realizada (2ª amostragem), utilizando outros 20 animais saudáveis e suas amostras foram submetidas ao mesmo procedimento aplicado (Figura 1). Quando, após a segunda amostragem, os resultados permaneceram rejeitados um novo intervalo de referência foi calculado para cada parâmetro.

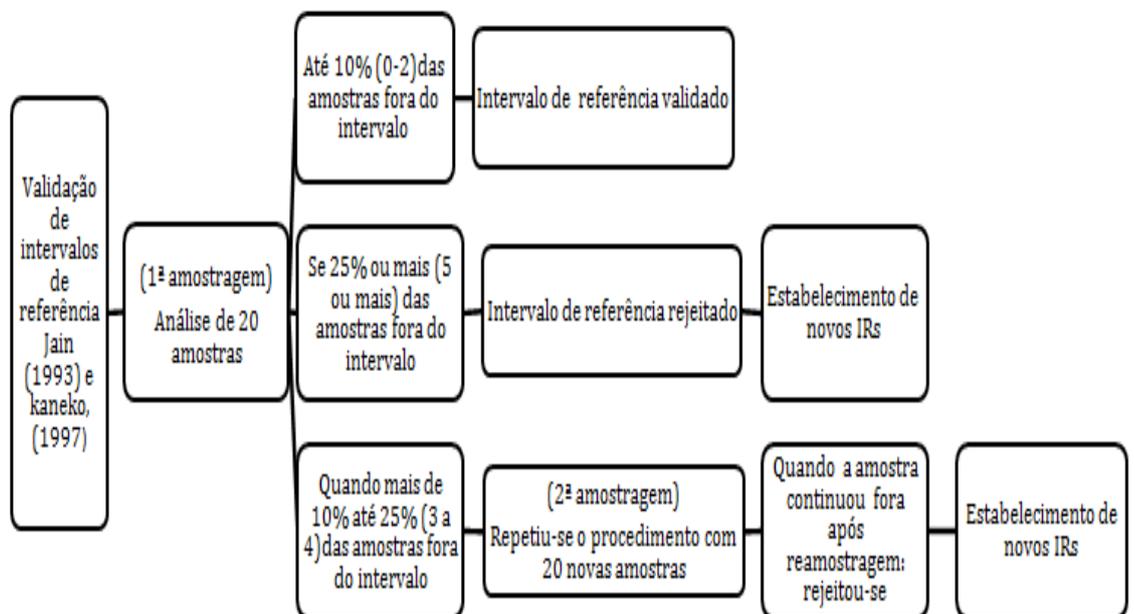


Figura 1. Procedimento de validação de intervalos de referência.

Os IRs foram determinados usando o programa Excel com o suplemento Reference Value Advisor (versão 2.1). O software executa os cálculos de acordo com as recomendações do CLSI, conforme sugerido pelas diretrizes da ASCVP. Os IRs foram calculados usando um método não paramétrico que também calculou o intervalo de confiança (IC) de 90%, exceto quando o número de observações fosse menor de 40. Nesse caso, foi utilizado o método robusto com os dados transformados em Box - Cox, conforme recomendado pelo software. Estatística descritiva, testes de normalidade de acordo com o método de Anderson - Darling com histogramas e Q - Q gráficos e transformação Box-Cox foram calculados. Para encontrar e remover outliers, foram utilizados os testes de Dixon - Reed e Tukey. (RUGGERONE et al., 2018).

### **3. RESULTADOS**

Foram submetidos ao processo de validação um total de 12 parâmetros bioquímicos. Desse total, 83% (10/12) dos intervalos foram validados e 17% (2/12) foram rejeitados. Os intervalos para albumina e GGT foram rejeitados na primeira amostragem, pois mais de cinco amostras estavam fora do intervalo de referência proposto por Kaneko (1997). Os resultados de proteína total e uréia tiveram que passar por uma segunda amostragem (três amostras fora do intervalo) e foram validados. Os demais parâmetros foram validados (Tabela 1). Para albumina e GGT foram estabelecidos novos IRs, utilizando todos os 44 animais selecionados (Tabela 2).

**Tabela 1.** Intervalos de referência (IRs) bioquímicos estabelecidos por Kaneko (1997) para espécie canina e o resultado do procedimento de validação com o total de amostras utilizadas (n=20) e o total fora do intervalo de referência.

Parâmetros	1 <sup>a</sup> amostragem	2 <sup>a</sup> amostragem	IRs (Kaneko, 1997)
<b>Albumina (g/L)</b>	<b>9/20</b>	-	<b>26-33</b>
ALT (U/L)	0/20	-	0-102
AST (U/L)	1/20	-	0-66
Colesterol (mg/dl)	2/20	-	135-275
Creatinina (mg/dl)	0/20	-	0,5-1,5
Fosfatase alcalina(U/L)	2/20	-	0- 156
<b>GGT (U/L)</b>	<b>7/20</b>	-	<b>0- 10</b>
Glicose (mg/dl)	1/20	-	65-118
Globulinas (g/L)	2/20	-	27-44
Proteínas totais (g/L)	3/20	0/20	54-71
Triglicerídeos (mg/dl)	0/20	-	20-112
Uréia (mg/dl)	3/20	2/20	21-60

OBS: Os valores em negrito indicam os parâmetros para os quais os IRs (Kaneko, 1997) foram rejeitados e o número de amostras que estavam fora do intervalo utilizado de acordo com a porcentagem estabelecida no protocolo; traços (-) indicam que as amostras não foram testadas em duas amostragens.

**Tabela 2.** Intervalos de referência estabelecidos para albumina e gama glutamiltransferase (GGT).

Parâmetros	Média	Mediana	DP	IR (IC 90%)	IR (IC 90%)
<b>Albumina (g/L)</b>	34	34	0,3	26 (24-29)	41 (39-42)
<b>GGT (U/L)</b>	10,6	11	2,7	5 (5,0-6,0)	16 (15,0-16,0)

OBS: DP= Desvio padrão; IR = Intervalo de referência; IC= Intervalo de confiança

#### 4. DISCUSSÃO

No presente trabalho a metodologia de validação proposta pela American Society for Clinical Veterinary Pathology (ASCVP) foi utilizada para validar parâmetros bioquímicos estabelecidos há mais de vinte anos e em outras regiões geográficas. Antes de existir uma metodologia específica para veterinária, a metodologia de validação do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) foi utilizada para cães de raça (NILSEN et al., 2015) e Búfalos (FONTES et al., 1012).

Para a maioria dos parâmetros encontramos que os intervalos propostos por Kaneko (1997) ainda são válidos para os cães criados na Amazônia Oriental. Para os parâmetros não validados os novos IRs estabelecidos podem ser utilizados nos laudos dos exames. Nielsen et al. (2010) também não validaram alguns parâmetros bioquímicos (Fosfatase alcalina, GGT, amilase e colesterol) e estabeleceram novos IRs específicos para raça Bernese da Montanha.

Nas determinações bioquímicas o intervalo de referência obtido para albumina (26 a 41 g/L) foi superior ao limite máximo estabelecido por Kaneko (1997) (26 a 33 g/L). Em trabalhos com a espécie canina foram determinados IRs semelhantes ao obtido no presente estudo. Para cães Bernese da Montanha os valores obtidos foram de 26 a 44 g/L (NIELSEN et al. 2010), enquanto Lavoué et al. (2013) encontraram o intervalo de 27 a 38 g/L para esse parâmetro bioquímico. Chang et al. (2016), utilizando cães de raças variadas, obtiveram um intervalo de 30 a 44 g/L.

O intervalo de referência obtido para albumina (26 a 41 g/L) foi superior ao limite máximo estabelecido por Kaneko (1997) (26 a 33 g/L). Em trabalhos com a espécie canina foram determinados IRs semelhantes ao obtido no presente estudo. Para cães Bernese da Montanha os valores obtidos foram de 26 a 44 g/L (NIELSEN et al., 2010), enquanto Lavoué et al. (2013) encontraram o intervalo de 27 a 38 g/L para esse parâmetro bioquímico. Chang et al. (2016), utilizando cães de raças variadas, obtiveram um intervalo de 30 a 44 g/L.

Para que se mantenha uma produção normal de albumina é necessário que o estado nutricional esteja adequado, e a ingestão de proteínas é de fundamental importância (COOPER et al., 2009). O atual manejo alimentar de cães é baseado na utilização de rações comerciais que são formuladas para atender todas as necessidades nutricionais dos animais. Há vinte anos a alimentação de cães era

baseada em alimentação caseira e a ingestão de proteínas poderia não ser a quantidade ideal e isso pode explicar as diferenças observadas. Gonzáles et al. (2001) encontraram menores valores de albumina em cães e atribuíram esse achado ao tipo de alimentação dos animais que era baseado em alimentação caseira. Segundo Chung et al. (2016), o manejo alimentar de cães pode influenciar nos resultados do IRs obtidos.

Para os resultados da atividade de GGT, observou-se um intervalo (5,0 a 16,0 U/L) superior aos limites mínimo e máximo previamente estabelecido (0 a 10 U/L) por Kaneko (1997). Outros autores encontraram valores semelhantes aos obtidos no presente estudo. Lavoué et al. (2013) obtiveram o intervalo de <5 a 12,4 U/L, Nielsen et al. (2010) estabeleceu o intervalo de 0 a 12,2 U/L e Chang et al. (2016) também encontraram que a atividade da GGT (3 a 11 U/L) foi superior quando comparada com os IRs previamente estabelecidos. A elevação na atividade da GGT é geralmente atribuída a colestase, hepatopatias e indução por medicamentos (CHAPMAN & HOSTUTLER 2013). Os animais selecionados não estavam fazendo uso de medicações que pudessem influenciar na atividade dessa enzima. Além disso, outros parâmetros que indicam a possibilidade de doença hepatobiliar (AST, ALT e FA) estavam dentro dos IRs preconizados por Kaneko (1997).

Já é reconhecido que variações fisiológicas (raça, idade, sexo, dieta e atividade muscular) podem influenciar os IRs obtidos para parâmetros bioquímicos. Por tanto, alguns autores enfatizam a necessidade de estabelecer intervalos em subpopulações que levem em conta fatores como raça, idade e sexo (DUNLOP et al., 2011). Outras fontes de variação são as condições ambientais, metodologias e reagentes usados no processamento das amostras (MUNDIN et al., 2006; RORTVEIT et al., 2015).

## 5. RECOMENDAÇÕES

Para a maioria dos parâmetros bioquímicos os IRs estabelecidos previamente na literatura ainda são válidos para utilização em cães criados na Amazônia Oriental. Os novos intervalos estabelecidos para albumina e GGT podem ser utilizados em substituição aos IRs antigos.

Recomendamos que cada laboratório veterinário estabeleça seus próprios IRs, pois são mais representativos da população atendida. Na impossibilidade de estabelecer intervalos próprios, a recomendação é que o procedimento de validação seja utilizado para verificar se intervalos antigos ou estabelecidos em outras regiões geográficas são válidos.

Os IRs estabelecidos para outros parâmetros bioquímicos (eletrólitos, minerais e outras enzimas) que não foram avaliados no presente trabalho devem passar pelo procedimento de validação e, se necessário, novos intervalos devem ser estabelecidos para os que não forem validados.

A recomendação de validar ou estabelecer novos IRs deve ser ampliada também para outras espécies domésticas (felinos, ovinos, caprinos, bovinos, suínos, equinos e bubalinos) e silvestres.

## 6. REFERÊNCIAS

Bourgès-Abella N, Geffré A, Concordet D, Braun, JP, Trumel, C. Canine RI for the Sysmex XT-2000iV hematology analyser. *Vet Clin Pathol*. 2011;40(3):303-305.

Chapman SE, Hostutler RA. A Laboratory Diagnostic Approach to Hepatobiliary Disease in Small Animals. *Vet Clin Small Anim*. 2013; 43, 1209–1225.

Chung SH, Chang LW, Cheng TL, Lin CJ, Wen-Ying Chen WY, Chou CC. Establishing in-house reference intervals for dogs in veterinary clinics. *Taiwan Veterinary Journal*. 2016; 42 (2): 53–67.

Cooper SE, Wellman LM, Carsillo EM. Hyperalbuminemia associated with hepatocellular carcinoma in a dog. *Vet Clin Pathol. American Society for Veterinary Clinical Pathology*. 2009; 38(4): 516–520.

Dunlop MM, Sanchez-Vazquez MJK, Freeman P, Gibson G, Sacchini F, Lewis F. Determination of serum biochemistry reference intervals in a large sample of adult greyhounds. *Journal of Small Animal Practice*. 2011; 52, 4–10.

Ferreira CES, Andriolo A. Intervalo de referência no laboratório clínico. *J Bras Patol. Med Lab*. 2008; v. 44. n. 1. p. 11-16.

Fontes DG, Monteiro MVB, Jorge EM, Oliveira CMC, Ritter RA, França RT, et al. Hematological parameters of buffaloes of different ages reared in the central region of Rio Grande do Sul. *R. bras. Ci. Vet.*v. 18, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2011.

Friedrichs KR. Reference intervals: an essential, expanding, and occasionally equivocal standard. *Vet Clin Path*. 2010; 39(2):131–132.

Friedrichs KR, Harr KE, Freeman KP, Szladovits B, Walton RM, Barnhart KF, Blanco-Chavez J. ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics. *Vet Clin Pathol*. 2012;41:441-453.

George JW, Snipes J, Lane VM. 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet Clin Pathol*. 2010; 39:138-148.

González FHD, Carvalho V, Möller VA, Duarte FR. Perfil Bioquímico Sanguíneo de Cães e Gatos na Cidade de Porto Alegre, Rio Grande Do Sul, Brasil. *Arquivos da Faculdade de Veterinária. UFRGS*. 2001; 29(1):1-6.

Kaneco JJ, Harvey JW, Bruss ML. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5.ed. California: Academic, 1997.

Lavoué R, Geffré A, Braun JP, Peeters D, Trumel C. Breed-specific biochemical reference intervals for the adult Dogue de Bordeaux. *Vet Clin Pathol* 42/3, 2013.

Mundim AV, Coelho AO, Hortêncio SM, Guimarães EC, Espindola FS. Influence of age and sex on the serum biochemical profile of Doberman dogs in the growth phase. *Comp Clin Pathol*. 2007; 16:41–46.

Nielsen L, Kjelgaard-Hansen M, Jensen A L, Annemarie T. Kristense. Breed-specific variation of hematologic and biochemical analytes in healthy adult Bernese Mountain dogs. *Vet Clin Pathol*. 2010; 39:20-28.

ODHIAMBO, C.; OYARO, B.; ODIPO, R.; OTIENO, F.; ALEMNJI, G.; WILLIAMSON, J.; ZEH, C. Evaluation of Locally Established Reference Intervals for Hematology and Biochemistry Parameters in Western Kenya. *PLOS ONE*. 2015;10(4).

Ozarda, Y. Reference intervals: current status, recent developments and future Considerations. *Biochemia Medica*. 2016; 26(1):5–16.

Ruggerone B, Giraldi M, Paltrinieri S, Scarpa P. Hematologic and biochemical reference intervals in Shetland Sheepdogs. *Vet Clin Pathol*. 2018;47:617-624.

Rortveit R, Saevik BK, Eggertsdottir AV, Skancke E, Lingaas F, Thoresen SI, Jansen JH. Age-related changes in hematologic and serum biochemical variables in dogs aged 16–60 days. *Vet Clin Pathol*. 2015; 44/1, 47–57.

Russell KA, Roussel AJ. Evaluation of the ruminal serum chemistry profile. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*, v. 23, p. 403-426, 2007.

Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*: Wiley-Blackwell; 2013.

Tate JT, Yen T, Jones RDG. Transference and Validation of Reference Intervals. *Clinical Chemistry*. 2015; 61:8. 1012–1015.

Thrall MA. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. 2nd ed. ed. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell; 2012.