

2

**CONGRESSO INTERNACIONAL DE
ENFERMAGEM VETERINÁRIA**

| A Fisioterapia em Animais de Companhia |

14_16

Out/2011

Viana do Castelo

ciev.ipvc.pt

ciev@esa.ipvc.pt



Papers in conference proceedings



Método de Elisa e as suas aplicações em diagnóstico

Moreira R¹, Capela I¹, Almeida D¹, Mesquita JR¹, Nóbrega C¹, Vala H^{1,2}

¹Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu, Portugal

²Centro de Estudos em Educação, Tecnologias e Saúde, Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Politécnico de Viseu, Viseu

INTRODUÇÃO

O método ELISA é um teste imunoenzimático que se baseia na interacção antigénio-anticorpo, tratando-se do método imunológico actualmente mais utilizado (Crowther, 2001). Este método, que permite detectar antigénio (Ag) ou anticorpo (Ac), foi desenvolvido nos anos 70, tendo sido muito difundido a partir de 1985 com o ensaio para anticorpos anti-HIV (Faulkner, 2010).

| MÉTODO ELISA | DETECTA | PLACA COM | CONJUGADO + ENZIMA |
|--------------|---------|-----------|--------------------------|
| INDIRECTO | AC | AG | AC |
| SANDUÍCHE | AG | AC | AG Teste / AC Marcadores |
| COMPETIÇÃO | AG | AC | AC |
| CAPTURA | AC | AC | AG |

MATERIAL E MÉTODOS

No desenvolvimento do método Elisa o material necessário é: Ag purificado (para detectar ou quantificar Ac); Ac purificado (para detectar ou quantificar Ag); controles (Positivo, Negativo, "cut-off") para os ensaios qualitativos; padrões (soluções com concentração conhecida do Ag/Ac a ser doseado) para ensaios quantitativos; amostras a serem testadas (sangue, soro, plasma, fluidos corporais ou fezes); placa de microtitulação de plástico com 96 poços; tampão de lavagem: utilizado para remover o Ag ou Ac livres na placa, Ag ou Ac ligados com pouca avidéz e outras moléculas interferentes; conjugado: Ac ou Ag ligados covalentemente a uma enzima; substrato enzimático (ex.: ácido 5-aminosalicílico); cromógeno: substância incolor que, ao ser oxidada pela reacção enzimática, produz cor e leitor de ELISA – espectrofotómetro (Shen & Louie, 2005).

No método ELISA indirecto, as placas são pré-incubadas com os antigénios contra os quais se quer detectar a

produção de anticorpos. Depois, procede-se a uma lavagem para retirar os antígenos não aderidos. De seguida, adiciona-se a amostra (onde se pretende detectar um anticorpo específico) realizando-se uma segunda lavagem para, posteriormente, se adicionar o anticorpo marcado com enzima. Após uma terceira e última lavagem, adiciona-se o substrato e o cromógeno sendo, por fim, analisada a reacção enzimática (Adaptado de Faulkner, 2010).

No método ELISA sanduiche, anticorpos específicos são aderidos à placa, procedendo-se, de seguida, uma lavagem e à adição adiciona-se depois a solução a pesquisar Ag (amostra) no mesmo local. Após os procedimentos normais de incubação e de lavagem, a placa é incubada com um soro policlonal marcado com enzima, que reconhece o antígeno associado ao anticorpo aderido à placa, caso estejamos perante o antígeno pesquisado (Adaptado de Faulkner, 2010).

No método ELISA captura, há detecção de Ac's (principalmente IgM, evitando a acção do factor reumatóide). Este imunoensaio é realizado através da adição de Ac IgG monoclonais contra IgM aos poços da placa; após as lavagens para retirar os Ac livres há adição do soro/plasma com Ac IgM específico a ser pesquisado; de seguida procede-se a uma nova lavagem, desta vez, para retirar os Ac não capturados, adicionando-se depois, Ag específicos marcados com uma enzima (conjugado) para o Ac pesquisado; para finalizar realiza-se mais uma lavagem para remover o conjugado não fixado, fazendo-se, de seguida, a adição do cromógeno e do substrato. Se o cromógeno for oxidado pela acção da reacção enzimática, haverá o desenvolvimento de cor, logo, na amostra existia o Ac pesquisado (Adaptado de Faulkner, 2010).

No ELISA competição, anticorpos específicos são aderidos à placa, procedendo-se, de seguida, a uma lavagem. Depois, adiciona-se primeiro o Ag-teste (amostra do paciente) e após uma segunda lavagem procede-se à adição do 2º Ag (Ag-marcado) havendo assim, competição dos dois antígenos pelo anticorpo incubado para a formação do imunocomplexo. Para finalizar o processo, adiciona-se a enzima específica para o Ag-teste e o substrato e procede-se à leitura do resultado. Neste imunoensaio quanto maior a quantidade de Ag-teste, menor a possibilidade de ligação do Ag marcado e assim, menor a intensidade de cor emitida (Adaptado de Faulkner, 2010).

APLICAÇÕES

Algumas das aplicações em veterinária do método ELISA sanduiche incluem a dosagem de hormonas, marcadores tumorais e outras proteínas séricas; detecção de antígenos virais e de outros patógenos nas fezes,

na urina e secreções (detecta quantidades na ordem dos 10^{-12} a 10^{-14} g) e diagnóstico de cisticercos em líquido cefaloraquidiano (LCR) (Sena, 2010).

Uma das aplicações método ELISA indirecto em veterinária é o diagnóstico sorológico de doenças infecto-contagiosas, onde a detecção de Ac IgG, IgA ou IgE seja significativa como na Leishmaniose e noutras doenças não parasitárias como a Linfadenite Caseosa (Sena, 2010).

Algumas das aplicações em veterinária do método ELISA captura método incluem a detecção de anticorpos da classe IgM contra os mais diversos antigénios (virais, bacterianos, protozoários) em todas as doenças em que seja importante identificar o seu recente aparecimento, como por exemplo a Toxoplasmose e da Diarreia Bovina Viral (DVB); dosagem de outros Acs e dosagem de citocinas (Sena, 2010).

Algumas das aplicações em veterinária no método ELISA competição incluem a dosagem de hormonas, marcadores tumorais e outras proteínas séricas, bem como o diagnóstico sorológico de algumas doenças como o Herpesvírus Bovino tipo I (Faulkner, 2010; Sena, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De entre os métodos imunológicos utilizados em diagnóstico, o ELISA destaca-se como método de eleição, por apresentar elevada especificidade e sensibilidade, quando comparado com outros métodos utilizados na rotina para o imunodiagnóstico de patologias. No entanto é muito susceptível a erros de pipetagem, alterações nos reagentes, variações nos tempos de incubação e lavagens, devendo ser executada por pessoal treinado e especializado.

Bibliografia

Crowther JR (2001). *Methods in molecular biology*TM. The ELISA Guidebook. (Volume 149). Humana Press, New Jersey, VII; 9-45; 115-153

Faulkner A (2010). ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). *Imunologia & Hematologia*. <http://imunologiahematologia.wordpress.com/2010/01/26/elisa/>, consultado em 01/05/2011.

Hames BD (1999). *Immunodiagnosics, A Practical Approach*, edited by Raymond Edwards, Oxford University Press, New York: 1-3

Sena L(2010). ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Slideshare. <http://www.sliderashare.net/labimuno/elisa-3454963>, consultado em 01/04/2011

Shen WC, Louie S (2005) *Immunology for Pharmacy Student*. Hardwood academic publishers, Los Angeles, 165-170

Emergências Neonatais em Animais de Companhia

Costa, C. P. P.; Hospital Veterinário Montenegro

1. Introdução

Neonatologia é o estudo e a ciência do recém-nascido, sendo que, o período a ser considerado, irá variar de acordo com a espécie.

O conhecimento das emergências mais comuns nos recém-nascidos e das diferenças entre a fisiologia neonatal e adulta pode ajudar a controlar estes doentes, de forma a conseguir uma sobrevivência o mais elevada possível. Os neonatos podem necessitar de serem reanimados após uma cesariana ou mesmo após um parto normal. Em ambos os casos, a primeira causa da mortalidade é a hipóxia, que pode ser contrariada se tivermos em conta as necessidades básicas dos neonatos.

Idealmente, o parto deve decorrer sem complicações e pode ser realizado em casa, no entanto, existem casos de gravidez de risco e de distócias. Nestes casos o animal deve ser levado imediatamente para um centro veterinário para ser submetido a uma cesariana, de modo a evitar o sofrimento fetal. Devem ser usadas luvas estéreis para manusear o recém-nascido, e equipamento estéril para contactar com o mesmo.

Dado que as causas são múltiplas e que a causa incitante pode não ser determinada antes da morte, os cuidados de suporte são a chave para os recém-nascidos que subitamente revelam debilidade, uma diminuição da velocidade de crescimento, que se isolam do resto da ninhada ou que manifestam qualquer outro sinal de agravamento do seu estado de saúde.

Para assegurar os melhores cuidados ao recém-nascido, é imperativo realizar um exame físico completo para identificar alterações congénitas, como fendas do palato, atresia anal, fontanelas abertas, *pectus excavatum*, e sopros cardíacos.

Nos cachorros e gatinhos considera-se que o período pediátrico é entre as 0 e 12 semanas de idade. Este período é subdividido em três grupos: recém-nascidos (0-2 semanas de idade), lactentes (2 a 6 semanas de idade) e jovens (6-12 semanas de idade).

O baixo peso ao nascimento e a velocidade de crescimento são os factores mais importantes de mortalidade neonatal. Os recém-nascidos prematuros têm um baixo peso ao nascimento, não atingiram a sua maturidade fisiológica, logo têm menos surfactante pulmonar e não estão preparados para enfrentar os desafios ambientais.

Um peso ao nascimento normal para um cão de porte médio é de aproximadamente de 500gr e para um gato é de 100gr. Os recém-nascidos podem perder cerca de 10% do seu peso corporal nas primeiras vinte e quatro horas depois do nascimento devido à evaporação de água no organismo. No entanto, passado este período devem ganhar peso rapidamente. Os cachorros e os gatinhos devem aumentar cerca de 10% do seu peso corporal por dia durante o período neonatal. A monitorização do peso duas vezes por dia permitirá detectar recém-nascidos que não ganham peso.

Até aos 4 a 7 dias de idade as membranas mucosas do recém-nascido estão hiperémicas devido ao elevado número de eritrócitos em circulação. Nos primeiros dias depois do parto, o hematócrito ronda os 60%.

2. Factores que afectam a mortalidade

2.1. Hipóxia

A hipóxia pode resultar de um bloqueio físico do tracto respiratório ou do cordão umbilical durante a distócia, quando o recém-nascido se encontra no canal vaginal, ou de depressão respiratória causada pelos agentes anestésicos administrados à mãe durante a cirurgia³. Nestes casos, os recém-nascidos apresentam bradicardia, bradipneia e movimentos diminuídos da parede torácica. Trata-se de uma resposta auto-reguladora realizada durante o período fetal e nas primeiras semanas do período pós-natal para conservar a energia e o oxigénio.³

A hipóxia é a primeira causa de mortalidade, que pode ser reduzida, nos casos de cesarianas, removendo rapidamente os fetos dos sacos amnióticos. As secreções das vias aéreas devem ser removidas imediatamente com auxílio de uma pêra de borracha e o neonato deve ser esfregado com uma toalha quente vigorosamente, para estimular o sistema respiratório.^{2,3}

Se um recém-nascido continuar a não responder depois das suas vias se encontrarem desobstruídas, deve ser instituído um suporte respiratório artificial, utilizando um cateter de 20G endotraqueal ou mesmo um tubo endotraqueal sem cuff. Caso não exista batimentos cardíacos, pode ser conjugada a massagem cardíaca com o suporte respiratório artificial.²

2.2. Desidratação

Os recém-nascidos estão mais propensos a desidratação devido à imaturidade da sua função renal, ao aumento da relação entre a área superficial e a massa, e à maior permeabilidade da pele. O teste da elasticidade da pele para avaliar a desidratação não é adequado aos recém-nascidos, devido ao maior teor de água e ao menor teor de gordura da pele.¹ No entanto a desidratação pode ser julgada através da avaliação das membranas mucosas (que devem estar húmidas e hiperémicas, e não pegajosas ou pálidas) e da capacidade de urinar. Se for usada uma mecha de algodão húmida para estimular a região perineal de um recém-nascido que não tenha urinado recentemente, se não houver micção é provável que ele esteja desidratado³.

A taxa e a via de administração de fluidos dependem do grau de desidratação, as vias possíveis incluem a oral, subcutânea, intraperitoneal, intravenosa e intraóssea². A fluidoterapia é essencial, um neonato com membranas pálidas e diminuição do TRC encontra-se pelo menos 10% desidratado, os fluidos muito raramente são restabelecidos por via oral devido à baixa perfusão e absorção gastro-intestinal.^{2,3} Deve-se ter em atenção que o sistema renal de um recém-nascido é imaturo e incapaz de concentrar urina, logo não é difícil exceder o volume de fluidos necessários, provocando edemas e muitas das vezes o óbito. O peso deve ser monitorizado de hora a hora e os sinais de sobredosagem devem ser causa de reavaliação do plano de fluidoterapia³.

2.3. Hipotermia

Os cachorros e os gatinhos com menor peso ao nascimento, podem entrar rapidamente em hipotermia devido à relação entre a superfície corporal e a massa corporal mais elevada.³

A hipotermia afecta de forma adversa as funções fisiológicas, acentua a bradicardia (numa tentativa de diminuir as exigências metabólicas), provocando a hipoxia dos tecidos e conduz a acidose metabólica. As respostas de tremores e vasoconstrição não estão presentes até cerca de uma semana de idade, e os recém-nascidos não possuem gordura para o isolamento.³

Deve-se manter um cachorro ou um gatinho recém-nascido com uma temperatura corporal ideal e estimular a sua pele esfregando-a com uma toalha quente, isto pode ser suficiente para que se consiga ter uma respiração normal. A frequência respiratória normal para um cachorro ou gatinho é de 10 a 18 movimentos/minuto se o animal estiver hipotérmico, a frequência respiratória está diminuída.³ Os filhotes devem ser colocados num ambiente previamente aquecido, a uma temperatura entre 30° e 33°C, visto que a hipotermia ocorre

rapidamente mediante a exposição a baixas temperaturas. O controlo da temperatura pode ser feito utilizando incubadoras pediátricas, toalhas aquecidas ou recipientes contendo a fonte directa de calor.¹

2.4.Hipoglicémia

A amamentação deve ser estimulada o mais rápido possível, pois o risco de hipoglicemia é grande devido a um fornecimento pobre de nutrientes ou devido a um parto difícil.¹ O colostro fornece glicose e calor ao neonato. Quando a amamentação não pode ser imediata administra-se uma ou duas gotas de um composto açucarado (glicose), por via oral, ou dextrose a 5% por via parenteral.¹

A hipoglicemia resulta normalmente de refeições inadequadas ou pouco frequentes. Um cachorro pode sobreviver 24 horas e manter concentrações sanguíneas de glicose normais através da glucogenólise e a neoglucogenese. A dextrose intravenosa ou intraóssea é o tratamento ideal até o recém-nascido ser capaz de se alimentar.³

3.Conclusão

Em muitos casos, a causa da morte neonatal mantém-se por esclarecer. O termo síndrome de enfraquecimento refere-se a um recém-nascido, encontrando-se saudável, de repente piora sem razão aparente, acabando muitas das vezes por culminar na sua morte. Muitas vezes estão presentes hipotermia, desidratação, hipoglicemia e hipoxia, que conduzem ao declínio do estado do animal e podem ser os únicos achados dos testes de diagnóstico. No mesmo animal podem estar presentes múltiplas causas de doença, o que complicará ainda mais o problema.

Bibliografia

1. Domingos Thalia Cathleen Souza, Rocha Amanda de Ascensão, Cunha Isabel Candia Nunes (2008). Cuidados básicos com a gestante e o neonato canino e felino. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal*. Vol.1 (2): 94- 120.
2. King Lesley G., Boag Amanda (2007). *Manual of emergency and critical care* (2ªedição). Inglaterra. BSAVA: 237-240.
3. Wilson Olivia, DVM, Memon Mushtaq A., BVSc, PhD, DACT (2011). Emergências neonatais. *Veterinary Medicine*. Vol.13 (76): 59-66.

Enxerto pediculado de modelo axial ilíaco circunflexo profundo

Teixeira G^{1,2}, Esteves F¹, Rodrigues H², Cruz R¹

¹Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Superior Politécnico de Viseu. Viseu, Portugal

²Hospital Veterinário Tutti-Natura, Av. Alberto Sampaio n.º 85 Viseu, 3510-031 Viseu

Em Medicina Veterinária, é bastante frequente o aparecimento de animais com feridas em que seja necessário o seu encerramento através de processos cirúrgicos. Desta forma, torna-se indispensável conhecer as melhores técnicas a aplicar na resolução desses casos. Quando é possível a sua utilização, os enxertos pediculados são a melhor opção para a reconstrução dos defeitos, pela sua facilidade de aplicação e rapidez na resolução do problema. Os factores determinantes para o sucesso do procedimento são o conhecimento das várias técnicas, a aplicação correcta destas e o manuseamento cuidadoso da pele.

Deep circumflex iliac axial pattern flap

Teixeira G^{1,2}, Esteves F¹, Rodrigues H², Cruz R¹

¹Escola Superior Agrária de Viseu, Instituto Superior Politécnico de Viseu. Viseu, Portugal

²Hospital Veterinário Tutti-Natura, Av. Alberto Sampaio n.º 85 Viseu, 3510-031 Viseu

In Veterinary Medicine, it is quite often the appearance of animals with wounds that need closure by surgical procedures. Thus, it becomes essential to know the best techniques to apply in resolving these cases. When it is possible to use the pedicle grafts are the best choices to rebuild the defects, its ease of application and speed in solving the problem. The determining factors for the success of the procedure are the knowledge of various techniques, the correct application of these and the careful handling of the skin.