



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

MODELO CANINO PARA SÉPSIS: CONTRIBUIÇÃO PARA A CLASSIFICAÇÃO E
ESTRATIFICAÇÃO EM DOENTES SÉPTICOS

SARA AZEVEDO PRATA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

COORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno Castanheira
Aires da Silva

LISBOA

2017



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

MODELO CANINO PARA SÉPSIS: CONTRIBUIÇÃO PARA A CLASSIFICAÇÃO E
ESTRATIFICAÇÃO EM DOENTES SÉPTICOS

SARA AZEVEDO PRATA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte Correia

Doutora Ana Isabel Simões Pereira
Duarte

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

ORIENTADORA

Doutora Solange Judite Roque
Coelho Alves Gil

COORIENTADOR

Doutor Frederico Nuno Castanheira
Aires da Silva

LISBOA

2017

Hoje, apenas hoje, executarei um programa pormenorizado. Talvez não o cumpra perfeitamente, mas ao menos escrevê-lo-ei. E fugirei de dois males: a pressa e a indecisão.

Hoje, apenas hoje, acreditarei firmemente - embora as circunstâncias mostrem o contrário – que Deus se ocupa de mim como se não existisse mais ninguém no mundo.

Hoje, apenas hoje, não terei qualquer medo. De modo especial não terei medo de apreciar o que é belo e de crer na bondade.

Papa João XXIII

Agradecimentos

A todos os Professores e Funcionários que encontrei nesta Casa, por continuarem a formar Médicos Veterinários, mostrando-lhes tantas formas de servir a sociedade.

A todos os Colegas com quem me cruzei, companheiros de trabalho, estudo ou lazer, pelas amizades que quero manter para a vida.

À Prof. Dr.^a Solange Gil, por ter aceitado ser minha Orientadora e pelo profissionalismo, disponibilidade, dedicação e auxílio constantes. Obrigada por todo o ânimo!

Ao Dr. Frederico Aires da Silva, por ter aceitado ser meu Coorientador e por me ter acolhido no dia-a-dia do Laboratório que dirige, nesta Faculdade.

Ao Prof. Dr. António Ferreira e aos Médicos Veterinários, Enfermeiros Veterinários, Funcionários e Estagiários do HEV-FMV-UL, obrigada por seis meses inesquecíveis, de muita aprendizagem, companheirismo e desafios. Obrigada a todos!

Ao Prof. Telmo Nunes, pelo apoio na análise estatística. Obrigada pelo tempo que, a muito custo, dá aos alunos. É, verdadeiramente, um exemplo de disponibilidade ao outro.

Ao Professor Doutor Luís Tavares, pela utilização dos Laboratórios de Virologia e Imunologia da FMV, e ao Prof. Dr. Ricardo Bexiga, por ter auxiliado a obtenção da placa ELISA utilizada neste trabalho.

À Dr.^a Joana Dias, aluna de Doutoramento da FMV, e à Dr.^a Sandra Aguiar, por terem suportado com calma e paciência todas as interrupções e pedidos de ajuda. Sem a vossa ajuda, a conclusão deste trabalho não teria sido, de todo, possível.

Ao Miguel, por ter aceitado crescer comigo, por todo o apoio, toda a paciência e toda a confiança. Obrigada por teres acreditado nas minhas capacidades nos momentos em que eu mais duvidei. Contigo espero partilhar os frutos desta e de tantas outras aventuras.

À Inês, por ser a minha melhor amiga e companheira em tudo na vida, pelo apoio, pela paciência e por tudo o que não pode ser posto em palavras. É um orgulho partilhar contigo esta vocação.

Aos meus Pais, por se dedicarem a mim e à Inês por inteiro, sem hesitação. Obrigada Mãe, por toda a paciência e colo ao longo de todos estes anos de esforços. Obrigada por acreditares sempre nas coisas que somos capazes de fazer!

A Deus, por me ter abençoado de forma tão generosa, por colocar tantas pessoas maravilhosas no meu caminho e por se fazer, nelas, presente.

RESUMO

Modelo Canino para Sépsis: Contribuição para a classificação e estratificação em doentes sépticos

A sépsis é uma síndrome grave que pode surgir por diversos motivos, afetando muitos seres Humanos e animais. Devido à sua elevada prevalência e às elevadas taxas de mortalidade que lhe podem estar associadas, é importantíssimo o seu estudo. A Parvovirose canina predispõe à ocorrência de sépsis secundária a translocação bacteriana de origem gastrointestinal. Estudos com animais naturalmente infetados por *Parvovirus* podem ser úteis no estudo da sépsis, não só em animais, mas também em seres humanos. O principal objetivo do estudo foi propor e aplicar um sistema de classificação de pacientes sépticos baseado no modelo PIRO (*Predisposition, Insult, Response, Organ failure*). Em paralelo, foram estudadas as diferenças entre dois métodos de avaliação de SRIS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica). Foram avaliados alguns mediadores inflamatórios e a presença de DNA bacteriano no sangue de animais com Parvovirose. Os 31 animais da amostra foram classificados segundo o sistema proposto no que toca à Predisposição, Resposta, e Disfunção orgânica (para o elemento Infeção foi atribuída a todos a mesma classificação). Os dados foram recolhidos a partir de registos clínicos obtidos na UIDI do HEV-FMV-UL e sujeitos a dois conjuntos de critérios para diagnóstico de SRIS. Em 13 animais foi quantificada a concentração de CRP, e em 12 animais a expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α , em relação a animais controlo. Foi investigada a presença de DNA bacteriano de *E. coli* e de *Staphylococcus* spp. no sangue de 12 animais. As concentrações de CRP medidas no sangue de cães com Parvovirose foram mais elevadas em relação às medidas no sangue de cães do grupo controlo ($p < 0.001$), tendo sido determinado um valor de concentração de CRP (83,8 mg/L) a partir do qual é possível dizer que está em curso um processo de SRIS (AUC=0.85). As diferenças entre a utilização de diferentes conjuntos de critérios de diagnóstico de SRIS, tanto à entrada como às 48h após internamento, revelaram-se significativas ($p < 0,01$). Não houve diferenças entre as classificações PIRO no início do internamento e após 48h ($p = 0,187$). Não foi verificada uma correlação entre o aumento da concentração sérica de CRP e o aumento da classificação PIRO ($r_s = 0,187$; $p = 0,540$). Foi detetada expressão de IL-6 e TNF- α em, respetivamente, 5 e 6 animais com Parvovirose, apesar de não ter sido possível o estudo das medições de IL-6 e TNF- α . Foi detetado DNA bacteriano em 3 dos cães com Parvovirose. Este trabalho representa uma contribuição para o desenvolvimento de um sistema de classificação de doentes sépticos da espécie canina. Foi possível estabelecer um valor de uma proteína de fase aguda (CRP) a partir do qual podemos afirmar que ocorre SRIS. É premente descobrir outros biomarcadores capazes de monitorizar mais objetivamente pacientes Humanos e animais e permitir uma intervenção mais precoce no decurso do agravamento clínico.

Palavras-chave: Parvovirose, sépsis, SRIS, PIRO, CRP, IL-6, TNF- α , bDNA, HEV-FMV-UL.

ABSTRACT

Canine model for sepsis: a contribution to the classification and stratification of septic patients

Sepsis is a severe condition that can appear following many other diseases. It affects many Human beings, as well as animals. Given its high prevalence and mortality rates, the study of this affection is paramount. Canine Parvovirus is a disease that can be a predisposing cause of sepsis, because of bacterial translocation of gut origin. Studies involving naturally CPV infected dogs can be useful regarding the investigation of sepsis mechanisms, not only in animals but also in human beings.

The main purpose of this work is to propose and implement a sepsis patient scoring and stratification system based on the PIRO model. In parallel, the differences between different SIRS diagnostic criteria were evaluated. Another goal was to study a few inflammatory mediators, as well as the presence of bacterial DNA in dogs prone to sepsis, confronting those results with the clinical scores.

The 31 animals that composed the experimental group were scored according to several parameters regarding Predisposition, Response and Organ dysfunction (all the subjects were attributed an equal Infection score). Data was retrieved from clinical records of the HEV-FMV-UL Infectious Diseases Unit. The animals were also subjected to slightly different SIRS diagnostic criteria. CRP concentration as well as IL-6 and TNF- α quantity were measured in 13 and 12 animals, respectively. *E. coli* and *Staphylococcus* spp. bacterial DNA presence in blood samples was also investigated in 13 animals from the experimental group.

Blood CRP measurements were significantly higher in CPV infected dogs when compared to dogs in the control group ($p < 0.001$). A CRP threshold value for the presumptive diagnosis of SIRS was found (83.8 mg/L), based on approved Veterinary Medicine SIRS criteria (AUC=0.85). The differences between the utilization of different SIRS diagnostic criteria, on hospital admission as well as after 48h, were significant ($p < 0,01$). The differences between scores obtained on hospital admission and after 48h were not statistically significant ($p = 0,187$). A correlation between the increase in CRP concentration and the increase in the PIRO score was not found ($r_s = 0,187$; $p = 0,540$). Although IL-6 and TNF- α expression was detected in 5 and 6 animals, respectively, it was not possible to perform a statistical analysis. Bacterial DNA was detected in 3 of the 12 animals that composed the experimental group.

This work represents a contribution towards the development of a classification system for septic canine patients. It is urgent to discover new biomarkers, capable of enabling a more objective monitorization of both Human and animal septic patients.

Keywords: CPV, Parvovirus, sepsis, SIRS, PIRO, CRP, IL-6, TNF- α , bDNA, HEV-FMV-UL.

Índice Geral

Agradecimentos	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas	xiii
Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos	xv
I - DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO ESTÁGIO CURRICULAR	1
1. MEDICINA INTERNA	1
2. CIRURGIA	1
3. IMAGIOLOGIA	2
4. INTERNAMENTO	2
5. UNIDADE DE ISOLAMENTO DE DOENÇAS INFECIOSAS	2
II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. SÉPSIS	3
1.1. Bacteriemia, Endotoxemia, Sepsis e SRIS – conceitos.....	3
1.2. Fisiopatologia	5
1.2.1. PAMPs e DAMPs.....	5
1.2.2. As citocinas na mediação da resposta inflamatória	6
1.2.3. A resposta de fase aguda	7
1.2.4. A inflamação e a coagulação.....	8
1.2.5. A resposta anti-inflamatória compensatória	9
1.2.6. A síndrome de disfunção multiorgânica	10
1.3. Exame Físico.....	12
1.4. Diagnóstico.....	12
1.4.1. Alterações laboratoriais	12
1.4.2. Imagiologia	14
1.4.3. Identificação da Infecção	14
1.4.4. Biomarcadores.....	15
1.5. Tratamento	16
1.5.1. Fluidoterapia	16
1.5.2. Utilização de fármacos vasopressores e inotrópicos positivos	17
1.5.3. Antibioterapia	18
1.5.4. Proteção gastrointestinal	18
1.5.5. Cuidados pós-estabilização	18
1.6. Prognóstico.....	18
2. PARVOVIROSE CANINA.....	20
2.1. A Parvovirose como modelo natural de sépsis	20
2.2. Etiologia e Epidemiologia	21
2.2.1. História e Subtipos.....	21
2.2.2. Persistência no Meio Ambiente	21
2.3. Suscetibilidade	22
2.4. Patogenia da Infecção	23
2.5. Exame Físico e História Clínica	24
2.6. Diagnóstico.....	25
2.6.1. Exames complementares	25
2.6.1.1. Alterações laboratoriais	25
2.6.1.2. Imagiologia.....	25
2.6.2. Exames microbiológicos	26
2.6.2.1. Detecção de Anticorpos anti-CPV	26
2.6.2.2. Detecção de antígeno fecal.....	26
2.6.2.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	26

2.6.2.4. Teste de Hemaglutinação	27
2.7. Tratamento	27
2.7.1. Fluidoterapia	27
2.7.2. Antibioterapia	28
2.7.3. Tratamento anti-emético	28
2.7.4. Suporte nutricional	28
2.7.5. Analgesia	28
2.8. Prognóstico	29
2.9. Prevenção.....	29
3. PIRO: UM SISTEMA DE ESTADIAMENTO PARA A SÉPSIS	31
3.1. A utilidade dos sistemas de estadiamento	31
3.2. Sistemas de estadiamento de doentes críticos ou sépticos na Medicina Humana	31
3.2.1. PIRO (<i>Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction/failure</i>)	31
3.2.1.1. Predisposição.....	32
3.2.1.2. Infeção	32
3.2.1.3. Resposta.....	33
3.2.1.4. Disfunção/insuficiência orgânica	33
3.2.2. APACHE (<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i>)	34
3.2.3. SOFA (<i>Sequential/ Sepsis-related Organ Failure Assessment</i>)	34
3.2.4. MEDS (<i>Mortality in Emergency Department Sepsis</i>).....	35

III - MODELO CANINO PARA SÉPSIS: CONTRIBUIÇÃO PARA A CLASSIFICAÇÃO E ESTRATIFICAÇÃO EM DOENTES SÉPTICOS..... 36

1. OBJETIVOS	36
2. MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1. Caracterização da amostra.....	37
2.2. Critérios de inclusão	38
2.3. Critérios de exclusão	38
2.4. Classificação PIRO e diagnóstico clínico de SRIS.....	38
2.4.1. Dados recolhidos	38
2.4.2. Critérios de classificação.....	38
2.5. Quantificação de CRP	40
2.6. Quantificação da expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α	41
2.6.1. Extração de RNA	41
2.6.2. Produção de DNA complementar.....	41
2.6.3. Quantificação da expressão de mRNA IL-6 e TNF- α por RT-qPCR	42
2.7. Identificação de DNA bacteriano	43
2.7.1. Extração de DNA genómico	43
2.7.2. Amplificação por PCR	43
2.7.3. Identificação dos produtos de amplificação.....	44
2.8. Análise Estatística	44
2.8.1. Classificação PIRO e identificação de SRIS	44
2.8.2. Quantificação de CRP.....	44
2.8.3. Concentração de CRP e classificação PIRO	45
2.8.4. Concentração de CRP e SRIS.....	45
3. RESULTADOS	46
3.1. Classificação PIRO e identificação de SRIS	46
3.2. Concentração de CRP	47
3.3. Concentração de CRP e classificação PIRO	49
3.4. Concentração de CRP e SRIS	49
3.5. Quantificação da expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α	50
3.6. Identificação de DNA bacteriano	51
4. DISCUSSÃO.....	52
4.1. Os critérios de definição de SRIS.....	52
4.2. O desempenho do sistema PIRO	53
4.2.1. Predisposição.....	53
4.2.2. Infeção	54

4.2.3. Resposta.....	55
4.2.4. Disfunção Orgânica	55
4.2.4.1. Disfunção renal.....	56
4.2.4.2. Disfunção cardiovascular.....	56
4.2.4.3. Disfunção respiratória	57
4.2.4.4. Disfunção hepática	58
4.2.4.5. Alterações hemostáticas.....	60
4.2.5. A classificação total.....	60
4.3. Concentração de CRP	63
4.4. A concentração de CRP, os critérios de SRIS e a classificação PIRO	63
4.5. Quantificação de IL6 e TNF- α	63
4.6. Identificação de DNA bacteriano	64
4.7. Observação conjunta dos resultados obtidos.....	66
5. CONCLUSÃO	68
IV - BIBLIOGRAFIA.....	69
V - ANEXOS.....	78
ANEXO 1: TABELAS DE REGISTO DAS VARIÁVEIS RECOLHIDAS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS ANIMAIS NO QUE TOCA ÀS VARIÁVEIS RESPOSTA E DISFUNÇÃO ORGÂNICA.	78
ANEXO 2: TABELAS COM A CLASSIFICAÇÃO PIRO E SRIS DOS ANIMAIS INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	101

Índice de figuras

Figura 1: Médias de classificação P (Predisposição), R (Resposta), O (Disfunção Orgânica) e PIRO (Total) dos animais sobreviventes (Alta) e dos animais que morreram (Morte).	47
Figura 2: Placa ELISA durante a execução da experiência, no momento após a adição do conjugado enzima-anticorpo (a azul), à exceção do poço número 1 da linha A, ao qual já tinha sido adicionado a solução de paragem (a amarelo). Os diferentes tons de azul evidenciam macroscopicamente as diferenças entre as concentrações de CRP nos diferentes poços.	48
Figura 3: Curva padrão gerada para obtenção das concentrações de CRP nas amostras de plasma testadas. Original.	48
Figura 4: Representação gráfica das concentrações de CRP medidas no plasma dos cães com Parvovirose e cães do grupo controlo em relação à curva padrão. Original.	48
Figura 5: Médias das concentrações de CRP nos cães com diagnóstico de Parvovirose (Média = 75,935; EP = 9,460) e nos cães do grupo controlo (Média = 6,655; EP = 1,966), com as respetivas barras de erro.....	49
Figura 6: Curva ROC que mostra a sensibilidade e especificidade dos valores de CRP na deteção de animais em SRIS segundo os critérios SRIS 1991.	50
Figura 7: Resultados da eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com os primers para identificação de <i>E. coli</i> (A) e <i>Staphylococcus</i> spp. (B).	51
Figura 8: Exemplo de FFTree para o elemento Resposta (AUC=0,96; sensibilidade=1; especificidade=0,96).	62

Índice de tabelas

Tabela 1: Número de horas passadas nos diferentes serviços ou unidades do HEV-FMV-UL.	1
Tabela 2: Bactérias passíveis de ser isolados através de métodos rotineiros de hemocultura, a partir da corrente sanguínea de cães e gatos com bacteriémia, segundo Sykes (2014).	3
Tabela 3: Critérios para o diagnóstico clínico de SRIS em cão e em gato, segundo Sykes (2014b).	4
Tabela 4: Alterações hematológicas, bioquímicas e hemostáticas possivelmente encontradas em pacientes sépticos (Silverstein & Otto, 2012; Silverstein, 2015a).	14
Tabela 5: Tipos de fluidos usados para a reposição e manutenção da circulação sanguínea, segundo Silverstein & Otto (2012) e Silverstein (2015b).	17
Tabela 6: Caracterização da amostra de 31 animais que foram alvo do estudo da classificação PIRO.	37
Tabela 7: Critérios de classificação propostos para a predisposição e respetiva pontuação, em cães com Parvovirose, tendo em conta a idade, a raça e o status vacinal do doente (Glickman et al., 1985; Houston et al., 1996; Goddard & Leisewitz, 2010; Greene & Decaro, 2012).	39
Tabela 8: Critérios de classificação propostos para a resposta e respetiva pontuação, em cães com Parvovirose, tendo em conta a temperatura, a frequência cardíaca, a frequência	

respiratória e a contagem leucocitária do doente (¹ Rijnberk & Stokhof, 2009; ² Boag, 2011 ³ Sykes, 2014; ⁴ Marshall & Sweeney, 1990).....	39
Tabela 9: Critérios de classificação propostos para a disfunção orgânica em cães com Parvovirose, tendo em conta parâmetros clínicos e analíticos. A evidência de disfunção de um sistema orgânico equivale a 1 ponto (¹ Osterbur, Mann, Kuroki & Declue, 2014; Barsanti, 2012. ² Osterbur et al., 2014. ³ Kenney et al., 2010).	40
Tabela 10: Primers usados para quantificação da expressão de mRNA por RT-qPCR, respetivas sequências e tamanho dos segmentos amplificados (Henriques et al., 2016).....	42
Tabela 11: Primers usados na amplificação do DNA de E. coli e Staphylococcus spp. por PCR, sequências, tamanho dos segmentos amplificados e referência bibliográfica.....	44
Tabela 12: Tabelas de frequências dos animais que se considerou exibirem SRIS segundo os critérios SRIS 1991 e SRIS 2001, tanto à entrada no internamento como às 48 horas, e resultados dos respetivos testes de McNemar.....	46
Tabela 13: Valores das médias de $2^{\Delta\Delta CT}$ e erro-padrão da quantificação relativa da expressão de IL-6 e TNF- α	50
Tabela 14: Definições de LPA e SDRA para pacientes animais segundo Wilkins et al. (2007).	58
Tabela 15: Resumo de alguns dos resultados obtidos com cada experiência, em cada amostra, em conjunto com o desfecho observado.	66

Lista de abreviaturas, símbolos e acrónimos

3,3',5,5'-TMB – 3,3',5,5'-

Tetramethylbenzidine

ALT – Alanina aminotransferase

APACHE – *Acute Physiology and Chronic*

Health Evaluation

ARDS – *Acute Respiratory Distress*

Syndrome

AUC – *Area Under the Curve* (ou *Area*

Under the Receiver Operating

Characteristic)

bDNA – *Bacterial deoxyribonucleic acid*

bpm – batimentos por minuto

CARS – *Compensatory Anti-inflammatory*

Response Syndrome

cDNA – *Complementary deoxyribonucleic acid*

CID – Coagulação Intravascular

Disseminada

COX-2 – Cicloxigenase-2

CPAP – *Continuous Positive Airway*

Pressure

CPV-2 – *Canine Parvovirus 2*

CRP – *C-reactive protein*

C_T – *Cycle threshold*

DAMPs – *Damage-associated Molecular*

Patterns

DNA – *Deoxyribonucleic acid*

dNTP – *Deoxynucleotide Triphosphate*

DPBS – *Dulbecco's Phosphate-Buffered*

Saline

EB – Excesso de bases

EDTA – Acido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – *Enzyme-linked immunoabsorbent*

assay

ESICM – *European Society of Intensive*

Care Medicine

FAS – Fosfatase Alcalina Sérica

FC – Frequência cardíaca

FFT – *Fast Frugal Trees*

FiO₂ – Fração de Oxigénio Inspirado

FPV – *Feline Parvovirus*

FR – frequência respiratória

g – grama

gDNA – *Genomic complementary deoxyribonucleic acid*

HCAS – *Health-care associated sepsis*

HEV-FMV-UL – Hospital Escolar

Veterinário da Faculdade de Medicina

Veterinária

HI – *Haemagglutination inhibiting units*

HMGB1 – *High Mobility Group Box-1*

HMWK – *High Molecular Weight*

Kininogen

IL-1 – *Interleukin 1*

IL-1 β – *Interleukin 1 beta*

IL-6 – *Interleukin 6*

IL-8 – *Interleukin 8*

iNOS – *Induceable Nitric Oxide Synthase*

kg – quilograma

LPS – *Lipoprotein S*

LRA – Lesão Renal Aguda

MDA – *Maternally derived antibodies*

MEDS – *Mortality in Emergency*

Department Sepsis

mg/dL – miligrama por decilitro

mg/L – miligrama por litro

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MIF – *Macrophage Migration Inhibitory*

Factor

ml – mililitro

mmHg – milímetros de mercúrio

mM – milimole

mmol/L – millimole por litro

MODS – *Multiple Organ Dysfunction Syndrome*

NF-κB – *Nuclear Factor Kappa B*

ng – nanograma

NGAL – *Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*

NLR – *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing proteins*

nm – nanómetro

°C – Grau Celsius

PaO₂ – Pressão parcial de oxigênio

PCO₂ – Pressão parcial de CO₂

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PCT – Procalcitonina

PDF – Produtos de Degradação da Fibrina

PEEP – *Positive End Expiratory Pressure*

PFA – Proteínas de fase aguda

pM – Picomole

PIRO – Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction/failure

PRR – *Pattern recognition receptors*

qSOFA – *quick SOFA*

RNA – *Ribonucleic acid*

ROC – *Receiver Operating Characteristic*

RPL27 – *Ribosomal Protein L27*

rpm – respirações por minuto; rotações por minuto

RT-PCR – *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR – *Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction*

s – segundo

SACiUCI – Grupo de Estudos de Sepsis Adquirida na Comunidade em doentes internados em Cuidados Intensivos

SDMO – Síndrome de Disfunção Multiorgânica

SDRA – Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda

SIBO – *Small Intestinal Bacterial Overgrowth*

SOFA – *Sequential/ Sepsis-related Organ Failure Assessment*

SRIS – Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TC – Tomografia Computorizada

TF – Fator Tissular

TGF-β – *Tumor Growth Factor β*

TLR – *Toll-like receptors*

TNF-α – *Tumor Necrosis Factor – α*

TNM – *Tumour, node and metastasis*

TP – Tempo de Protrombina

TRC – Tempo de repleção capilar

TTPA – Tempo de Tromboplastina parcial ativado

UIDI – Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas

U/L – Unidades por litro

U/μL – Unidades por microlitro

ΔΔC_T – *Double-delta C_T*

μL – microlitro

μM – micromole

I - Descrição das atividades desenvolvidas no estágio curricular

O estágio curricular foi realizado entre 5 de setembro de 2016 e 3 de março de 2017, tendo a duração de 6 meses, no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV-UL). As atividades foram desenvolvidas em diferentes períodos do dia, abrangendo turnos da noite, fins de semana e feriados, de acordo com o escalonamento rotativo atribuído a todos os estagiários, em diferentes áreas (Tabela 1). Todas as atividades foram desenvolvidas sob a supervisão ou orientação do Médico Veterinário ou Enfermeiro Veterinário responsável.

Tabela 1: Número de horas passadas nos diferentes serviços ou unidades do HEV-FMV-UL.

Serviço	Número de horas
Medicina Interna	330
Cirurgia	168
Imagiologia	48
Internamento	276
Unidade de Isolamento de Doenças Infecciosas	222
Total	1044

1. Medicina Interna

No serviço de Medicina Interna do HEV-FMV-UL a autora participou em primeiras consultas, consultas de rotina e de seguimento e em consultas de referência nas diversas áreas de especialidade que o HEV-FMV-UL oferece. Nessas consultas foi possível recolher, de forma autónoma, a história pregressa e anamnese dos animais e realizar um exame físico detalhado a cada paciente. Sob a supervisão do Médico Veterinário responsável pela consulta foi possível participar em vários procedimentos médicos, destacando-se as colheitas de amostras de sangue, colocação de cateteres endovenosos, preparação e administração de fármacos por diferentes vias e realização de exames citológicos através de PAAF ou zaragatoas, entre outros. Com o Médico Veterinário responsável foi também possível discutir cada caso clínico no que à abordagem de diagnóstico e ao tratamento dizia respeito.

2. Cirurgia

O serviço de Cirurgia de Animais de Companhia do HEV-FMV-UL funciona de 2ª a 6ª feira, preferencialmente de manhã. As atividades desenvolvidas compreenderam a receção dos animais (confirmando as informações de contacto dos donos e o cumprimento do jejum pré-anestésico), a sua cateterização endovenosa, preparação e administração dos fármacos pré-anestésicos, tricotomia e assepsia da zona cirúrgica, a indução anestésica, a monitorização anestésica dos animais e assistência durante a cirurgia e, por último, o seu

acompanhamento pós-cirúrgico. As cirurgias presenciadas incluem-se principalmente no campo de Cirurgia de Tecidos Moles, mas também nos campos de Cirurgia Ortopédica, de Neurocirurgia e de Cirurgia Oftalmológica.

3. Imagiologia

Neste serviço foi prestado auxílio nas áreas de Ecografia (a funcionar entre as 14:00 horas e as 21:00 horas), Radiografia e Tomografia Axial Computorizada (ambas a funcionar entre as 8:00 horas e as 16:00 horas). As funções incluíram o posicionamento correto dos animais, a sua sedação, anestesia e monitorização anestésica. Foi possibilitada a aprendizagem no que toca à interpretação das imagens recolhidas e ao seu significado do ponto de vista clínico.

4. Internamento

O serviço de Internamento compreendeu a realização de turnos de 12 horas, diurnas ou noturnas, em dias de semana ou em fins de semana e feriados. As responsabilidades incluíram o acompanhamento dos animais hospitalizados, a sua monitorização clínica, a gestão da sua alimentação e passeios, a limpeza das jaulas, a preparação e administração da medicação prescrita pelo Médico Veterinário responsável do caso clínico ou do Internamento e a entrega e explicação de notas de alta aos donos. Outros procedimentos efetuados foram mudança de pensos, limpeza de feridas, venopunção para colocação de cateteres endovenosos ou colheita de amostras de sangue e algaliações.

5. Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas

O desenvolvimento de atividades na Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas foi essencial, uma vez que o presente trabalho incide, principalmente, na caracterização do quadro clínico apresentado por pacientes com diagnóstico de Parvovirose. As duas últimas horas de cada turno foram passadas na UIDI (Unidade de Isolamento de Doenças Infeciosas) do HEV-FMV-UL, além dos turnos normalmente atribuídos a todos os estagiários. Durante os turnos de Internamento diurnos, noturnos, de fim de semana ou feriado, esse compromisso traduziu-se na participação nas monitorizações clínicas e administração de medicação dos pacientes internados na UIDI.

Foi possível participar na monitorização, higienização e medicação dos animais internados, aproveitando o potencial da unidade como local de treino tutorado e de aperfeiçoamento de competências clínicas, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Solange Gil, assistindo também a algumas das suas consultas de seguimento. Foi possível, também, acompanhar o curso clínico dos pacientes, participar na discussão dos casos clínicos e recolher tanto amostras como informações clínicas, a partir dos registos da UIDI, que foram essenciais para a realização deste trabalho.

II - Revisão Bibliográfica

1. Sépsis

1.1. Bacteriemia, Endotoxemia, Sépsis e SRIS – conceitos

Antes de referir os mecanismos envolvidos na sépsis, interessa esclarecer alguns conceitos que comumente são confundidos. De acordo com as mais recentes orientações, a sépsis deve ser definida como a alteração grave do funcionamento dos sistemas de órgãos que resulta de uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (Singer et al., 2016). A presença de bactérias viáveis em circulação é definida como bacteriemia (tabela 2). Pode ocorrer bacteriemia devido a qualquer infecção (como peritonite, pneumonia ou piómetra) mas a mesma não tem de estar associada a uma resposta inflamatória sistêmica (Greiner, Wolf & Hartmann, 2008; Silverstein & Otto, 2012). Endotoxemia é a presença do componente LPS (*Lipoprotein S*) da parede celular de bactérias gram-negativas em circulação, podendo ou não estar associado a bacteriemia (Silverstein & Otto, 2012; Sykes, 2014b).

Tabela 2: Bactérias passíveis de ser isolados através de métodos rotineiros de hemocultura, a partir da corrente sanguínea de cães e gatos com bacteriemia, segundo Sykes (2014).

	Cães	Gatos
Comuns (>10% dos isolados)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus</i> spp., incluindo <i>S. pseudintermedius</i>, <i>S. aureus</i>, e <i>staphylococci</i> coagulase-negativos • <i>Streptococcus</i> spp., especialmente <i>S. canis</i>, mas também organismos do complexo <i>S. bovis</i> e, raramente, outros <i>streptococci</i> • <i>Escherichia coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> • Outras Enterobacteriaceas (<i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Citrobacter freundii</i>, <i>Enterobacter cloacae</i>) • Anaeróbios
Pouco comuns (1% a 10% dos isolados)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus</i> spp. • <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Serratia</i> spp., <i>Enterobacter cloacae</i> • <i>Pasteurella canis</i> e <i>Pasteurella dagmatis</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • Anaeróbios (<i>Clostridium perfringens</i>, <i>Prevotella</i> spp., <i>Bacteroides</i> spp., <i>Fusobacterium</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Salmonella</i> spp. • Bactérias gram-negativas não Enterobacteriaceas (<i>Pasteurella multocida</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Acinetobacter baumannii</i>) • <i>Staphylococci</i> • <i>Streptococci</i>
Raros (≤1% dos isolados)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Erysipelothrix</i> spp. • <i>Brucella</i> spp. • <i>Citrobacter freundii</i> • <i>Acinetobacter</i> spp. • <i>Salmonella</i> spp. • <i>Mycobacterium</i> spp. • <i>Campylobacter</i> spp. • Outros agentes patogénicos nosocomiais, por exemplo, <i>Ralstonia pickettii</i>, <i>Burkholderia cepacia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus</i> spp.

Em 1991, à medida que se ia tornando cada vez mais clara a relação entre sépsis e os mecanismos inflamatórios, é realizada uma reunião de consenso sobre a matéria. Um dos resultados desta reunião é a definição precisa de SRIS (Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica) e a sua distinção de sépsis (Bone et al., 1992). SRIS é o conjunto de sinais clínicos apresentados pelo paciente quando está em curso uma resposta inflamatória sistêmica, consequência de causas infecciosas ou não infecciosas (Silverstein & Otto, 2012). Segundo as mais recentes definições, sépsis é a disfunção orgânica potencialmente mortal que resulta de uma resposta descontrolada do hospedeiro à infecção (Singer et al., 2016). Na Conferência previamente mencionada são estabelecidos critérios clínicos para o diagnóstico de SRIS, numa tentativa de melhor selecionar pacientes para ensaios clínicos que visavam estudar a eficácia de novos tratamentos contra a sépsis (Bone et al., 1992). Mais tarde, esses critérios foram adaptados à Medicina Veterinária (tabela 3), não só com esse objetivo mas também numa tentativa de detetar casos de sépsis em fases mais precoces ou em que os sinais clínicos eram mais subtis (Hauptman, Walshaw & Olivier, 1997).

Tabela 3: Critérios para o diagnóstico clínico de SRIS em cão e em gato, segundo Sykes (2014b).

Parâmetros	Cão	Gato
Temperatura	<37.8 ou >39.4 °C	<37.8 ou >39.7 °C
FC	>140 bpm	<140 ou >225 bpm
FR	>30 rpm ou PCO ₂ <32 mmHg	>40 rpm
Contagem de leucócitos	<6000 ou >16,000 células/μL, ou >3% neutrófilos imaturos	<5000 ou >19,500 células/μL, ou >5% neutrófilos imaturos

Legenda: °C, graus Celsius; FC, frequência cardíaca; bpm, batimentos por minuto; FR, frequência respiratória; rpm, respirações por minuto; PCO₂, pressão de dióxido de carbono; mmHg, milímetros de mercúrio; células/μL, células por microlitro.

Segundo estes critérios, SRIS é diagnosticada em cão se o paciente apresentar pelo menos 2 dos 4 critérios: temperatura corporal inferior a 37.8°C ou superior a 39.4°C, frequência cardíaca superior a 140 batimentos por minuto, frequência respiratória superior a 30 respirações por minuto ou pressão de CO₂ inferior a 32 mmHg, e contagem leucocitária inferior a 6000 ou superior a 16,000 células/μL. Em gatos é necessário que se verifiquem pelo menos 3 dos 4 critérios (Sykes, 2014b). Em 2001 esses critérios foram atualizados no campo da medicina humana, de forma a incluir mais parâmetros e a aumentar a especificidade da abordagem (Levy et al., 2003).

De acordo com as mais recentes recomendações em Medicina Humana (Singer et al., 2016) não faz sentido a designação de sépsis grave, encontrada em muita da literatura, tanto na

área da Medicina Humana como na área da Medicina Veterinária (sépsis resultante em disfunção orgânica ou em hipoperfusão dos tecidos, com hipotensão, hiperlactacidemia ou oligúria antes ou após a adequada administração de fluidos). Persiste, em ambas as áreas, a designação de choque séptico. No caso de pacientes caninos trata-se de hipotensão (pressão sistólica <90mmHg ou pressão arterial média <70mmHg) que não pode ser resolvida apenas com reposição de fluidos, sendo necessário tratamento com fármacos vasopressores (Silverstein & Otto, 2012; Sykes, 2014b).

1.2. Fisiopatologia

Segundo estudos epidemiológicos de larga-escala na área da Medicina Humana a sépsis é a principal causa de morte em pacientes críticos. Não são comuns estudos semelhantes na área da Medicina Veterinária, mas estima-se que uma grande parte dos animais em estado crítico sofra também de sépsis (Lewis, Chan, Pinheiro, Armitage-Chan & Garden, 2012). Ao longo das últimas décadas, muitos foram os esforços no sentido de esclarecer os mecanismos complexos que caracterizam a sépsis (Sykes, 2014b).

Estudos efetuados em animais, aos quais eram inoculadas elevadas doses de bactérias viáveis ou de componentes bacterianos, como LPS, pareciam suportar a teoria de que era a resposta inflamatória exagerada, consequência da estimulação excessiva do sistema imunitário, a grande culpada pelas elevadas taxas de mortalidade e morbidade. Em estudos como estes foi demonstrado que a neutralização de certas citocinas pró-inflamatórias resultava na redução da mortalidade após estimulação com LPS ou bactérias viáveis, inoculadas na corrente sanguínea dos animais. Seguiram-se diversos ensaios clínicos em pacientes com sépsis grave, desenhados na tentativa de estudar o efeito da inibição destas citocinas. A ausência de resultados promissores em quase todos os ensaios clínicos desenhados segundo este modelo fez repensar o papel atribuído à inflamação excessiva como principal causa de mortalidade e morbidade nestes pacientes (Anas, Wiersinga, de Vos, & van der Poll, 2010).

1.2.1. PAMPs e DAMPs

A existência de recetores capazes de reconhecer moléculas de agentes patogénicos e a sua presença ubíqua no organismo são o que permite ao sistema imunitário uma resposta eficaz contra esses mesmos agentes. Esses recetores são os *Pattern Recognition Receptors* (PRR) (Lewis et al., 2012), dos quais são exemplos os TLRs (*Toll-like Receptors*) e os NLRs (*nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing proteins*).

A cascata de eventos que compõem a sépsis começa a desenvolver-se quando esses recetores detetam moléculas provenientes dos microrganismos conhecidas como PAMPs (*Pathogen-associated Molecular Patterns*) (Sykes, 2014b). Estas moléculas são exclusivamente produzidas por agentes microbianos, o que possibilita uma discriminação

self e *non-self* eficiente. Além disso, são pouco variáveis e comuns a classes inteiras de microrganismos, o que permite que um número relativamente pequeno de PRRs consiga reconhecer um grande número de agentes potencialmente patogênicos. Por fim, são geralmente vitais à patogenicidade ou sobrevivência do microrganismo em causa (Lewis et al., 2012). Exemplos dos mesmos são o lípido A do LPS bacteriano, peptidoglicanos, flagelina, DNA ou RNA de cadeia dupla (Sykes, 2014b).

Os PRRs também reconhecem moléculas libertadas pelas células endógenas em caso de lesão: os *Damage-associated Molecular Patterns* (DAMPs). Estes têm um papel mais preponderante no desencadear de SRIS. São conhecidas, na área da Medicina Humana, importantes DAMPs como a HMGB1 (*High Mobility Group Box-1*), uma proteína associada à cromatina, e o DNA celular (Sykes, 2014b).

O facto de os PRRs reconhecerem tanto PAMPs como DAMPs torna possível a instalação de diversos mecanismos de *feedback* positivo que, por sua vez, contribuem para a propagação de uma resposta inflamatória generalizada. A persistência de um quadro inflamatório desse tipo faz com que os mecanismos originalmente existentes para defender o organismo contra agressões externas levem a uma maior danificação dos tecidos, diminuindo a atividade antimicrobiana e podendo, ainda, permitir a instalação de infeções oportunistas (Lewis et al., 2012).

1.2.2. As citocinas na mediação da resposta inflamatória

A ligação de PAMPs ou DAMPs aos PRRs desencadeia uma cascata de moléculas sinalizadoras, culminando na ativação do NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*). Esta molécula desempenha um papel fundamental na regulação da resposta imunitária à infeção, uma vez que ativa a transcrição de um grande número de genes, incluindo aqueles que codificam proteínas de fase aguda, fatores de coagulação e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α (*Tumor Necrosis Factor – α*) (Lewis et al., 2012) e diversas interleucinas, tais como: IL-1 α e IL-1 β , IL-6 ou IL-8 (Silverstein & Otto, 2012).

O macrófago é a principal célula do sistema imunitário a iniciar a resposta a PAMPs e DAMPs. A resposta inicial dos macrófagos à endotoxina é a libertação de citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 β e TNF- α . O TNF- α é responsável por diversas funções imunitárias e inflamatórias, tais como estimular os próprios macrófagos a produzir IL-1, IL-6 e fatores estimuladores de colónias de macrófagos. Estas citocinas são mediadores precoces da inflamação. Em cães, a sua concentração começa a aumentar 15 minutos após a exposição a LPS, atinge o pico 2 horas depois, e volta aos níveis normais cerca de 4 horas depois (Silverstein & Otto, 2012). A sua ação no endotélio compreende estimulação da produção de iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) e COX-2 (Cicloxigenase-2), levando a vasodilatação e redução do fluxo sanguíneo. Além de tudo isto, o TNF- α induz a expressão de proteínas pró-coagulantes como o fator tissular (TF) e reduz a produção de

proteínas anticoagulantes como a trombomodulina, contribuindo para a ativação da cascata da coagulação (Lewis et al., 2012).

A IL-1 é uma interleucina co-estimuladora dos linfócitos Th2, estimula a resposta de fase aguda, e induz a hipertermia (ou febre) entre outros efeitos pró-inflamatórios (Silverstein & Otto, 2012).

A IL-6, uma das interleucinas mais investigadas no que toca a estudos sobre sépsis ou SRIS em animais de companhia, também promove a resposta de fase aguda além de exercer estimulação sobre a ativação dos leucócitos e proliferação de células precursoras da linha mieloide (Lewis et al., 2012).

No contexto da resposta anti-inflamatória a IL-10 é de grande importância. O seu papel passa pela inibição da libertação de TNF- α , IL-1 β e IL-6 a partir de macrófagos e monócitos e pela indução da proteína antagonista dos recetores de IL-1 (Lewis et al., 2012). A sua importância no equilíbrio entre as respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória já foi muitas vezes descrita em modelos experimentais. No entanto, animais em sépsis ou SRIS podem apresentar níveis diminuídos desta interleucina em circulação em comparação com animais saudáveis, o que evidencia o desequilíbrio entre ambas as respostas nestes casos (DeClue et al., 2012).

1.2.3. A resposta de fase aguda

Além da libertação de uma grande variedade de citocinas, a estimulação dos PRRs também promove a libertação de uma grande variedade de proteínas de fase aguda (PFA) por parte dos hepatócitos. A resposta de fase aguda é caracterizada pela febre, neutrofilia, e ativação das cascatas da coagulação e do complemento. São reconhecidos, de forma geral, dois grupos de PFA: as de tipo I, (como a substância amiloide A ou a proteína C-reativa), induzidas pela libertação de IL-1 α , IL-1 β e TNF- α ; e as de tipo II (como a α 2-glicoproteína ou a α 1-antitripsina), induzidas pela libertação de IL-6 (Moshage, 1997). Como consequência da sobreprodução de PFA, as concentrações de outras proteínas, como albumina, proteína C, proteína S e antitrombina diminuem (Lewis et al., 2012).

Na área da Medicina Humana muita investigação tem incidido sobre duas proteínas: a procalcitonina e a proteína C-reativa (ou CRP, de *C-reactive protein*), uma PFA. A CRP é produzida pelos hepatócitos e libertada para a corrente sanguínea em resposta ao estímulo de citocinas pró-inflamatórias (Kushner & Feldman, 1978). A magnitude das alterações da sua concentração no curso de um processo infeccioso ou inflamatório reflete a progressão da doença e a atividade inflamatória. Podem estar aumentadas em diversos casos, como sépsis, pancreatite, neoplasia, leptospirose ou leishmaniose. É um indicador muito sensível e pouco específico de inflamação (Lewis et al., 2012; McClure, van Schoor, Thompson, Kjølgaard-Hansen & Goddard, 2013).

1.2.4. A inflamação e a coagulação

A elevada prevalência de alterações da coagulação e de CID em doentes com sépsis sublinha a estreita relação entre as vias da inflamação e da coagulação (Lewis et al., 2012). A uma escala local, a ativação da coagulação e deposição de fibrina podem ser uma medida preventiva na tentativa de limitar a dispersão de agentes patogénicos e de mediadores inflamatórios para além do local da agressão (Sykes, 2014b).

As diversas citocinas pró-inflamatórias e PAMPs, como o LPS, induzem a expressão de fator tissular (FT) por parte de monócitos, macrófagos e células parenquimatosas (Lewis et al., 2012). Desta forma dá-se a ativação da cascata da coagulação através da via extrínseca. Uma vez que ocorre também a exposição de FT, a partir de células endoteliais danificadas no decurso do processo inflamatório, ocorre o aumento da concentração do fator de von Willebrand (Sykes, 2014b).

A trombomodulina é um importante anticoagulante que se liga à trombina, impedindo-a de clivar o fibrinogénio. O complexo trombomodulina-trombina também ativa a proteína C, que por sua vez, se liga à proteína S. Num cenário normal, o complexo proteína C-proteína S inativa os fatores de coagulação ativados Va e VIIIa, impedido a coagulação. A lesão endotelial promove uma redução na expressão de trombomodulina, o que inviabiliza a ativação da proteína C, a sua ligação à proteína S e os efeitos anticoagulantes deste complexo (Sykes, 2014b). Na área da Medicina Humana a utilização de proteína C ativada recombinante já foi bastante estudada. Chegou a ser recomendada a sua utilização em pacientes com sépsis grave, mas os estudos mais recentes não fornecem evidências de que a sua utilização seja benéfica, quer em pacientes com sépsis grave, quer em pacientes em choque séptico (Lewis et al., 2012).

Além do papel do FT no despoletar da coagulação na presença de inflamação, é também de relevar a importância do sistema calicreína-cinina ou sistema de contacto. A sua função é iniciar e participar na resposta a agressões, principalmente no que toca à inflamação e à coagulação. Neste sistema participam os fatores de coagulação XII (ou fator de Hageman), a précalicreína (ou fator de Fletcher) e o cininogénio de alto peso molecular (HMWK, de *high molecular weight kininogen*). O HMWK é o responsável pela ligação destas moléculas num complexo e pela ligação do mesmo às superfícies. Quando há lesão endotelial e exposição de colagénio, este ativa o fator XII. O fator XIIa (fator XII ativado) promove a ativação da précalicreína, formando-se a calicreína. Depois de formados o fator XIIa e a calicreína o HMWK é ativado e é libertada bradicinina. Após ativação, o complexo ativa o fator XI, dando início à via intrínseca da coagulação (Wu, 2015). A lesão endotelial, as plaquetas ativadas e as superfícies bacterianas ativam este sistema, levando à formação de calicreína e de bradicinina. A calicreína acelera a fibrinólise através da conversão do plasminogénio em plasmina, e promove a ativação do próprio fator XII, levando à ativação da cascata do

complemento pela via clássica. A bradicinina promove a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular, bem como a redução da função plaquetária (Lewis et al., 2012).

A ativação da cascata da coagulação, a alteração dos elementos anticoagulantes e a ineficiente fibrinólise levam a um estado prótrombótico e de hipercoagulabilidade que, apesar de ser de difícil diagnóstico, pode contribuir para disfunção orgânica através de mediadores inflamatórios e formação de microtrombos, ao mesmo tempo que promove o consumo dos diversos elementos necessários à coagulação. Estas alterações são clinicamente reconhecidas como CID (Silverstein & Otto, 2012).

1.2.5. A resposta anti-inflamatória compensatória

Durante o desenvolvimento de uma infecção ou perante um potente estímulo inflamatório são reconhecidas moléculas que levam à libertação de diversos mediadores pró-inflamatórios. A reação inflamatória local ou sistémica pode ser benéfica ou deletéria. A resposta inflamatória excessiva pode levar a disfunção orgânica, enquanto que a resposta anti-inflamatória que visa regular o processo inflamatório pode fazer com que haja um enfraquecimento do sistema imunitário (Adib-Conquy & Cavaillon, 2009).

Nos anos 90 é proposto o acrónimo CARS (*Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*) para designar a resposta compensatória contra o processo inflamatório excessivo que ocorre na SRIS e na sépsis (Bone, Grodzin & Balk, 1997). Inicialmente, Bone e colegas postularam que, a dado momento, predominaria a SRIS ou a CARS em determinado paciente. Outros afirmaram que à SRIS se seguia a CARS. Atualmente reconhece-se que a sépsis envolve a ativação precoce e simultânea de mecanismos pro e anti-inflamatórios (Singer et al., 2016). A CARS não parece ser um fenómeno generalizado que enfraquece todas as funções do sistema imunitário, mas sim uma adaptação que produz resultados diferentes conforme as diferentes células ou tecidos, com destaque para a reprogramação dos linfócitos. No sentido de diminuir a inflamação são produzidas diversas citocinas anti-inflamatórias, entre as quais a IL-10 e o TGF- β (*Tumor Growth Factor β*) (Adib-Conquy & Cavaillon, 2009).

Nalguns pacientes o processo inflamatório exagerado pode rapidamente dar lugar a imunossupressão, causada pela apoptose de linfócitos B, linfócitos T CD4+ e de células foliculares dendríticas (Silverstein & Otto, 2012). A apoptose é um fenómeno que ocorre na sépsis, embora de forma irregular entre indivíduos e entre populações celulares. Sabe-se que afeta maioritariamente linfócitos circulantes e esplénicos, bem como células epiteliais gastrointestinais, pelo menos, no ser humano (Adib-Conquy & Cavaillon, 2009). O mecanismo de imunossupressão não está bem esclarecido, mas pensa-se que poderá ser resultado do aumento da produção de glucocorticoides (Silverstein & Otto, 2012).

1.2.6. A síndrome de disfunção multiorgânica

Antes de existir um consenso, o conjunto de alterações dos diversos sistemas de órgãos que eram verificadas no decurso de sépsis ou SRIS recebia diversas designações, como falência orgânica múltipla ou falência orgânica sequencial. Em 1991, da mesma conferência em que é esclarecido o conceito de SRIS, resulta um conceito que visa descrever estas alterações: a síndrome de disfunção multiorgânica (SDMO), ou MODS (*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*). Este novo termo revela-se mais apropriado uma vez que sublinha a incapacidade dos sistemas de órgãos em manter a homeostasia, revelada através de um conjunto de sinais e sintomas progressivos e relacionados entre si (Bone et al., 1992).

O mecanismo desta síndrome é complexo e ainda não está totalmente esclarecido. Ao longo das décadas foram descritos três modelos para explicar o início da SDMO. O primeiro, *one-hit model* em que a SDMO é a consequência de uma única agressão inicial, como a sépsis; o segundo, o *two-hit model*, que propõe a existência de duas agressões, sendo o segundo de menor magnitude, como uma infeção do local de cateterização; por fim, o *sustained hit model* descreve a SDMO como uma consequência de uma agressão contínua que não só é causadora, como mantém a disfunção. Pensa-se que esta síndrome resulta de uma combinação de diversos mecanismos como hipoxia celular, indução de apoptose, translocação microbiana a partir do intestino, desregulação do sistema imunitário e disfunção mitocondrial. As mais recentes evidências apontam a desregulação do sistema imunitário e a consequente disfunção mitocondrial como os principais culpados. A disfunção mitocondrial e consequente hipoxia citopática (ou seja, a deficiente utilização de oxigénio apesar de adequado fornecimento de oxigénio aos tecidos) promovem a alteração das funções celulares ou mesmo morte celular. Apesar das consequências clínicas negativas, esta alteração da função mitocondrial pode ser uma adaptação à inflamação prolongada, que pode reverter-se aquando a recuperação. No entanto, danos permanentes podem surgir se esta resposta se mantiver por demasiado tempo (Osterbur, Mann, Kuroki & DeClue, 2014).

Atualmente considera-se que existe SDMO num animal que sofre de sépsis ou SRIS se apresenta disfunção de 2 ou mais sistemas de órgãos, distantes do local de início da infeção (Sykes, 2014b). Os sistemas mais comumente envolvidos (além da coagulação) são o cardiovascular, respiratório, renal, gastrointestinal, hepático e microcirculatório (Silverstein & Otto, 2012).

A disfunção cardiovascular resulta, muito provavelmente, da ação das citocinas pró-inflamatórias circulantes, da disfunção mitocondrial resultante e de alterações no cálcio intracelular dos cardiomiócitos. Tudo isto promove aumento da permeabilidade endotelial e diminuição da contratilidade cardíaca, com subsequente diminuição do débito cardíaco, podendo levar a choque séptico (Silverstein & Otto, 2012). Num estudo em que foram incluídos 16 cães com disfunção ventricular esquerda induzida por doença sistémica grave,

sem história prévia de insuficiência cardíaca congestiva, mais de metade sofria de doença neoplásica ou de sépsis (Nelson & Thompson, 2006).

A Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda (ou ARDS, do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) é uma forma grave de lesão pulmonar aguda que pode ocorrer em pacientes humanos e animais com sépsis ou SRIS. O impedimento das trocas gasosas nestes pacientes está associado a lesão epitelial e endotelial e a alterações da composição, produção e função do surfactante pulmonar. Tudo isto acaba por promover a infiltração do espaço intersticial e alveolar por líquido e células inflamatórias, tipicamente reconhecida através de padrões radiográficos (Silverstein & Otto, 2012). Em pacientes humanos o desenvolvimento de SDRA (Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda) está associado a um risco de mortalidade hospitalar 4 vezes mais elevado (Mikkelsen et al., 2013). Pensa-se que a taxa de mortalidade seja mais elevada em pacientes animais (Osterbur et al., 2014).

A lesão renal aguda (LRA) é uma sequela comum de sépsis e SRIS em pacientes humanos. Apesar da falta de estudos sobre a incidência de LRA em animais com sépsis ou SRIS, pensa-se que seja pouco frequente. Não obstante, está descrito o tratamento bem-sucedido de uma cadela com LRA anúrica secundária a SRIS por necrose da parede da vesícula biliar (Hoareau et al., 2014). A LRA em pacientes sépticos deve-se não só à necrose tubular aguda, consequência da isquémia renal promovida pela vasoconstrição da artéria renal e pela diminuição do débito cardíaco, mas também a lesões de isquémia e reperfusão, ativação de macrófagos e neutrófilos, alterações do metabolismo do monóxido de azoto, hipoxia citopática e apoptose (Silverstein & Otto, 2012).

A disfunção neurológica associada a sépsis está ainda pouco caracterizada. São comuns sinais de alteração do SNC como estupor, coma ou convulsões em pacientes que sofrem de choque séptico. A influência direta das toxinas produzidas pelos agentes infecciosos, a redução do fluxo sanguíneo cerebral ou a alteração da barreira hematoencefálica podem estar na sua gênese. A incidência desta complicação em pacientes animais está por determinar (Silverstein & Otto, 2012).

Os sinais de disfunção gastrointestinal em pacientes sépticos podem incluir *ileus*, vômito, diarreia com sangue, ulceração e melena. Podem estar presentes alterações subsequentes como desequilíbrios eletrolíticos e SIBO (*Small Intestinal Bacterial Overgrowth*). O aumento da permeabilidade da mucosa intestinal é frequente, predispondo a translocação bacteriana para a corrente sanguínea (Silverstein & Otto, 2012). Pensa-se que os principais mecanismos responsáveis pela translocação bacteriana sejam a alteração da microbiota intestinal e a quebra física da mucosa gastrointestinal. Após um estímulo nocivo grave a microbiota gastrointestinal é imediatamente destruída, permitindo o crescimento gradual de bactérias patogénicas. A quebra física da barreira da mucosa gastrointestinal é provavelmente provocada pela elevada libertação de mediadores inflamatórios e endotoxina, bem como redução e alterações na produção das proteínas das junções celulares do epitélio

intestinal (Osterbur et al., 2014). O efeito das citocinas pró-inflamatórias, a alteração do metabolismo celular e a apoptose têm, mais uma vez, um papel preponderante (Silverstein & Otto, 2012).

Devido ao importante papel do fígado na defesa do organismo, as alterações hepáticas podem contribuir tanto para o início como para a progressão da sépsis. A disfunção hepática pode levar à liberação de substâncias provenientes da degradação de bactérias e dos seus produtos para a corrente sanguínea. Este é o órgão mais afetado no caso dos cães, podendo estes pacientes apresentar hipoalbuminemia, coagulopatia, hipoglicemia, icterícia, alteração do estado mental e encefalopatia (Silverstein & Otto, 2012).

1.3. Exame Físico

Os sinais clínicos de sépsis estão associados aos sinais de SRIS, previamente descritos, variando conforme a gravidade da doença e a existência, ou não, de disfunção multiorgânica.

Clinicamente, os cães podem apresentar-se na fase hiperdinâmica ou hipodinâmica da sépsis. A fase hiperdinâmica é a fase compensatória caracterizada por febre, membranas mucosas hiperêmicas, taquicardia e pulso hipercinético. À medida que a SRIS progride a fase hiperdinâmica pode dar lugar à fase hipodinâmica, associada a descompensação. É caracterizada por bradicardia e hipotensão, membranas mucosas pálidas e hipotermia. A fase hiperdinâmica é tida como uma manifestação precoce ou menos grave da reação inflamatória sistêmica à infecção, enquanto que a fase hipodinâmica representa uma situação de morte iminente. Ao contrário do que acontece com cães, os gatos não aparentam passar por uma fase hiperdinâmica, sendo a instalação de choque séptico muito mais precoce (DeClue & Spann, 2014). Desconhece-se o mecanismo que determina esta diferença (Costello, 2015).

1.4. Diagnóstico

A suspeita de sépsis é confirmada quando o paciente cumpre os critérios clínicos que permitem identificar SRIS (acima descritos) e é identificada uma fonte de infecção (Silverstein & Otto, 2012). Devem ser realizados exames complementares como: hemograma, painel de análises bioquímicas séricas, urianálise e provas de coagulação (Silverstein, 2015a).

1.4.1. Alterações laboratoriais

A tabela 4 sumariza algumas das alterações analíticas possivelmente existentes em animais que sofrem de sépsis. As alterações hematológicas mais comuns incluem anemia, leucocitose e trombocitopenia. A leucocitose com desvio à esquerda e a evidência citológica de toxicidade dos neutrófilos indicam que está em curso um processo inflamatório continuado com liberação precoce de leucócitos da medula óssea. A trombocitopenia pode

resultar de aumento da permeabilidade endotelial, sequestro plaquetário ou CID. A anemia pode ser resultado de perda de sangue por via gastrointestinal, hemólise, remoção prematura pelo sistema reticuloendotelial ou redução da produção de eritrócitos (Silverstein & Otto, 2012).

O desenvolvimento de CID é comum em animais com sépsis. Os testes de coagulação demonstram, primeiro, um estado de hipercoagulabilidade e depois, de hipocoagulabilidade, à medida que a doença progride. Este último é mais fácil de reconhecer clinicamente e marca o desenvolvimento de CID.

As alterações bioquímicas em animais com sépsis podem resultar da doença que precedeu o quadro de sépsis ou a consequências da mesma, tal como SDMO (Silverstein & Otto, 2012). As alterações observadas podem incluir azotemia, aumento das transaminases hepáticas, hiperbilirrubinemia ou desequilíbrios eletrolíticos. Pode verificar-se hiperglicemia na fase inicial do choque séptico. Após agravamento do estado clínico pode existir hipoglicemia, como resultado de gluconeogênese hepática reduzida ou aumento do transporte de glucose não regulado pela insulina. Pode existir hipoalbuminemia por diminuição da produção, por aumento da permeabilidade vascular ou devido à elevada produção de proteínas de fase aguda. Cães que sofrem de tromboembolismo ao nível da musculatura esquelética podem exibir aumentos marcados da creatinina cinase (Sykes, 2014b). Podem efetuar-se outros testes como gasimetria ou medição de lactato. Muitos pacientes desenvolvem acidose metabólica, que reflete hipoperfusão dos tecidos e hiperlactacidemia (Silverstein, 2015a).

Tabela 4: Alterações hematológicas, bioquímicas e hemostáticas possivelmente encontradas em pacientes sépticos (Silverstein & Otto, 2012; Silverstein, 2015a).

Alterações Hematológicas	
Sépsis ou SRIS	Anemia, aumento do hematócrito, leucocitose ou leucopénia, aumento de neutrófilos imaturos, neutrófilos tóxicos, monocitose, trombocitopénia.
Alterações Bioquímicas	
Doença subjacente a SRIS/sépsis Disfunção orgânica progressiva	Hiperglicémia ou hipoglicémia, hiperbilirrubinémia, hipoalbuminémia, hiperlactacidémia, hipocalcémia (cálcio ionizado), acidose metabólica.
Alterações Hemostáticas	
Coagulação Intravascular Disseminada	Dímeros D aumentados, PDF (Produtos de Degradação da Fibrina) aumentados, TTPA (Tempo de Tromboplastina parcial ativado) prolongado, TP (Tempo de Protrombina) prolongado, Antitrombina diminuída, atividade da proteína C-ativada diminuída.

A urianálise pode revelar isostenúria devido à perda de capacidade de concentração, proteinúria devido a lesão glomerular ou tubular, glicosúria devido a lesão tubular ou hiperglicémia, bacteriúria se estiver um curso uma infeção do trato urinário, piúria, hematória e cilindrúria secundariamente a LRA (Silverstein, 2015a).

1.4.2. Imagiologia

O estudo imagiológico do abdómen e do tórax deve ser efetuado em todos os pacientes suspeitos de SRIS ou sépsis, pois pode oferecer valiosas pistas no que toca à deteção de um foco de infeção ou inflamação que esteja na origem do quadro clínico e de lesões orgânicas consequentes (Silverstein, 2015a). A radiografia torácica pode auxiliar o diagnóstico de pneumonia ou SDR, bem como a identificação de alterações dos espaços intervertebrais compatíveis com disco-espondilite. A ecografia abdominal pode ajudar a identificar sequelas possivelmente presentes no animal séptico, como tromboembolismo de diversos órgãos, resultando na alteração da sua ecogenicidade (Sykes, 2014b).

1.4.3. Identificação da Infeção

A identificação de um foco de infeção e a recolha de tecido ou fluido para cultura e testes de sensibilidade aos antibióticos é de grande importância, não só para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo de infeção como para a adequação da antibioterapia, apesar de poder tornar-se difícil em pacientes com coagulopatia (Silverstein & Otto, 2012).

Dependendo da suspeita clínica pode colher-se amostras de sangue, fluido de lavagem broncoalveolar, endotraqueal ou transtraqueal, líquido cefalorraquidiano, fluido intra-articular, aspirados de órgãos, líquido de derrame peritoneal, líquido de derrame pleural e urina. São frequentemente isolados microrganismos aeróbios e anaeróbios gram-positivos e gram-negativos, dependendo do material colhido e do local de colheita. A análise das fezes deve ser considerada em caso de diarreia hemorrágica (Silverstein, 2015a).

Além de tudo isto, pode ser realizada a detecção de ácidos nucleicos bacterianos por PCR no sangue total. A sua utilização em conjunto com a cultura microbiológica é promissora, principalmente na identificação de microrganismos de crescimento fastidioso (Silverstein, 2015a).

1.4.4. Biomarcadores

É desejável o reconhecimento precoce da sépsis, uma vez que a mortalidade está associada ao desenvolvimento de disfunção orgânica, hipotensão e hiperlactacidémia. A inespecificidade dos sinais clínicos mais precoces como a taquipneia ou a taquicardia remete para a necessidade de marcadores mais precoces. Biomarcadores são mensurações bioquímicas ou celulares de um estado ou processo biológico. Os biomarcadores ideais de sépsis permitiriam detetar a presença de infeção e monitorizar temporalmente a sua gravidade e a progressão de sépsis grave para choque séptico. Ao mesmo tempo, poderiam ser usados para monitorizar a resposta ao tratamento e formular um prognóstico (Cho & Choi, 2014).

Podem ser divididos em marcadores de infeção, como LPS ou DNA bacteriano, marcadores de resposta celular, como moléculas de adesão intercelular, e produtos de células inflamatórias e da resposta humoral, como interleucinas (Silverstein & Otto, 2012).

Tanto o TNF- α como a IL-6 têm sido objeto de estudo, tanto no sentido de perceber os mecanismos que caracterizam a sépsis e a SRIS, como na busca de melhores técnicas de detecção da doença. Está demonstrado o aumento das suas concentrações em pacientes humanos com sépsis ou choque séptico (Pinsky et al., 1993; Oberholzer et al., 2005). Animais em sépsis ou SRIS apresentam níveis de TNF- α (Fransson et al., 2007; DeClue, Sharp & Harmon, 2012; Ok et al., 2015) e IL-6 (DeClue et al., 2012) significativamente superiores em comparação a animais saudáveis.

Outro alvo de muita investigação é a CRP. O facto de aumentar cerca de 100 vezes em resposta a uma agressão (muito mais do que a maioria das proteínas de fase aguda), a sua rápida regulação e a sua curta meia-vida tornam-na promissora na monitorização da resposta ao tratamento de infeções (Young, Gleeson & Cripps, 1991). Apesar da sua inespecificidade para a sépsis (uma vez que os seus níveis aumentam em diversos estados de inflamação ou infeção) tem sido bastante usada em Medicina Humana na avaliação da gravidade do estado do paciente e na monitorização da resposta à antibioterapia (Vincent,

Donadello & Schmit, 2011; Póvoa, Teixeira-pinto & Carneiro, 2011). Na área da Medicina Veterinária, um estudo sobre sépsis e SRIS em cães demonstrou uma correlação entre níveis progressivamente inferiores de CRP e a velocidade de recuperação dos animais, sugerindo a sua utilização como marcador de prognóstico neste contexto (Gebhardt et al., 2009). De acordo com o potencial deste biomarcador foi desenvolvido um teste rápido para a medição da CRP, cujos resultados se revelaram comparáveis com os obtidos através de ELISA quantitativo (Plickert, Einspanier, Arndt, Brunberg & Kohn, 2011).

A procalcitonina (PCT) é um precursor da calcitonina, que é secretada na glândula tiróide em indivíduos saudáveis para regulação da concentração plasmática de cálcio. Em caso de infeção a PCT é secretada de diversos tecidos, como o pulmonar, hepático, renal, pancreático, esplénico ou adiposo (Cho & Choi, 2014). Num estudo de meta-análise relativamente recente a PCT revelou-se útil na distinção entre sépsis e SRIS de origem não infecciosa (Wacker, Prkno, Brunkhorst, & Schlattmann, 2013). A sua utilidade na área da Medicina Veterinária está, ainda, pouco estudada (Silverstein & Otto, 2012).

Outros mediadores da resposta inflamatória, mais tardios, são o HMGB1 e o MIF (*Macrophage Migration Inhibitory Factor*). Ambos se verificaram aumentados em pacientes humanos com sépsis ou choque séptico (Bozza et al., 2004; Sundén-Cullberg et al., 2005), podendo fornecer informações relevantes quanto ao prognóstico (Cho & Choi, 2014).

1.5. Tratamento

O estado clínico de pacientes com SRIS ou sépsis pode mudar rapidamente. Como tal, podem ser necessários ajustes frequentes do tratamento. A monitorização deve ser muito frequente (Silverstein, 2015b).

1.5.1. Fluidoterapia

Pacientes com SRIS ou sépsis sofrem frequentemente de hipoperfusão sistémica. A otimização da função cardiovascular através de fluidoterapia adequada promove a reposição da perfusão dos tecidos e minimiza sequelas decorrentes da isquémia (tabela 5). Embora a fluidoterapia agressiva seja essencial ao aumento do débito cardíaco é necessário adequar a mesma às necessidades do paciente, por forma a evitar os danos causados por sobrecarga de fluidos. Os fluidos a ser utilizados podem ser cristaloides isotónicos, cristaloides hipertónicos, coloides sintéticos ou componentes sanguíneos (Silverstein, 2015b).

Tabela 5: Tipos de fluidos usados para a reposição e manutenção da circulação sanguínea, segundo Silverstein & Otto (2012) e Silverstein (2015b).

Tipo de Fluido	Dose	Recomendações
Cristalóides isotônicos	Cão: até 90 ml/kg, em <i>bolus</i> repetidos de 20 ml/kg Gato: até 60 ml/kg, em <i>bolus</i> repetidos de 10 ml/kg	Para reposição do volume intravascular e intersticial. Pode causar edema em animais com aumento de permeabilidade capilar ou baixa pressão oncótica.
Cristalóides hipertônicos	3-5 ml/kg, a uma velocidade não superior a 1 ml/kg/minuto	Não repetir a administração, devido a risco de hipernatrêmia.
Colóides sintéticos	Cão: 5-20 ml/kg, em <i>bolus</i> repetidos de 5 ml/kg Gato: 5-10 ml/kg, em <i>bolus</i> repetidos de 3-5 ml/kg	Para reposição do volume vascular e pressão oncótica. Particularmente benéficos em caso de hipoproteinêmia. Podem provocar coagulopatias, hemodiluição e LRA.
Albumina humana	Calcular déficit de albumina (em g): $10 \times (\text{concentração desejada de albumina} - \text{concentração de albumina do paciente}) \times \text{peso-vivo(kg)} \times 0.3$	Para hipoalbuminemia grave. Monitorizar frequentemente devido a possibilidade de reação imediata ou retardada. Administrar uma única vez.
Albumina canina	1-2 g/kg/dia	Poucos estudos. Usar com precaução.
Plasma fresco congelado	10-15 ml/kg à medida do necessário	Para colmatar deficiências em fatores de coagulação e aumentar pressão oncótica.
Concentrado de eritrócitos	10-15 ml/kg	Utilizar se perda de sangue grave, hemólise ou anemia. Para promover elevação do hematócrito em 10-15%.
Sangue total	20 – 25 ml/kg	Para tratamento de anemia, trombocitopenia, deficiências em fatores de coagulação e aumentar pressão oncótica.

1.5.2. Utilização de fármacos vasopressores e inotrópicos positivos

Pacientes com SRIS ou sépsis podem apresentar hipotensão apesar da fluidoterapia de reposição de volume. Nestes casos, o paciente pode beneficiar de terapêutica com vasopressores. A decisão de iniciar a terapêutica é tomada se os défices de volume estimados já tiverem sido repostos, se mantiver vasodilatação (membranas mucosas hiperêmicas e extremidades quentes), se o exame ecocardiográficos confirmar volumes intraventriculares adequados e se houver normalização da pressão venosa central (Silverstein, 2015b).

A maioria dos fármacos vasopressores é administrada em infusão contínua. Inicialmente, é frequentemente usada a dose mínima recomendada, com reajustes a cada 15 a 30 minutos consoante a resposta do paciente. Pretende-se uma pressão arterial média de 65 a 70 mmHg. Alguns exemplos destes fármacos são a dopamina, a dobutamina, a norepinefrina e a vasopressina (Silverstein, 2015b).

1.5.3. Antibioterapia

A antibioterapia é um dos pilares do tratamento da sépsis, a par do tratamento de suporte, pois permite o tratamento da sua causa subjacente, ou seja, a infeção. Em cães está demonstrado que a antibioterapia empírica é benéfica (Silverstein, 2015b). Num estudo que incluía cães com sépsis de origem abdominal demonstrou-se que a existência e aplicação precoce de um protocolo de antibioterapia adequado resultam no aumento da taxa de sobrevivência em 10% (Abelson, Buckley, & Rozanski, 2013). Uma vez colhidas amostras dos locais suspeitos de infeção, e enquanto não se obtêm os resultados de testes de sensibilidade, deve iniciar-se antibioterapia de largo espectro. A antibioterapia empírica deve ser eficaz contra microrganismos gram-positivos, gram-negativos e anaeróbios. Alguns exemplos de combinações de antibióticos são: Ampicilina e Enrofloxacina, Ampicilina e Amicacina, Clindamicina e Cefotaxime, e Clindamicina e Enrofloxacina (Silverstein, 2015b).

1.5.4. Proteção gastrointestinal

É comum ocorrer disfunção e hemorragia gastrointestinal secundariamente a SRIS ou sépsis. A diminuição da perfusão da mucosa gastrointestinal pode resultar em hipersecreção de ácido gástrico, secreção insuficiente de muco e ulceração. Para minimizar estes efeitos está recomendada a utilização de antieméticos (como Ondasetron ou Maropitant), antiácidos (como Omeprazol ou Famotidina) e pró-cinéticos (como a Metoclopramida), bem como implementação de nutrição parenteral precoce (Silverstein, 2015b).

1.5.5. Cuidados pós-estabilização

Uma vez estabilizado o estado clínico do paciente, devem ser abordadas as suas necessidades nutricionais. A nutrição entérica deve ser instituída, se for bem tolerada, para a saúde das vilosidades gastrointestinais, diminuição da translocação bacteriana e estimulação da motilidade. Deve considerar-se a nutrição parenteral se a anterior resultar em vômito, náusea, diarreia ou dor abdominal (Silverstein, 2015b).

1.6. Prognóstico

O prognóstico é, na maioria das vezes, reservado. Depende do tipo de doença subjacente à sépsis ou SRIS, do sucesso no tratamento dessa doença e da resposta do paciente à terapêutica (Silverstein, 2015b). A taxa de mortalidade descrita é bastante elevada, mesmo

com cuidados intensivos (Burkitt, Haskins, Nelson & Kass, 2007; Bentley, Otto & Shofer, 2007). A taxa de mortalidade é maior quanto mais grave e extensa for a disfunção orgânica (Kenney et al., 2010). A manutenção de pressão arterial e das concentrações de albumina em níveis adequados está associada a melhor prognóstico. (Bentley et al., 2007). As causas mais comuns do agravamento do quadro clínico, independentemente da intensidade do tratamento instituído, são alterações de coagulação, SDMO e lesão pulmonar aguda (Silverstein, 2015b).

A investigação científica tende a caminhar para a descoberta de novos testes de diagnóstico e novas opções terapêuticas, tendo em vista o aumento das hipóteses de sobrevivência destes pacientes (Silverstein & Otto, 2012).

2. Parvovirose canina

2.1. A Parvovirose como modelo natural de sépsis

Ao longo de décadas têm sido usados modelos animais para melhor compreender os mecanismos da sépsis. Os primeiros foram modelos de endotoxemia, geralmente provocada pela inoculação intravenosa de LPS. Originalmente desenhados para estudar a fisiopatologia, foram depois utilizados para estudos preliminares de novas terapêuticas. No entanto, apesar de muitos deles terem apresentado resultados promissores, os mesmos resultados não se verificaram em ensaios clínicos de tratamento de pacientes humanos com sépsis (Otto, 2007). Quando comparados com modelos de infecção natural não se demonstraram bons modelos por não mimetizarem adequadamente as alterações que ocorrem em pacientes sépticos (Remick & Ward, 2005).

A técnica de laqueação e perfuração do ceco em ratinhos é considerada a mais correta para a investigação em sépsis. No entanto, tem limitações relevantes, como o tamanho pequeno dos animais, a sua reduzida esperança média de vida, a falta de diversidade de idade e de género (uma vez que são quase exclusivamente usados machos jovens) e a elevada semelhança genética entre animais (Fink, 2014).

Os modelos caninos espontâneos de sépsis têm alguns aspetos em comum com o modelo humano. Entre eles, o facto de a sépsis poder ter origens muito diversas e o facto de a inflamação resultar em alterações metabólicas e hemodinâmicas complexas. O trato gastrointestinal é uma das fontes mais comuns de infecção (Nguyen et al., 2006), à semelhança do que acontece no caso do cão (Laforcade et al., 2003). Este animal exhibe a resposta inicial hiperdinâmica, à semelhança dos seres humanos (Natanson et al., 1986). Finalmente, a população de cães que são hospitalizados por doenças associadas à ocorrência de sépsis apresenta diversidade genética e de género, e o objetivo da intervenção médica é a sobrevivência (Otto, 2007).

A Parvovirose canina é uma doença que predispõe à ocorrência de sépsis de origem gastrointestinal. Apesar da natureza viral do insulto inicial, a mortalidade da doença está associada a perda de integridade da mucosa intestinal, translocação bacteriana, sépsis e choque (Mylokani et al., 2016). Estudos com animais naturalmente infetados com CPV poderiam fornecer informação acerca de casos de sépsis com origem na perda de integridade da mucosa intestinal. É uma doença de diagnóstico fácil, o que se torna vantajoso tendo em vista um ensaio clínico (Otto, 2007).

É reconhecido o papel da predisposição genética em pacientes humanos (Villar et al., 2004; Maio, Torres, & Reeves, 2005) e essa predisposição pode aplicar-se aos cães, já que algumas raças podem ser mais gravemente afetadas pelo CPV (Glickman et al., 1985; Houston et al., 1996).

O estado de hipercoagulabilidade que é característico do quadro clínico de sépsis, como esclarecido anteriormente, pode ser comparável ao que acontece em cães com Parvovirose.

Num estudo prospetivo, 100% dos cães com Parvovirose exibiam sinais de hipercoagulabilidade (Otto, Rieser, Brooks & Russell, 2000).

Também parecem existir semelhanças entre cães com Parvovirose e pacientes humanos com sépsis no que toca às alterações na produção de mediadores inflamatórios e na sua importância na progressão da doença.

2.2. Etiologia e Epidemiologia

2.2.1. História e Subtipos

A Parvovirose canina é a gastroenterite de transmissão viral mais comum e uma das doenças infecciosas mais frequentes em cachorros. Estão descritas infeções naturais em cães domésticos (*Canis familiaris*), no cão-do-mato (*Speothos venaticus*), no coiote (*Canis latrans*), no lobo (*Canis lupus*), na raposa caranguejeira (*Cerdocyon thous*) e no lobo-de-crina (*Chrysocyon brachyurus*) (Greene & Decaro, 2012).

É causada por variantes do *Parvovirus* canino-2 (CPV-2, de *Canine Parvovirus-2*), pertencentes ao género *Parvovirus*, família *Parvoviridae*. Os *Parvovirus* são vírus de pequena dimensão, sem envelope, com o seu material genético na forma de uma cadeia simples de DNA (Sykes, 2014a). O CPV-2 emergiu pela primeira vez em 1978, nos Estados Unidos e na Austrália. A sua origem não está bem esclarecida mas pensa-se que terá tido origem a partir de mutações sofridas por um vírus antigenicamente semelhante proveniente de um carnívoro silvestre (Goddard & Leisewitz, 2010). Devido à sua semelhança com o FPV (Parvovirus Felino) pensa-se que possa ser uma variante do mesmo, adaptada a diferentes hospedeiros. Em meados dos anos 70 e 80, o vírus CPV-2 foi rapidamente substituído pelas suas variantes CPV-2a e CPV-2b (Yesilbag, Yilmaz, Ozkul, & Pratelli, 2007). Na década de 2000 foi identificada uma nova variante, o CPV-2c, que está disseminada em alguns países europeus, nomeadamente Portugal, Itália e Alemanha. O vírus continua a sofrer mutações e têm sido descritos diversos vírus mutantes (Zhou, Zeng, Zhang & Li, 2017).

Em Portugal não foi detetada a variante CPV-2a mas as variantes CPV-2b e CPV-2c revelaram-se igualmente distribuídas (Decaro et al., 2007).

Apesar de existirem dúvidas quanto à sua origem, espalhou-se muito rapidamente pelo mundo inteiro (Carmichael, 2005). Tem o seu material genético conservado na forma de DNA mas, apesar disso, o CPV tem uma elevada taxa de mutação genética tornando-o, nesse aspeto, muito semelhante a um vírus RNA (Shackelton, Parrish, Truyen & Holmes, 2005).

2.2.2. Persistência no Meio Ambiente

O CPV-2 é um vírus extremamente contagioso, ubiqüitário e extremamente resistente no meio-ambiente, podendo permanecer infetante por 5-7 meses (Pollock & Coyne, 1993). A

maioria das infecções resulta do contacto com fezes contaminadas presentes no ambiente. Insetos e roedores podem atuar como vetores, da mesma forma que diversos objetos ou equipamentos incorretamente higienizados depois da sua utilização (usados em tratamentos médico-veterinários ou tosquias) podem atuar como fomites, uma vez que o vírus pode sobreviver no pêlo durante longos períodos de tempo (Greene & Decaro, 2012).

2.3. Suscetibilidade

Entre animais suscetíveis é bastante comum o desenvolvimento de doença grave, com elevadas taxas de mortalidade (Greene & Decaro, 2012). Apesar de bastante estudados, os fatores que afetam a predisposição dos cães para o desenvolvimento de doença causada pelo CPV ainda não estão bem esclarecidos e são, alguns deles, algo controversos. A replicação celular é essencial para a replicação viral. Por este motivo, o vírus tem um elevado tropismo para tecidos em que as células se repliquem muito rapidamente, como os enterócitos. Deste modo são maioritariamente afetados cães muito jovens (Lamm & Rezabek, 2008), quase exclusivamente entre as 6 semanas e os 6 meses de idade.

Os animais tornam-se muito mais suscetíveis a partir do momento em que os anticorpos maternos (MDA, *Maternally Derived Antibodies*) deixam de estar presentes em títulos capazes de conferir proteção (Pollock & Coyne, 1993). A idade em que os MDA deixam de conferir proteção é muito variável, podendo ocorrer cerca das 6 semanas em cachorros filhos de cadelas com baixos títulos de anticorpos anti-CPV-2 ou muito mais tarde em cachorros cujas mães exibem títulos elevados de anticorpos (Greene & Decaro, 2012). Os MDA constituem a principal e mais precoce proteção contra o vírus, apesar de poderem interferir com os protocolos de vacinação por vezes empregues (Vila Nova & Gil, 2017). Apesar de ser improvável a manifestação de sinais clínicos de Parvovirose em animais com títulos de MDA superiores a 80 unidades HI (*haemagglutination inhibiting* ou inibição de hemaglutinação) está demonstrado que cães com títulos de MDA entre 80 e 160 unidades HI podem sofrer infeção sem sinais clínicos evidentes da doença, com replicação viral ao nível dos enterócitos, ocorrendo excreção do vírus infetante nas fezes (Decaro, Campolo & Desario, 2005).

O estado vacinal dos animais é preponderante. Houston, Ribble, & Head (1996) documentam que a probabilidade de infeção é 12.5 vezes superior em cães não vacinados. No mesmo estudo verificaram que após os 6 meses de idade o risco de desenvolvimento de Parvovirose foi duas vezes superior em relação a fêmeas inteiras.

A influência do género na predisposição à infeção pelo vírus é algo controversa, bem como a influência da raça. Existem estudos que documentam uma maior prevalência da infeção em cães de raça, mas nunca foi solidamente demonstrada uma maior prevalência numa raça em particular (Kalli et al., 2010). É sugerida uma maior predisposição em *Rottweilers*, *Doberman Pinschers*, Malamutes do Alaska, *American Pit Bull Terriers*, *Labrador Retrievers*,

American Staffordshire Terriers e Pastores Alemães, e uma menor predisposição no *Caniche Toy* e em *Cocker Spaniels*, quando comparados com cães de raça indefinida (Houston et al., 1996; Glickman, Domanski, Patronek, & Visintainer, 1985). No entanto, esta relação é muitas vezes apontada como o resultado de uma sobrerepresentação destas raças (nomeadamente *Rottweilers* e *Doberman Pinschers*) em estudos norte-americanos. Da mesma forma, a aparente detecção de um maior número de casos de Parvovirose em cães de raça pode dever-se às condições de sobrepopulação a que estes são, por vezes, sujeitos antes de serem adotados, em relação à maioria dos cães de raça indefinida (Kalli et al., 2010).

2.4. Patogenia da Infecção

O *Parvovirus* canino dissemina-se rapidamente entre cães através da exposição, por via oronasal, a fezes contaminadas (emitidas por cães infetados). A replicação viral começa no tecido linfóide da orofaringe, linfonodos mesentéricos e timo. A virémia institui-se 1 a 5 dias após a infeção. O vírus infeta predominantemente o tecido epitelial que reveste o trato gastrointestinal (língua, mucosa oral e esofágica e principalmente as criptas intestinais ao nível do intestino delgado) e o tecido linfóide do timo, linfonodo e medula óssea. Também pode ser isolado a partir de tecido pulmonar, esplénico, renal e miocárdico. Ao infetar as células epiteliais germinais que se desenvolvem nas criptas intestinais o vírus impede o seu normal desenvolvimento e migração para o topo das vilosidades intestinais, onde normalmente adquirem as capacidades absorptivas que lhes permitem participar na absorção de nutrientes. Desta forma, a renovação celular normal do epitélio fica comprometida e as vilosidades intestinais não se desenvolvem corretamente. Por consequência, ficam comprometidas também as funções de absorção de nutrientes e a barreira gastrointestinal. O CPV-2 também destrói as células precursoras dos leucócitos circulantes, o que resulta em neutropénia e linfopénia num grande número de animais infetados. A quebra da barreira protetora da mucosa intestinal permite a translocação de microbiota intestinal e o estabelecimento de infeções bacterianas secundárias que frequentemente evoluem para quadros de bacteriémia, endotoxémia e coagulação intravascular disseminada (CID). A morte, consequência de disfunção multiorgânica, pode ser tão precoce como 2 dias após o estabelecimento de doença clínica evidente (Greene & Decaro, 2012).

A excreção do CPV-2 começa no terceiro ou quarto dia após a exposição, geralmente antes do aparecimento de quaisquer sinais clínicos evidentes. Estudos levados a cabo com técnicas de ELISA (*enzyme-linked immunoabsorbent assay*) demonstraram que o vírus é libertado em grandes quantidades nas fezes de animais doentes durante um máximo de 7 a 10 dias após a inoculação. No entanto, através da técnica de RT-PCR (*Real-Time Polymerase Chain Reaction*) foram detetadas as três variantes de CPV-2 em fezes de cães infetados várias semanas após a infeção (Decaro et al., 2005). O desenvolvimento de

imunidade humoral local (ao nível da mucosa intestinal) é, muito provavelmente, determinante para o fim da excreção viral através das fezes. O seu estabelecimento é bastante precoce, sendo atingidos títulos detetáveis de anticorpos cerca de 3 a 4 dias após o estabelecimento da infeção, podendo manter-se estáveis durante pelo menos 1 ano (Greene & Decaro, 2012). Se os animais sobrevivem à doença a imunidade adquirida é frequentemente duradoura, protegendo o animal contra o vírus para o resto da sua vida (Pollock & Coyne, 1993).

2.5. Exame Físico e História Clínica

O quadro clínico é muito variável entre os cães que contraem Parvovirose, sendo possíveis a infeção inaparente e a doença aguda e fatal. A infeção subclínica é a que ocorre na maioria dos cães, principalmente em cães que exibem títulos de MDA que protegem da doença clínica mas não da infeção (Greene & Decaro, 2012). A gravidade dos sinais clínicos depende da estirpe viral envolvida e da imunidade do hospedeiro, que pode variar consoante a sua exposição a fatores de *stress*, tais como o desmame ou presença de infeções concomitantes por outros vírus ou por parasitas do trato gastrointestinal (Greene & Decaro, 2012).

Os sinais clínicos mais comuns são vômito grave e incoercível, diarreia (muitas vezes sanguinolenta) e desidratação. Ao exame físico os cachorros apresentam frequentemente hipertermia (até 41°C), letargia, fraqueza, desidratação e abdómen muito brando à palpação, sendo possível, por vezes, detetar líquido no interior das ansas intestinais ou uma massa tubular, que frequentemente indica invaginação intestinal. Alguns cães podem exibir mucosas pálidas, aumento do tempo de repleção capilar e hipotermia. A história clínica revela inapetência, vômito incoercível e diarreia líquida, muitas vezes sanguinolenta e de cheiro nauseabundo. A diarreia pode tornar-se evidente a partir da presença de fezes líquidas ou sangue no períneo ou no termómetro. Podem estar presentes sinais neurológicos devido a hipóxia secundária a miocardite, hipoglicémia, tromboembolismo intracraniano ou hemorragia. Posto isto, deve considerar-se infeção concomitante pelo vírus da esgana (Sykes, 2014a).

Alguns cães podem desenvolver miocardite viral mediante infeção *in utero* ou antes das 6 semanas de idade. Raramente resistem à infeção e toda a ninhada está afetada. Os sinais de disfunção cardíaca podem ser precedidos de sinais clínicos gastrointestinais ou não. Pode ocorrer morte súbita, sem doença prévia aparente, ou podem existir sinais evidentes de insuficiência cardíaca congestiva. A doença miocárdica por CPV tem-se tornado cada vez menos comum devido ao aumento da pressão de vacinação ao longo das últimas décadas. Deste modo, o elevado título de MDAs previne a infeção neonatal, quando a replicação do tecido miocárdico ocorre a maior velocidade e está, por isso, mais sujeito à infeção viral. Por vezes são detetados casos de miocardite viral em cachorros que não são

amamentados corretamente ou em filhos de fêmeas que vivem em ambiente isolado, não vacinadas. Da mesma forma, não é comum a infecção generalizada em cachorros recém nascidos, com hemorragia e necrose dos tecidos: cerebral, hepático, pulmonar, renal, linfoide e gastrointestinal (Greene & Decaro, 2012).

Animais em choque séptico podem apresentar-se taquicárdicos ou bradicárdicos, com alteração do estado mental e com pulso fraco. Apesar de menos comuns, podem ser observados sinais neurológicos como tremores e convulsões (Sykes, 2014a).

2.6. Diagnóstico

2.6.1. Exames complementares

2.6.1.1. Alterações laboratoriais

Ao hemograma é frequente uma leucopénia grave, devido a neutropénia. Esta ocorre não só devido à infecção da medula óssea, mas também devido ao sequestro de neutrófilos no tecido gastrointestinal (Sykes, 2014a). No entanto, a contagem leucocitária pode encontrar-se dentro de valores normais devido à linfopénia induzida pelo vírus e à neutrofilia promovida por infeções bacterianas secundárias (Greene & Decaro, 2012). Pode existir trombocitose ou, mais raramente, trombocitopénia. Alguns cachorros desenvolvem anemia devido à perda de sangue através do intestino. Esta pode ser não regenerativa ou tornar-se regenerativa (Sykes, 2014a).

Podem ocorrer alterações na análise do perfil bioquímico, tais como hipoproteinémia, hypoalbuminémia ou hipoglicémia (está também descrita a ocorrência de hiperglicémia ligeira). Podem também estar presentes desequilíbrios eletrolíticos como hiponatrémia, hipoclorémia ou hipocaliémia. A desidratação grave por vezes presente pode resultar em azotémia. Cães que desenvolvem sépsis podem ter hiperbilirrubinémia e aumento das transaminases hepáticas (Sykes, 2014a).

Um pequeno número de animais desenvolve alterações no perfil de coagulação. Essas alterações podem incluir o aumento do tempo de tromboplastina parcial ativada, diminuição da atividade da antitrombina ou aumento da concentração sérica de fibrinogénio. Apesar de tudo, ainda não é completamente claro o efeito direto desta doença infecciosa na coagulação (Sykes, 2014a).

2.6.1.2. Imagiologia

O estudo radiográfico do abdómen é útil para descartar a presença de corpos estranhos. A ultrassonografia é indispensável para a confirmação de invaginação intestinal ou para o reconhecimento de derrame peritoneal. Ambos os exames podem ajudar no reconhecimento de alterações inespecíficas como a presença de fluido ou gás no interior das ansas intestinais, hipomotilidade ou diminuição da espessura das camadas da parede intestinal (Mylokani, Kalli & Rallis, 2016).

2.6.2. Exames microbiológicos

2.6.2.1. Detecção de Anticorpos anti-CPV

Pode recorrer-se à quantificação de anticorpos anti-CPV no soro de animais afetados através de inibição de hemaglutinação, ou à sua medição semiquantitativa através de um teste ELISA. No entanto, uma vez que muitos cães são seropositivos devido a exposição prévia ao vírus, infecção subclínica, persistência de MDAs ou vacinação um resultado positivo não diagnóstico de infecção ativa por CPV-2. Apesar disso, os ensaios quantitativos podem ser úteis na quantificação de MDAs, com o objetivo de determinar qual o momento mais indicado para iniciar o protocolo vacinal ou para verificar se os anticorpos vacinais estão presentes em níveis protetores no final do mesmo (Mylokaniš et al., 2016).

2.6.2.2. Detecção de antigénio fecal

A deteção de antigénio viral nas fezes pode ser feita através de testes rápidos de imunocromatografia, sendo necessária apenas uma zaragatoa retal para obter resultados rapidamente. Este é um dos meios de diagnóstico mais usado pela sua elevada especificidade, facilidade de utilização e baixo custo. A especificidade excede os 90%. No entanto, a sensibilidade varia entre 16% e 80% consoante os vários testes disponíveis no mercado e a técnica utilizada como *gold standard*, que pode ser a deteção por PCR ou por imunomicroscopia electrónica (Mylokaniš et al., 2016; Sykes, 2014). A ocorrência de falsos-negativos está geralmente associada a infecção recente, a excreção diminuída ou intermitente, à ação de anticorpos neutralizantes no lúmen intestinal (que aprisionam o antigénio e o tornam não detetável), ao efeito diluidor da diarreia e à formação de complexos antigénio-anticorpo. A vacinação recente com vacinas vivas modificadas pode, teoricamente, estar relacionada com a ocorrência de resultados falsos-positivos (Mylokaniš et al., 2016). Apesar de estar demonstrado que estes testes rápidos não detetam excreção viral em cães saudáveis recentemente imunizados com vacinas vivas modificadas (Decaro et al., 2014), a ocorrência de resultados falsos-positivos entre 4-10 dias após a inoculação vacinal é referida por fabricantes (Zoetis, 2017). Também é possível a deteção de antigénio fecal através de ELISA. No entanto, este método está associado a menor sensibilidade (Desario et al., 2005; E. Mylokaniš et al., 2016).

2.6.2.3. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Estão disponíveis no mercado diversos serviços de diagnóstico por PCR para deteção das variantes de CPV-2. O material genético viral pode ser detetado nas fezes em concentrações tão baixas quanto 1000 cópias de DNA por miligrama de fezes. Esta técnica é extremamente útil quando os testes rápidos têm resultados negativos mas a infecção por CPV continua a ser a principal suspeita (Mylokaniš et al., 2016; Sykes, 2014). Apesar desta enorme vantagem, pode haver amplificação eficiente do DNA viral extraído de fezes de

animais sem sinais de gastroenterite ou com diarreia crônica. Além disso, é possível a detecção de DNA viral nas fezes de cães saudáveis imunizados recentemente com vacinas vivas modificadas, embora em menor quantidade em relação aos títulos verificados em caso de infecção natural (Decaro et al., 2014). De futuro, a quantificação do vírus nas fezes ou no sangue através de *real-time* PCR pode ajudar na diferenciação entre cães recentemente vacinados ou naturalmente infetados (Mylokani et al., 2016).

2.6.2.4. Teste de Hemaglutinação

O Parvovírus canino promove aglutinação dos eritrócitos. Por conseguinte, a sua presença nas fezes pode ser detetada com um teste de hemaglutinação que envolve a mistura de uma suspensão de fezes com eritrócitos de origem suína numa lâmina. A aglutinação dos eritrócitos indica a presença do vírus nas fezes, embora este teste não seja específico para esta doença. Tem uma baixa sensibilidade, provavelmente devido à presença de anticorpos neutralizantes nas fezes. Estudos demonstram que, em alguns animais cujas fezes foram submetidas ao teste de hemaglutinação, e em que esse teste foi positivo fraco ou negativo, a detecção por PCR revelou a presença de DNA viral em quantidades consideráveis (Desario et al., 2005).

2.7. Tratamento

O tratamento é essencialmente de suporte e de combate contra infeções bacterianas secundárias, estando assente nos seguintes pilares: fluidoterapia, antibioterapia, tratamento antiemético e suporte nutricional (Mylokani et al., 2016). A instituição de fluidoterapia adequada e a manutenção de níveis apropriados de glicémia são os aspetos mais importantes do tratamento. Quando possível, o paciente deve ser hospitalizado em isolamento.

2.7.1. Fluidoterapia

A manutenção de hidratação e pressão oncótica adequadas, através de fluidoterapia por via intravenosa, bem como a correção de desequilíbrios eletrolíticos e ácido-base são da maior importância. Regra geral, o fluido de primeira escolha para a reposição inicial do volume sanguíneo e da hidratação é uma solução cristalóide isotónica como, por exemplo, o Lactato de Ringer. Os fluidos escolhidos podem ser suplementados com Cloreto de Potássio para manter a normocaliémia ou tratar a hipocaliémia. Pode ser necessária, também, a suplementação com dextrose, já que a hipoglicémia é frequentemente verificada nestes pacientes. A glicémia deve ser medida uma a duas vezes por dia (Mylokani et al., 2016).

A taxa de fluidoterapia deve ser calculada de acordo com as necessidades de manutenção, a desidratação, o peso do animal e as perdas estimadas, com o objetivo de melhorar determinados parâmetros clínicos como o tempo de repleção capilar (TRC), a qualidade do

pulso, a cor das mucosas ou a pressão arterial média. Nos casos em que não existe evidência de choque hipovolêmico a hidratação pode ser restabelecida ao longo de 12 a 24 horas, e ao longo de 1 a 2 horas em caso de hipovolemia grave. Os colóides também estão indicados na presença de edema periférico, hipoalbuminemia ou hipoproteinemia. Pode ser administrado plasma fresco, uma vez que contém albumina, fatores de coagulação e anticorpos. O seu custo elevado e disponibilidade por vezes reduzida podem impossibilitar a sua administração (Mylokani et al., 2016).

2.7.2. Antibioterapia

Deve ser administrado parenteralmente um fármaco ou combinação de fármacos antimicrobianos de largo espectro, devido ao elevado risco de sépsis associado à quebra da barreira intestinal e devido à neutropenia, muitas vezes graves. Por exemplo, amoxicilina ou ampicilina como agentes únicos ou em combinação com metronidazol, ou cefoxitina (Australian Infectious Diseases Advisory Panel [AIDAP], 2013; Mylokani et al., 2016).

2.7.3. Tratamento anti-emético

Pode ser administrada Metoclopramida (um antagonista dos recetores dopaminérgicos) em cães com vômito grave. O seu efeito pró-cinético exige uma especial vigilância, de forma a prevenir ou detetar precocemente invaginações intestinais. Os antagonistas da serotonina Ondasetron ou Dolasetron podem ser usados com sucesso em casos de vômito incoercível. O maropitant (um antagonista dos recetores da neurocinina-1) é uma escolha extremamente popular, que previne o vômito causado quer por estimulação central, quer por estimulação periférica. Os primeiros previnem o vômito estimulado por apenas uma das vias (Mylokani et al., 2016).

2.7.4. Suporte nutricional

A instituição precoce de nutrição entérica via cateter nasoesofágico está associada à melhoria da integridade da mucosa intestinal e maior rapidez de reparação da mesma e, por conseguinte, a menor possibilidade de translocação bacteriana. Raramente é necessária a administração de nutrientes por via parentérica (Mylokani et al., 2016).

2.7.5. Analgesia

A dor abdominal provocada pela enterite grave deve ser tratada adequadamente, pois é um fator agravante da perda de apetite. Podem ser usados buprenorfina, um agonista parcial dos recetores opióides μ ; ou butorfanol, um antagonista dos recetores opióides K com afinidade para os recetores opióides μ (Mylokani et al., 2016; British Small Animal Veterinary Association, 2014). O maropitant, utilizado como antiemético, é um inibidor da

substância P, um mediador da dor visceral. Desta forma, é possível que tenha alguma ação algésica na dor de origem gastrointestinal (Mylokaniš et al., 2016).

2.8. Prognóstico

O prognóstico é variável consoante a gravidade da doença e a disponibilidade económica dos donos, ou seja, se podem ou não pagar o tratamento adequado, geralmente dispendioso (Sykes, 2014a). Estudos acerca da influência de vários fatores na progressão da doença reportam um tempo de hospitalização médio de aproximadamente 6 dias (Mantione & Otto, 2005 ; Mylokaniš et al., 2016). As taxas de sobrevivência podem ser muito elevadas (na ordem dos 90%) em centros de tratamento especializado, sendo mais baixas em centros de cuidados primários (Savigny & Macintire, 2010).

A ausência de leucopénia ou linfopénia significativas nas 24 horas após internamento é um fator de bom prognóstico, com um valor preditivo positivo de sobrevivência de 100%. A presença de leucopénia e/ou neutropénia e linfopénia no momento do internamento é um fator de pior prognóstico, já que está associado a menores taxas de sobrevivência (Goddard, Leisewitz, Christopher, Duncan & Becker, 2008). A presença de sinais indicativos de SRIS está relacionada com maiores taxas de mortalidade, o que enfatiza a sua importância na fisiopatologia desta doença (Kalli et al., 2010; Sykes, 2014).

Ao contrário do que foi sugerido por estudos anteriores (Homer, 1983) estudos mais recentes não conseguiram comprovar a existência de qualquer relação entre a idade, o peso corporal, o género ou a raça e o prognóstico (Kalli et al., 2010).

Geralmente, cachorros que sobrevivem aos primeiros 3 a 4 dias de internamento têm uma recuperação bem-sucedida. As complicações mais comuns são a bacteriémia e choque séptico, como já foi referido, invaginação intestinal, pneumonia por aspiração e estenose esofágica (devido ao vômito frequente) (Sykes, 2014a).

2.9. Prevenção

A prevenção correta da infeção por CPV-2 inclui imunização ativa dos cachorros, quarentena, isolamento e procedimentos de limpeza e desinfeção. A imunização correta é o método de prevenção mais eficiente (Sykes, 2014a).

Segundo as mais recentes orientações da WSAVA (*World Small Animal Veterinary Association*) a vacina contra o CPV-2 é considerada nuclear, ou seja, é uma vacina que todos os cães devem receber, em intervalos recomendados, de forma a estarem eficazmente protegidos ao longo da vida contra as principais doenças infecciosas (Day, Horzinek, Schultz & Squires, 2010).

Na maioria dos casos, a imunidade passiva que é conferida pelos MDA desaparece entre as 8 e as 12 semanas de vida. No entanto, a variabilidade é imensa. Em todos os momentos existirão animais cujos MDA já não se encontram em títulos capazes de conferir proteção e

que são capazes de desenvolver uma resposta vacinal adequada, e animais com títulos de MDA em circulação que não só conferem proteção como impedem uma correta resposta à vacinação. A recomendação do VGG (*Vaccination Guidelines Group*) da WSAVA é que a primeira dose da primovacinação seja administrada entre as 6 e as 8 semanas, seguida de reforços a cada 2 a 4 semanas até, pelo menos, às 16 semanas de idade (Day et al., 2010).

3. PIRO: Um Sistema de Estadiamento para a Sépsis

3.1. A utilidade dos sistemas de estadiamento

Quando não existe um leque variado de opções terapêuticas, a necessidade de um sistema que divida os pacientes que sofrem de determinada doença em diversos grupos é reduzida. À medida que se vão investigando e descobrindo novas opções e modalidades terapêuticas para determinada doença, aumenta a necessidade de um sistema de classificação fiável, que permita avaliar o melhor tratamento, ou combinação de tratamentos, dirigido às características de cada paciente, conforme gravidade da doença. Deste modo, a classificação de doentes sépticos revela-se cada vez mais necessária (Marshall, 2014).

Diversos sistemas de estratificação são usados globalmente na prática clínica, mas talvez o mais conhecido e mais aplicado seja o sistema *Tumour, node and metastasis* (TNM), desenvolvido nos anos 40 por Pierre Denoix para a classificação de doentes oncológicos (Vincent, 2009). Este sistema é baseado na avaliação independente do tamanho e grau de infiltração do tumor, presença ou ausência de extensão aos linfonodos, e presença ou ausência de metástases à distância (Sobin & Fleming, 1997). As doenças oncológicas apresentam certas características que permitem o desenvolvimento de sistemas de classificação adequados e fiáveis. Pode ser diagnosticada localmente e detetada sistemicamente, o que constitui uma base objetiva para a avaliação de tais sistemas. Além disso, desenvolve-se lentamente e a sua progressão pode ser monitorizada ao longo do tempo. O seu tratamento é multimodal e pode incluir cirurgia, quimioterapia e terapêutica dirigida ao tumor. A decisão entre um só ou uma combinação destes tratamentos varia, logicamente, consoante o tipo de doença oncológica em questão, mas também consoante a sua evolução, pelo que se torna necessário o estadiamento (Marshall, 2014).

A sépsis é, de certa forma, semelhante às doenças oncológicas. Ambas têm elevada prevalência na população, com elevadas taxas de mortalidade. São o resultado de um processo fisiopatológico complexo que envolve desregulação celular e podem desenvolver-se em, praticamente, qualquer órgão, sendo muitas vezes necessário tanto o tratamento médico como cirúrgico. Seja qual for o tratamento aplicado a qualquer uma das doenças, é sempre muito dispendioso e envolve diversos agentes farmacológicos. Finalmente, quando o tratamento é bem-sucedido está associado a uma recuperação lenta e progressiva (Vincent, 2009). Desta forma, à medida que surgem novos estudos acerca da sépsis e de novas estratégias de tratamento, torna-se preponderante o estabelecimento de sistemas de estadiamento que permitam a escolha objetiva das melhores modalidades terapêuticas.

3.2. Sistemas de estadiamento de doentes críticos ou sépticos na Medicina Humana

3.2.1. PIRO (*Predisposition, Insult, Response, Organ dysfunction/failure*)

Em 2001, o painel de especialistas reunido na *International Sepsis Definitions Conference* propõe uma nova linha de pensamento. Apesar de previamente esclarecidos conceitos

como sépsis, sépsis grave ou choque séptico, estes termos não permitem a caracterização e estadiamento dos pacientes consoante o seu quadro clínico. É, então, identificada a necessidade de um sistema de estadiamento que estratifique os pacientes consoante o risco de sofrerem um mau desfecho e o seu potencial de resposta ao tratamento. Usando uma variação do sistema TNM desenvolveram o sistema PIRO – Predisposição, Infecção, Resposta, Disfunção Orgânica (*organ dysfunction/failure*). Este sistema classifica os pacientes consoante os fatores que os predispõem a sépsis, a natureza e gravidade da infecção, a magnitude da resposta ao agente infeccioso e o grau de disfunção ou insuficiência orgânica consequente (Levy et al., 2003). Desde então, diversos estudos de derivação e validação de diferentes parâmetros de classificação têm sido efetuados (Moreno et al., 2008; Rubulotta et al., 2009; Howell et al., 2011).

3.2.1.1. Predisposição

Os fatores pré-existentes podem ter um efeito substancial no desfecho da doença, uma vez que podem promover diferenças na progressão da doença em diferentes pacientes e influenciar decisões terapêuticas. Além da variabilidade genética, cada vez mais implicada, são exemplos desses fatores o estado de saúde do paciente previamente ao desenvolvimento de sépsis, a possibilidade de agravamento de quaisquer doenças concomitantes, ou a sua pertença cultural ou religiosa, que pode modificar as opções terapêuticas. Estes e outros fatores podem influenciar tanto a incidência da sépsis como o seu prognóstico, de forma semelhante ou não. Por exemplo, um estado de imunossupressão aumenta o risco de contração de infecção, diminui a magnitude da resposta inflamatória e pode não ter qualquer influência direta sobre a probabilidade de disfunção orgânica (Levy et al., 2003). Fatores como idade avançada, existência de doença hepática crónica, cardiomiopatia congestiva, diabetes ou doença oncológica podem ser fatores predisponentes, uma vez que a taxa de mortalidade é superior quanto maior a idade do paciente ou mais avançada a sua doença prévia (Rubulotta et al., 2009; Howell et al., 2011).

3.2.1.2. Infecção

O local, tipo e extensão da infecção têm um impacto significativo no prognóstico (Levy et al., 2003). Através do estudo da relação entre taxas de mortalidade em grupos de pacientes sépticos e as diferentes variáveis que podem caracterizar uma infecção têm sido identificados alguns fatores que contribuem para o agravamento do prognóstico, entre os quais: sépsis associada a cuidados de saúde (HCAS, *Health-care associated sepsis*), infecção fúngica, infecção por microrganismos multirresistentes, aplicação de antibioterapia não conforme com as atuais *guidelines* (Granja et al., 2013), infecção do trato urinário por microrganismos não gram-negativos, infeções nosocomiais fúngicas ou por bactérias gram-positivas ou infeções nosocomiais fúngicas da cavidade abdominal (Rubulotta et al., 2009).

3.2.1.3. Resposta

É cada vez mais controversa a utilidade dos critérios de SRIS para a caracterização de doentes sépticos, na perspetiva da sua utilidade clínica (Singer et al., 2016). No entanto, estes critérios têm sido propostos, não como meio de diagnóstico, mas como componentes que podem servir para caracterizar a resposta do paciente em conjunto com informação de outra natureza. Alterações na frequência cardíaca, frequência respiratória, contagem leucocitária ou percentagem de neutrófilos mostraram estar relacionadas com o aumento da taxa de mortalidade em doentes sépticos (Rubulotta et al., 2009; Howell et al., 2011; Granja et al., 2013).

A integração de biomarcadores, como o TNF- α , a IL-6 ou a CRP, na avaliação da resposta tem vindo a ser muito estudada (Cho & Choi, 2014). A variação da concentração da CRP demonstrou ser uma variável relevante para a avaliação da resposta num modelo proposto de sistema PIRO (Granja et al., 2013).

3.2.1.4. Disfunção/insuficiência orgânica

Os sistemas de classificação de disfunção ou insuficiência orgânica podem ser usados para descrever quantitativamente o grau de disfunção que se desenvolve na progressão de uma doença crítica (Levy et al., 2003). A disfunção orgânica pode ser oculta. Logo, a sua presença deve ser considerada em qualquer paciente com suspeita de infeção (Singer et al., 2016). No âmbito do Grupo de Estudos da Sepsis Adquirida na Comunidade e internada em Cuidados Intensivos (SACiUCI), em que colaboram clínicos de várias unidades de cuidados intensivos de hospitais portugueses, foi utilizado o sistema SOFA para a avaliação da disfunção orgânica, testando a sua capacidade de previsão da mortalidade como parte integrante de um sistema PIRO. A classificação SOFA inicial, bem como a sua variação ao longo dos primeiros 5 dias de internamento, mostrou estar associada com a mortalidade. Outros parâmetros integrados na avaliação da disfunção orgânica e associados com a mortalidade foram a concentração sérica de lactato (inicial e ao longo dos primeiros 5 dias de internamento) e a glicémia. A hipoglicémia mostrou associação com a mortalidade no dia 1 e no dia 2, e a hiperglicémia nos dias 3 a 5 (Granja et al., 2013). Noutros estudos são utilizadas variáveis semelhantes sem que seja atribuída a cada uma, individualmente, uma classificação que varia consoante a sua magnitude, como acontece no sistema SOFA. Em vez disso, é atribuída uma classificação pré-determinada à variável se o seu valor estiver acima de um determinado limite. São exemplos a concentração sérica de ureia ou a contagem de plaquetas (Howell et al., 2011).

3.2.2. APACHE (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation*)

O modelo APACHE foi concebido para prever o risco de mortalidade em pacientes críticos admitidos em Unidades de Cuidados Intensivos, utilizando informações disponíveis no processo clínico dos pacientes (Knaus, Zimmerman, Wagner, Draper & Lawrence, 1981). Ao longo de alguns anos sofreu algumas atualizações (APACHE II e APACHE III) no sentido de melhorar a previsão das taxas de mortalidade dos pacientes internados (Knaus, Draper, Wagner & Zimmerman, 1985; Knaus et al., 1991). A utilização deste modelo requer a integração de dados que não estão disponíveis no departamento de emergências. Além disso, é um modelo de classificação genérico para elaboração de um prognóstico de doença crítica, não específico para sépsis ou SRIS (Macdonald, Arendts, Fatovich & Brown, 2014).

3.2.3. SOFA (*Sequential/ Sepsis-related Organ Failure Assessment*)

O sistema de classificação SOFA foi proposto após uma reunião de consenso do ESICM (*European Society of Intensive Care Medicine*), em 1996. O proposto sistema pretende descrever quantitativamente, e de forma tão objetiva quanto possível, o grau de disfunção ou insuficiência orgânica observado em grupos de pacientes ou individualmente. São atribuídos pontos, segundo uma tabela, a determinados parâmetros usados para monitorizar a função dos diferentes sistemas de órgãos. Quanto maior o valor de determinado parâmetro, maior a pontuação, e mais grave a disfunção. Segundo o grupo de especialistas, a sua aplicação permitiria não só aumentar o conhecimento sobre a disfunção orgânica e as relações entre a disfunção dos vários órgãos, como também avaliar os efeitos de novos tratamentos e caracterizar os pacientes no momento do internamento (Vincent et al., 1996). De acordo com as mais recentes orientações, pacientes com uma pontuação SOFA igual ou superior a 2 têm um risco de mortalidade entre 2 a 25 vezes superior em relação a pacientes com pontuação SOFA inferior a 2. Este sistema não foi desenvolvido com uma ferramenta de decisão clínica, mas sim com o objetivo de caracterizar o quadro clínico. As variáveis utilizadas (tais como a concentração sérica de creatinina ou bilirrubina) exigem testes laboratoriais e, por isso, podem não refletir prontamente a disfunção de sistemas de órgãos individuais. O painel propõe o qSOFA (*quick SOFA*), que ao incorporar dados referentes ao estado mental, à pressão sistólica e à frequência respiratória permite identificar prontamente pacientes adultos com suspeita de infeção, aos quais é atribuído um pior prognóstico (Singer et al., 2016). Apesar desta adaptação, continua a excluir fatores como a idade, a raça ou eventuais comorbilidades que podem contribuir para o aumento das taxas de mortalidade na sépsis (Macdonald, Arendts, Fatovich, & Brown, 2014). Num estudo recente foi demonstrado que a implementação da classificação SOFA, após a integração de outros dados como doenças prévias, sinais vitais e concentração de lactato, resulta numa melhoria significativa da capacidade de prognóstico, tanto no momento do internamento como 24 horas depois (Innocenti et al., 2017).

3.2.4. MEDS (Mortality in Emergency Department Sepsis)

A maior parte dos doentes sépticos apresenta-se, inicialmente, no departamento de emergências. A capacidade de avaliar a gravidade da doença num paciente e o seu risco de mortalidade é importante, e deve ser rapidamente atualizável se houver um agravamento do quadro clínico. É, assim, proposto como um sistema simples e útil para estratificar pacientes e guiar decisões terapêuticas, como ferramenta de investigação e como ferramenta administrativa, para a monitorização da utilização de recursos e controlo de qualidade (Shapiro et al., 2003). O sistema MEDS requer uma avaliação subjetiva do risco de mortalidade a curto-prazo e pode ser menos preciso quanto mais grave for a doença (Jones, Saak & Kline, 2008). Além disso, não considera a natureza ou a virulência do agente infeccioso (Macdonald et al., 2014).

III - Modelo canino para sépsis: Contribuição para a classificação e estratificação em doentes sépticos

1. Objetivos

Como já foi mencionado, tanto os estudos acerca da fisiopatologia da sépsis que se baseiam na administração de endotoxina como os que se baseiam na perfuração do ceco de ratinhos têm algumas limitações.

O principal objetivo deste trabalho é testar uma metodologia de classificação e estratificação de pacientes sépticos, utilizando o potencial da Parvovirose canina como modelo natural para o estudo de sépsis. Nesse sentido, foi aplicado o esquema de classificação – PIRO – a cães com diagnóstico de Parvovirose internados na UIDI do HEV-FMV-UL. Foi também medida a atividade de dois mediadores inflamatórios, a IL-6 e o TNF- α , a concentração de CRP, e feita a pesquisa de DNA bacteriano (ou bDNA) no sangue, na tentativa de fornecer resultados úteis para o estadiamento de sépsis, não só em casos de Parvovirose canina, mas também em casos de outras doenças que a ela predispõem e noutras espécies.

2. Materiais e Métodos

2.1. Caracterização da amostra

Para o estadiamento retrospectivo dos animais doentes segundo o sistema PIRO proposto foram recolhidos dados de 31 cães internados na UIDI do HEV-FMV-UL, entre novembro de 2013 e junho de 2017 (Tabela 6).

Tabela 6: Caracterização da amostra de 31 animais que foram alvo do estudo da classificação PIRO.

Género	n (%)	Idade	n (%)	Status Vacinal	n (%)
Macho	20 (65)	<6 sem	1 (3)	Não vacinado	21 (68)
Fêmea	11 (35)	>6 sem	21 (68)	Primovacinação incompleta/ e ≤6 meses	8 (26)
		>6m	6 (19)	Desconhecido	2 (6)
		Desconhecida	3 (10)	Vacinado	0 (0)

Raça	n (%)
Indefinida	16 (52)
Labrador	5 (16)
<i>Rottweiler</i>	1 (3)
Bulldogue francês	3 (10)
Caniche	1 (3)
<i>Beagle</i>	1 (3)
<i>Spitz Anão</i>	1 (3)
<i>Yorkshire Terrier</i>	1 (3)
Malamute do Alaska	1 (3)
<i>Cocker</i>	1 (3)

n, número de animais; %, percentagem.

A 13 dos animais acima referidos, internados na UIDI do HEV-FMV-UL entre maio de 2016 e junho de 2017, foram recolhidas amostras de sangue para a quantificação de proteína C-reativa. Em 12 amostras foi medida a expressão de IL-6 e TNF- α e investigada a presença de DNA bacteriano de *Staphylococcus* spp. e *E. coli*. Uma das amostras usadas para a medição da expressão das citocinas não foi suficiente para a quantificação de CRP e a este grupo foram adicionadas, posteriormente, duas amostras. O sangue foi centrifugado, separando-se o plasma dos elementos figurados, antes de armazenamento a -80°C.

Para o estudo da quantificação de CRP e da expressão de IL-6 e TNF- α foi utilizado um grupo de controlo composto por 8 animais saudáveis.

2.2. Critérios de inclusão

Foram sujeitos à classificação PIRO e à aplicação de dois conjuntos de critérios para diagnóstico de SRIS todos os indivíduos da espécie canina que estiveram internados na UIDI do HEV-FMV-UL novembro de 2013 e junho de 2017, com diagnóstico positivo de Parvovirose (ou seja, detecção do antígeno viral nas fezes por imunocromatografia ou PCR), com resultados de hemograma e bioquímicas existentes, com monitorizações registadas e disponíveis para consulta e com desfecho conhecido (alta ou morte).

Para o estudo da evolução temporal da classificação PIRO e das diferenças entre conjuntos de critérios para diagnóstico de SRIS, de entre os animais acima referidos, foram usados 27 dos 31 animais, sujeitos a internamento na UIDI do HEV-FMV-UL durante um período mínimo de 48 horas.

Para a quantificação de proteína C-reativa (13 animais), das citocinas IL-6 e TNF- α (12 animais) e para a identificação de bDNA (12 animais) foram usados os mesmos critérios de inclusão, à exceção do desfecho conhecido e do período de internamento mínimo de 48 horas. A estes animais também foram aplicados os conjuntos de critérios para diagnóstico de SRIS e a classificação PIRO.

2.3. Critérios de exclusão

Todos os indivíduos que não cumprissem os critérios de inclusão ou que apresentassem doenças ou afeções que pudessem causar alterações gastrointestinais relevantes como diarreia, concomitantes ao diagnóstico de Parvovirose, foram excluídos do estudo (por exemplo, infeção por mais vírus com tropismo gastrointestinal).

2.4. Classificação PIRO e diagnóstico clínico de SRIS

2.4.1. Dados recolhidos

Os dados foram recolhidos do historial clínico de cada animal, consultado através do *software* de gestão de clínicas e hospitais veterinários QVet[®], e também através das fichas clínicas arquivadas em papel na UIDI (Anexo 1). Foram incluídos alguns dos parâmetros avaliados pelos clínicos nas monitorizações e alguns parâmetros analíticos. Os parâmetros clínicos incluídos foram frequência cardíaca, frequência respiratória, temperatura, TRC e cor das membranas mucosas. Os parâmetros analíticos incluídos foram contagem leucocitária, contagem plaquetária e doseamentos de albumina, creatinina, ureia, bilirrubina, ALT e FAS.

2.4.2. Critérios de classificação

Para avaliar se cada animal se encontrava, ou não, em SRIS foram utilizados dois conjuntos de critérios de diagnóstico: o descrito no capítulo anterior (Tabela 2), aos quais se deu o nome de SRIS 1991. A mesma avaliação foi feita novamente, com os mesmos critérios, mas sendo necessária uma alteração na cor das mucosas e/ou no TRC para que o animal fosse

considerado um doente em SRIS. A este conjunto de critérios deu-se o nome de SRIS 2001. Desta forma, tentou-se aumentar a especificidade destes critérios, como é sugerido no artigo resultante da *SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference* de 2001 (Levy et al., 2003).

Os critérios propostos para a classificação de cada um dos parâmetros – P, R e O - foram reunidos e, por vezes, extrapolados a partir de diversas fontes bibliográficas disponíveis sobre a matéria, tanto da área da Medicina Veterinária como da área da Medicina Humana (Tabelas 7 a 9). No que toca à Infeção todos os animais tiveram igual classificação (igual a 1), já que, neste estudo, o agente infeccioso passível de promover o desenvolvimento de sépsis é o *Parvovirus* em todos os animais.

Tabela 7: Critérios de classificação propostos para a predisposição e respetiva pontuação, em cães com Parvovirose, tendo em conta a idade, a raça e o *status* vacinal do doente (Glickman et al., 1985; Houston et al., 1996; Goddard & Leisewitz, 2010; Greene & Decaro, 2012).

	Parâmetros	Pontuação
<i>Idade</i>	<6 semanas	1
	>6 semanas e ≤6 meses	3
	>6 meses	2
<i>Raça</i>	<i>Toy Poodles e Cocker Spaniels</i>	1
	Raça indeterminada	2
	<i>Rottweillers, Labrador Retriever, American Staffordshire Terrier, Pastor Alemão, Malamute do Alaska</i>	3
<i>Vacinação</i>	Primovacinação completa	0
	Primovacinação incompleta ou incorreta	2
	Não vacinado ou <i>status</i> vacinal desconhecido	3

Tabela 8: Critérios de classificação propostos para a resposta e respetiva pontuação, em cães com Parvovirose, tendo em conta a temperatura, a frequência cardíaca, a frequência respiratória e a contagem leucocitária do doente (¹Rijnberk & Stokhof, 2009; ²Boag, 2011; ³Sykes, 2014; ⁴Marshall & Sweeney, 1990).

Critérios	Pontuação			
	0	1	2	3
T (°C)	37.8 - 39.4 ³	39.5-40.4	36-37.7 ou 40.5-41.4	<36 ou >41.4
FC (bpm)	60-140 ¹	141-150 ²	151-170 ²	<60 ou >171-220 ²
FR (rpm)	10–30 ¹	31-40	41-50	>50 ou <10
Contagem de leucócitos (células/μL)	6000 - 16,000 ^{3†}	4,200-5,999 ou 16,001-20,800 ^{4†}	2,940-4,199 ou 20,801-27,040 ^{4†}	<2,939 ou >27,041 ^{4†}

Legenda: T, temperatura; °C, graus Celsius; FC, frequência cardíaca; bpm, batimentos por minuto; FR, frequência respiratória; rpm, respirações por minuto; células/μL, células por microlitro.

† reduções de 28% e de 33% entre intervalos (Marshall & Sweeney, 1990).

Tabela 9: Critérios de classificação propostos para a disfunção orgânica em cães com Parvovirose, tendo em conta parâmetros clínicos e analíticos. A evidência de disfunção de um sistema orgânico equivale a 1 ponto (¹Osterbur, Mann, Kuroki & Declue, 2014; Barsanti, 2012. ²Osterbur et al., 2014. ³Kenney et al., 2010).

Disfunção	Critérios
Renal ^{1†}	Creatinina>1.64 mg/dl; Creatinina>1.64 mg/dl e Ureia>56 mg/dl
Cardiovascular ²	Hipotensão que requer administração de fármacos vasopressores
Respiratória ²	Necessidade de suplementação de oxigénio ou ventilação, ARDS
Hepática ^{1†}	Ácidos biliares>25 µmol/L (pós-prandial) e/ou Bilirrubina>0,41; ALT>130 U/L 37°C e FAS>337 U/L 37°C; Albumina < 2.1 g/dl
Alterações da coagulação ³	Plaquetas≤100,000/µL

Legenda: mg/dl, miligrama por decilitro; g/dl, grama por decilitro; ARDS, *Acute Respiratory Distress Syndrome*; ALT, alanina aminotransferase; FAS, fosfatase alcalina sérica; U/L 37°C, unidades por litro a 37 graus Celsius; µL, microlitro.

[†]Os valores apresentados correspondem aos limites máximos considerados pelo Laboratório de Análises Clínicas Professor M. Braço Forte.

2.5. Quantificação de CRP

A medição quantitativa da CRP foi feita com recurso ao *Canine C Reactive Protein ELISA Kit* (Abcam; Cambridge, RU) de acordo com as instruções do fabricante. De acordo como este teste de ELISA *sandwich*, a intensidade da cor varia proporcionalmente com a concentração de CRP em cada amostra. Deste modo, a quantidade de CRP na amostra testada pode ser determinada a partir de uma curva padrão construída e corrigida para a diluição. O *kit* inclui todos os reagentes utilizados (à exceção da água desionizada utilizada na preparação de alguns reagentes) e uma placa ELISA de poliestireno, de 96 poços, à superfície dos quais estão adsorvidos anticorpos anti proteína C-reativa. Foram utilizados plasmas obtidos a partir das amostras de sangue, após centrifugação. Cada amostra e cada diluição para construção da curva padrão foi analisada em duplicado, tendo sido incluídos 2 poços sem amostra ou solução padrão, como controlos negativos. Os reagentes foram preparados de acordo com as instruções, assim como as soluções para construção da curva padrão, que foram preparados a partir de diluições seriadas da solução calibradora (*Dog C Reactive Protein Calibrator*). Após descongelação em gelo, as amostras foram diluídas em 1:1000 com a solução diluidora. Foram então adicionadas aos respetivos poços, assim como as soluções padrão, permanecendo em incubação durante 10 minutos. De seguida, todos os poços foram submetidos a um total de quatro lavagens, com a solução de lavagem fornecida. A seguir à lavagem foi adicionado o conjugado enzima-anticorpo (anticorpos anti proteína C-reativa conjugados com enzima peroxidase *horseradish*), seguindo-se novo período de incubação de 10 minutos, e repetição das lavagens. O substrato enzimático

(3,3',5,5'-TMB) foi então adicionado a cada poço e, passados 5 minutos, foi adicionada a solução que termina a reação enzimática. A leitura foi feita no aparelho FLUOstar® Omega (BMG Labtech; Ortenberg, Alemanha) a 450 nm. É possível a determinação da concentração de CRP entre os 3,125 ng/ml e os 200 ng/ml (Abcam, 2014). A concentração de CRP dos animais com Parvovirose e dos animais de um grupo de controlo foram analisadas na mesma placa de ELISA. As concentrações de CRP dos animais de ambos os grupos foram extrapoladas a partir da curva padrão com o programa informático GraphPad Prism 7.03.

2.6. Quantificação da expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α

2.6.1. Extração de RNA

Para a extração de RNA, as amostras (ou seja, a porção dos elementos figurados do sangue, obtidos por centrifugação) foram descongeladas em gelo. Foi seguido um protocolo, convenientemente adaptado (Harbor, 2016). Às amostras foi adicionado um tampão para lise dos eritrócitos (preparado conforme as instruções), seguindo-se uma centrifugação e eliminação do sobrenadante. Após repetição deste passo, foi adicionado DPBS (*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) estéril (também adequadamente preparado), seguindo-se nova centrifugação e eliminação do sobrenadante. Após adição de solução de TRIzol (Sigma-Aldrich) e de Clorofórmio (Sigma-Aldrich), e posterior ressuspensão, as amostras foram novamente centrifugadas, tendo sido recuperado o sobrenadante. A este foi adicionado isopropanol frio, para precipitação do RNA durante algumas horas, a -20°C. Então, as amostras foram novamente centrifugadas, o sobrenadante removido e o RNA precipitado e lavado com álcool a 70%. Após nova centrifugação e eliminação do sobrenadante, a solução de RNA de cada amostra foi filtrada em colunas de remoção de gDNA (Qiagen), das quais o RNA foi eluído em 20 μ l de RNase *Free Water* (Qiagen) por centrifugação. Para maior eliminação de DNA contaminante, a solução contendo o RNA extraído de cada amostra foi submetida a tratamento por DNase.

Numa primeira fase, a solução de RNA foi incubada com 1 μ l de tampão DNase I Buffer 10x (Invitrogen) e 1 μ l de enzima DNase I RNase-free 1 U/L (Invitrogen) durante 1 hora, a 37°C. De seguida, foi adicionado à solução 1 μ l de tampão EDTA (Invitrogen), seguindo-se um período de incubação de 15 minutos, a 65°C. Após o tratamento, as amostras foram postas em gelo durante 5 minutos. A concentração de RNA e a sua pureza foram determinadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, EUA).

2.6.2. Produção de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por PCR com o termociclador *VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO™* (VWR; Radnor, Pensilvânia, EUA). Para a fase de preparação,

ao RNA extraído de cada amostra foram adicionados 1 µl de *primer Anchored Oligo* (dT)₁₈ 50 µM (Roche) e água. A mistura, perfazendo o volume de 11 µl, foi então submetida à temperatura de 65°C durante 10 minutos. De seguida foram adicionados à mistura 4 µl de tampão *Transcriptor RT Reaction Buffer* (Roche), 4 µl de mistura de desoxirribonucleótidos *dNTP Mix*, de 10 mM cada desoxirribonucleótido (Roche), 0.5 µl de solução protetora de *RNA Protector RNase Inhibitor* (Roche), e 0.5 µl de enzima transcriptase reversa *Transcriptor High Fidelity 20 U/µl* (Roche), perfazendo um total de 20 µl. A mistura final foi submetida, primeiro a 50°C durante 30 minutos, e depois a 80°C durante 5 minutos. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C e, numa fase posterior, utilizado para a amplificação por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

2.6.3. Quantificação da expressão de mRNA IL-6 e TNF-α por RT-qPCR

A experiência RT-qPCR foi efetuada, em poços duplicados, com o termociclador StepOnePlus™ (Applied Biosystems; Warrington, RU) em placas de 96 poços (Frilabo; Maia, Portugal). Como controlo endógeno foi utilizado o gene RPL27 (*Ribosomal Protein L27*). Todos os *primers* utilizados foram desenhados (Henriques et al., 2016) e produzidos por um fabricante (Frilabo). Em cada reação foram incluídos 2 µl (80 nM) de cada *primer*, ou seja, *forward* e *reverse* (Tabela 9), 2 µl de cDNA, 4 µl de água esterilizada e 10 µl de SYBR® *Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), num volume total de 20 µl por cada reação. Os ciclos térmicos foram os seguintes: desnaturação inicial durante 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de amplificação (95°C durante 15 segundos e hibridização a 60°C durante 1 minuto) e fase final de *melting*, durante a qual foram aplicados aumentos sucessivos de temperatura nos poços (95°C durante 15 segundos e 60°C durante 1 min, seguindo-se novo aumento de temperatura até 95°C, a uma velocidade de 0.3°C/s). As curvas de *melting* obtidas foram usadas para verificar a especificidade de cada segmento amplificado. Para determinar as diferenças relativas na expressão de mRNA entre o grupo de animais com diagnóstico de Parvovirose e o grupo de animais controlo foi usado o método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ ou *Double-delta C_T* (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 10: *Primers* usados para quantificação da expressão de mRNA por RT-qPCR, respetivas sequências e tamanho dos segmentos amplificados (Henriques et al., 2016).

Gene	Sequência	Tamanho do segmento amplificado (pares de bases)
IL-6	5'-CTGGCAGGAGATTCCAAGGAT-3' 5'-TCTGCCAGTGCCTCTTTGC-3'	167
TNF-α	5'-CTGCCTCAGCCTCTTCTCCTT-3' 5'-CTGGGCAAGAGGGCTGATTA-3'	133
RPL27	5'-TCGTCAACAAGGATGTCTTCAGAG-3' 5'-TCTTGCCAGTCTTGTACCTCTCCT-3'	96

2.7. Identificação de DNA bacteriano

2.7.1. Extração de DNA genómico

Também nesta experiência foram usados como amostras os elementos figurados do sangue. Para extração do DNA genómico (gDNA) foram usadas colunas de eliminação de gDNA do *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen GmbH; Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O gDNA foi eluído da membrana da coluna por centrifugação após adição de *RNase-Free Water* (fornecida com o mesmo *kit*) à coluna. A concentração de DNA e a sua pureza foram determinadas por espectrofotometria no equipamento NanoDrop™ 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific; Waltham, EUA).

Para controlo positivo de *E. coli* na reação PCR foi extraído DNA a partir de colónias semeadas em placa de gelose de sangue, gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária. Para tal, homogeneizou-se uma pequena porção das colónias semeadas em 500 µl de água e ferveu-se durante 10 minutos. O DNA foi então obtido por centrifugação a 13000 rpm, durante 5 minutos. O DNA para controlo positivo de *Staphylococcus* spp. foi cedido pela empresa Magnomics, *startup* sediada na FMV. O processo de extração necessário para obtenção deste DNA é mais complexo e requer enzimas que não se encontravam disponíveis no laboratório.

2.7.2. Amplificação por PCR

O DNA extraído a partir das amostras, bem como o de *Staphylococcus* spp. e *E. coli* (para controlo positivo), foi analisado por PCR convencional num termociclador *VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO™* (VWR; Radnor, Pensilvânia, EUA). Para cada reação foram utilizados 0.5 µl de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1.5 µl de MgCl₂ 25mM (Thermo Scientific), 0.5 µl de mistura de desoxirribonucleótidos dNTP Mix 10 mM, cada desoxirribonucleótido (Roche), 0.1 µl de enzima *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* 2 U/µl (Thermo Scientific), 15.9 µl de água e, por fim, 5 µl de DNA, num volume total de 25 µl. Os *primers* utilizados para amplificação do DNA de *Staphylococcus* spp. foram StaG422 e Stag765 0.2 µM (StabVida), enquanto que para amplificação do DNA de *E. coli* foram utilizados os *primers* 16S 25 pM (Tabela 11). O programa de amplificação utilizado foi o seguinte: desnaturação à temperatura de 95°C durante 30 minutos, 30 ciclos a 98°C durante 30 segundos, 55°C durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto e finalmente a fase de extensão à temperatura de 72°C durante 10 minutos.

Tabela 11: Primers usados na amplificação do DNA de *E. coli* e *Staphylococcus* spp. por PCR, sequências, tamanho dos segmentos amplificados e referência bibliográfica.

Gene	Sequência	Tamanho do segmento amplificado (pares de bases)	Referência
16S	5'-GCTGACGAGTGGCGGACGGG-3' 5'-TAGGAGTCTGGACCGTGTCT-3'	253	Tivendale et al., 2004
TStaG422	5'-GGCCGTGTTGAACGTGGT CAAATCA-3'	370	Martineau et al., 2001
TStag765	5'- TIACCATTTTCAGTACCTTCTGGTAA-3'		

2.7.3. Identificação dos produtos de amplificação

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1.5%. Para o gel foram usados 3 g de agarose (Applichem) em 200 ml de tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE). Foram usados 5 µl do DNA de cada amostra, juntamente com 1 µl de corante NZYDNA *Loading Dye* (NZYTech). Foi utilizado o marcador de peso molecular de 1 kb *GeneRuler DNA Ladder* (Thermo Scientific). Os produtos de amplificação foram, de seguida, analisados numa câmara de transiluminação por radiação ultravioleta (Chemidoc™ XRS+). Os controlos positivos da reação PCR foram referidos anteriormente.

2.8. Análise Estatística

Todos os dados utilizados foram registados com recurso ao programa informático *Microsoft Office Excel* 2016. Os testes estatísticos escolhidos para cada análise foram implementados com o programa informático R, versão 3.4.0 (R Core Team, 2015), ou com o suplemento *Real Statistics Resource Pack*, versão 4.3 (Zaiontz, 2017), para *Microsoft Office Excel* 2016.

2.8.1. Classificação PIRO e identificação de SRIS

Para verificar se houve diferenças significativas entre o número de animais que se considerou sofrer de SRIS, segundo o conjunto de critérios SRIS 1991 e SRIS 2001, à entrada e às 48 horas, foi usado o teste de McNemar.

Para estudar a evolução da classificação PIRO após as primeiras 48 horas de internamento foi empregue o Wilcoxon Signed-Ranks Test.

2.8.2. Quantificação de CRP

Para avaliar se os dados apresentavam distribuição normal foi aplicado o teste Shapiro-Wilk. Depois foi aplicado o teste Mann-Whitney para duas amostras independentes.

2.8.3. Concentração de CRP e classificação PIRO

Para averiguar se existe uma correlação entre a concentração de CRP de um animal e a classificação PIRO aferida no dia da colheita foi aplicado um teste de correlação de Spearman.

2.8.4. Concentração de CRP e SRIS

Numa tentativa de calcular um valor *cut-off* para a concentração de CRP, a partir do qual se poderia dizer que determinado animal se apresentava em SRIS, os valores de CRP da amostra de animais com Parvovirose e a respetiva classificação segundo os critérios SRIS 1991 foram usados para construir uma curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Foi usada a ferramenta pROC (Robin et al., 2011) do programa R.

3. Resultados

3.1. Classificação PIRO e identificação de SRIS

O teste de McNemar, aplicado para avaliar as diferenças entre a classificação obtida segundo o conjunto de critérios SRIS 1991 e a sua modificação, SRIS 2001, à entrada e após 48 horas de internamento, revelou que as diferenças entre a classificação obtida para cada animal, tanto à entrada como às 48 horas, são significativas (Tabela 12), sugerindo uma maior especificidade do conjunto de critérios SRIS 2001.

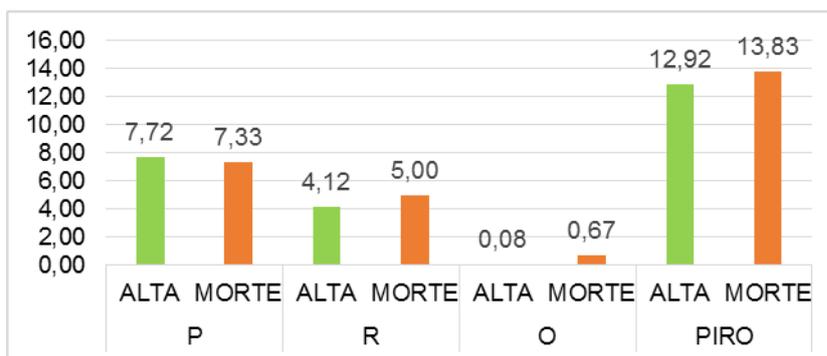
Tabela 12: Tabelas de frequências dos animais que se considerou exibirem SRIS segundo os critérios SRIS 1991 e SRIS 2001, tanto à entrada no internamento como às 48 horas, e resultados dos respetivos testes de McNemar.

	Entrada			48 horas			
	SRIS 2001			SRIS 2001			
SRIS 1991	S	N	TOTAL	SRIS 1991	S	N	TOTAL
S	6	11	17	S	10	9	19
N	0	10	10	N	0	8	8
TOTAL	6	21	27	TOTAL	10	17	27
$\chi^2 = 9.09$	gl = 1	p < 0,01		$\chi^2 = 7.11$	gl = 1	p < 0,01	

Legenda: S, Sim; N, Não; χ^2 , valor de qui-quadrado; gl, graus de liberdade; p, probabilidade de significância.

Os animais foram classificados segundo os dados anteriormente referidos (Anexo 2). De entre os animais da amostra, 2 morreram, o que confere ao desfecho “morte” pouca representatividade. Além disso, os parâmetros e suas pontuações não foram extrapolados e posteriormente testados em populações diferentes. Em vez disso, foram desenvolvidos a partir de literatura científica e com base em algum conhecimento empírico. Desta forma, não foi estudada estatisticamente a relação entre a classificação PIRO e o desfecho. A figura 1 apresenta as médias de classificação PIRO dos animais que tiveram alta e dos animais que morreram. A média das classificações do elemento P foi a única que se verificou superior em animais que tiveram alta (7,72) em relação a animais que morreram (7,33). Para o elemento R a média das classificações foi de 4,12 para os animais que tiveram alta e de 5,00 para os animais que morreram. No que toca ao elemento O, a classificação média dos animais que tiveram alta foi de 0,08 e a dos animais que morreram foi de 0,67. Por fim, a média da classificação total PIRO entre animais que tiveram alta foi 12,92, e entre animais que morreram foi 13,83.

Figura 1: Médias de classificação P (Predisposição), R (Resposta), O (Disfunção Orgânica) e PIRO (Total) dos animais sobreviventes (Alta) e dos animais que morreram (Morte).

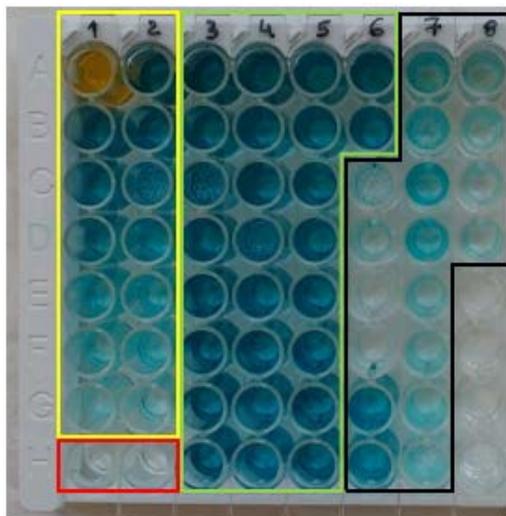


No que toca à classificação PIRO obtida no início do período de internamento e após 48 horas, o Wilcoxon Signed-Ranks Test revelou que não há diferenças significativas entre as classificações obtidas no início do período de internamento e após 48 horas ($z = 0,906$; $\alpha = 0,05$; $p = 0,187$).

3.2. Concentração de CRP

A figura 2 mostra a placa ELISA utilizada, durante a execução da experiência. É visível a magnitude superior das concentrações de CRP referentes a animais do grupo experimental em relação a animais do grupo de controlo. As figuras 3 e 4 mostram a curva padrão gerada e as concentrações de CRP das amostras analisadas.

Figura 2: Placa ELISA durante a execução da experiência, no momento após a adição do conjugado enzima-anticorpo (a azul), à exceção do poço número 1 da linha A, ao qual já tinha sido adicionado a solução de paragem (a amarelo). Os diferentes tons de azul evidenciam macroscopicamente as diferenças entre as concentrações de CRP nos diferentes poços. Original.



Legenda: as filas 1 e 2 correspondem aos poços em que foram analisadas as soluções padrão (moldura amarela); nos poços H1 e H2, o controlo negativo (moldura vermelha); nas filas 3, 4, 5 e poços A6 e B6 foram analisadas as amostras do grupo experimental (moldura verde); nos poços C6 a H6, fila 7 completa e poços A8 a D8 foram analisadas as amostras dos animais do grupo de controlo (moldura preta).

Figura 3: Curva padrão gerada para obtenção das concentrações de CRP nas amostras de plasma testadas. Original.

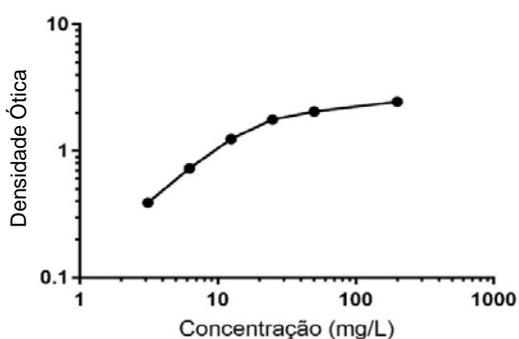
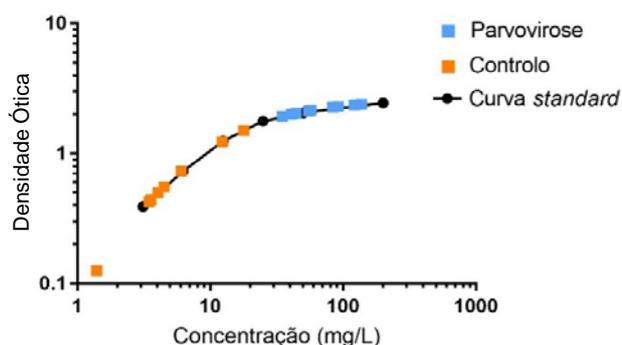


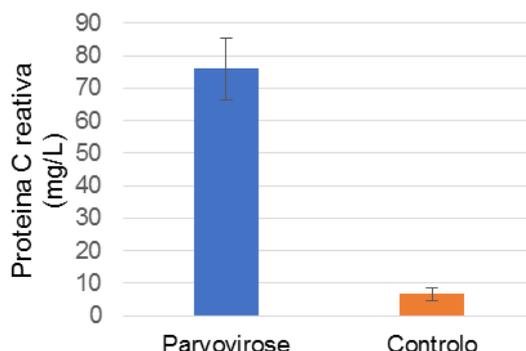
Figura 4: Representação gráfica das concentrações de CRP medidas no plasma dos cães com Parvovirose e cães do grupo controlo em relação à curva padrão. Original.



O teste Shapiro-Wilk para avaliação da distribuição demonstrou que os dados não se encontravam normalmente distribuídos ($W=0,89716$ e $p<0,05$). O teste Mann-Whitney indicou que as concentrações de CRP observadas nos cães com diagnóstico de Parvovirose (Mediana = 57,392) eram significativamente superiores às observadas nos cães do grupo de

controlo (Mediana = 4,280), $U = 24,436$, $p < 0.001$, como se pode observar também através da figura 5.

Figura 5: Médias das concentrações de CRP nos cães com diagnóstico de Parvovirose (Média = 75,935; EP = 9,460) e nos cães do grupo controlo (Média = 6,655; EP = 1,966), com as respetivas barras de erro.



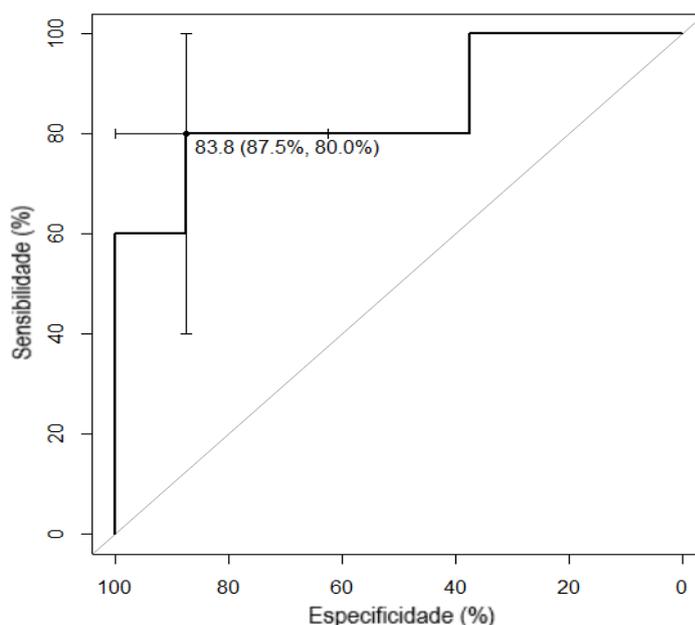
3.3. Concentração de CRP e classificação PIRO

Segundo o teste de Spearman, não existe uma correlação entre o aumento da concentração sérica de CRP e o aumento da classificação PIRO ($r_s = 0,187$; $p = 0,540$).

3.4. Concentração de CRP e SRIS

Na figura 6 está representada a curva ROC gerada a partir dos resultados da concentração de CRP dos animais do grupo experimental e respetivas classificações segundo os critérios SRIS 1991. Uma curva ROC serve para avaliar o desempenho de uma determinada classificação binária a partir de uma variável ordinal, continua ou discreta. Apresenta a sensibilidade (proporção de observações positivas corretamente classificadas) e a especificidade (proporção de observações negativas corretamente classificadas) dos valores da variável inserida. (Robin et al., 2011). A curva gerada mostra que o valor de CRP que melhor indica que o animal se encontra em SRIS segundo os critérios SRIS 1991 é 83.8 mg/L (AUC = 0.85), com sensibilidade de 80% [40%; 100%] e uma especificidade de 87,5% [62,5%; 100%].

Figura 6: Curva ROC que mostra a sensibilidade e especificidade dos valores de CRP na detecção de animais em SRIS segundo os critérios SRIS 1991.



3.5. Quantificação da expressão de mRNA de IL-6 e TNF- α

O método $2^{\Delta\Delta C_T}$ é um método de quantificação relativa a partir da comparação do limiar da fase exponencial (*threshold*). Os valores C_T das amostras são comparados com os de um controlo, sendo que ambos são normalizados a um gene endógeno adequado (neste caso, o RPL27). A média dos C_T das amostras do grupo de controlo, normalizados ao gene endógeno (ΔC_T referência), é subtraída aos valores C_T das amostras do grupo experimental, também elas normalizadas ao gene endógeno (ΔC_T amostra). Para que o cálculo de $\Delta\Delta C_T$ seja válido, a eficiência da amplificação da amostra alvo e da referência endógena deve ser aproximadamente igual (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores obtidos encontram-se na tabela 13.

Tabela 13: Valores das médias de $2^{\Delta\Delta C_T}$ e erro-padrão da quantificação relativa da expressão de IL-6 e TNF- α .

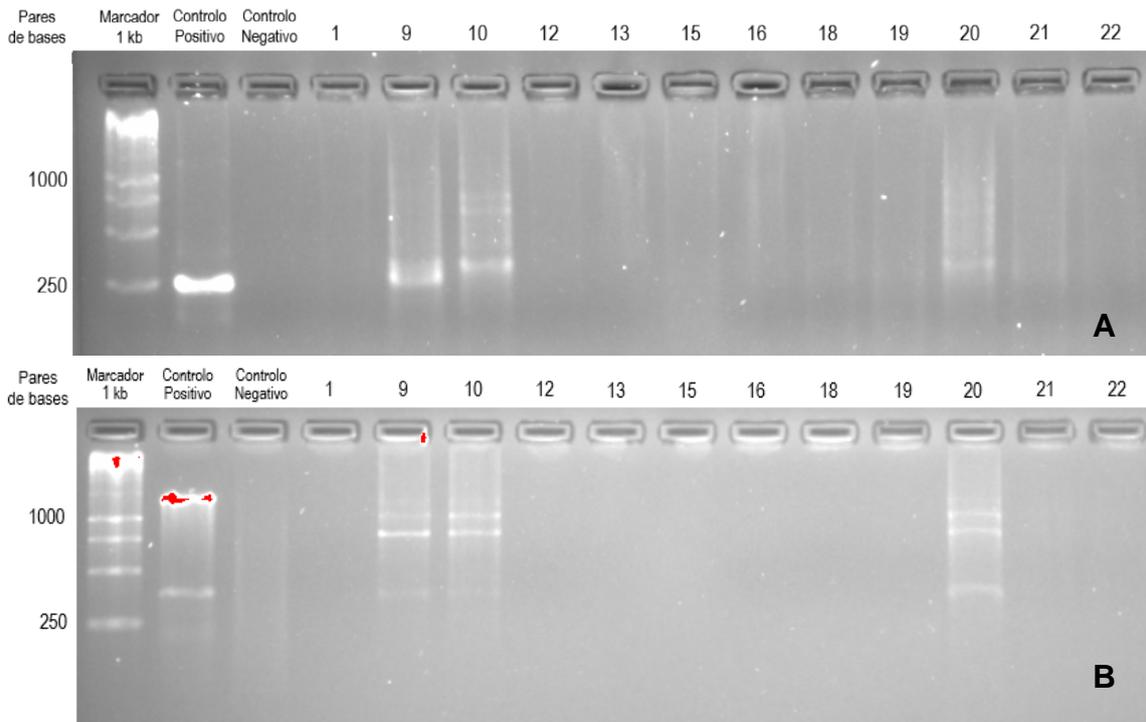
Interleucina	Média $2^{\Delta\Delta C_T}$	Erro-padrão
IL-6	1698,36	1167,34
TNF- α	3,77	3,03

Em 5 das amostras provenientes de cães com Parvovirose houve expressão de IL-6, sempre com valores de C_T superiores a 34. Em 6 das amostras provenientes de cães com Parvovirose houve expressão de TNF- α , sempre com valores de C_T superiores a 29.

3.6. Identificação de DNA bacteriano

Os resultados da eletroforese em gel de agarose demonstram a presença de DNA bacteriano, tanto no ensaio para detecção de DNA de *E. coli* como no ensaio para detecção de DNA de *Staphylococcus* spp. no plasma dos animais 9, 10 e 20 (Figura 7).

Figura 7: Resultados da eletroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR com os *primers* para identificação de *E. coli* (A) e *Staphylococcus* spp. (B).



Legenda: kb, *kilobase*.

4. Discussão

4.1. Os critérios de definição de SRIS

Hauptman e colaboradores (1997) propuseram uma adaptação dos critérios sugeridos alguns anos antes para pequenos animais (Purvis & Kirby, 1994), sendo que sépsis era, no referido estudo, verdadeiramente diagnosticada na presença de: confirmação histológica, microbiológica ou evidência de infecção, e de doença sistêmica. Os resultados da aplicação dos critérios de diagnóstico propostos (um cão era diagnosticado como séptico na presença de, pelo menos, dois dos critérios) foram então comparados com o diagnóstico verdadeiro de sépsis, tendo sido calculadas uma sensibilidade de 97% e uma especificidade de 64% (Hauptman et al., 1997).

No presente estudo compõem a amostra animais com Parvovirose, cujos dados foram recolhidos retrospectivamente, na sua maioria. Para comprovação de bacteriemia apenas puderam ser utilizados os casos colhidos prospectivamente. Como tal, não existem, na maior parte dos casos, amostras que permitam comprovar bacteriemia. Assim, na maioria das amostras existe evidência da infecção viral mas não de sépsis, apesar de se considerar que a maior causa de morte em animais com diagnóstico de Parvovirose é o estabelecimento de sépsis ou de CID (consequência da SRIS) (Greene & Decaro, 2012). Deste modo, não foi possível calcular a especificidade e sensibilidade dos critérios de diagnóstico para SRIS. Tal só seria possível se o resultado da aplicação desses critérios fosse comparado com um *gold standard*. Esta é, não só uma limitação deste estudo, mas uma das grandes limitações encontradas, ainda hoje, nos estudos acerca de sépsis, tanto em Medicina Veterinária como em Medicina Humana: é possível identificar a presença de infecção e de resposta inflamatória mas não existe um teste de diagnóstico, *gold standard*, capaz de identificar sépsis com bom poder discriminatório (Singer et al., 2016).

Através dos valores mencionados por Hauptman e colaboradores (1997) é possível afirmar que a aplicação deste método é muito pouco específica. O autor refere também que, no que toca à sépsis, é preferível um método pouco específico, mas sensível o suficiente para detetar casos iniciais ou clinicamente pouco evidentes de sépsis. No entanto, e apesar de o conjunto de critérios ainda ser muito aplicado dessa forma, tanto na prática clínica como na condução de estudos (Burkitt, Haskins, Nelson & Kass, 2007; Sykes, 2014), são frequentes as tentativas de o tornar mais específico. Num inquérito a Médicos Veterinários acerca de sépsis em cães e gatos, conduzido em 2006, 80% dos inquiridos afirmaram utilizar os critérios de SRIS em cães. No entanto, a maioria desses 80% considera o cumprimento de 3 critérios, e não 2, para o diagnóstico de SRIS em cães (Cynthia M. Otto, 2007b).

A especificidade de alguns destes critérios pode ser bastante mais baixa no que toca a casos de Parvovirose, já que os cachorros apresentam frequentemente valores mais elevados de frequência cardíaca e frequência respiratória, sem que isso se deva a qualquer estado de doença. A dor e/ou a ansiedade podem também levar a aumentos nestes

parâmetros, contribuindo para a diminuição da sua especificidade (Fransson et al., 2007). Também a contagem leucocitária pode promover a diminuição da especificidade. Uma contagem leucocitária inferior a 6000 células/ μ L pode simplesmente refletir a destruição de células precursoras na medula óssea, e não ser um sinal de SRIS (Savigny & Macintire, 2010). No estudo de Fransson (2007) e colaboradores a temperatura corporal mostrou uma relação significativa com a possível existência de SIRS. No entanto, este era um dos parâmetros para o diagnóstico de SRIS. Além disto, as médias de temperatura corporal de animais do grupo controlo e de animais com diagnóstico de piómetra não apresentaram diferenças significativas entre si. No mesmo estudo é proposta uma alternativa para estimar a probabilidade de existir SRIS com base nos valores de CRP, FC e temperatura corporal. Neste estudo foi demonstrado que é significativamente maior o número de animais que se considerou estar em SRIS segundo os critérios SRIS 1991, do que o número de animais assim classificados segundo os critérios SRIS 2001. O mesmo se verifica tanto à entrada no internamento como após 48 horas. Esta diferença pode resultar de um aumento da especificidade do conjunto de critérios com a modificação SRIS 2001, tal como foi sugerido no caso da Medicina Humana (Levy et al., 2003). Como já foi referido, a modificação dos critérios consistiu na obrigatoriedade de TRC aumentado ou de alteração na cor das membranas mucosas para que fossem considerados os critérios de SRIS. Tal ajuste pode tornar menos sensível a deteção de SRIS, uma vez que a alteração de qualquer um destes parâmetros indica uma alteração na perfusão sanguínea periférica, podendo ser já um sinal de comprometimento da função circulatória, sendo pouco útil em doentes em que existe hipovolémia ligeira a moderada (Schriger & Baraff, 1991; Rijnberk & Stokhof, 2009).

4.2. O desempenho do sistema PIRO

Neste trabalho foi analisada a classificação PIRO em 31 animais, dos quais apenas 6 morreram. Como referido anteriormente, os critérios de classificação de cada um dos elementos do sistema PIRO (à exceção do elemento Infeção) foram propostos para este trabalho tendo em conta diversas fontes bibliográficas, incluindo estudos prévios, sem que fosse feito um estudo dos parâmetros que maior influência tem, tanto no desenvolvimento de sépsis como na sua gravidade e na mortalidade que lhe está associada. Na base desta proposta estão diversos estudos que visam, eles próprios, propor modelos robustos de estadiamento de sépsis tendo por base o sistema PIRO (Howell et al., 2011; Granja et al., 2013; Rathour et al., 2015).

4.2.1. Predisposição

No que toca à Medicina Humana já foram propostos diversos fatores que podem ter influência na probabilidade de desenvolver sépsis: idade acima dos 65 anos, o género, Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica, doença hepática, residência ou internamento em lar,

existência de neoplasia com ou sem metástases (Howell et al., 2011), tratamento com quimioterápicos ou agentes imunossupressores, doença hematológica crônica, doença renal crônica ou *Diabetes mellitus* (Granja et al., 2013; Rathour et al., 2015). A combinação entre a presença destes fatores e a herança genética que caracteriza cada paciente de forma diferente contribui para que indivíduos expostos ao mesmo tipo de infecção exibam ou não a doença, com diferentes graus de gravidade e diferentes prognósticos (Cynthia M. Otto, 2007b). Também na Medicina Veterinária a idade já foi identificada como um fator que influencia a resposta inflamatória. Foi verificado que a idade altera a produção de mediadores inflamatórios (como IL-6 e TNF- α) em resposta a PAMPs de bactérias gram-negativas, podendo ser um fator contribuinte para a mortalidade de cães geriátricos com sépsis (Deitschel, Kerl, Chang & DeClue, 2010). Também a raça pode ser um fator importante. Num outro estudo foi observado que a magnitude da produção de TNF- α por monócitos do sangue periférico foi superior em cães de raça tida como predisposta à infecção por *Parvovirus*, como o *Rottweiler* (Nemzek, Agrodnia & Hauptman, 2007).

Uma vez que, neste estudo, foram apenas incluídos cães com diagnóstico de Parvovirose, os critérios incluídos foram a idade, a raça e a vacinação. A média das classificações do elemento P foi de 7,72 entre os cães que tiveram alta e de 7,33 entre os cães que morreram. A maioria dos cães da amostra (21) tinha idade compreendida entre as 6 semanas e os 6 meses. A maioria dos cães não tinha raça definida (13), existindo apenas dois animais de raças tidas como predispostas a Parvovirose (1 *Rottweiler* e 1 Malamute do Alaska). Nenhum dos cães internados na UIDI e incluídos neste estudo tinham registo de vacinação correta. A maioria não tinha qualquer registo de vacinação (18) e alguns apresentavam história de primovacinação incompleta ou incorreta.

À exceção do parâmetro da raça, a idade e o *status* vacinal que caracterizam a maioria dos cães incluídos refletem apenas aquilo que já foi referido acerca da predisposição à infecção pelo *Parvovirus*. A superioridade da média das classificações do elemento Predisposição nos cães que tiveram alta, em relação aos cães que morreram, aparenta ser um resultado da sobre-representação de animais em idade mais suscetível à infecção por *Parvovirus* e de animais não vacinados. Assim sendo, são fatores pouco adequados para classificar a predisposição para o desenvolvimento de sépsis, assim como para a previsão do desfecho (Kalli et al., 2010).

4.2.2. Infecção

Uma vez que a Parvovirose como modelo de sépsis é a base deste estudo, o elemento Infecção não foi estudado, tendo sido atribuída a todos os animais a classificação de 1. No entanto, têm sido propostos, na área da Medicina Humana, diversas classificações tendo em conta o local de infecção ou o tipo de microrganismo responsável, por exemplo: pneumonia, infecção do trato urinário, meningite ou encefalite (Howell et al., 2011; Rathour et al., 2015),

existência de hemoculturas positivas, HCAS, ou implementação prévia de tratamento antibiótico adequado (Granja et al., 2013). Apesar de se saber que os sinais clínicos de sépsis são influenciados pelo tipo, local e extensão da infecção, essas influências não estão ainda bem caracterizadas na área da Medicina Veterinária (Otto, 2007b).

4.2.3. Resposta

A média das classificações do elemento Resposta foi de 4,12 para os animais que tiveram alta e de 5 para os animais que morreram. Apesar de não ter sido aplicado nenhum teste estatístico, isto pode ser um sinal de que este tipo de classificação pode ter utilidade na elaboração de um prognóstico. Os parâmetros usados são os mesmos que foram usados para atribuir SRIS. Logo, podem ser apontadas a este sistema de classificação as mesmas limitações, que podem ter promovido a atribuição de classificações demasiado elevadas e, por conseguinte, ter resultado na diminuição da especificidade (cachorros podem apresentar frequência cardíaca e frequência respiratória mais elevada e ser saudáveis, esses aumentos podem resultar de dor e/ou a ansiedade, ou contagem leucocitária francamente diminuída devido ao efeito do *Parvovirus* nas células precursoras) (Fransson et al., 2007; Savigny & Macintire, 2010).

Em doentes humanos, alguns dos mesmos parâmetros foram identificados como bons indicadores da resposta, por exemplo, frequência cardíaca, frequência respiratória ou contagem leucocitária (Howell et al., 2011). Granja e colaboradores (2013) identificaram a frequência cardíaca, a contagem de neutrófilos e a concentração de CRP como os melhores indicadores considerados, tendo sido identificada uma associação dos mesmos com a mortalidade hospitalar. Noutro estudo já mencionado, os parâmetros que demonstraram uma associação significativa com a mortalidade foram frequência respiratória superior a 20 rpm e mais de 5% de neutrófilos imaturos presentes na contagem diferencial (Rathour et al., 2015). Tendo em conta estes e outros modelos, talvez a categorização de cada parâmetro seja demasiado ambiciosa, especialmente tendo em conta o tamanho da amostra utilizada. Biomarcadores que pudessem ajudar os clínicos a perceber a evolução clínica de um paciente com sépsis seriam uma ferramenta extremamente valiosa. A identificação de potenciais parâmetros com valor preditivo em relação ao prognóstico, em estudos retrospectivos, é um primeiro passo essencial no estabelecimento de sistemas de classificação como este (Otto, 2007b).

4.2.4. Disfunção Orgânica

A média das classificações referentes a este elemento foi de 0,08 para os animais que tiveram alta e 0,67 para os animais que morreram. Estas classificações bastante baixas podem ser reflexo da elevada taxa de sucesso no tratamento destes animais na UIDI do HEV-FMV-UL (Machado & Gil, 2017), já que da amostra de 31 cães apenas 4

demonstraram algum sinal de SDMO, de acordo com a classificação proposta, obtendo todos a classificação de 1. No entanto, podem também ser resultado da não avaliação dos parâmetros que poderiam permitir a atribuição de uma classificação (por exemplo, não existem medições da concentração de ácidos biliares para nenhum dos animais da amostra).

4.2.4.1. Disfunção renal

Para a avaliação da função renal são úteis medições de ureia e creatinina séricas, bem como do débito urinário (Bagshaw, George & Bellomo, 2008). Dos 31 animais da amostra, apenas 1 apresentou valores de creatinina sérica acima do valor de referência. Apesar de este parâmetro analítico não ter sido mensurado em todos os animais da amostra, o aparentemente baixo número de animais com sinais analíticos de LRA pode dever-se à pouca sensibilidade deste parâmetro no que toca a diminuições discretas da função renal, já que um ligeiro aumento pode representar uma diminuição substancial (de mais de 75%) da taxa de filtração glomerular (Willard & Tvedten, 2011). Não foi possível obter registos acerca do débito urinário. Em caso de sépsis pode ocorrer LRA devido a hipoperfusão renal e consequente isquémia, levando a necrose tubular, ou devido a apoptose promovida pelos mediadores inflamatórios em circulação, sendo que o segundo parece ser o processo mais comum em cães, tal como em doentes humanos (Osterbur et al., 2014). Foi também proposto que, durante o processo de LRA devido a sépsis a arteríola eferente sofre uma maior vasodilatação em relação à arteríola aferente (que também sofre vasodilatação), o que resulta no aumento do fluxo sanguíneo renal, redução da pressão capilar glomerular e redução da taxa de filtração glomerular (Wan et al., 2008). Assim, uma vez que a necrose tubular aguda não parece estar envolvida neste processo, a histopatologia também não parece ser um bom método para diagnóstico de LRA secundária a sépsis (Wan et al., 2008). A NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*) tem vindo a atrair interesse no seio da investigação de biomarcadores da função renal em doentes humanos. Tem vindo a demonstrar qualidades como capacidade de diagnóstico precoce de LRA, bem como valor de prognóstico, em diversas etiologias de LRA, como sépsis (Devarajan, 2010).

4.2.4.2. Disfunção cardiovascular

Nenhum dos animais incluídos tinha registo de administração de um fármaco vasopressor, pelo que não foi possível relacionar quaisquer achados com a função cardiovascular e com o desfecho. Apesar de este critério ser baseado numa medida terapêutica, tem sido usado em estudos retrospectivos e prospetivos para estratificação dos pacientes (Osterbur et al., 2014). A ecocardiografia pode ser uma ferramenta muito valiosa na deteção de depressão miocárdica, à semelhança do que acontece em doentes sépticos humanos, já que pode revelar dilatação biventricular e redução da fração de ejeção. A depressão miocárdica pode

ocorrer na ausência de hipotensão e ser um indicador precoce de disfunção cardiovascular (Dickinson, Rozanski & Rush, 2007).

Em nenhum dos pacientes foi detetada a existência de choque séptico. Segundo as definições previamente revistas, o choque séptico consiste em hipotensão evidenciada por pressão sistólica inferior a 90 mmHg ou pressão arterial média inferior a 70 mmHg. Em nenhum dos cães da amostra existe registo de medição da pressão arterial.

A avaliação do TRC e da qualidade do pulso femoral foram sempre incluídas nas monitorizações. No entanto, o seu carácter bastante subjetivo e pouco sensível para deteção de hipovolémia ou hipotensão moderadas faz com que não sejam adequados (Schriger & Baraff, 1991; Rijnberk & Stokhof, 2009). Em casos de sépsis pode ser útil a medição de troponinas cardíacas, cujo aumento mostrou estar associado a mortalidade precoce (Langhorn et al., 2013). Outro estudo, que incluía cadelas com sépsis secundária a piómetra e sujeitas a cirurgia, revelou que a saturação venosa central de oxigénio (ScvO₂), a concentração de lactato, e um valor negativo de EB (excesso de bases) estão independentemente relacionados com a probabilidade de morte (Conti-Patara et al., 2012).

De acordo com as mais recentes recomendações na área da Medicina Humana, doentes em choque séptico devem ser identificados clinicamente através da necessidade de fármacos vasopressores para manutenção da pressão arterial média de, pelo menos, 65 mmHg, ou através de níveis de lactato superiores a 2 mmol/L (>18 mg/dL) na ausência de hipovolémia. A combinação destes parâmetros está associada a taxas de mortalidade em internamento superiores a 40% (Singer et al., 2016).

4.2.4.3. Disfunção respiratória

Nenhum dos animais incluídos tinha registo de ventilação artificial ou suplementação de oxigénio. Por isso, à semelhança do que se verificou no caso da disfunção cardiovascular, não foi possível relacionar quaisquer achados com o desfecho.

Em 2007 foi realizada uma reunião de consenso de forma a estabelecer critérios de diagnóstico (Tabela 14) de SDRA ou LPA específicos para medicina veterinária, tendo por base observações clínicas em animais e fatores de risco conhecidos em doentes humanos (Wilkins et al., 2007).

Tabela 14: Definições de LPA e SDRA para pacientes animais segundo Wilkins et al. (2007).

Considera-se SDRA/LPA se forem cumpridos pelo menos 1 parâmetro de cada um dos 4 critérios; o cumprimento do 5º é recomendado, mas opcional.
1. Início agudo (<72 horas) de respiração esforçada em repouso
2. Existência de fatores de risco conhecidos (inflamação, infecção, sépsis, SRIS, traumatismo grave, etc.)
3. Evidência de exsudação capilar pulmonar sem aumento da pressão capilar pulmonar (um ou mais dos seguintes): <ol style="list-style-type: none"> Presença de infiltrados bilaterais/difusos à radiografia torácica (mais que um quadrante/lobo pulmonar) Sinais de aumento da densidade bilateral nas porções dependentes, à TC Presença de fluido proteináceo nas vias aéreas Aumento do fluido extravascular pulmonar
4. Evidências de trocas gasosas ineficientes (um ou mais dos seguintes): <ol style="list-style-type: none"> Hipoxémia sem PEEP ou CPAP e FiO₂ conhecido <ol style="list-style-type: none"> Rácio PaO₂/FiO₂: ≤ 300 mmHg para LPA; ≤ 200 mmHg para SDRA Gradiente de oxigênio alveolar-arterial aumentado Disfunção de ventilação/perfusão Diminuição das trocas gasosas entre gás inspirado e sangue alveolar (<i>dead-space ventilation</i>)
5. Sinais de inflamação pulmonar difusa <ol style="list-style-type: none"> Neutrofilia do fluido de lavagem transtraquel/broncoalveolar Presença de biomarcadores de inflamação no fluido de lavagem transtraquel/broncoalveolar Imagiologia molecular (PET)

Legenda: SDRA, Síndrome de Dificuldade Respiratória Aguda; LPA, Lesão Pulmonar Aguda; SRIS, Síndrome de Resposta Inflamatória Aguda; TC, Tomografia Computorizada; PEEP, Pressão Expiratória Final Positiva (*Positive End Expiratory Pressure*); CPAP, Pressão Positiva Contínua na Via Aérea (*Continuous Positive Airway Pressure*); FiO₂, Fração de Oxigênio Inspirado; PaO₂, pressão parcial de oxigênio.

Apesar de tal não ter sido possível no presente trabalho, de futuro, a aplicação destas definições pode tornar possível o desenvolvimento de estudos prospetivos válidos e comparáveis entre si, que podem contribuir para a melhoria da capacidade de diagnóstico e tratamento desta afeção (Wilkins et al., 2007).

4.2.4.4. Disfunção hepática

Dos 31 animais incluídos apenas 3 demonstraram sinais de disfunção hepática. A concentração sérica de ácidos biliares é indicativa da função hepática. Apesar de ser recomendada a sua avaliação pré e pós-prandial, esta última não é, muitas vezes, possível devido ao estado clínico do doente (por exemplo, em caso de vômito ou anorexia). Não obstante, uma única medição (pós-prandial) é significativa, sendo que valores aumentados são indicativos de diminuição da função hepática. Desta forma, são úteis para deteção de disfunção hepática oculta (Mathews, 2006; Willard & Twedt, 2012).

Geralmente, o doseamento de bilirrubina é indicado quando há icterícia, bilirrubinúria (em quantidades significativas no cão e em qualquer quantidade no gato) ou suspeita de doença

hepática não aparente. Os níveis de bilirrubina sérica podem estar aumentados em caso de sépsis, endotoxemia ou inflamação, já que certas endotoxinas e mediadores da inflamação aguda podem alterar o metabolismo da bilirrubina e promover aumentos da sua concentração sérica (Willard & Twedt, 2012). Apesar de este parâmetro ter sido usado para classificar animais quanto à presumível presença ou ausência de disfunção hepática, num estudo acerca de SDMO em cães com sépsis, a sua utilidade como parâmetro único foi questionada (Kenney et al., 2010).

Apesar da sua inespecificidade para avaliar perda de função hepática, considerou-se o aumento das concentrações séricas de ALT e FAS porque muito raramente foram pedidos parâmetros bioquímicos mais específicos, como a medição dos ácidos biliares.

A alanina aminotransferase (ALT) encontra-se elevada quando existe necrose ou lesão do parênquima hepático secundariamente a estase biliar. Não é específica para o parênquima hepático (pode estar elevada em doentes com lesão grave do músculo esquelético) e, infelizmente, o seu aumento não está relacionado com perda de função biliar (Mathews, 2006; Willard & Twedt, 2012).

Da mesma forma, o aumento da fosfatase alcalina sérica (FAS) não está relacionado com a diminuição da função hepática, apesar de poder ocorrer colestase intra-hepática, por compressão local ou difusa dos canalículos biliares, em caso de sépsis. No total da amostra, 1 cão, sobrevivente, apresentou aumento da concentração de FAS em duas ocasiões diferentes. Um dos aumentos foi inferior a 3 vezes o valor superior de referência, e o cão tinha menos de 1 ano de idade, o que pode ser considerado normal (Willard & Twedt, 2012). No entanto, chegou a apresentar um quadro clínico reservado, com registos de bilirrubinúria e mucosas subictéricas.

A hipoglicémia é um indicador pouco sensível e pouco específico da função hepática, já que a perda de massa hepática funcional tem de ser na ordem dos 70-80% para que esta ocorra, e que a mesma se pode dever não só ao comprometimento da gluconeogénese hepática, mas também à diminuição das reservas de glicogénio hepático, e à redução da degradação hepática de insulina (Willard & Twedt, 2012). No que toca à afeção em questão, pode verificar-se hiperglicémia na fase inicial do choque séptico. Após agravamento do estado clínico pode existir hipoglicémia, como resultado de gluconeogénese hepática reduzida ou aumento do transporte de glucose não regulado pela insulina (Sykes, 2014b). Nos animais da amostra considerada não havia registos destes valores de forma consistente entre todos os animais.

Dos 31 animais da amostra, 3 apresentaram níveis diminuídos de albumina sérica. Um desses animais foi o que apresentou aumento da FAS. Dos outros dois, um não sobreviveu ao segundo dia de internamento e outro, apesar de se ter apresentado à consulta em presumível choque, sobreviveu.

A disfunção hepática pode resultar em hipoalbuminemia quando, pelo menos, 70 - 80% do parênquima está afetado, o que implica a existência de sinais clínicos compatíveis (Willard & Twedt, 2012). Em cães com Parvovirose é provável que a hipoalbuminemia seja devida à diarreia, com perda de proteína através do intestino. No entanto, em quadros de sépsis, a hipoalbuminemia pode ser promovida pelo aumento da permeabilidade vascular (com perda de albumina para o espaço extravascular), pelo aumento de produção de proteínas de fase aguda ou pelo efeito do LPS, que pode promover a diminuição da produção de NF-κB (Silverstein & Otto, 2012; Sykes, 2014b).

4.2.4.5. Alterações hemostáticas

De acordo com a classificação proposta, apenas 2 dos animais incluídos no estudo apresentaram alteração hemostática, sendo que um sobreviveu (um Malamute do Alasca) e outro morreu, após agravamento do quadro clínico, antes das primeiras 48 horas de internamento. O animal que sobreviveu foi visto na consulta do HEV-FMV, pela primeira vez, num estado muito grave, com alteração do estado mental, prostração intensa, mucosas pálidas e TRC aumentado. Obviamente, não é possível saber com certeza, mas à luz do quadro clínico apresentado e do valor reduzido de contagem plaquetária, este cão pode ter desenvolvido CID.

Num estudo em que foi utilizado o mesmo valor de contagem de plaquetas para determinar se animais com sépsis de origem abdominal apresentavam alterações hemostáticas, a presença das mesmas mostrou estar independentemente relacionada com a mortalidade. No entanto, no mesmo estudo foram também considerados TP ou TTPA aumentados em mais de 25% em relação ao limite superior de referência (Kenney et al., 2010). Outros parâmetros que podem ser usados para vigiar a ocorrência de CID em cães com sépsis são a diminuição de atividade da antitrombina e o aumento de Dímeros D (OK et al., 2015).

4.2.5. A classificação total

A média das classificações totais foi de 13,83 para os animais que morreram e de 12,92 para os animais que tiveram alta. O reduzido número de animais da amostra, bem como a reduzida taxa de mortalidade, aliados ao desenvolvimento extremamente empírico dos sistemas de classificação usados para cada um dos componentes (P, R e O) tornam difícil o tipo de trabalho estatístico que foi feito nos trabalhos supramencionados (Peduz, Concato, Kemper, Holford & Feinstein, 1996).

Não houve diferenças significativas entre as classificações obtidas no início do período de internamento e após 48 horas, o que talvez torne a classificação proposta pouco sensível a alterações discretas do estado clínico dos doentes ou a respostas à terapêutica instituída. Num dos estudos referidos conduzido por Howell (2011) é validada a utilidade do sistema PIRO para o estadiamento de doentes humanos sépticos. No estudo foram usados dados

de três grupos. A partir de um dos grupos foi criado o sistema de classificação, identificando fatores com influência na mortalidade. Depois de elaborado o sistema de classificação, este foi aplicado nos dois grupos restantes (um grupo para validação externa e outro para validação interna). Os resultados mostraram que o aumento da mortalidade esteve relacionado com o aumento da classificação PIRO, com AUC igual a 0,90, 0,86 e 0,83 nos grupos de derivação, de validação interna e de validação externa, respetivamente.

Um outro estudo, também já mencionado, que teve como objetivo identificar as variáveis que poderiam ser incluídas em cada componente do sistema PIRO tendo em vista uma melhor previsão da mortalidade, usou dados recolhidos de doentes sépticos humanos internados em UCI de diversos hospitais de Portugal (Granja et al., 2013). A classificação resultante da combinação dos valores dos quatro componentes apresentou uma boa capacidade de previsão da mortalidade (AUC=0,84).

O sistema de classificação PIRO mostra ter um bom desempenho na previsão da mortalidade de pacientes suspeitos de sépsis, sendo superior em comparação com outros sistemas como o APACHE II ou o MEDS (Nguyen, Van Ginkel, Batech, Banta & Corbett, 2012). Em comparação com o sistema SOFA, também demonstrou ter um melhor desempenho (Macdonald et al., 2014). O SOFA inclui apenas variáveis fisiológicas e laboratoriais, sem considerar fatores do hospedeiro como a idade ou a presença de comorbilidades.

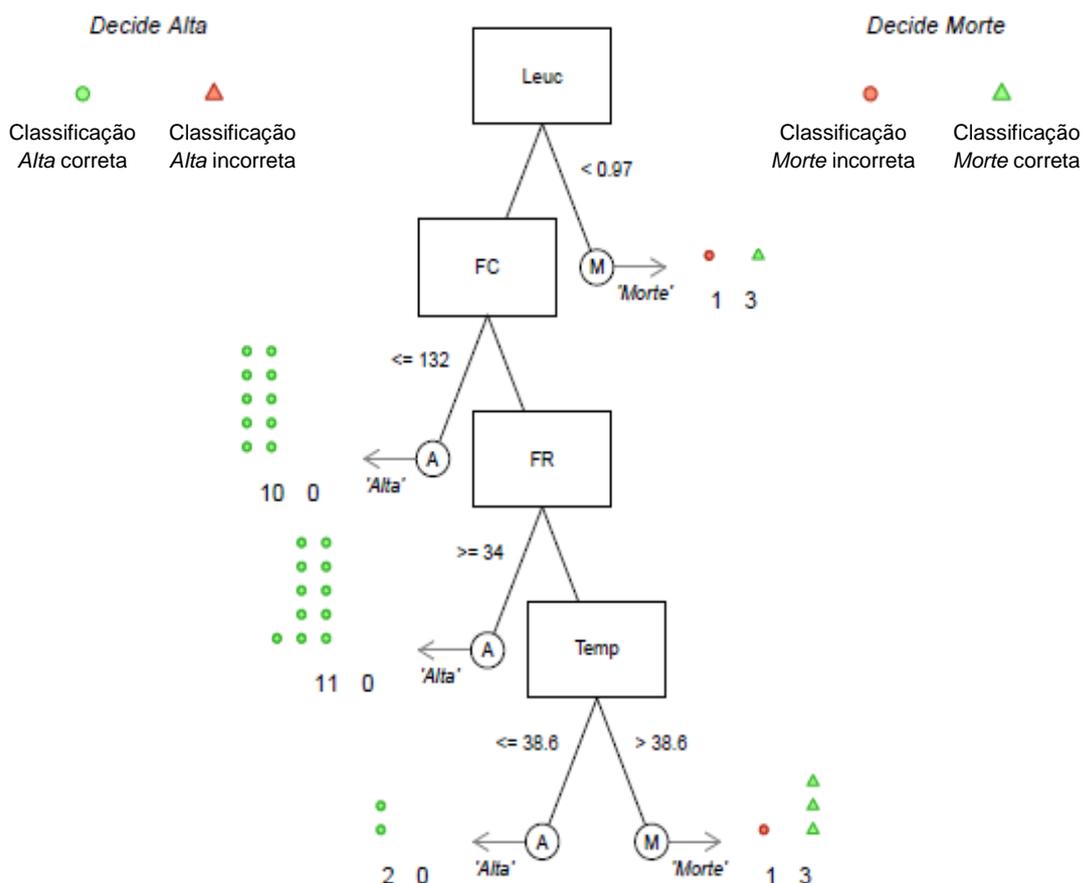
Tendo em vista a melhor identificação de doentes sépticos humanos nos Departamentos de Urgência, o grupo de trabalho que reviu, pela terceira vez, as definições relativas a sépsis e choque séptico, propõe a utilização do qSOFA (*quick* SOFA) numa árvore de decisão para deteção de doentes sépticos, e do sistema SOFA para a monitorização da sua função multiorgânica. Este é recomendado por integrar parâmetros relativamente simples de obter rapidamente e por ser bastante popular no seio da comunidade médica (Singer et al., 2016). Num estudo retrospectivo, o SOFA mostrou ter boa capacidade discriminatória entre sobreviventes e não sobreviventes, superior à do sistema PIRO. Também neste estudo, o valor de prognóstico do SOFA mostrou aumentar com a presença de fatores de risco, como a presença de comorbilidades (Innocenti et al., 2017).

Como já foi referido anteriormente, o estudo desta doença em cães é promissor no que toca ao avanço do conhecimento científico no que toca à sépsis. A maior dificuldade no desenho de modelos de ensaios clínicos para aplicação em pacientes caninos é a ausência de um sistema de classificação validado para a espécie, de forma a documentar a gravidade e a progressão da doença (Otto, 2007). No presente trabalho não foi possível levar a cabo essa validação. No entanto, foi demonstrado que é possível a implementação de tal sistema, que talvez fosse muito melhor aplicado no contexto de um estudo prospetivo. Esta mudança seria extremamente útil no sentido de tornar clara, à partida, toda a informação a recolher e, por conseguinte, tornar elegíveis mais animais. É necessário, também, usar métodos mais

fiáveis para a criação de parâmetros e para a atribuição de classificações. Uma ferramenta interessante seria a produção de *Fast Frugal Trees* (FFT). As FFT são árvores de decisão baseadas em regras de hierarquia, criadas a partir de um conjunto normalmente pequeno de informações (Koehler & Harvey, 2004). São frequentemente preferidas a estratégias mais complexas de decisão (como a regressão logística) e são mais fáceis de interpretar e implementar na prática (Marewski & Gigerenzer, 2012). Têm sido usadas para diversos fins no contexto da Medicina Humana, como no diagnóstico de depressão (Jenny, Pachur, Williams, Becker & Margraf, 2013) ou na implementação de processos de decisão em departamentos de urgência (Green, 1997). Na figura 3 está demonstrada uma FFT, a título de exemplo, que poderia ser usada para atribuir classificações aos parâmetros que compõem o elemento Resposta do sistema PIRO, elaborada com a ferramenta *FFTrees* do programa R (Phillips, 2017).

É necessário ressaltar que este exemplo foi construído com poucos dados, o que tornou impossível a divisão da amostra numa amostra de extrapolação e numa amostra de validação, como seria recomendável (Phillips, 2017). Desta forma, este exemplo pode ter um bom desempenho apenas para esta amostra.

Figura 8: Exemplo de FFTree para o elemento Resposta (AUC=0,96; sensibilidade=1; especificidade=0,96).



Legenda: Leuc, contagem leucocitária; FC, frequência cardíaca; FR, frequência respiratória; Temp, temperatura.

4.3. Concentração de CRP

Os 13 cães incluídos na amostra apresentaram concentrações séricas de CRP aumentadas em relação aos cães do grupo de controlo. Este achado é interessante, mas não inesperado (Kocaturk et al., 2010; McClure et al., 2013), já que a CRP é, como já foi revisto, uma proteína inflamatória de fase aguda que aumenta em caso de inflamação, sendo inespecífica quanto à causa. Em casos de sépsis em cães, a sua concentração já foi associada ao tempo de hospitalização (Fransson et al., 2007). Em seres humanos, a variação da sua concentração ao longo dos primeiros dias de internamento está relacionada com o prognóstico (Póvoa et al., 2011; Granja et al., 2013). Em estudos futuros talvez seja interessante avaliar a CRP de animais com sépsis ao longo de alguns dias, na tentativa de implementar, por exemplo, testes rápidos para a medição da concentração de CRP na prática clínica comum, já que esta afeção exige um pronto e atento cuidado do doente (Plickert et al., 2011).

4.4. A concentração de CRP, os critérios de SRIS e a classificação PIRO

No estudo de Fransson e colaboradores (2007), a concentração de CRP foi o único parâmetro que demonstrou estar significativamente relacionado com SRIS, além dos critérios clínicos usados para a diagnosticar. Deste modo, o resultado da curva ROC realizada no âmbito do presente trabalho vai de encontro ao que foi previamente descrito. De acordo com os critérios de SRIS utilizados, uma concentração de CRP igual ou superior a 83,8 mg/L pode ser usada para detetar a presença de SRIS, à luz do quadro clínico.

A ausência de correlação entre o aumento da concentração de CRP e o aumento da classificação PIRO pode ser o resultado da possível inadequação dos critérios de atribuição de classificação. No entanto, dos 4 animais com concentrações de CRP acima dos 83,8 mg/L, 3 apresentaram classificações PIRO acima ou próximas das médias, tanto para os animais que tiveram alta como para os que morreram (classificações de 11, 15 e 18). Um desses animais apresentou uma classificação PIRO baixa no dia da colheita de sangue mas o desfecho é desconhecido porque teve alta contra indicação médica.

4.5. Quantificação de IL6 e TNF- α

O facto de apenas ter ocorrido expressão em algumas das amostras, tanto no caso da IL-6 como no caso do TNF- α , bem como o elevado erro-padrão associado à média dos valores de $2^{\Delta\Delta CT}$ e a existência de valores de C_T muito elevados, não permite estabelecer comparações entre os níveis de IL-6 e de TNF- α de animais com Parvovirose e de animais saudáveis.

Foi já demonstrado que em animais com sépsis, quer promovida pela inoculação de endotoxina (Song, Kim, Yu, Park & Park, 2012), quer como consequência de uma infeção contraída (Rau et al., 2007; DeClue, Sharp & Harmon, 2012; OK et al., 2015), a expressão

dos mediadores inflamatórios IL-6 e TNF- α é superior em relação à que se verifica em cães saudáveis. Segundo um estudo de Rau e colaboradores (2007), quanto mais elevados os níveis de IL-6 no dia de entrada em internamento, maior a gravidade da doença, a taxa de mortalidade e menor a sobrevida. No entanto, DeClue (2012) e colaboradores verificaram que os níveis de IL-6 e TNF- α são, de facto, superiores em animais com sépsis. Neste estudo, nenhum dos mediadores inflamatórios estudados demonstrou sensibilidade ou especificidade satisfatórias para o diagnóstico de sépsis, nem para a elaboração de um prognóstico. Os autores deste último reconhecem algumas limitações do mesmo, nomeadamente a ausência de mensurações seriadas dos mediadores, algo que foi implementado no estudo conduzido por Rau *et al.* Sendo que a produção destes mediadores é dinâmica, o seu pico de produção pode ter sido, por algumas vezes, perdido. A avaliação seriada poderia, assim, ter resultado numa associação significativa entre a concentração dos mediadores e a taxa de mortalidade (DeClue et al., 2012).

Além de já ter sido reportada a utilidade da quantificação de TNF- α para a elaboração de um prognóstico em casos de Parvovirose canina (Bastan, Kurtdele & Ozen, 2013), tem sido estudada a sua utilidade para o diagnóstico de sépsis ou SRIS e para a atribuição de prognósticos. Está demonstrada a sua participação no processo inflamatório exuberante que caracteriza a sépsis (OK et al., 2015). No entanto, não está demonstrada sua correlação com a gravidade da doença (Fransson et al., 2007). A mesma relação já se encontra há muito descrita na área da Medicina Humana (Debets, Kampmeijer, Van Der Linden, Buurman & Van Der Linden, 1986).

Dos 5 cães nos quais foi detetada a expressão de mRNA de IL-6, 2 tiveram alta e 3 tiveram alta contra indicação clínica. A expressão de mRNA de TNF- α foi detetada em 6 cães, dos quais 1 morreu, 3 tiveram alta e 2 tiveram alta contra indicação clínica. O desconhecimento de todo o curso clínico dos animais que saíram da UIDI contra o aconselhamento médico torna difícil tecer considerações quanto à relação entre a expressão de mRNA das citocinas e o desfecho.

4.6. Identificação de DNA bacteriano

A análise dos produtos de amplificação do PCR sugerem a presença de bDNA de *E. coli* e de *Staphylococcus* spp. no sangue de 3 dos animais testados. A existência de várias bandas de DNA em algumas amostras sugerem inespecificidade da reação PCR e a necessidade de otimização da técnica. Para confirmar a natureza dos produtos de amplificação obtidos deveria ter-se feito a sua sequenciação.

É sabido que pode ocorrer bacteriemia em cães saudáveis, desde que o fígado elimine efetivamente os microrganismos em circulação. Para que tal seja possível, é necessário que a carga bacteriana não ultrapasse a capacidade funcional do sistema reticuloendotelial. Em cães com síndrome de diarreia hemorrágica aguda, não houve diferenças significativas

entre os sinais clínicos apresentados por cães com hemoculturas positivas em relação a cães com a mesma doença e com hemoculturas negativas (Unterer et al., 2015). O mesmo não se pode afirmar no caso de cães com Parvovirose, doença em que se dá a combinação de quebra da barreira gastrointestinal com a neutropénia resultante da infeção viral, ficando comprometida a remoção de bactérias da corrente sanguínea (Goddard & Leisewitz, 2010; Unterer et al., 2015).

Apesar de serem bastante usadas no diagnóstico de bacteriémia e/ou sépsis, as hemoculturas nem sempre têm resultados satisfatórios, podendo o seu resultado ser negativo na presença de bacteriémia. Isto pode ser o resultado da opsonização, que torna as bactérias indisponíveis para a cultura (Krentz & Allen, 2017) ou da administração prévia de antibióticos.

A deteção de bDNA pode ser uma alternativa para o diagnóstico. Such e colaboradores (2002) demonstraram a presença de bDNA no soro e líquido ascítico em 32% dos doentes humanos com cirrose e com hemoculturas negativas. O microrganismo mais frequentemente detetado foi *E. coli*. Demonstraram também que o bDNA era detetado em períodos de tempo variáveis após a abdominocentese terapêutica, sugerindo que este fenómeno pode estar relacionado com episódios de translocação bacteriana a partir do lúmen intestinal.

4.7. Observação conjunta dos resultados obtidos

Apesar de não ter sido possível fazer a análise estatística de todos os dados obtidos, é importante observar os registos das medições efetuadas em cada amostra (Tabela 15).

Tabela 15: Resumo de alguns dos resultados obtidos com cada experiência, em cada amostra, em conjunto com o desfecho observado.

Amostra	Expressão de RNA de IL-6	Expressão de RNA de TNF- α	CRP (mg/L)	bDNA	Classificação PIRO	Desfecho
1	S	N	-	N	9	Alta
9	S	N	34,9	S	7	Alta CI*
10	S	S	137,9	S	9	Alta CI*
12	N	N	44,4	N	8	Alta
13	N	N	84,1	N	16	Alta
15	N	S	120,7	N	8	Morte
16	N	N	55	N	15	Alta
18	N	S	92	N	6	Alta
19	S	S	57,3	N	10	Alta CI*
20	N	N	123,6	S	15	Alta
21	S	S	55,3	N	8	Alta
22	N	S	83,4	N	6	Alta

Legenda: IL-6, *interleukin 6*; TNF- α , *tumor necrosis factor α* ; CRP, *C-reactive protein*; mg/L, miligrama por litro; bDNA, *bacterial DNA*; PIRO, *Predisposition, Insult, Organ dysfunction*; S, sim; N, não; Alta CI, Alta contra-indicação.

*Estes animais não foram incluídos nos testes estatísticos referentes à deteção de SRIS e à classificação PIRO.

É difícil estabelecer uma relação entre as diversas observações. De notar a elevada concentração de CRP em dois dos animais nos quais foi detetado bDNA (10 e 20). Na amostra proveniente do animal 10 houve expressão detetável de IL-6 e de TNF- α . Este animal tem registo de diarreia abundante, com laivos de sangue vivo, durante o período de internamento. Além disso, não apresentou um quadro clínico preocupante, tendo em conta o diagnóstico de Parvovirose. O mesmo se passou com o animal 20. O animal 9 apresentou apenas expressão de IL-6 e presença de bDNA. Este era, curiosamente, um animal de raça *Rottweiler*, supostamente predisposta à infeção por Parvovírus. Esta observação não vai de encontro ao que é afirmado no estudo de Nemzek e colaboradores, que verificaram que a magnitude de produção de TNF- α em cães de raças supostamente predispostas à infeção por Parvovírus (como o *Rottweiler*) é bastante superior à verificada em cães de outras raças. O mesmo não foi demonstrado no que toca à IL-6. De referir que o cão 9 tinha já 10 meses.

Foi impossível saber o seu desfecho, uma vez que saiu do internamento contra indicação médica.

O cão da amostra 15, o único que não sobreviveu, não tinha à entrada uma classificação PIRO muito elevada, nem foi detetado bDNA em circulação. No entanto, o valor de CRP foi elevado. O seu quadro clínico foi-se agravando ao longo de vários dias, apesar do tratamento.

5. Conclusão

O estudo realizado representa uma contribuição para o desenvolvimento de um sistema de classificação e estratificação de doentes sépticos, específico para a espécie canina. Sistema este que foi aplicado retrospectivamente, após diversas e exaustivas pesquisas. Não foi possível validar o sistema de classificação proposto. No entanto, foi demonstrado que é possível a implementação de um sistema semelhante. Os resultados poderiam ter sido mais satisfatórios se os dados tivessem sido recolhidos prospectivamente na sua totalidade.

Foi demonstrado que é significativamente maior o número de animais que se considerou estar em SRIS segundo os critérios SRIS 1991, do que o número de animais assim classificados segundo os critérios SRIS 2001. Apesar da provável perda de sensibilidade na deteção de SRIS, esta adaptação surge na tentativa de dar resposta à necessidade de critérios mais específicos na deteção desta afeção grave do sistema imunitário.

As fragilidades apontadas, tanto aos critérios para diagnóstico de SRIS como aos parâmetros utilizados para cada elemento do sistema PIRO, podem traduzir-se em conselhos úteis para o futuro delineamento de estudos do mesmo género, em conjunto com a aplicação de novas ferramentas, como as *FFTrees*.

Foi demonstrado que os cães com Parvovirose têm concentrações mais elevadas de CRP em circulação em relação a cães saudáveis. Isto é de esperar, dada a inespecificidade que é apontada a esta PFA. De realçar que neste estudo foi possível determinar um valor-limite a partir do qual se pode dizer que está em curso um processo de SRIS: 83,8 mg/L, à luz dos critérios de diagnóstico revistos na literatura Médico-veterinária. Esta pode ser uma grande mais-valia, especialmente quando aliada à utilização de testes rápidos.

Não foi possível avaliar estatisticamente a produção de IL-6 e de TNF- α dos animais do grupo experimental em relação aos animais do grupo de controlo. Contudo, tal não significa que estes mediadores não têm importância no processo inflamatório complexo que é a sépsis; a sua importância já tem sido demonstrada. A otimização da conservação de amostras, utilização de diferentes kits de extração de RNA e a sua recolha prospectiva poderão melhorar a sua deteção em estudos futuros.

A análise dos produtos de amplificação por PCR sugerem a presença de DNA bacteriano no sangue de 3 dos animais do grupo experimental. Apesar de ser necessária a otimização da técnica, esta observação pode ser uma porta para investigação futura do diagnóstico de sépsis através da identificação de DNA bacteriano por PCR.

Por fim, este trabalho realça a necessidade de continuar a investigar esta complexa afeção que é a sépsis, avançando na descoberta de biomarcadores que possam ser objetivamente medidos e reflitam processos biológicos normais e patogénicos, bem como as respostas dos doentes às intervenções terapêuticas.

Bibliografia

- Abcam. (2014). Canine C Reactive Protein ELISA Kit.
- Abelson, A. L., Buckley, G. J., & Rozanski, E. A. (2013). Positive impact of an emergency department protocol on time to antimicrobial administration in dogs with septic peritonitis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23(5), 551–556. <https://doi.org/10.1111/vec.12092>
- Adib-Conquy, M., & Cavaillon, J. M. (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(1), 36–47. <https://doi.org/10.1160/TH08-07-0421>
- Anas, A. A., Wiersinga, W. J., de Vos, A. F., & van der Poll, T. (2010). Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *The Netherlands Journal of Medicine*, 68(4), 147–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421654>
- Australian Infectious Diseases Advisory Panel [AIDAP]. (2013). Antibiotic Prescribing Detailed Guidelines. Australia: Zoetis Australia.
- Bagshaw, S. M., George, C., & Bellomo, R. (2008). Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation. *Critical Care*, 12(2). <https://doi.org/10.1186/cc6863>
- Barsanti, J. A. (2012). Urinary Disorders. In M. D. Willard & H. Tvedten (Eds.), *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5th ed., pp. 126–155). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Bastan, I., Kurtdebe, A., & Ozen, D. (2013). Prognostic usefulness of some parameters in dogs with canine parvovirus. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62(February), 139–145. <https://doi.org/10.1501/Vetfak>
- Bentley, A. M., Otto, C. M., & Shofer, F. S. (2007). Comparison of dogs with septic peritonitis: 1988-1993 versus 1999-2003: Retrospective Study. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 391–398. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00251.x>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., ... Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*, 101(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Bone, R. C., Grodzin, C. J., & Balk, R. A. (1997). Sepsis : A New Hypothesis for Pathogenesis of the Disease Process. *Chest*, 112, 235–243.
- Bozza, F. A., Gomes, R. N., Japiassú, A. M., Soares, M., Castro-faria-neto, H. C., Bozza, P. T., & Bozza, M. T. (2004). Macrophage Migration Inhibitory Factor Levels Correlate With Fatal Outcome in Sepsis, 22(4), 309–313. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000140305.01641.c8>
- British Small Animal Veterinary Association. (2014). *BSAVA Small Animal Formulary*. (I. Ramsey, Ed.) (8th ed.). Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association.
- Burkitt, J. M., Haskins, S. C., Nelson, R. W., & Kass, P. H. (2007). Relative Adrenal Insufficiency in Dogs with Sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6640(January).
- Carmichael, L. E. (2005). An annotated historical account of canine parvovirus. *Journal of Veterinary Medicine Series B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 52(7–8), 303–311. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2005.00868.x>

- Cho, S.-Y., & Choi, J.-H. (2014). Biomarkers of sepsis. *Infection and Chemotherapy*, 46(1), 1–12. <https://doi.org/10.3109/10408363.2013.764490>
- Conti-Patara, A., de Araújo Caldeira, J., de Mattos-Junior, E., de Carvalho, H. da S., Reinoldes, A., Pedron, B. G., ... Cortopassi, S. R. G. (2012). Changes in tissue perfusion parameters in dogs with severe sepsis/septic shock in response to goal-directed hemodynamic optimization at admission to ICU and the relation to outcome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 22(4), 409–418. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2012.00769.x>
- Costello, M. (2015). Feline Sepsis. In *World Small Animal Veterinary Association World Conference Proceedings*. Bangkok.
- Day, M. J., Horzinek, M. C., Schultz, R. D., & Squires, R. A. (2010). WSAVA Vaccination guidelines for the owners and breeders of dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice*, 57(January 2016). <https://doi.org/10.1111/jsap.12431>
- Debets, J. M. H., Kampmeijer, R., Van Der Linden, M. P. M. H., Buurman, W. A., & Van Der Linden, C. J. (1986). Plasma Tumor Necrosis Factor and Mortality in Critically Ill Septic Patients. *Critical Care Medicine*, 17(6), 489–494.
- Decaro, N., Campolo, M., Desario, C., Elia, G., Martella, V., Lorusso, E., & Buonavoglia, C. (2005). Maternally-derived antibodies in pups and protection from canine parvovirus infection. *Biologicals*, 33(4), 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.06.004>
- Decaro, N., Crescenzo, G., Desario, C., Cavalli, A., Losurdo, M., Colaianni, M. L., ... Buonavoglia, C. (2014). Long-term viremia and fecal shedding in pups after modified-live canine parvovirus vaccination. *Vaccine*, 32(30), 3850–3853. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.050>
- Decaro, N., Desario, C., Addie, D. D., Martella, V., Vieira, M. J., Elia, G., ... Buonavoglia, C. (2007). The study molecular epidemiology of canine parvovirus, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1222–1224. <https://doi.org/10.3201/eid1308.070505>
- DeClue, A. E., & R., S. D. (2014). Sepsis in Dogs & Cats : Pathophysiology and Recognition. In *ACVIM Forum*. Nashville, TN.
- DeClue, A. E., Sharp, C. R., & Harmon, M. (2012). Plasma Inflammatory Mediator Concentrations at ICU Admission in Dogs with Naturally Developing Sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 624–630. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00895.x>
- Deitschel, S. J., Kerl, M. E., Chang, C. H., & DeClue, A. E. (2010). Age-associated changes to pathogen-associated molecular pattern-induced inflammatory mediator production in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(5), 494–502. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2010.00565.x>
- Desario, C., Decaro, N., Campolo, M., Cavalli, A., Cirone, F., Elia, G., ... Buonavoglia, C. (2005). Canine parvovirus infection: Which diagnostic test for virus? *Journal of Virological Methods*, 126, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.02.006>
- Devarajan, P. (2010). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. *Nephrology*, 15, 419–428. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01317.x>
- Dickinson, A. E., Rozanski, E. A., & Rush, J. E. (2007). Reversible Myocardial Depression Associated with Sepsis in a Dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21, 1117–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2007.tb03074.x>
- E. Mylokani, M., Kalli, I., & S. Rallis, T. (2016). Canine parvoviral enteritis: an update on the

- clinical diagnosis, treatment, and prevention. *Veterinary Medicine: Research and Reports*, (9), 91–100. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/VMRR.S80971>
- Fink, M. P. (2014). Animal models of sepsis. *Virulence*, 5(1), 143–53. <https://doi.org/10.4161/viru.26083>
- Fransson, B. A., Lagerstedt, A. S., Bergstrom, A., Hagman, R., Park, J. S., Chew, B. P., ... Ragle, C. A. (2007). C-reactive protein, tumor necrosis factor ??, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS: Original Study. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 373–381. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2006.00203.x>
- Gebhardt, C., Hirschberger, J., Rau, S., Arndt, G., Krainer, K., Schweigert, F. J., ... Kohn, B. (2009). Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 19(5), 450–458. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00462.x>
- Glickman, L. T., Domanski, L. M., Patronek, G. J., & Visintainer, F. (1985). Breed related risk factors for canine parvovirus enteritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 187(September), 589–594.
- Goddard, A., & Leisewitz, A. L. (2010). Canine Parvovirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 40(6), 1041–1053. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2010.07.007>
- Goddard, A., Leisewitz, A. L., Christopher, M. M., Duncan, N. M., & Becker, P. J. (2008). Prognostic usefulness of blood leukocyte changes in canine parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 309–316. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2008.0073.x>
- Granja, C., Póvoa, P., Lobo, C., Teixeira-Pinto, A., Carneiro, A., & Costa-Pereira, A. (2013). The Predisposition, Infection, Response and Organ Failure (Piro) Sepsis Classification System: Results of Hospital Mortality Using a Novel Concept and Methodological Approach. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053885>
- Green, L. (1997). What alters physicians' decisions to admit to the coronary care unit? *Journal of Family Practice*, September.
- Greene, C. E., & Decaro, N. (2012). Canine Parvovirus Enteritis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and cat* (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Greiner, M., Wolf, G., & Hartmann, K. (2008). A retrospective study of the clinical presentation of 140 dogs and 39 cats with bacteraemia. *Journal of Small Animal Practice*, 49(8), 378–383. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2008.00546.x>
- Harbor, P. C. (2016). RNA and miRNA Isolation from Human Peripheral Blood. Cleveland, Ohio.
- Hauptman, J. G., Walshaw, R., & Olivier, N. B. (1997). Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Veterinary Surgery: VS*, 26(5), 393–7. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1997.tb01699.x>
- Henriques, S., Silva, E., Silva, M. F., Carvalho, S., Diniz, P., Lopes-Da-Costa, L., & Mateus, L. (2016). Immunomodulation in the canine endometrium by uteropathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research*, 47(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0396-z>
- Hoareau, G. L., Epstein, S. E., Palm, C., Ybarra, W., Jandrey, K. E., & Cowgill, L. D. (2014). Resolution of anuric acute kidney injury in a dog with multiple organ dysfunction syndrome. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 24(6), 724–730. <https://doi.org/10.1111/vec.12248>

- Homer, G. W. (1983). Canine parvovirus in New Zealand : Epidemiological and Diagnostic Methods. *New Zealand Veterinary Journal*, 31, 164–166.
<https://doi.org/10.1080/00480169.1983.35010>
- Houston, D. M., Ribble, C. S., & Head, L. L. (1996). Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 208(4), 542–546.
- Howell, M. D., Talmor, D., Schuetz, P., Hunziker, S., Jones, A. E., & Shapiro, N. I. (2011). Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Critical Care Medicine*, 39(2), 322–327.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3182037a8e>
- Innocenti, F., Tozzi, C., Donnini, C., De Villa, E., Conti, A., Zanobetti, M., & Pini, R. (2017). SOFA score in septic patients: incremental prognostic value over age, comorbidities, and parameters of sepsis severity. *Internal and Emergency Medicine*.
<https://doi.org/10.1007/s11739-017-1629-5>
- Iris Kalli, Leontides, L. S., Mylonakis, M. E., Adamama-Moraitou, K., Rallis, T., & Koutinas, A. F. (2010). Factors affecting the occurrence, duration of hospitalization and final outcome in canine parvovirus infection. *Research in Veterinary Science*, 89(2), 174–178.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.02.013>
- Jenny, M. A., Pachur, T., Williams, S. L., Becker, E., & Margraf, J. (2013). Simple rules for detecting depression. *Journal of Applied Research in Memory and Cognition*, 2(3), 149–157. <https://doi.org/10.1016/j.jarmac.2013.06.001>
- Jones, A. E., Saak, K., & Kline, J. A. (2008). Performance of the Mortality in emergency department Sepsis score for predicting hospital mortality among patients with severe sepsis and septic shock. *The American Journal of Emergency Medicine*, 26(6), 689–692. <https://doi.org/10.1016/j.ajem.2008.01.009>
- Kenney, E. M., Rozanski, E. a, Rush, J. E., deLaforcade-Buress, A. M., Berg, J. R., Silverstein, D. C., ... Shaw, S. P. (2010). Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 236(1), 83–87.
<https://doi.org/10.2460/javma.236.1.83>
- Kocaturk, M., Martinez, S., Eralp, O., Tvarijonaviciute, A., Ceron, J., & Yilmaz, Z. (2010). Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 51(September). <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00965.x>
- Koehler, D. J., & Harvey, N. (Eds.). (2004). *Blackwell Handbook of Judgment and Decision Making*. Malden, MA, USA: Blackwell.
- Krentz, T., & Allen, S. (2017). Bacterial translocation in critical illness. *Journal of Small Animal Practice*, 58(April), 191–198. <https://doi.org/10.1111/jsap.12626>
- Kushner, I., & Feldman, G. (1978). Control of the acute phase response. Demonstration of C-reactive protein synthesis and secretion by hepatocytes during acute inflammation in the rabbit. *Journa of Experimental Medicine*, 148, 466–477.
<https://doi.org/10.1084/jem.148.2.466>
- Laforcade, A. M., Freeman, L. M., Shaw, S. P., Brooks, M. B., Rozanski, E. a, & Rush, J. E. (2003). Hemostatic Changes in Dogs with Naturally Occurring Sepsis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17(5), 674–679. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02499.x>

- Lamm, C. G., & Rezabek, G. B. (2008). Parvovirus Infection in Domestic Companion Animals. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 38(4), 837–850. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2008.03.008>
- Langhorn, R., Oyama, M. A., King, L. G., Machen, M. C., Trafny, D. J., Thawley, V., ... Kjelgaard-Hansen, M. (2013). Prognostic Importance of Myocardial Injury in Critically Ill Dogs with Systemic Inflammation. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27, 895–903.
- Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., ... Ramsay, G. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical Care Medicine*, 31(4), 1250–1256. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B>
- Lewis, D. H., Chan, D. L., Pinheiro, D., Armitage-Chan, E., & Garden, O. A. (2012). The Immunopathology of Sepsis: Pathogen Recognition, Systemic Inflammation, the Compensatory Anti-Inflammatory Response, and Regulatory T Cells. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 26(3), 457–482. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2012.00905.x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Macdonald, S. P. J., Arendts, G., Fatovich, D. M., & Brown, S. G. A. (2014). Comparison of PIRO, SOFA, and MEDS scores for predicting mortality in emergency department patients with severe sepsis and septic shock. *Academic Emergency Medicine*, 21(11), 1257–1263. <https://doi.org/10.1111/acem.12515>
- Machado, I. (2017). *Frequência de doenças infecciosas em carnívoros domésticos hospitalizados na Unidade de Isolamento do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa de Outubro de 2013 a Janeiro de 2016*. Universidade de Lisboa- Faculdade de Medicina Veterinária.
- Maio, A. De, Torres, M. B., & Reeves, R. H. (2005). Genetic Determinants Influencing the Response to Injury, Inflammation and Sepsis. *Shock*, 23(1), 11–17. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000144134.03598.c5>
- Mantione, N. L., & Otto, C. M. (2005). Characterization of the use of antiemetic agents in dogs with parvoviral enteritis treated at a veterinary teaching hospital: 77 cases (1997-2000). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(11), 1787–1793. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.227.1787>
- Marewski, J. N., & Gigerenzer, G. (2012). Heuristic decision making in medicine. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, (14), 77–89.
- Marshall, J. C. (2014). The PIRO (predisposition, insult, response, organ dysfunction) model: toward a staging system for acute illness. *Virulence*, 5(1), 27–35. <https://doi.org/10.4161/viru.26908>
- Marshall, J., & Sweeney, D. (1990). Microbial Infection and the Septic Response in Critical Surgical Illness - Sepsis, not infection, determines outcome. *Journal of the American Medical Association*, 125(Table 1).
- Mathews, K. A. (Ed.). (2006). *Veterinary Emergency and Critical Care Manual* (2nd ed.). Guelph, Ontario, Canada: Lifelearn.
- McClure, V., van Schoor, M., Thompson, P. N., Kjelgaard-Hansen, M., & Goddard, A. (2013). Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*

Association, 243(3), 361–6. <https://doi.org/10.2460/javma.243.3.361>

- Mikkelsen, M. E., Shah, C. V, Meyer, N. J., Gaieski, D. F., Lyon, S., Miltiades, A. N., ... Christie, J. D. (2013). The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients Presenting to the Emergency Department With Severe Sepsis. *Shock*, 40(5), 375–381. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182a64682>
- Moshage, H. (1997). REVIEW ARTICLE Cytokines and the Hepatic Acute Phase Response. *Journal of Pathology*, 266(August 1996), 257–266.
- Natanson, C., Fink, M. P., Ballantyne, H. K., MacVittie, T. J., Conklin, J. J., & Parrillo, J. E. (1986). Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *Journal of Clinical Investigation*, 78(1), 259–270. <https://doi.org/10.1172/JC1112559>
- Nelson, O. L., & Thompson, P. A. (2006). Cardiovascular dysfunction in dogs associated with critical illnesses. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(5), 344–349. <https://doi.org/42/5/344> [pii]
- Nemzek, J. A., Agrodnia, M. D., & Hauptman, J. G. (2007). Breed-specific pro-inflammatory cytokine production as a predisposing factor for susceptibility to sepsis in the dog: Original Study. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 368–372. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2006.00215.x>
- Nguyen, H. B., Rivers, E. P., Abrahamian, F. M., Moran, G. J., Abraham, E., Trzeciak, S., ... Talan, D. A. (2006). Severe Sepsis and Septic Shock: Review of the Literature and Emergency Department Management Guidelines. *Annals of Emergency Medicine*, 48(1). <https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2006.02.015>
- Nguyen, H. B., Van Ginkel, C., Batech, M., Banta, J., & Corbett, S. W. (2012). Comparison of Predisposition, Insult/Infection, Response, and Organ dysfunction, Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, and Mortality in Emergency Department Sepsis in patients meeting criteria for early goal-directed therapy and the severe se. *Journal of Critical Care*, 27(4), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.08.013>
- Oberholzer, A., Souza, S. M., Tschoeke, S. K., Oberholzer, C., Abouhamze, A., Pribble, J. P., & Moldawer, L. L. (2005). Plasma cytokine measurements augment prognostic scores as indicators of outcome in patients with severe sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*, 23(6), 488–93. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000163802.46355.59>
- OK, M., ER, C., YILDIZ, R., ÇÖL, R., AYDOĞDU, U., ŞEN, İ., & GÜZELBEKTEŞ, H. (2015). Sepsisli Köpeklerde Akut Faz Proteinler, Bazı Sitokinler ve Hemostatik Parametrelerin Değerlendirilmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (January). <https://doi.org/10.9775/kvfd.2015.13418>
- Osterbur, K., Mann, F. A., Kuroki, K., & Declue, A. (2014). Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(4), 1141–1151. <https://doi.org/10.1111/jvim.12364>
- Otto, C. M. (2007a). Clinical trials in spontaneous disease in dogs: A new paradigm for investigations of sepsis: State-of-the-Art Review. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00249.x>
- Otto, C. M. (2007b). Sepsis in veterinary patients: What do we know and where can we go?: Guest Editorial. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 329–332. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00253.x>
- Otto, C. M., Rieser, T. M., Brooks, M. B., & Russell, M. W. (2000). Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of the American Veterinary*

- Medical Association*, 217(10), 1500–4. <https://doi.org/10.2460/javma.2000.217.1500>
- Peduz, P., Concato, J., Kemper, E., Holford, T. R., & Feinstein, A. R. (1996). Study of the Number of Events per Variable in Logistic Regression Analysis. *Journal of Clinical Epidemiology*, 49(12), 1373–1379.
- Phillips, N. (2017). FFTrees: Generate, Visualise, and Compare Fast and Frugal Decision Trees. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=FFTrees>
- Pinsky, M. R., Vincent, J. L., Deviere, J., Alegre, M., Kahn, R. J., & Dupont, E. (1993). Serum cytokine levels in human septic shock: Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*, 103(2), 565–575. <https://doi.org/10.1378/chest.103.2.565>
- Plickert, H. D., Einspanier, R., Arndt, G., Brunnberg, L., & Kohn, B. (2011). Evaluation of a point-of-care test for canine C-reactive protein. *Veterinary Clinical Pathology*, 40(3), 384–388. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00339.x>
- Pollock, R. V., & Coyne, M. J. (1993). Canine parvovirus. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 23(3), 555–568. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(93\)50305-4](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(93)50305-4)
- Póvoa, P., Teixeira-pinto, A. M., & Carneiro, A. H. (2011). C-reactive protein , an early marker of community- acquired sepsis resolution: a multi-center prospective observational study.
- Purvis, D., & Kirby, R. (1994). Systemic inflammatory response syndrome: septic shock. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 24(6), 1225–47. <https://doi.org/10.1080/17415349.2015.1113150>
- R Core Team. (2015). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Rathour, S., Kumar, S., Hadda, V., Bhalla, A., Sharma, N., & Varma, S. (2015). PIRO concept: Staging of sepsis. *Journal of Postgraduate Medicine*, 61(4), 235–242. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.166511>
- Rau, S., Kohn, B., Richter, C., Fenske, N., Küchenhoff, H., Hartmann, K., ... Hirschberger, J. (2007). Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Veterinary Clinical Pathology*, 36(3), 253–260. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2007.tb00220.x>
- Remick, D. G., & Ward, P. A. (2005). Evaluation of Endotoxin Models for the Study of Sepsis. *Shock*, 24(Supplement 1), 7–11. <https://doi.org/10.1097/01.shk.0000191384.34066.85>
- Rijnberk, A., & Stokhof, A. A. (2009). General Examination. In F. J. Rijnberk, A. van Sluijs (Ed.), *Medical History and Physical Examination in Companion Animals* (2nd ed., pp. 47–62). Elsevier Limited.
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J., & Müller, M. (2011). pROC : an open-source package for R and S + to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, (12), 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-77>
- Rubulotta, F., Marshall, J. C., Ramsay, G., Nelson, D., Levy, M., & Williams, M. (2009). Predisposition, insult/infection, response, and organ dysfunction: A new model for staging severe sepsis. *Critical Care Medicine*, 37(4), 1329–1335. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31819d5db1>
- Savigny, M. R., & Macintire, D. K. (2010). Use of oseltamivir in the treatment of canine parvoviral enteritis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(1), 132–142.

<https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00404.x>

- Schriger, D. L., & Baraff, L. J. (1991). Capillary Refill - Is It a Useful Predictor of Hypovolemic States? *Annals of Emergency Medicine*, 20:6(June), 601–605.
- Shackelton, L. A., Parrish, C. R., Truyen, U., & Holmes, E. C. (2005). High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(2), 379–84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406765102>
- Shapiro, N. I., Wolfe, R. E., Moore, R. B., Smith, E., Burdick, E., & Bates, D. W. (2003). Mortality in Emergency Department Sepsis (MEDS) score: A prospectively derived and validated clinical prediction rule. *Critical Care Medicine*, 31(3), 670–675. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000054867.01688.D1>
- Silverstein, D. (2015a). Systemic Inflammatory Response Syndrome & Sepsis - Part 1: Recognition & Diagnosis. *Today's Veterinary Practice*, (February), 38–44.
- Silverstein, D. (2015b). Systemic Inflammatory Response Syndrome & Sepsis - Part 2: Stabilization & Treatment. *Today's Veterinary Practice*, (February), 38–44.
- Silverstein, D., & Otto, C. M. (2012). Sepsis. In C. E. Greene (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and cat* (4th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Singer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J., Craig, M., Hotchkiss, R. S., ... Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Journal of the American Medical Association*, 315(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287.The>
- Sobin, L. H., & Fleming, I. D. (1997). TNM Classification of Malignant Tumors. *Cancer*, 80(9), 1803–1804. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(19971101\)80:9<1803::AID-CNCR16>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(19971101)80:9<1803::AID-CNCR16>3.0.CO;2-9)
- Song, R., Kim, J., Yu, D., Park, C., & Park, J. (2012). Kinetics of IL-6 and TNF- α changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 146(2), 143–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.02.008>
- Such, J., Francés, R., Muñoz, C., Zapater, P., Casellas, J. A., Cifuentes, A., ... Pérez-Mateo, M. (2002). Detection and Identification of Bacterial DNA in Patients With Cirrhosis and Culture-Negative, Nonneutrocytic Ascites. *Hepatology*, 135–141. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.33715>
- Sundén-Cullberg, J., Norrby-Teglund, A., Rouhiainen, A., Rauvala, H., Herman, G., Tracey, K. J., ... Treutiger, C. J. (2005). Persistent elevation of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in patients with severe sepsis and septic shock. *Critical Care Medicine*, 33(3), 564–73. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000155991.88802.4D>
- Sykes, J. E. (2014a). Canine Parvovirus Infections and Other Viral Enteritides. In *Canine and Feline Infectious Diseases*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Sykes, J. E. (2014b). Sepsis. In *Canine and Feline Infectious Diseases*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Tivendale, K. A., Allen, J. L., Ginns, C. A., Crabb, B. S., & Browning, G. F. (2004). Virulence of Avian Pathogenic Escherichia coli. *Society*, 72(11), 6554–6560. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.11.6554>
- Unterer, S., Lechner, E., Mueller, R. S., Straubinger, R. K., Schulz, B. S., & Hartmann, K. (2015). Prospective study of bacteraemia in acute haemorrhagic diarrhoea syndrome in dogs. *Veterinary Record*, (January). <https://doi.org/10.1136/vr.102521>

- Vila Nova, B. (2017). *Avaliação da resposta imunitária humoral induzida pela vacinação para Esgana e Parvovirose caninas*. Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.
- Villar, J., Maca-Meyer, N., Pérez-Méndez, L., Flores, C., Cohen, J., Martin, G., ... Motulsky, A. (2004). Bench-to bedside review: Understanding genetic predisposition to sepsis. *Critical Care*, 8(3), 180. <https://doi.org/10.1186/cc2863>
- Vincent, J.-L. (2009). PIRO: The Key to Success? In J. Rello, A. Rodríguez, & E. Díaz (Eds.), *Management of Sepsis: The PIRO Approach* (pp. 1–163). New York: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00479-7>
- Vincent, J.-L., Donadello, K., & Schmit, X. (2011). Biomarkers in the Critically Ill Patient: C-reactive Protein. *Critical Care Clinics*, 27(2), 241–251. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2010.12.010>
- Vincent, J. L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., ... Thijs, L. G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. *Intensive Care Medicine*, 22(7), 707–710. <https://doi.org/10.1007/BF01709751>
- Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F. M., & Schlattmann, P. (2013). Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(5), 426–435. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(12\)70323-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(12)70323-7)
- Wan, L., Bagshaw, S. M., Langenberg, C., Saotome, T., May, C., & Bellomo, R. (2008). Pathophysiology of septic acute kidney injury: What do we really know? *Critical Care Medicine*, 36(4). <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318168ccd5>
- Wilkins, P. A., Otto, C. M., Baumgardner, E., Dunkel, B., Bedenice, D., Paradis, M. R., ... Pranzo, G. (2007). Acute lung injury and acute respiratory distress syndromes in veterinary medicine: consensus definitions - The Dorothy Russell Havemeyer Working Group on ALI and ARDS in Veterinary Medicine. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 17(4), 333–339. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00238.x>
- Willard, M. D., & Tvedten, H. (Eds.). (2011). *Small Animal CLinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Willard, M. D., & Twedt, D. C. (2012). Gastrointestinal, Pancreatic, and Hepatic Disorders. In M. D. Willard & H. Tvedten (Eds.), *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods* (5th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders.
- Wu, Y. (2015). Contact pathway of coagulation and inflammation. *Thrombosis Journal*, 13. <https://doi.org/10.1186/s12959-015-0048-y>
- Yesilbag, K., Yilmaz, Z., Ozkul, A., & Pratelli, A. (2007). Aetiological role of viruses in puppies with diarrhoea. *Veterinary Record*, 161(5), 169–170. <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2007.00238.x>
- Young, B., Gleeson, M., & Cripps, A. W. (1991). C-reactive protein: *Pathology*, 23, 118–124. <https://doi.org/10.3109/00313029109060809>
- Zaiontz, C. (2017). Real Statistics Using Excel. Retrieved February 6, 2017, from www.real-statistics.com
- Zhou, P., Zeng, W., Zhang, X., & Li, S. (2017). The genetic evolution of canine parvovirus – A new perspective. *Plos One*, 1–13.
- Zoetis. (2017). Canine Parvovirus Antigen Test Kit Witness® CPV. Estados Unidos. Retrieved from https://www.zoetisus.com/_locale-assets/dog/diagnostics/witness-cpv-direction-insert.pdf

IV - Anexos

Anexo 1: Tabelas de registo das variáveis recolhidas para classificação dos animais no que toca às variáveis Resposta e Disfunção orgânica.

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x 103/µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
JUNIOR Entrada: 27/11/13 Morte: 28/11/13 4 meses, s/ vacinas Raça: Indefinida	9h	140	24	38,5	r. pálidas	<2	forte	84									
	16h	188	24	37,6	pálidas	<2	forte										
	24h	160	24	39,4	pálidas	<2	forte										
	9h	128	24	37,7	pálidas			121	9,8	84						2,4	
	16h	taq				>2	fracol	low									
	24h																
	11/12/13	9h							6,19	182							
		16h															
		24h															
	12/12/13	9h															
CHICO Entrada: 11/12/13 Transferido: 16/12/13 Raça: Dog Lusitano 1 vacina 20/11 4 meses	9h	120	28		r. pálidas	<2	forte	119									
	16h			39,9		<2	forte										
	24h																
	13/12/13	9h	192	32	38,6	rosadas	<2	forte									
		16h	192	32	38,6	rosadas	<2	forte									
		24h	140	32		rosadas		forte									
	14/12/13	9h	120	28	38,6	rosadas	<2	forte									
		16h	120	28	38,4	rosadas	<2	forte									
		24h	120	28	38,4	rosadas	<2	forte									
	15/12/13	9h	120	28	38,4	rosadas	<2	forte									
	16h																
	24h																
16/12/13	9h	120	28	38,4	rosadas	<2	forte		8,77	555					1,1		
	16h																
	24h																

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
MAGGIE 2 meses	11/1/14	9h															
		24h	108	28	37,8	rosadas	<2	forte	9,2								
	12/1/14	9h	120	24	38,2	rosadas	<2	forte	90								
		16h	124	24	38,2	rosadas	<2	forte									
	13/1/14	9h	100	24	38	rosadas	<2	forte	100								
		16h	124	32	38	rosadas	<2	forte									
Entrada: 11/1/14 Saída: 15/1/14 Raça: Indefinida s/ vacinas	14/1/14	9h	160	24	38,9	rosadas	<2	forte									
		24h	160	24	38,9	rosadas	<2	forte									
	15/1/14	9h	140	30	38,4	rosadas	<2	forte									
		16h	150	20	38,2	rosadas	<2	forte									

ROCKY 4 meses	12/1/14	9h	160	40	38,6	rosadas	<2	forte	53	1,5	315					3,1	
		16h	144	32	39,5	rosadas	<2	forte									
	13/1/14	9h	120	48	38,5	pálidas	<2	forte	65								
		16h	124	32	39,7	rosadas	<2	forte	99								
	14/1/14	9h	108	24	39,3	r. pálido	<2	forte	68								
		16h	96	32	38,1	pálidas	<2	forte	80								
Entrada: 12/1/14 Saída: 21/1/14 Raça: Indefinida s/ vacinas	15/1/14	9h	110	36	38,1	rosadas	<2	forte	62								
		16h	140	44	38,2	rosadas	<2	forte	41								
	16/1/14	9h	120	36	38,4	rosadas	<2	forte	62								
		16h	140	44	38,2	rosadas	<2	forte	99								
	17/1/14	9h	123	28	38,3	rosadas	<2	forte	52								
		16h	138	24	38,3	rosadas	<2	forte									
18/1/14	9h	128	36	38,3	rosadas	<2	forte	38,8									
	16h	120	16	38,6	rosadas	<2	forte										
18/1/14	9h	140	36	38,3	rosadas	<2	forte										
	24h	140	36	38,3	rosadas	<2	forte										

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁷ /µ)	Plaquetas (x10 ³ /µ)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	19/1/14	9h	152	28	38,5	rosadas	<2	forte										
		16h	128	28	38,8	rosadas	<2	forte										
		24h	144	20	38,7	rosadas	<2	forte										
	20/1/14	9h	156	30	38,4	rosadas	<2	forte										
		16h	148	40	38,7	rosadas	<2	forte										
		24h	148	40	38,1	rosadas	<2	forte										
	21/1/14	9h	ALTA															
		16h																
		24h																
MERIDA	5/6/14	9h	136	24	39,6	r. pálidas	<2	forte		0,201	345						2	
		16h																
		24h																
	6/6/14	9h	130	24	39,1	r. pálidas	<2	forte										
		16h	142	28	38,6	r. pálidas	<2	forte	42									
		24h																
	7/6/14	4h	MORTE															
NAOMI 4 meses	8/9/14	9h			38,6													2,4
		16h																
		24h	160	40	38,5	rosadas	<2	forte										
	9/9/14	9h			40,1													
		16h																
		24h																
	10/9/14	9h	186	32	38,2	rosadas	<2	forte	74									
		16h	128	36	38,2	rosadas	<2	forte										
		24h	160	24	38,8	rosadas	<2	forte	67									
11/9/14	9h	180	32	38,9	rosadas	<2	forte	64										
	16h	144	30	38,2	rosadas	<2	forte											
	24h	124	24	38,3	rosadas	<2	forte											
12/9/14	9h	136	28	38,6	rosadas	<2	forte											
	16h																	
	24h																	

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
4 LUA 8 meses Entrada: 12/10/14 Saída: 16/10/16 Raça: Indefinida s/ vacina	12/10/14	9h		39,6		<2	não forte										
		16h	140	28	38,9	rosadas	<2	forte									
	13/9/14	9h	92	28	37,2	rosadas	<2	forte									
		16h	96	36	38,6	rosadas	<2	forte									
	14/9/14	24h	110	20		rosadas	<2	forte									
		9h	88	36	38,5	r. páldas	<2	forte									
	15/9/14	16h	92	35	39,2	r. páldas	<2	forte									
		24h	88	34	38,9	r. páldas	<2	forte									
16/9/14	9h	100	airar		rosadas	<2	forte										
	16h	100	40	38,9	rosadas	<2	forte										
16/9/14	24h	100	38	38,9	rosadas	<2	forte										
	9h	90	36		rosadas	<2	forte										

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)
LEITÃO Entrada: 12/10/14 Saída: 16/10/14 Raça: indefinida S/vacinas	12/10/14	9h														
		16h	88	40	39,2	rosadas	<2	forte								
	13/10/14	24h	180	24	37,9	páldas	Igual a 2	forte								
		9h	164	24	38,7	r. páldas	<2	forte								
	14/10/14	16h	100	28	38,6	páldas	<2	forte								
		24h	86	36	37,1	r. páldas	<2	forte	96							
	15/10/14	9h	80	25	37,3	r. páldas	<2	forte		4,12	262					
		16h	86	36		r. páldas	<2	forte								
	16/10/14	24h	100	28	38,5	r. páldas	<2	forte								
		9h	104	32		rosadas	<2	forte								
16/10/14	16h	100	36	38,4	rosadas	<2	forte									
	24h	100			rosadas	<2	forte									

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x103/µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
SNOOPY 9 meses Entrada: 14/10/14 Saída: 21/10/14 Raça: indefinida 1 dose primovacinação?	14/10/14																
	15/10/14	9h	96	36	38,9	rosadas	<2	forte									
		16h	88	arfar		rosadas	<2	forte									
		2h	96	28	38,4	rosadas	<2	forte									
		9h	96	36	38,6	rosadas	<2	forte	15,7	298							
		16h	102	30		rosadas	<2	forte									
		24h	96	28	38,4	rosadas	<2	forte									
		17/10/14	9h	ALTA E REGRESSO POR VÔMITO, DIARREIA E ANOREXIA													
		16h															
		24h	162	48	38,4	rosadas	<2	forte									
		9h	162	48	38,4	rosadas	<2	forte									
		16h	88	36		rosadas	<2	forte									
		24h	80	60	38,9	rosadas	<2	forte									
		9h	64	arfar	38,9	r. pálidas	igual a 2	forte									
		16h	128	arfar		r. pálidas	<2	forte									
	24h	80	arfar	38,6	rosadas	<2	forte										
	9h	84	arfar	38,8	rosadas	<2	forte										
	16h	88	28	38,6	rosadas	<2	forte										
	24h	88	24	38,5	rosadas	<2	forte										
	9h	80	40	38,5	rosadas	<2	forte										
AMORA 9 meses Entrada: 18/10/14 Saída: 24/10/14 Raça: indefinida	18/10/14	9h															
		16h	200	40	39,5	rosadas	<2	forte									
		24h	180	56	40,1	rosadas	<2	forte									
		9h	96	arfar	38,9	r. pálidas	<2	forte									
		16h	96	arfar	39,9	r. pálidas	igual a 2	menos F									
		24h	124	82	39	rosadas	<2	forte	3,0	97 (agreg)							2,5
		9h	140	arfar	39,1	rosadas	<2	forte									
		16h	120	80	38,9	rosadas	<2	forte									
		24h	112	28	38,5	rosadas	<2	forte									
		9h	109	48	38,7	rosadas	<2	forte									
	16h	108	32		rosadas	<2	forte										
	24h	104	28	39,2	rosadas	<2	forte										
	9h	96	60	38,5	rosadas	<2	forte										
	16h	92	60		rosadas	<2	forte										
	24h	100	arfar	38,6	rosadas	<2	forte										

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	23/10/14	9h	88	artar	38,7	rosadas	<2	forte	20,2	94,3 (eqre)							
		16h	100	artar		rosadas	<2	forte									
	24h	96	36		rosadas	<2	forte										
	24/10/14	9h															
		16h	96	artar	38,5	rosadas	<2	forte									
		24h															

Nº4	21/10/14	9h															
		16h	24h	39,5	rosadas	<2	forte	94									
Entrada: 21/10/14 Morte: 23/10/14 Idade 2/3 meses Vacinação desconhecida	22/10/14	9h	180	28	38,9	rosadas	<2	forte									
		16h	160	32	38,9	rosadas	<2	forte									
		24h	160	24	36,1	r. pálidas	<2	forte									
	23/10/14	2,30h	35,1														
		5,30h	encontrado morto														

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁹ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
SPIKE. 6 meses	9h	120	24	38,2	rosadas	<2	forte	96	3,1	167							
	16h	132	24	38	r. pálidas <2		forte										
	24h																
Raça: indefinida s/ vacinas		INTERNAMENTO DE FIM DE SEMANA (Visitação)															
BALI 3 meses	11/6/15	11h							3,91	166	0,85	142	345			2,96	
		16h															
		24h			39,6		igual a 3	forte	42								
	12/6/15	9h	88		40,6	rosadas	<2	forte	100								
		16h	106	44	39	rosadas	<2	forte	114								
		24h	184	48	39,5	rosadas	<2	forte	93								
	13/6/15	9h				subictericas	<2	forte	104								
		16h															
		24h	160	36	38,6	rosadas	<2	forte									
	14/6/15	9h	200	68	39,5	r. pálidas	<2	forte									
		16h	144	48	38,3	rosadas	<2	forte									
		24h	172	60	38,9	rosadas	<2	forte									
15/6/15	9h			38,8	r. pálidas	<2	forte		20,5	103 (c/ agregação)	0,7	84	5434				
	16h		33	38,5	r. pálidas	<2	forte										
	24h																
16/6/15	9h	42		38,7	r. pálidas	<2	forte										
	16h	82		38,2	l. ictericas	<2	forte										
	24h	100	anfar	38,1	l. ictericas	<2	forte										
17/6/15	9h	70		38,1	rosadas	<2	forte										
	16h	72	56	38,3	rosadas	<2	forte										
	24h																
18/6/15	9h	120		38,1	rosadas	<2	forte										
	16h	108	anfar		rosadas	<2	forte										
	24h	132	60		rosadas	<2	forte										
19/6/15	9h	126	60	38,3	rosadas	<2	forte		39,7	251 (c/ agregação)	241					2,1	
	16h																
	24h																

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁹ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)
VIOLETA 5 meses Entrada: 15/6/15 Saída: 19/6/15 Raça: indefinida s/vacinas	15/6/15 9h															
	15/6/15 16h			39,2	rosadas	<2	forte	128	7,18	241						
	15/6/15 24h															
	16/6/15 9h	182	36		rosadas	<2	forte									
	16/6/15 16h	128	32	38,6	rosadas	<2	forte									
	16/6/15 24h	112	24	38,1	rosadas	<2	forte									
17/6/15 9h	120	28	37,9	r. pálidas	<2	forte										
17/6/15 16h	120	32	38,4	r. pálidas	<2	forte										
17/6/15 24h																
18/6/15 9h	126	30	38,3	r. pálidas	<2	forte										
18/6/15 16h	136	34		r. pálidas	<2	forte										
18/6/15 24h	128	24	38,7	r. pálidas	<2	forte										
19/6/15 9h	136	30	38,7	r. pálidas	<2	forte										
19/6/15 16h	144	38		r. pálidas	<2	forte										
19/6/15 24h	108		38,8	rosadas	<2	forte										

LOKI, 3 meses Entrada: 15/6/15 Saída: 17/6/15 Raça: indefinida s/vacinas	15/6/15		16/6/15		17/6/15	
	9h	16h	9h	16h	9h	16h
	24h		24h		24h	
		200		37,5		r. pálidas
						<2
						forte
	186	44	38,9	rosadas	<2	forte
	180	60	38,4	rosadas	<2	forte
	148	28	38,3	r. pálidas	<2	forte
	120	80	37,9	r. pálidas	<2	forte

BRUTUS 5 meses Entrada: 19/7/15 Saída: 22/7/15 Raça: x Korweller S/vacinas	20/7/15		21/7/15		22/7/15	
	9h	16h	9h	16h	9h	16h
	24h		24h		24h	
		186		34		39,9
				rosadas		<2
				forte		
	200	36	rosadas	<2	forte	
	164	48	38,4	rosadas	<2	forte
				16,3	192	2,9
	184	36	38,6	rosadas	<2	forte
	112	38	rosadas	<2	forte	
	80	32	38,5	rosadas	<2	forte
	96	32	38,4	rosadas	<2	forte

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	9h	14h																
BONNIE 3 meses	25/7/15	9h			38,4		3	100		13	88						3,8	
		14h																
		24h																
	26/7/15	9h	130	26		rosadas		<2	forte									
		16h	144	24		rosadas		<2	forte									
		24h	120	24	39,1	rosadas		<2	forte									
	27/7/15	9h			38,6	rosadas		<2	forte									
		16h			38,9													
		24h	80	20	38,5	rosadas		<2	forte									
28/7/15	9h			38,7	rosadas		<2	forte										
	16h	76	anfiar		rosadas		<2	forte										
	24h		anfiar		rosadas		<2	forte										
29/7/15	9h																	
	16h																	
	24h																	
BART 1 mês	14/8/15	17h			39,9	rosadas		<2	forte	80	16,9	235						
		24h	160	32	39,4	rosadas	igual a 2		forte									
		9h	140	24	39,7	rosadas		<2	forte									
	15/8/15	16h	180	24	38,4	Hiperémicas		igual a 2	forte									
		24h	108	24	38	Hiperémicas		<2	forte									
		9h	100	24	37,8	Hiperémicas		<2	forte									
	16/8/15	16h																
		24h																
		9h	104	16	37,6	rosadas		<2	forte									
	17/8/15	16h																
		24h	124	32	37,7	rosadas		<2	forte									
		9h	100	32	37,8	lig. Pálidas		<2	forte									
18/8/15	16h																	
	24h																	
	9h																	
LUNA 2 anos	22/8/15	9h								5								
		16h																
		24h	80	40	37,5	rosadas		<2	forte									
	23/8/15	9h	72	36	38	r. pálidas		<2	forte									
		16h	88	60	38	rosadas		<2	forte									
		24h	100	44		rosadas		<2	forte									
	24/8/15	9h	104	32		rosadas		<2	forte									
		16h	112	40	37,8	rosadas		<2	forte									
		24h	112	32	37,8	rosadas		<2	forte									
25/8/15	9h																	
	16h																	
	24h																	

Animal	Data e Hora	FC (ppm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
KAYA	26/8/15	11:30h			rosadas	<2	forte	75									
		16h	134	28	rosadas	<2	forte										
	27/8/15	24h	180	40	38,2	rosadas	<2	forte									
		9h				rosadas	<2	forte									
Entrada: 26/8/15 Saída: 28/08/15 Raça: indefinida S/vacinas 2 meses	28/8/15	9h	132	60	38,5	rosadas	<2	forte									
		16h			38,2												
		24h															

INTERNAIMENTO COMBINADO DE 3 DIAS

Animal	Data e Hora	FC (ppm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
JOCA	4/9/15	9h															
		16h	140	24	37,9	rosadas	<2	forte									
	5/9/15	9h	110	24	38,2	r. pálidas	<2	forte		1,1	139						
		16h	108	24		pálidas	<2	forte									
	6/9/15	24h	100	24	38,9	r. pálidas	<2	forte									
		9h	140	36	37,7												
	7/9/15	16h	82	32	38,1	r. pálidas	<2	forte									
		24h	80	36	38,3	rosadas	<2	forte									
	8/9/15	9h	96	36	38,3	rosadas	<2	forte									
		16h	160	40	38,1	rosadas	<2	forte									
9/9/15	24h	82	36	38,3	rosadas	<2	forte										
	9h	120	20	38	rosadas	<2	forte										
10/9/15	16h	142	40	38,3	rosadas	<2	forte										
	24h	100	32	38	rosadas	<2	forte										
		9h	88	32	38,7	rosadas	<2	forte									
		16h	100	42	38,6	rosadas	<2	forte									
		24h	124	36		rosadas	<2	forte									

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µ)	Plaquetas (x10 ³ /µ)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)			
	9h	16h	24h	9h	16h	24h	9h	16h	24h	9h	16h	24h	9h	16h	24h	9h	16h	24h		
CARLOTA Entrada: 9/9/15 Saída: 15/9/15 Raça: indefinida mais de 6 meses s/vacinas	9/9/15	9h	220	56	40,9	rosadas	<2	forte		1,35	402	1,1								
		16h	160	28	38,7	rosadas	<2	forte												
		24h	182	42	39,4	rosadas	<2	forte												
	10/9/15	9h	132	24	38,7	rosadas	<2	forte												
		16h	148	24	38,6	rosadas	<2	forte												
		24h	162	36	38,6	rosadas	<2	forte												
	11/9/15	9h	80	20	38,1	rosadas	<2	forte												
		16h	104	40		rosadas	<2	forte												
		24h	120	28	38,6	rosadas	<2	forte												
	12/9/15	9h	96	20	38,5	rosadas	<2	forte												
		16h	112	28	38,6	rosadas	<2	forte												
		24h	100	32	39,1	rosadas	<2	forte												
13/9/15	9h	116	arfar	38,8	r. pálidas	<2	forte													
	16h	120	20	38,7	rosadas	<2	forte													
	24h	148	24	38,2	rosadas	<2	forte													
14/9/15	9h	168		38,2	rosadas	<2	forte													
	16h																			
	24h																			
JAGUAR Entrada: 20/9/15 Saída: 26/9/15 Raça: indefinida 6 meses s/vacinas	20/9/15	9h	164	36	39,2	rosadas	<2	forte	82	1,07	207	0,87	15						2,7	
		16h	160	40	39,3	r. pálidas	igual a 2	forte												
		24h	148	40	39,5	rosadas	<2	forte												
	21/9/15	9h	100	40	40	rosadas	<2	forte												
		16h	186	42	40,6	r. pálidas	<2	forte												
		24h	176	28	39,9	r. pálidas	<2	forte												
	22/9/15	9h	110	24	39,8	rosadas	<2	forte												
		16h	160	24	39,6	rosadas	<2	forte	83	5,1	142									1,9
		24h	120	24	38,9	rosadas	<2	forte												
	23/9/15	9h	120	20	38,1	rosadas	<2	forte												
		16h																		
		24h																		

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x103/µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
PIZZI 10 meses Entrada: 22/10/15 Saída: 26/10/15 Raça: Caniche s/Vacinas	24/9/15	9h	146	24	38,6	rosadas	<-2	forte										
		16h																
	24/9/15	24h	84	24	38,4	rosadas	<-2	forte										
		9h	136	32	38,6	rosadas	<-2	forte										
	25/9/15	16h	84	20	38,2	rosadas	<-2	forte										
		24h	128	32	38,7	rosadas	<-2	forte										
	26/9/15	9h																
		16h																
	27/9/15	9h	108	30	38,6	rosadas	<-2	forte										
		16h																
24h																		
PIZZI 10 meses	22/10/15	9h																
		16h																
	22/10/15	24h	52	20	37,9	rosadas	<-2	forte	49	13,5	202		0,71				3,2	
		9h	64	20	37,8	rosadas	<-2	forte	86									
	23/10/15	16h	64	16	37,8	rosadas	<-2	forte										
		24h	60	16		rosadas	<-2	forte										
	24/10/15	9h	68	???	37,6	rosadas	<-2	forte										
		16h	84	28	38	r. pálidas	<-2	forte										
	24/10/15	24h	92	24	38	rosadas	<-2	forte										
		9h	92	40	38	rosadas	<-2	forte										
25/10/15	16h	88	42		rosadas	<-2	forte											
	24h	104	36		rosadas	<-2	forte											
26/10/15	9h	80	24	38	pálidas	<-2	forte		16,3	323								
	16h	80	30	38,3	r. pálidas	<-2	forte											
24h																		

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
ESTRELA Idade desconhecida Entrada: 24/10/15 Saída: 30/10/15 Raça: indefinida s/ vacinas	24/10/15	9h				rosadas	<2	forte	62									
		16h				rosadas	<2	forte										
		24h	172	44	39,5	rosadas	<2	forte										
	25/10/15	9h				rosadas	<2	forte										
		16h				rosadas	<2	forte										
		24h	184	40	39,6	pálidas	<2	forte		4,5	185							2,8
	26/10/15	9h	110	214	39,7	pálidas	<2	forte										
		16h	100	36	40,1	r. pálidas	<2	forte										
		24h	172	32	39,2	pálidas	<2	forte	57									
	27/10/15	9h	146	32	39,6	r. pálidas	<2	forte	83									
		16h	142	32	38,2	r. pálidas	<2	forte										
		24h	120	12	38,2	r. pálidas	<2	forte										
28/10/15	9h				38,6			83										
	16h	84	30	38,8	r. pálidas	<2	forte	76										
	24h	88	44	38,3	r. pálidas	<2	forte	64										
29/10/15	9h	84	32	38,6				86										
	16h							83										
	24h	80	24	38,3	pálidas	<2	forte											
30/10/15	9h	84	36	38,2	r. pálidas	<2	forte			20,6	104							
	16h																	
	24h																	
PUSCAS Idade desconhecida Entrada: 31/10/15 MORTE: 1/1/15 Raça: indefinida s/ vacinas	31/10/15	9h																
		16h				pálidas	<2	forte	83									
		24h	224	60	40,6	pálidas	<2	forte		0,967	300				18			2,4
	1/1/15	9h	150	54	41,2	pálidas	>2	forte(?)										
		16h																
		24h																
	Raça: indefinida s/ vacinas	9h																
		16h																
		24h																

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (ppm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁷ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT 3PC (U/L)	FAS (U/L 3PC)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
ESTRELA 3 meses	2/1/16	9h															
		16h	184	32	38,7	rosadas	<-2	forte		5,0	394					3,2	
		9h	180	36	38,6	pálidas	<-2	forte									
		16h															
		24h	200	28	39,5	pálidas	<-2	forte									
		9h	196	32	40,5	pálidas	<-2	forte									
Entrada: 2/1/16 MORTE: 5/1/16 Raça: indefinida Vac.: Puppy DP	4/1/16	16h	206	32	39,8	pálidas	<-2	forte									
		24h	140	32	39,8	pálidas	<-2	forte									
		9h	186	36	39,9	pálidas	<-2	forte									
		14h			39,2				86								
	5/1/16	24h															
PUPPY 2 meses	Entrada: 26/5/16 Saída: 29/5/16 Raça: Beagle vacinação 1 toma vang 7 s/ vinheta	26/5/16	1h a.m.	130		rosadas	<-2	forte									
			9h	184	36	38,9	pálidas	<-2	forte								
		16h	164	20	38,2	rosadas	<-2	forte		11	468						
		24h															
		9h	132	32	38,3	r. pálidas	<-2	forte									
		16h	140	38	38,8	r. pálidas	<-2	forte									
		24h	140	28	38,5	r. pálidas	<-2	forte	77								
		9h	200	40	38,2	rosadas	<-2	forte									
		16h	192	40	37,5	rosadas	<-2	forte									
		24h	190	36	38,1	rosadas	<-2	forte									
	29/5/16	9h	160	44	38,1	r. pálidas	<-2	forte									
		16h															
		24h															
FOXXY Idade: 10 sem	Entrada: 13/7/16 Saída: 17/7/16 Raça: Shitz Anão Vac.: Puppy DP	13/7/16	9h	112		rosadas	<-2	forte	51	9	273		0,5			2,2	
			16h	124	40	38,6	rosadas	<-2	forte								
		24h	120	32		r. pálidas	<-2	forte									
		9h	124	32	38,4	r. pálidas	<-2	forte	13								
		16h	108	40	38,1	r. pálidas	<-2	forte	131								
		24h	100	60	38	r. pálidas	<-2	forte	89								
		9h	156	32	38,7	r. pálidas	<-2	forte									
		15/7/16	16h	120	60	39	r. pálidas	<-2	forte	68							
		24h															
		16/7/16	9h	180	taq.	39	r. pálidas	<-2	forte								
		16h	140	ganir		r. pálidas	<-2	forte									
		24h	140	48	38,7	rosadas	<-2	forte									
		9h															
		16h															
		24h															
	17/7/16	16h															
		24h															

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁹ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Urela (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
KIKA 2 meses Entrada: 6/10/16 Saída: 8/10/16 Raça: indefinida s/vacinas	6/10/16	160	taqui	38,1	r. pálidas	<2	forte		8,48	129		0,51		28		2	
	7/10/16	142	40	38,4	rosadas	<2	forte										
	16h	140	40	38,6	rosadas	<2	forte										
	24h	156	44	37,8	rosadas	<2	forte										
	8/10/16	ALTA insuficiencia económica. Reav. MI															
	9/10/16	normal	normal	37,8	rosadas	<2	forte										
	10/10/16	9h	BEG														
	16h	BEG															
	24h	BEG															
	11/10/16	9h	BEG														
	16h	BEG															
	24h	BEG															
	12/10/16	9h	BEG														
16h	BEG																
24h	BEG																
13/10/16	9h	BEG															
16h	BEG																
24h	BEG																
BOB Entrada: 18/09/16 Saída: 21/09/16 (alta contra indicação) Idade: 10 meses Fim vacinação: 12 sem	18/9/16	152	44	40,2	Rosadas	<2 seg	Forte	37	2,94	361		2,22		82		2,9	
	16h	92	56	39,8	rosadas	>2 seg	Forte										
	24h	120	48	39	Hiper	>2 seg	Forte										
	19/9/16	80	48	38,6	rosadas	2	Forte										
	20/9/16	100	46	39,2	Rosadas	<2 seg	Forte										
	16h	140	20	39	rosadas	<2 seg	forte										
	24h	120	36	39,1	Rosadas	<2 seg	Forte										
	21/9/16	120	36	39,1	Rosadas	<2 seg	Forte										
	16h	120	36	39,1	Rosadas	<2 seg	Forte										
	24h	120	36	39,1	Rosadas	<2 seg	Forte										

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
Entrada: 23/10/2016 Raça: indeterminada 4 meses	23/10/16	9h	136	36	38,8	Hiper	<2	Forte	10,6 (6-17)	278 (200-500)	0,16 (0,4-1,4)		38 (10-70)				
		16h	124	36	38,4	Rosadas	<2	Forte									
	24/10/16	24h	72	32	38,2	Rosadas	<2	Forte									
		9h	132	48	38,9	Rosadas	<2	Forte									
	25/10/16	16h	112	24	38,3	Rosadas	<2	Forte									
		24h	141	56	38	Rosadas	<2	Forte									
Raça: indeterminada 4 meses	26/10/16	9h	146	42	38,7	Rosadas	<2	Forte	9,85	521							
		16h	160	40	38,2	Rosadas	<2	Forte									
	27/10/16	24h	148	arter	37,8	Rosadas	<2	Forte									
		9h	156	32	38,3	Rosadas	<2	Forte									
	27/10/16	16h	160	28	38,3	Rosadas	<2	Forte									
		24h															

ZUKY	31/10/16	9h							1,8								
		16h															
	1/11/16	24h															
		9h	160	28	37,6	pálidas	<2	forte	23								
	Entrada: 31/10/16 Saída: 31/11/2016 Raça: Yorkshire Terrier 2 meses Não vacinado	2/11/16	16h	180	60	39,5	rosadas	<2	forte								
			24h	200	58	39,6	rosadas	<2									2,2
3/11/16	9h	220	52	38,3	rosa pálidas	<= 2	forte		12,64	310							
	16h																
24h																	

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)		
Skipper Entrada:11/11/16 Morte: 19/11/16 Raça: Bulldog Francês 2 meses S/ vacinas	11/11/16																	
	9h	160	40	38,2	Rosadas	<=2	Forte	87 mg/dl										
	16h	140	32	38,8	Pálidas	<2	Forte		16,2	277		0,4					2,7	
	24h	156	34	37,9	Rosadas	<2	Forte											
	9h	180	36	38,5	Rosadas	<2	Forte											
	13/11/16																	
	9h	180	36	37,1	Pálidas	<2	Forte											
	16h	160	40	37,7	Pálidas	<2	Forte											
	24h	188	44	38,2	Pálidas	<2	Forte											
	14/11/16																	
	9h	160	28	39,2	Pálidas	<2	Forte	LOW										
	16h	140	28	40	Pálidas	<2	Forte											
	24h	154	14	38,9	Rosadas	<2	Forte											
	15/11/16																	
	9h	140	30	38	R. pálido	>2	Forte	156										
	24h	180	24	38,6	R. pálido	<2	Forte	48										
	16/11/16																	
	9h	160	32	38,6	Rosadas	<2	Forte	61										
16h	100	27	38,5	R. pálido	igual a 2	Forte	97											
24h	128	24	39,6	Rosadas	<2	Forte	104											
17/11/16																		
9h	160	20	39,6	R. pálido	igual a 2	Forte	111										1,4	
16h	160	24	37,8	R. pálido	igual a 2	Forte	76											
24h	120	16	37,9	Pálidas	<2	Forte	19h: 76 21h: 80											
18/11/16																		
9h	180	10	38,1	Pálidas	igual a 2	Forte												
16h	172	28	36,7	Pálidas	>2	Forte												
24h	156	32	35,9	Pálidas	<2	Forte												
19/11/16																		
9h	132	24	LOW	Pálidas	-	Forte												
16h																		
24h																		
UTCHI Entrada:22/11/16 Saída:2/12/16 Raça: Malamute do Alaska 2 meses Vacinação: dose única Eurican Primo	22/11/16																	
	18h	175	48	39,4	R. pálidas	<2	forte	low	0,78	322		1,39		13			2,1	
	24h	175	36	39,4	rosadas	<2	forte											
	9h	144	38	38,5	rosadas	<2	forte	28										
	16h	128	20	39,7	rosadas	<2	forte	41										
	24h	182	26	39,4	rosadas	<2	forte	59										
	9h	144	20	38,7	r.pálidas	2	forte	85										
	16h	160	20	38,5	r.pálidas	2	forte	85										
	24h	140	20	38,6	r.pálidas	<2	forte	89										
	25/11/16																	
	9h	120	16	37,5	r.pálidas	>2	forte	125										
	16h	160	40	38,5	pálidas	>2	forte		0,64	3,74								
	24h	156	32	38,7	pálidas	<2	forte	169										
	26/11/16																	
	9h	184	28	38,4	pálidas	<2	forte	155										
	16h	180	36	39,3	r. pálidas	<2	forte	167										
	24h	180	40	38,8	pálidas	<2	forte	28										
	27/11/16																	
9h	200	24		pálidas	<2	forte	179											
16h	172	44	38,5	rosadas	<2	forte												
24h																		

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	28/11/16	9h	128	20	38	r.pálidas	<2	forte	111								
		16h	225	48	38	r.pálidas	<2	forte	65,4	27,6	15,7						
	29/11/16	9h	172	28	39,3	r.pálidas	<2	forte									
		16h	160	28	39	r.pálidas	<2	forte									
	30/11/16	9h	140	28	38,7	r.pálidas	<2	forte									
		16h	178	28	38,1	rosadas	<2	forte									
1/12/16	9h	200	40	38,5	rosadas	<2	forte										
	16h	220	36	38	rosadas	<2	forte										
	24h	130	36	38,5	rosadas	<2	forte										
2/12/16	9h	170	44	38,6	rosadas	<2	forte		52,2	408						1	
	16h	160	arfar	38,1	pálidas	<2	forte										
24h																	

KYRA 3 meses	30/11/16	9h	200	38,1	rosadas	2	forte		11,2	455							
		16h	160	28	38,1	rosadas	<2	forte									
	1/12/16	9h	154	32	37,5	rosadas	<2	forte									
		24h	156	32		rosadas	<2	forte									
	2/12/16	9h	136	24	38,6	rosadas	<2	forte									
		16h	160	24	38,2	rosadas	<2	forte									
	3/12/16	9h	160	24	38,7	rosadas	<2	forte									
		16h	144	24	37,5	r.pálidas	<2	forte									
	4/12/16	9h	154	32	37,6	r.pálidas	<2	forte									
		16h	160	32	37,8	r.pálidas	<2	forte									
	24h																

Entrada:30/11/16 Saída: 4/12/16 Raça: Bulldog Francês Não vacinada	30/11/16	9h	200	38,1	rosadas	2	forte		11,2	455							
		16h	160	28	38,1	rosadas	<2	forte									
	1/12/16	9h	154	32	37,5	rosadas	<2	forte									
		24h	156	32		rosadas	<2	forte									
2/12/16	9h	136	24	38,6	rosadas	<2	forte										
	16h	160	24	38,2	rosadas	<2	forte										
3/12/16	9h	160	24	38,7	rosadas	<2	forte										
	16h	144	24	37,5	r.pálidas	<2	forte										
4/12/16	9h	154	32	37,6	r.pálidas	<2	forte										
	16h	160	32	37,8	r.pálidas	<2	forte										
24h																	

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ⁷ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	9h	16h	140	44	38,8	rosadas	<2	forte		13.47	614		0,52	24			2,1	
GUI, 3 meses s/ vacinas Entrada: 9/12/16 Saída: 10/12/16 Raça: Labrador	9/12/16	24h	240	36	38,9	r. pálidas	<2	forte										
	10/12/16	9h	>200	32	38,1	rosadas	<2	forte										
		16h	200	32	37,8	rosadas	<2	forte										
		24h	140	44	38,8	rosadas	<2	forte										
		9/12/16	9h							0,7	63 (agreg)		2,89					
		10/12/16	9h	180	40	38,1	pálidas/ict. cerca de 2	forte										
BENJI Entrada: 9/12/16 MORTE: 10/12/16 Raça: Labrador 5 meses puppy dp 23/08; e e urican dia 6/10.	9/12/16	16h																
		24h																
	10/12/16	16h																
		24h																

Animal	Data e Hora	FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Urela (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
STARK	7/2/17	9h	186	44	38,9	rosadas	<2	forte	121	43,4	583	0,69	18			2,3	
		16h	170	52	38,6	r. pálidas	<2	forte									
	8/2/17	24h	168	36	38,6	r. pálidas	<2	forte									
		9h	180	44	38,3	r. pálidas	<2	forte									
	9/2/17	16h	200	44	38,3	r. pálidas	<2	forte									
		24h	220	40	37,8	r. pálidas	<2	forte									
Entrada: 07/02/2017 Saída: 10/02/17 Raça: Labrador 2 meses 1 dose vacinal	9/2/17	9h	180	48	38,1	rosadas	<2	forte									
		16h	200	40	38,4	rosadas	<2	forte									
	10/2/17	24h	168	38,2	rosadas	<2	forte										
		9h	240	44	37,8	rosadas	<2	forte		40,35	656						
	10/2/17	16h	240	40	38,4	rosadas	<2	forte									
		24h															
ASHA 3 meses	9/2/17	9h	156	28	38	r. pálidas	<2	forte	112	19,6	197						
		24h	132	20	38,6	rosadas	<2	forte									
	10/2/17	16h	128	24	38,1	rosadas	<2	forte									
		24h	160	24	37,9	rosadas	<2	forte									
	11/2/17	9h	176	32	38,6	rosadas	<2	forte									
		16h	152	32	39,1	rosadas	<2	forte									
12/2/17	24h	200	40	37,8	rosadas	<2	forte										
	9h	200	40	38,5	rosadas	<2	forte										
13/2/17	16h	148	40	38,4	rosadas	<2	forte										
	24h	140	38	38,4	rosadas	<2	forte										
Vac.: desconhecida	13/2/17	9h	200	40	39	rosadas	<2	forte									
		16h	200	40	39	rosadas	<2	forte									
13/2/17	24h	9h	200	40	39	rosadas	<2	forte									
		16h	200	40	39	rosadas	<2	forte									

Animal	Data e Hora		FC (bpm)	FR (rpm)	Temp (°C)	Mucosas	TRC	Pulso	Glucose (mg/dl)	Leucócitos (x10 ³ /µl)	Plaquetas (x10 ³ /µl)	Ureia (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	ALT (U/L 37°C)	FAS (U/L 37°C)	Bilirrubina (mg/dl)	Albumina (g/dl)	
	9h	16h																
PATC Entrada: 5/4/17 Saída: 10/4/17 Raça: Cocker S/ vacinas 6 meses	5/4/17	9h								7,54	124 (agreg)		0,47				25	
		16h	98	24	38,3	rosadas	<-2	forte										
		24h																
		6/4/17	9h	80	32	39,1	r. pálidas	<-2	forte									
			16h	84	24	37,9	r. pálidas	<-2	forte									
			24h	92	28	37,9	r. pálidas	<-2	forte									
		7/4/17	9h	108	24	38,3	r. pálidas	<-2	forte									
			16h	76	21	38	rosadas	<-2	forte									
			24h	124	32	37,8	rosadas	<-2	forte									
		8/4/17	9h	152	A/feir	38	rosadas	<-2	forte									
		16h																
		24h	120	32	38,9	rosadas	<-2	forte										
	9/4/17	9h	120	16	37,4	rosadas	<-2	forte										
		16h																
		24h	124	32		rosadas	<-2	forte										
	10/4/17	9h	128	40	38,8	rosadas	<-2	forte										
		16h	128			rosadas	<-2	forte										
		24h																
KIKO idade: 2 m	1/6/17	9h																
		16h	140	24	38,8	r. pálidas	<-2	forte		3,66	231						2,6	
		24h																
Vac.: não	2/6/17	9h	120	32	37,9	r. pálidas	<-2	forte	94									
Entrada: 1/6/17		16h	128	28	37,5	r. pálidas	<-2	forte										
Saída: 3/6/17		24h			38,4	r. pálidas	<-2	forte										
Raça: Indefinida																		
BOB Entrada: 12/6/17 Saída: 19/6/17 Raça: Indefinida S/ vacinas 1 mês	12/6/17	9h	152	16	38,1	r. pálidas	<-2	forte									2,2	
		16h																
		24h																
		13/6/17	9h	160	28	38	r. pálidas	<-2	forte									
			16h			38	r. pálidas	<-2	forte									
			24h	100	32	38	pálidas	<-2	forte									
		14/6/17	9h	120	20	37,8	r. pálidas	<-2	forte									
			16h	124	24	37,8	rosadas	<-2	forte	57								
			24h			38,4	rosadas	<-2	forte									
		15/6/17	9h			38,5	rosadas	<-2	forte									
			16h															
			24h	160	36	38	rosadas	<-2	forte									
		16/6/17	9h	220	36	39,2	r. pálidas	3	forte		1,06	285						1,9
		16h																
		24h	196	32	38,8	rosadas	<-2	forte										
	17/6/17	9h																
		16h																
		24h																
	18/6/17	9h																
		16h	180	24	38,6	r. pálidas	<-2	forte										
		24h	180	24	39,3	rosadas	<-2	forte										
	19/6/17	9h	204	36	39,8	rosadas	<-2	forte		11,16	123						1,9	
		16h	180	44	39	rosadas	<-2	forte										
		24h																

Anexo 2: Tabelas com a classificação PIRO e SRIS dos animais incluídos no estudo.

Animal	Dia	SIRS (1991)	SIRS (2001)	P	I	R	O Total	Desfecho
JUNIOR	27/11/2013	N	N	8	1	0	1	10 MORTE
MAGGIE	12/01/2014	N	N	8	1	0	0	9 ALTA
ROCKY	12/01/2014	S	N	8	1	6	0	15 ALTA
MERIDA	05/06/2014	S	S	8	1	4	1	14 MORTE
NAOMI	08/09/2014	S	N	8	1	3	0	12 ALTA
LEITÃO	13/10/2014	N	N	8	1	3	0	12 ALTA
SNOOPY	15/10/2014	N	N	7	1	1	0	9 ALTA
AMORA	18/10/2014	S	N	7	1	5	0	13 ALTA
BALI	12/06/2015	S	N	9	1	7	1	18 ALTA
VIOLETA	16/06/2015	S	N	8	1	4	0	13 ALTA
BRUTUS	20/07/2015	S	N	9	1	6	0	16 ALTA
BART	14/08/2015	S	S	7	1	4	0	12 ALTA
LUNA	22/08/2015	S	N	7	1	4	0	12 ALTA
JOCA	05/09/2015	N	N	7	1	3	0	11 ALTA
CARLOTA	09/09/2015	S	N	7	1	11	0	19 ALTA
JAGUAR	20/09/2015	S	S	8	1	6	0	15 ALTA
PIZZY	23/10/2015	N	N	7	1	0	0	8 ALTA
ESTRELA	25/10/2015	S	N	7	1	7	0	15 ALTA
PUSCAS	31/10/2015	S	S	5	1	11	0	17 MORTE
ESTRELA (16)	02/01/2016	S	N	7	1	5	0	13 MORTE
PUPPY	26/05/2016	S	S	7	1	4	0	12 ALTA
FOXY	13/07/2016	N	N	7	1	1	0	9 ALTA
SPOT	23/10/2016	N	N	8	1	1	0	10 ALTA
ZUKY	01/11/2016	S	S	7	1	7	0	15 ALTA
SKIPPER	12/11/2016	S	S	8	1	2	0	11 MORTE
UTCHI	22/11/2016	S	S	8	1	8	1	18 ALTA
KYRA	01/12/2016	N	N	8	1	2	0	11 ALTA
BENJI	09/12/2016	S	S	8	1	8	1	18 MORTE
STARK	07/02/2017	S	N	9	1	8	0	18 ALTA
AISHA	10/02/2017	N	N	9	1	1	0	11 ALTA
PATCH	06/04/2017	N	N	8	1	1	0	10 ALTA