



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TIRAS AUTION 10PA® NA DETEÇÃO DE
PROTEÍNA E RÁCIO UPC ALTERADO NA URINA DE CÃES E GATOS

MARTA ALEXANDRA NAZÁRIO MATIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte
Doutora Maria Teresa da Costa Mendes
Vítor Villa de Brito
Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

CO-ORIENTADOR

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DAS TIRAS AUTION 10PA® NA DETEÇÃO DE
PROTEÍNA E RÁCIO UPC ALTERADO NA URINA DE CÃES E GATOS

MARTA ALEXANDRA NAZÁRIO MATIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor António José de Freitas Duarte

Doutora Maria Teresa da Costa Mendes

Vítor Villa de Brito

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

ORIENTADOR

Dr. Luís Miguel do Amaral Cruz

CO-ORIENTADOR

Doutora Anabela de Sousa Santos da Silva
Moreira

2014

LISBOA

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, antes de mais, toda a disponibilidade e generosidade da Dr.^a Vera Pereira e toda a sua equipa do VetinLab, porque sem eles este trabalho não seria possível. Por todo o apoio e carinho desintencionado que recebi no curto período de tempo que passei no laboratório. Por me mostrarem que o mundo ainda tem pessoas altruístas e genuínas.

Quero ainda agradecer o apoio da empresa Menarini Diagnósticos Portugal, por terem patrocinado o estudo, disponibilizando duas caixas de tiras urinárias Aution 10PA[®].

Ao meu Orientador, Dr. Luís Cruz, e toda a equipa do Hospital Veterinário das Laranjeiras (HVL) pelo conhecimento partilhado, pela boa disposição constante e pelas experiências vivenciadas em conjunto, durante o período de estágio. Não podia deixar de agradecer aos colegas de estágio, por partilharem comigo o pânico em alturas de urgência e a excitação ao fazer procedimentos nunca antes realizados.

À minha Co-Orientadora, Professora Anabela Moreira, um excelente exemplo de profissionalismo na formação académica de estudantes, por todo o apoio e palavras sensatas em alturas desanimadoras. Pela disponibilidade e incentivo constantes durante a escrita da tese e pela partilha de experiências de vida. E, claro, pela alegria estonteante e boa disposição!

Aos colegas de curso, pela partilha de sentimentos e de conhecimento, porque estamos sempre a aprender uns com os outros. Ao Décio, à Maria, ao Samuel, à Sofia e à Susana por ouvirem os meus desabafos incondicionalmente.

Aos colegas do ensino básico e secundário porque me acompanharam em jornadas importantes. Um agradecimento especial à Andreia, à Carolina, ao Guilherme e à Rita, amigos de sempre e para sempre.

A toda a minha família, porque sem ela só existe o vazio.

Ao meu pai e à minha mãe, que é muito mais que minha mãe, pelos valores transmitidos. Aos meus irmãos, por serem os únicos que percebem os loucos dos meus pais. À Kiara, razão principal para ter escolhido este curso.

Finalmente, mas não menos importante, ao Tiago, por tornar o sonho em realidade.

RESUMO

Avaliação do desempenho das tiras Aution 10PA® na detecção de proteína e rácio UPC alterado na urina de cães e gatos

As tiras de reagentes colorimétricos que medem, de forma semi-quantitativa, os parâmetros bioquímicos da urina são utilizadas com grande frequência em Medicina Veterinária. Recentemente, foram desenvolvidas tiras que medem a creatinina urinária, permitindo, desta forma, calcular o rácio proteína/creatinina urinário (rácio UPC). Este tem vantagem sobre a medição da proteína, porque não é influenciado pela concentração urinária. Além disso, vários estudos mostraram a correlação entre o rácio UPC e a proteína excretada em 24 horas (*gold standard*). Como esta não pode ser medida na prática clínica de animais de companhia, a medição do rácio UPC tornou-se o método mais utilizado para detetar e quantificar proteinúria. Geralmente, os médicos veterinários enviam as amostras para o laboratório, o que pode ser demorado, por isso iriam ter benefícios se o rácio UPC pudesse ser medido imediatamente.

Neste trabalho, as tiras Aution 10PA®, desenvolvidas para a medicina humana, foram avaliadas e comparadas com os métodos de referência para a detecção de proteinúria, de rácio UPC alterado, de hematúria e de piúria. O objetivo foi determinar o desempenho destas tiras e a sua utilidade para o diagnóstico de proteinúria em cães ($n = 17$) e gatos ($n = 17$).

As tiras foram muito sensíveis na detecção de proteinúria em cães e gatos, mas foram pouco específicas. Para a detecção de rácio UPC alterado tiveram uma sensibilidade e especificidade perfeita no cão (100%), mas uma baixa sensibilidade no gato (30.8%). Em relação à precisão do diagnóstico de hematúria com as tiras Aution 10PA®, estas mostraram sensibilidade de 100% em cães e gatos, comparado com o método de referência (análise microscópica). A especificidade foi de 80% em cães e 64.3% em gatos. Na detecção de piúria, obteve-se uma sensibilidade de 50% em cães e de 100% em gatos e uma especificidade de 53.3% em cães e 0% em gatos. Quando comparada com os métodos quantitativos, houve uma correlação boa para as variáveis proteína ($\rho=0.88$), creatinina ($\rho=0.90$) e rácio UPC ($\rho=0.82$), medidas na urina de cães. Em gatos, a variável proteinúria ($\rho=0.75$) teve uma correlação razoável, mas a creatinina urinária ($\rho=0.40$) e o rácio UPC ($\rho=0.44$) tiveram uma correlação fraca. A correlação entre os valores de eritrócitos ($\rho=0.57$ no cão e $\rho=0.49$ no gato) e de leucócitos ($\rho=0.27$) obtidos com as tiras e com o microscópio ótico (M.O.) foi fraca em cães e gatos.

Palavras-chave: Proteinúria, Rácio UPC, Aution Sticks 10PA, Cães, Gatos, Urina tipo II

ABSTRACT

Evaluation of Aution 10PA[®] dipsticks for determining urine protein and UPC ratio in dogs and cats

Urinary dipsticks are routinely employed in veterinary medicine and constitute part of the urinalysis giving semi-quantitative information about biochemical parameters. Recently, a commercial dipstick that measures urine protein and creatinine concentrations and urine protein:creatinine (UPC) ratio has become available. The UPC ratio is better than measurement of protein, because it is not influenced by the urinary concentration. Besides, several studies have shown that UPC ratio correlates well with daily protein excretion (gold standard). The most widely used method for detection of proteinuria is the UPC ratio because daily urinary excretion of proteins cannot be routinely measured in dogs nor cats. Veterinary practitioners usually send samples for UPC ratio measurement to external laboratories. This can be time consuming, so it would be of benefit if the UPC ratio could be measured promptly.

In this study, Aution 10PA[®] dipsticks that are used in human medicine were evaluated and compared with the reference methods for detection of proteinuria, increased UPC ratio, haematuria and pyuria. The aims were to determine their performance and diagnostic usefulness in detecting proteinuria in dogs (n = 17) and cats (n = 17).

The dipsticks were very sensitive in the detection of proteinuria in cats and dogs, but were nonspecific. Detection of increased UPC ratio had a perfect sensitivity and specificity for the dog (100%), but low sensitivity in the cat (30.8%). Aution 10PA[®] dipsticks were very sensitive in the detection of haematuria in dogs and cats compared with the reference method (microscopic analysis). The specificity was 80% in dogs and 64.3% in cats. In detection of pyuria, the sensitivity was 50% (dogs) and 100% (cats) and specificity of 53.3% (dogs) and 0% (cats). In dogs, there was a good correlation between dipsticks and the quantitative measurement of urine protein ($\rho = 0.88$), creatinine ($\rho = 0.90$) and UPC ratio ($\rho = 0.82$). In cats, the correlation was reasonable for proteinuria ($\rho = 0.75$), but was poor for urine creatinine ($\rho = 0.40$) and the UPC ratio ($\rho = 0.44$). The correlation between the values of erythrocytes ($\rho = 0.57$ in dog and $\rho = 0.49$ in cat) and leukocytes ($\rho = 0.27$) obtained with the dipsticks and the optical microscope was poor in dogs and cats.

Keywords: Proteinuria, UPC ratio, Aution Sticks 10PA, Dogs, Cats, Urinalysis

ÍNDICE

1. ESTÁGIO CURRICULAR	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. FISIOLOGIA RENAL	5
3.1.1. Filtração glomerular	5
3.1.2. Reabsorção tubular	9
3.1.3. Secreção tubular	10
3.1.4. Equilíbrio hídrico	10
3.1.5. Equilíbrio ácido-básico	11
3.2. ANÁLISE DE URINA COMPLETA	11
3.2.1. Métodos de colheita	11
3.2.1.1 <i>Colheita por jato livre</i>	12
3.2.1.2 <i>Cateterização urinária</i>	12
3.2.1.3 <i>Cistocentese</i>	12
3.2.2. Manuseamento da amostra	13
3.2.3. Procedimento de análise de urina de rotina	14
3.2.4. Características físicas	15
3.2.4.1 <i>Cor</i>	15
3.2.4.2 <i>Aspetto</i>	16
3.2.4.3 <i>Cheiro</i>	16
3.2.4.4 <i>Densidade urinária específica</i>	16
3.2.5. Características químicas	18
3.2.5.1 <i>pH</i>	19
3.2.5.2 <i>Glicose</i>	20
3.2.5.3 <i>Corpos cetónicos</i>	21
3.2.5.4 <i>Proteínas</i>	21
3.2.5.5 <i>Creatinina</i>	23
3.2.5.6 <i>Bilirrubina</i>	23
3.2.5.7 <i>Sangue</i>	24
3.2.6. Exame do sedimento urinário	25
3.2.6.1 <i>Células epiteliais</i>	27
3.2.6.2 <i>Eritrócitos</i>	27
3.2.6.3 <i>Leucócitos</i>	28
3.2.6.4 <i>Cilindros urinários</i>	28
3.2.6.5 <i>Cristais</i>	29
3.2.6.6 <i>Lípidos</i>	30
3.2.6.7 <i>Bactérias</i>	31
3.2.6.8 <i>Outros</i>	31
3.3. ABORDAGEM CLÍNICA E AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE DOENÇA RENAL	32
3.3.1. Avaliação da função glomerular	33
3.3.1.1 <i>Ureia sérica</i>	34
3.3.1.2 <i>Creatinina sérica</i>	36
3.3.1.3 <i>Depuração da creatinina</i>	38
3.3.1.4 <i>Cistatina C</i>	38
3.3.2. Avaliação da função tubular	39

3.3.2.1	<i>Testes de concentração urinária</i>	39
3.3.2.2	<i>Excreção fracionária de eletrólitos</i>	41
3.3.2.3	<i>Rácio gamma-glutamyltransferase/creatinina urinário</i>	42
3.4.	PROTEINÚRIA	43
3.4.1.	Definição de proteinúria	43
3.4.2.	Localização da proteinúria	43
3.4.2.1	<i>Proteinúria extra-urinária</i>	44
3.4.2.2	<i>Proteinúria urinária</i>	45
3.4.2.3	<i>Proteinúria renal</i>	45
3.4.3.	Importância da avaliação e monitorização da proteinúria	46
3.4.3.1	<i>Monitorização da proteinúria</i>	47
3.4.4.	Deteção da proteinúria	47
3.4.4.1	<i>Teste da fita com reagentes colorimétricos</i>	47
3.4.4.2	<i>Teste turbidimétrico do ácido sulfossalicílico (ASS)</i>	48
3.4.4.3	<i>Rácio proteína/creatinina urinário (Rácio UPC)</i>	48
3.4.4.4	<i>Microalbuminúria (MA)</i>	51
3.4.4.5	<i>Método de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)</i>	52
4.	OBJETIVOS	53
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1.	AMOSTRAS DE URINA E DESENHO DO ESTUDO	55
5.2.	ANÁLISE DE URINA TIPO II	55
5.3.	ANÁLISE DE URINA COM AS TIRAS AUTION 10PA	59
5.4.	ANÁLISE BIOQUÍMICA QUANTITATIVA	61
5.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
6.	RESULTADOS	65
6.1.	ESTATÍSTICA DESCRITIVA	65
6.1.1.	Alterações gerais das amostras de urina	65
6.1.2.	Densidade urinária específica e pH	66
6.1.3.	Proteinúria	66
6.2.	PRECISÃO DO DIAGNÓSTICO COM AS TIRAS AUTION 10PA	68
6.2.1.	Desempenho diagnóstico das tiras	68
6.2.2.	Curva ROC e poder discriminatório das tiras	70
6.2.3.	Concordância do rácio UPC com diferenças na DUE e pH	71
6.2.4.	Concordância do rácio UPC em amostras com/sem hematúria e piúria	72
6.3.	COMPARAÇÃO ENTRE AS TIRAS AUTION 10PA E OS MÉTODOS DE REFERÊNCIA	72
6.3.1.	Teste de <i>Wilcoxon</i>	72
6.3.2.	Correlação de <i>Spearman</i>	73
7.	DISCUSSÃO	75
8.	CONCLUSÕES	83
9.	BIBLIOGRAFIA	85
10.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Amostra de urina canina dentro de um tubo de ensaio de 15 ml, antes da realização de qualquer procedimento analítico.....	56
Figura 2: (a) Tira urinária de reagentes colorimétricos Aution 10PA® (Arkray). (b) Embalagem das tiras urinárias Aution 10PA®, com a escala padrão para interpretação visual dos resultados.	56
Figura 3: Centrifugadora Z383K® (Hermle) utilizada neste estudo para centrifugar as amostras de urina.	57
Figura 4: Refratômetro clínico handrefractometer (Euromex®) utilizado neste estudo.	57
Figura 5: Microscópio ótico Nikon Eclipse E400®, utilizado neste estudo para o exame do sedimento urinário.	58
Figura 6: Exame microscópico do sedimento urinário. (a) Cristal de estruvite no sedimento urinário de gato. (sem corante; ampliação de 100x) (b) Leucócitos no sedimento urinário canino (sem corante; ampliação de 400x).	58
Figura 7: Refletômetro Aution Micro™ PU-4010 (Arkray®) utilizado neste estudo para a leitura automática das tiras Aution 10PA®.	59
Figura 8: Exemplo de uma impressão da análise feita pelo refletômetro Aution Micro™ numa tira urinária Aution 10PA®. GLU indica a glicose; PRO, proteínas; URO, urobilinogênio; BIL, bilirrubina; CRE, creatinina; BLD, sangue; KET, corpos cetônicos; NIT, nitritos; LEU, leucócitos; P/C, rácio UPC.	59
Figura 9: Analisador químico clínico RX Monaco® (Randox) utilizado neste estudo para a medição quantitativa da proteína, creatinina e rácio UPC urinários.	61
Figura 10: Curvas ROC construídas com os resultados obtidos com as tiras Aution 10PA® em amostras de urina de 17 cães e 17 gatos, utilizando o rácio UPC calculado no analisador químico como critério de referência para a identificação de proteinúria e de rácio UPC alterado.	70
Figura 11: Curvas ROC construídas com os resultados obtidos com as tiras Aution 10PA® em amostras de urina de cães e gatos com pH inferior a 7.5, utilizando o rácio UPC calculado no analisador químico como critério de referência para a identificação de proteinúria e rácio UPC alterado.	71
Figura 12: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições da proteína urinária com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).....	73
Figura 13: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições da creatinina urinária com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).....	74
Figura 14: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições do rácio UPC (mg/g) com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).....	74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação e definição da concentração urinária, avaliada através da osmolalidade e da DUE.	17
Tabela 2: Causas de proteinúria categorizadas de acordo com a localização da alteração subjacente	44
Tabela 3: Número de casos que apresentaram glicosúria, proteinúria, bilirrubinúria, isostenúria, hematúria, cetonúria, piúria e rácio UPC alterado.	66
Tabela 4: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA [®] com a leitura automática na máquina Aution Micro [™] para a deteção de proteinúria e rácio UPC alterado em cães e gatos.....	68
Tabela 5: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA [®] com a leitura automática na máquina Aution Micro [™] para a deteção de hematúria e piúria em cães e gatos.....	69
Tabela 6: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA [®] com a leitura automática na máquina Aution Micro [™] para a deteção de proteinúria em cães e gatos, em urinas com diferentes valores de pH.	69
Tabela 7: Concordância do diagnóstico entre a proteinúria e o rácio UPC medido nas tiras Aution 10PA [®] e no analisador químico em cães, tendo em conta os valores da DUE e do pH.	71
Tabela 8: Concordância do diagnóstico entre o rácio UPC medido nas tiras Aution 10PA [®] e o rácio UPC obtido com o analisador químico em cães, tendo em conta a presença ou ausência de hematúria e piúria	72
Tabela 9: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> entre a análise semi-quantitativa nas tiras e a medição quantitativa das proteínas, da creatinina, do rácio UPC, do sangue e dos leucócitos.	73
Tabela 10: Desempenho diagnóstico de tiras urinárias de diferentes fabricantes na deteção de proteinúria e de rácio UPC alterado em cães e gatos, publicadas anteriormente em estudos científicos.	77
Tabela 11: Coeficientes de correlação de <i>Spearman</i> entre os resultados semi-quantitativos das tiras urinárias de diferentes fabricantes e os resultados quantitativos dos métodos de referência.	79

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Prevalência das alterações registradas na urina tipo II realizada em 17 cães e 17 gatos.	65
Gráfico 2: Frequência dos resultados semi-quantitativos da proteinúria obtidos com as tiras Aution 10PA® em cães e gatos.	67
Gráfico 3: Frequência dos resultados semi-quantitativos do rácio UPC, calculados automaticamente pela máquina Aution Micro™, em cães e gatos.	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Percentagem
® – Marca registada
™ - *Trademark*
AHAI – Anemia hemolítica auto-imune
ANP – Péptido atrial natriurético
ASS – Ácido sulfossalicílico
ATP – Adenosina trifosfato
BUN – *Blood urea nitrogen*, em português, nitrogénio ureico sanguíneo
CAD – Cetoacidose diabética
CID – Coagulação intravascular disseminada
CO₂ – Dióxido de carbono
ERD – *Early renal detection*
dl - Decilitro
DM – Diabetes mellitus
DRC – Doença renal crónica
DUE – Densidade urinária específica
ECA – Enzima conversora de angiotensina
EF – Excreção fracionária
ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*
g - Grama
GGT – Gamma-glutamyltransferase
h - Hora
H⁺ – Ião hidrogénio
HVL – Hospital Veterinário das Laranjeiras
IECA's – Inibidores da enzima conversora de angiotensina
IgA – Imunoglobulina A
IRA – Insuficiência renal aguda
IRIS – *International Renal Interest Society*, em português, Sociedade Internacional de Interesse Renal
ITU – Infecção do trato urinário
kDa – Quilodaltons
kg – Quilograma
LR⁺ – *Likelihood ratio* positivo
LR – – *Likelihood ratio* negativo
MA – Microalbuminúria
mg – Miligrama
min – Minuto
ml – Mililitro
M.O. – Microscópio ótico
mOsm - Miliosmol
MV – Médicos Veterinários
nm – Nanómetro
NO – Óxido nítrico
PTH – Hormona da paratiróide ou paratormona
PU/PD – Poliúria e polidipsia
ROC – *Receiver Operating Characteristic*, em português, característica de operação do recetor
rpm – Rotações por minuto
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio
SNC – Sistema nervoso central

SRAA – Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TFG – Taxa de filtração glomerular
TGI – Trato gastrointestinal
UAC – Rácio albumina/creatinina urinário
UPC – Rácio proteína/creatinina urinário
VPN – Valor preditivo negativo
VPP – Valor preditivo positivo

1. ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular decorreu no HVL, em Lisboa, sob a orientação do Dr. Luís Cruz. Teve a duração de seis meses, com início a 1 de Outubro de 2013 e término a 31 de Março de 2014.

Durante este período, foram realizados horários semanais que rodavam pelos estagiários de maneira a assegurar a presença, no mínimo, dum estagiário no Hospital. A estagiária completou 40 horas semanais, distribuídas da seguinte forma: dois turnos de 12 horas (noites e fins-de-semana) e dois turnos de 8 horas. Assim, a componente prática do estágio correspondeu no total a 1040 horas.

A estagiária acompanhou quatro áreas que compõem a prática clínica: consultas, internamento, cirurgia e exames complementares de diagnóstico.

Nas consultas, acompanhou casos clínicos das mais variadas especialidades, como a gastroenterologia, dermatologia, nefrologia e acupunctura. Teve como principal responsabilidade auxiliar os Médicos Veterinários (MV) na contenção do animal e acompanhá-lo na realização do exame físico completo. Pôde ainda debater com o médico responsável a abordagem ao diagnóstico e qual a terapêutica apropriada para o paciente.

No internamento, ficou responsável pelo acompanhamento diário dos animais internados. Este acompanhamento consistia em conhecer a história clínica completa para poder realizar uma monitorização cuidada e dirigida ao problema do animal. Procedeu à limpeza das boxes, ao passeio dos cães, à alimentação dos animais, à administração de medicamentos, e quaisquer outros cuidados básicos de enfermagem que fossem necessários para a manutenção do bem-estar e para a recuperação dos pacientes.

Na cirurgia, fez a preparação do paciente para o procedimento cirúrgico. Preparou e administrou os fármacos de sedação adequados a cada caso, fez a tosquia e limpeza da área a incidir, colocou um cateter endovenoso para a administração de anestésico fixo e soro fisiológico e procedeu à intubação endotraqueal para administração de anestésico volátil. Durante o procedimento cirúrgico, realizou a monitorização do animal e manutenção da anestesia com recurso à medição da pressão arterial, temperatura, frequência cardíaca, frequência respiratória, reflexo pupilar e eletrocardiograma. Ficou ainda responsável pela reversão da anestesia fixa e pela vigilância do animal na sua recuperação durante o período pós-cirúrgico.

Quanto aos exames complementares de diagnóstico, foi possível realizar vários exames laboratoriais e assistir a alguns exames imagiológicos. A estagiária pôde fazer colheita de sangue,

processamento em centrífugadora e análise em máquinas de hemograma e de bioquímicas presentes no HVL. Pôde proceder ao exame microscópico de diversas amostras como gota de sangue, esfregaço de sangue, esfregaço de pele. Procedeu à leitura de densidade urinária e medição da glicose sanguínea. Quanto aos exames imagiológicos, ajudou na realização de radiografias, ecografias e endoscopias.

2. INTRODUÇÃO

A análise de urina tipo II é o terceiro exame laboratorial mais requisitado pelos médicos veterinários, sendo precedida apenas pelo hemograma e bioquímicas séricas. As razões para esse pedido ser tão frequente são várias e vão desde o método ser pouco invasivo e barato até à informação diversificada que pode ser obtida através dele. Na verdade, a urina tipo II tanto pode fornecer informações acerca do sistema urinário (rins, ureteres, bexiga e uretra) ou do sistema genital (prostatite, vaginite), como muitas vezes aparece alterada quando existem processos clínicos sistêmicos.

A informação adquirida com o exame da urina juntamente com a história pregressa, exame clínico e exames bioquímicos podem fornecer um diagnóstico das afeções mais comuns no cão e no gato (diabetes mellitus – DM, doença renal crónica – DRC). O exame do sedimento urinário pode fornecer indícios de problemas quando o animal ainda está assintomático. Além disso, existem certas doenças que beneficiam de um diagnóstico precoce para melhorar o tempo de sobrevida do paciente, como é o caso da nefropatia com perda de proteína urinária.

Devido às características particulares do glomérulo renal, em condições normais, não existe proteína na urina em quantidade suficiente para ser detetada pelos testes laboratoriais. No entanto, a presença de proteína na urina nem sempre é sinónimo de doença. Pode estar presente devido a processos transitórios que alteram a fisiologia renal momentaneamente, como a febre ou convulsões. Quando está presente devido a processos patológicos, pode ser extra-urinária (pré-renal ou genital) ou urinária (renal ou pós-renal). A proteinúria pré-renal é causada pelo aumento sérico de proteínas que conseguem atravessar a parede glomerular, como, por exemplo, a hemoglobina. A proteinúria genital ocorre quando existem processos exsudativos do trato genital e/ou dos órgãos genitais externos, enquanto a proteinúria pós-renal é causada por processos exsudativos do bacinete renal, ureteres, bexiga e uretra. Finalmente, a proteinúria renal pode ser causada por lesões estruturais ou funcionais que alteram a permeabilidade seletiva da parede glomerular ou que comprometem a reabsorção tubular das proteínas plasmáticas.

Assim, qualquer suspeita da presença de afeções que causem proteinúria deve ser confirmada ou despidada através da realização do exame de urina. A proteinúria é persistente quando ocorre em 3 testes urinários seriados, com um intervalo de, pelo menos, 2 semanas. Os casos em que a proteinúria é persistente e não existem mais alterações do exame de urina, normalmente, estão associados a proteinúria patológica de origem renal. Foi proposta pela Sociedade

Internacional de Interesse Renal (IRIS) a classificação dos animais consoante o grau de proteinúria em 3 sub-estágios: não proteinúrico, proteinúrico no limite (tradução do termo original inglês *borderline*) e proteinúrico. Os animais não proteinúricos são todos aqueles que têm rácio proteína/creatinina urinário (rácio UPC) inferior a 0.2. Os gatos com proteinúria no limite têm rácios UPC entre 0.2 e 0.4, sendo proteinúricos com rácios UPC superiores a 0.4. Os cães com proteinúria no limite têm rácios UPC entre 0.2 e 0.5, sendo proteinúricos com rácios UPC superiores a 0.5.

A medição da proteinúria pode ser feita através do teste das tiras com reagentes colorimétricos, do método turbidimétrico do ácido sulfossalicílico (ASS), do cálculo do rácio UPC e da medição da microalbuminúria (MA). As tiras com reagentes colorimétricos normalmente são o primeiro teste de rastreio utilizado. São mais sensíveis para a albumina do que para outras proteínas e dão origem a resultados falsos positivos. Em muitos laboratórios, um resultado positivo nas tiras é confirmado pelo teste ASS. Este teste é mais sensível que as tiras, porque deteta concentrações inferiores de proteína e deteta outras proteínas, como as proteínas de *Bence Jones* e as globulinas. O cálculo do rácio UPC é o método mais fidedigno, porque não é influenciado pela concentração da urina. Além disso, vários estudos mostraram a correlação entre a medição da proteína urinária em 24 horas e o rácio UPC. Normalmente, o rácio UPC é medido em laboratórios de referência, embora já existam várias tiras de reagentes colorimétricos (Multistix 10SG[®] e Microalbustix[®]; Multistix PRO[®]; Aution 10PA[®]) que medem a proteína e creatinina urinária, fazendo o cálculo do rácio UPC. Finalmente, a medição de pequenas quantidades de albumina é feita através da utilização de anticorpos específicos para a albumina canina ou felina. Este teste é muito mais sensível que os anteriores e pode ser útil no rastreio precoce de proteinúria. Pode ser medido no laboratório através do método ELISA ou em clínicas com recurso a testes rápidos (ERD Health Screen[®]).

Tendo em conta a importância do rastreio e da confirmação da proteinúria na prática clínica, quer em animais com doença renal, como em animais com outras afeções que causam proteinúria ou são agravadas por ela, este trabalho foi desenvolvido para avaliar o desempenho das tiras Aution 10PA[®] na deteção de proteinúria.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. FISIOLOGIA RENAL

Os rins dos mamíferos recebem 25% do débito cardíaco e têm como funções: filtrar o sangue, reabsorver substâncias filtradas essenciais para a manutenção do organismo e eliminar resíduos metabólicos. Asseguram o equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido-básico através da alteração da taxa de reabsorção e secreção de cada uma destas substâncias. Além disto, ainda produzem hormonas que regulam a produção de eritrócitos e a pressão sanguínea sistémica (Verlander, 2007). A eliminação de água e solutos é feita através de três processos principais: a filtração glomerular (passiva), a reabsorção tubular (passiva ou ativa) e a secreção tubular (ativa) (Stockham & Scott, 2002).

3.1.1. Filtração glomerular

O sangue entra no glomérulo pela arteríola aferente e expande-se por uma rede de capilares revestidos por epitélio fino. A parte não filtrável do sangue fica retida dentro dos capilares e sai do glomérulo pela arteríola eferente. A parte filtrável atravessa a parede dos capilares para o espaço de *Bowman*, dando origem ao filtrado glomerular. A taxa de filtração glomerular (TFG) é um parâmetro de função renal, avaliado frequentemente na prática clínica, que mede a quantidade de filtrado glomerular que se forma, por minuto (min), por quilograma (kg) de peso corporal (Dukes & Reece, 2004).

A parede do capilar glomerular é constituída por três camadas: endotélio capilar, membrana basal e epitélio visceral. Esta conformação é de grande importância na determinação da taxa e seletividade da filtração glomerular. O endotélio capilar é composto por uma fina camada de células com fenestras que permitem a passagem de água e componentes não celulares. A membrana basal é composta por glicoproteínas e pode ser dividida em três camadas consoante a conformação destas: lâmina rara interna e lâmina rara externa, localizadas nas extremidades, onde as fibrilas de glicoproteínas se dispõem de forma solta; e a lâmina densa, situada no interior, composta por fibrilas de glicoproteínas firmemente organizadas e carregadas negativamente. O epitélio visceral é composto por uma camada de células que estão interligadas de maneira complexa e denominam-se por podócitos (Verlander, 2007).

As forças que favorecem a filtração são: a pressão hidrostática do sangue dentro dos capilares e a pressão oncótica do filtrado no espaço de *Bowman*. Tendo em conta que as proteínas não são filtradas, a pressão oncótica do filtrado é mínima e, portanto, a principal força que leva à filtração é a pressão hidrostática dentro dos capilares. As forças que se opõem à filtração são: a pressão hidrostática do filtrado no espaço de *Bowman* e a pressão oncótica do sangue dentro

dos capilares. A pressão efetiva de filtração é a diferença entre a pressão hidrostática capilar, que favorece a filtração, e a pressão hidrostática do filtrado juntamente com a pressão oncótica capilar, que se opõem à filtração. Ao longo do percurso no glomérulo, a pressão efetiva de filtração diminui como consequência do aumento da pressão oncótica capilar e da diminuição da pressão hidrostática capilar. A TFG é o produto da pressão efetiva média, da permeabilidade da barreira e da área de superfície disponível (Dukes & Reece, 2004).

As características estruturais e químicas da parede dos capilares determinam a permeabilidade da barreira de filtração, que é seletiva. Relativamente ao tamanho, sabe-se que substâncias de raio molecular igual ou superior a 4 nm não são filtradas, ao contrário de substâncias de raio molecular igual ou inferior a 2 nm que são livremente filtradas. Assim, componentes celulares e proteínas plasmáticas do mesmo tamanho que a albumina ou superiores ficam retidas dentro do capilar, enquanto a água e os solutos são filtrados livremente. Outra propriedade que influencia a permeabilidade da barreira é a carga elétrica das moléculas. Uma vez que a lâmina densa é constituída por glicoproteínas carregadas negativamente, as moléculas de carga oposta passam a barreira com maior facilidade. Ou seja, para a mesma molécula, as formas catiónicas são filtradas mais facilmente que as formas neutras, que por sua vez também são filtradas mais facilmente que as formas aniónicas. A conformação e flexibilidade molecular também determina a sua habilidade para atravessar a barreira de filtração (Verlander, 2007).

A TFG depende, principalmente, da taxa de fluxo sanguíneo renal que, por sua vez, está dependente do volume sanguíneo, débito cardíaco, número de glomérulos funcionais e contração ou dilatação das arteríolas renais aferente e eferente (Stockham & Scott, 2002). Apesar das alterações que ocorrem na pressão sanguínea sistémica e no fluxo sanguíneo renal, o rim consegue manter a TFG em níveis constantes devido à existência de fatores sistémicos e intrínsecos. Os fatores humorais, principalmente o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), regulam a pressão sanguínea sistémica e o volume intravascular. O controlo intrínseco é feito por dois sistemas autorregulatórios reconhecidos: o reflexo miogénico e o *feedback* tubuloglomerular. Estes controlam a perfusão capilar glomerular, o fluxo sanguíneo renal e ainda o coeficiente de ultrafiltração (permeabilidade da barreira \times área de superfície disponível) (Verlander, 2007).

Quando há diminuição na pressão de perfusão renal, as células mesangiais presentes na arteríola aferente estimulam a produção e libertação da hormona renina. A renina catalisa a transformação de angiotensinogénio, produzido no fígado, em angiotensina I. No endotélio vascular dos pulmões, dos rins e de outros órgãos é produzida a enzima conversora de angiotensina (ECA), que catalisa a transformação da angiotensina I na sua forma mais ativa, a angiotensina II. A

angiotensina II é um forte vasoconstritor pois tem uma ação direta no aumento da pressão sanguínea sistêmica e na pressão de perfusão renal. Além disso, existem recetores específicos para a angiotensina II no tubo proximal, no ramo ascendente da ansa de *Henle* e no ducto coletor, que aumentam a reabsorção de sódio. A angiotensina II estimula a liberação de aldosterona, hormona produzida na adrenal, que atua no ducto coletor, aumentando a reabsorção de sódio e água. Estimula ainda a liberação da hormona antidiurética (ADH ou vasopressina), hormona produzida na hipófise, que promove a reabsorção de sal no ramo ascendente da ansa de *Henle* e no ducto coletor. Todas estas ações provocam, direta ou indiretamente, retenção de água e sal, aumento do volume intravascular e maior resistência vascular, o que contribui para o aumento da pressão sanguínea sistêmica e da pressão de perfusão renal. A angiotensina II é ainda responsável pela produção de prostaglandinas que provocam vasodilatação renal: a prostaglandina E_2 e a prostaglandina I_2 . A liberação destas substâncias é importante para contrabalançar o efeito vasoconstritor da angiotensina II nos vasos renais e manter a resistência vascular renal em níveis normais. Sem este efeito protetor, a vasoconstrição sistêmica levaria à diminuição do fluxo sanguíneo renal e da TFG, apesar do aumento da pressão sanguínea sistêmica. Quando a pressão de perfusão renal volta aos níveis normais e quando são detetados níveis elevados de angiotensina II no sangue, as células mesangiais deixam de libertar renina. Este sistema de *feedback* negativo mantém a perfusão renal e a TFG dentro de limites fisiológicos (Verlander, 2007).

Quando há aumento da tensão sobre a parede da arteríola aferente, o rim responde automaticamente, aumentando a resistência ao fluxo sanguíneo através da contração da arteríola. Pelo contrário, quando há uma diminuição da tensão sobre a parede arteriolar, o rim responde, diminuindo a resistência ao fluxo sanguíneo através da dilatação da arteríola aferente. Esta resposta é conhecida por reflexo miogénico e representa um mecanismo de autorregulação do fluxo sanguíneo renal e da TFG. O outro mecanismo de autorregulação renal é o *feedback* tubuloglomerular, composto por vários intervenientes. A mácula densa situa-se na porção distal do ramo ascendente da ansa de *Henle*, entre as arteríolas aferente e eferente, e é constituída por células especializadas. Quando estas detetam níveis elevados de sódio no fluido tubular ativam uma cascata de acontecimentos. Provocam a criação de fatores parácrinos, como o óxido nítrico (NO), a adenosina e a adenosina trifosfato (ATP). Como consequência, ocorre inibição da liberação de renina nas células justaglomerulares, aumento da resistência na arteríola aferente, diminuição da pressão de perfusão nos capilares, contração das células mesangiais e diminuição do coeficiente de ultrafiltração. Esta resposta causa uma diminuição na TFG do nefrónio individual, o que impede que a capacidade de transporte tubular seja afetada e previne que haja perda excessiva de fluidos e solutos (Verlander, 2007).

Existem ainda fatores sistêmicos que contribuem para a regulação da TFG, através de alterações no volume sanguíneo e no tônus vascular. A angiotensina II, a aldosterona e a vasopressina aumentam o volume sanguíneo através do aumento da absorção de água e solutos, enquanto o péptido atrial natriurético (ANP) tem o efeito contrário: diminui o volume sanguíneo ao aumentar a natriurese e a diurese. A vasopressina e as catecolaminas em circulação provocam vasoconstrição periférica e aumentam a pressão sanguínea. A estimulação dos recetores β -adrenérgicos ativa o SRAA que por sua vez causa vasoconstrição sistémica, enquanto a estimulação de recetores α -adrenérgicos provoca vasoconstrição renal. Existem ainda alguns fatores que podem aumentar a TFG, como por exemplo, o fator de crescimento semelhante à insulina e a ingestão de dietas com elevado teor proteico (Verlander, 2007).

A medição da TFG baseia-se no conceito de depuração (ou *clearance*) de uma substância plasmática. O soluto ideal para a medição da TFG não deve estar ligado a proteínas, deve ser livremente filtrado e não sofrer reabsorção nem secreção pelos túbulos renais. Os solutos que correspondem a estes critérios são a inulina, o iohexol e o manitol (Stockham & Scott, 2002). A taxa de depuração da inulina equivale à TFG e o seu cálculo matemático é representado da seguinte maneira:

$$TFG = (U_i \times V_i) \div P_i$$

Em que, U_i é a concentração de inulina urinária formada no período de tempo T ; V_i é o volume de urina colhido no período de tempo T ; e P_i é a concentração média de inulina plasmática durante o período de tempo T . Na prática clínica é comum usar-se a taxa de depuração de creatinina endógena, porque esta sofre um processamento no rim semelhante ao da inulina. A creatinina endógena é um resíduo do metabolismo muscular que é livremente filtrada, não é reabsorvida e, pelo menos no cão, não sofre secreção tubular. Noutras espécies, 10% da creatinina que é eliminada sofre secreção nos túbulos. Na prática, a medição da TFG é feita através da colheita de urina produzida em 24 horas para calcular o volume e concentração de creatinina urinária. A concentração da creatinina plasmática é calculada com base na medição da sua concentração passadas 12 horas, ou fazendo a média das medições no início e no fim do período de colheita. Ao multiplicar o volume de urina pela concentração de creatinina urinária e ao dividir este resultado pela concentração de creatinina plasmática, obtém-se uma aproximação da TFG em mililitro (ml) por min. Como na Medicina Veterinária ocorrem grandes variações entre indivíduos, é mais correto expressar o resultado com base no peso, ou seja, ml/min/kg (Verlander, 2007).

3.1.2. Reabsorção tubular

O filtrado glomerular contém aproximadamente a mesma concentração de sais e glicose que o plasma. Se não ocorresse reabsorção destas substâncias nos túbulos, a perda urinária de sódio, cloretos, potássio, bicarbonato e glicose seria impossível de compensar. No entanto, quando a urina chega aos ductos coletores, aproximadamente 99% dos solutos sofreram reabsorção (Verlander, 2007).

O túbulo proximal é responsável pela reabsorção de, pelo menos, 60% dos solutos filtrados. A estrutura dos túbulos e a sua proximidade anatômica com os capilares peritubulares facilitam o movimento entre o fluido tubular e o sangue, através de dois mecanismos: o transporte transcelular e paracelular. O transporte transcelular é feito através de mediadores, desde a zona apical até à membrana basolateral das células epiteliais proximais. As substâncias passam então para o fluido intersticial e finalmente para os capilares peritubulares, devido à ação das forças de *Starling* (pressão oncótica elevada e pressão hidrostática baixa dos capilares). O transporte paracelular é feito na *zonula ocludens*, estrutura permeável que une as células epiteliais adjacentes, através de difusão passiva. O sódio, a glicose, os aminoácidos, o fosfato, o sulfato e os aniões orgânicos atravessam a membrana apical através de transporte ativo secundário. O bicarbonato origina-se dentro das células epiteliais através do dióxido de carbono (CO_2) e é transportado através da membrana basolateral por co-transporte com o sódio. As proteínas de baixo peso molecular, como a insulina, o glucagon e a hormona da paratiróide (PTH) são transportadas por endocitose e degradadas em aminoácidos pelos lisossomas. A água difunde-se passivamente juntamente com os solutos. O cálcio e o potássio difundem-se passivamente por transporte paracelular (Verlander, 2007).

No tubo descendente da ansa de *Henle*, ocorre essencialmente reabsorção de água. Esta porção da ansa de *Henle* é permeável à água e impermeável ao sódio. As suas propriedades de permeabilidade passiva e a sua orientação espacial na medula são características essenciais para o papel que esta porção desempenha na reabsorção de água. O segmento distal dos túbulos, que inclui o tubo ascendente da ansa de *Henle* e o tubo contornado, é responsável pela reabsorção de sódio, potássio, cloretos, cálcio e magnésio, contra o gradiente de concentração. Como esta porção dos túbulos é impermeável à água, o fluido tubular presente no final do tubo contornado é hipotónico (Verlander, 2007).

No ducto coletor há reabsorção de sódio através de transporte ativo secundário, de cloretos pela via paracelular e de potássio através de transporte ativo primário. O ducto coletor é impermeável à água na ausência de vasopressina. Existem várias hormonas que são responsáveis pela homeostasia do organismo e que atuam no túbulo distal e no ducto coletor: a aldosterona, a angiotensina II e a vasopressina que aumentam a reabsorção de sódio e água; a endotelina que

inibe a bomba de sódio e potássio, aumentando a excreção de sal e água; e o ANP, que inibe a aldosterona e a vasopressina (Verlander, 2007).

3.1.3. Secreção tubular

O túbulo proximal secreta uma grande variedade de iões orgânicos para o fluido tubular. A maior parte dos resíduos do metabolismo endógeno e das substâncias exógenas estão ligadas a proteínas plasmáticas e, por isso, não são filtradas. No entanto, o túbulo proximal é responsável por retirar estas substâncias do sangue e excretá-las no fluido tubular através de transporte ativo secundário. As substâncias endógenas são os sais biliares, oxalatos, ureia, creatinina, prostaglandinas e epinefrina. Os túbulos são responsáveis pela secreção de alguns fármacos e toxinas como, por exemplo, antibióticos (penicilina G, trimetoprim), diuréticos (clorotiazida, furosemida), a morfina e seus derivados, o herbicida paraquat (Verlander, 2007).

O ducto coletor secreta potássio através do canal de potássio presente na membrana apical e através do gradiente eletroquímico que favorece a sua excreção (Verlander, 2007).

3.1.4. Equilíbrio hídrico

Uma das funções mais importantes dos rins é preservar o conteúdo hídrico do organismo e manter a tonicidade do plasma. Tal como acontece com os solutos, nos túbulos ocorre reabsorção de cerca de 99% da água que constitui o filtrado glomerular. Além disso, os túbulos têm a capacidade de concentrar a urina (maior reabsorção) quando o organismo é privado de água e de diluí-la (menor reabsorção) quando há sobrecarga de água (Dukes & Reece, 2004).

O túbulo proximal reabsorve mais de 60% da água presente no filtrado glomerular. Este processo é explicado quer pelo gradiente causado pela reabsorção de solutos, quer pela existência de uma grande área de superfície altamente permeável, devido à existência de canais de água nas membranas celulares (aquaporina-1 e aquaporina-7) (Verlander, 2007).

A capacidade de concentrar ou diluir a urina deve-se a três componentes: a existência do interstício medular hipertónico, a diluição do fluido tubular no ramo ascendente da ansa de *Henle* e no tubo contornado e a variação da permeabilidade à água no ducto coletor em resposta à vasopressina. O interstício medular hipertónico é o responsável por concentrar urina e é mantido pelo mecanismo de contracorrente existente entre a ansa de *Henle* e os *vasa recta*. Como o ramo descendente da ansa de *Henle* é permeável à água, há passagem de água para o interstício hipertónico. Além disso, neste segmento há secreção de ureia, o que contribui para a concentração urinária dentro do fluido tubular. A diluição do fluido tubular é feita através da reabsorção de sal no ramo ascendente da ansa de *Henle* e no tubo contornado distal, que são impermeáveis à água. O ducto coletor é impermeável à água na ausência de vasopressina e origina urina diluída.

Quando há hipovolémia ou desidratação a hipófise secreta vasopressina que atua ao nível do ducto coletor para reabsorver água (Dukes & Reece, 2004).

3.1.5. Equilíbrio ácido-básico

O pH normal do plasma é 7.4, valor necessário para o funcionamento celular. Os mecanismos que regulam o equilíbrio ácido-básico são: sistema tampão intracelular e extracelular, pulmões e rins. O sistema tampão e os pulmões são responsáveis pelas correções rápidas do pH plasmático, ao contrário dos rins, que controlam o pH mais lentamente ao excretarem íons de hidrogénio (H^+) (Verlander, 2007).

Os rins excretam ácido eficientemente devido a um conjunto de fatores: presença de enzimas que disponibilizam protões e bicarbonato; proteínas membranares que transportam H^+ para o fluido tubular e bicarbonato para o fluido intersticial; e, finalmente, tampões que minimizam o aumento da concentração de H^+ no fluido tubular. O túbulo proximal é o segmento que secreta a maior parte do ácido em excesso, enquanto o ducto coletor é o responsável por controlar a excreção efetiva de ácido e o pH final da urina (Dukes & Reece, 2004).

3.2. ANÁLISE DE URINA COMPLETA

O exame da urina é um método muito útil para a avaliação de diagnóstico das afeções do trato urinário, mas também pode refletir a presença de doenças sistémicas (Tripathi, Gregory, & Latimer, 2011). É um teste laboratorial rápido, simples e não invasivo. A análise completa de urina inclui a avaliação das características físicas [cor, aspeto, cheiro e densidade urinária específica (DUE)], dos parâmetros bioquímicos (pH, sangue, glicose, corpos cetónicos, bilirrubina, urobilinogénio e proteínas) e o exame microscópico do sedimento (eritrócitos, leucócitos, bactérias, fungos, células epiteliais, cristais e cilindros). Estes componentes devem ser sempre analisados em conjunto para evitar interpretações erradas dos resultados laboratoriais (Archer, 2005). Além disso, o exame de urina pode originar resultados falsos se os materiais não forem usados nem armazenados corretamente ou se não tiverem sido validados em medicina veterinária (Wamsley & Alleman, 2007).

3.2.1. Métodos de colheita

O objetivo principal na colheita de urina é obter e analisar uma amostra que represente, o mais próximo possível, a urina existente dentro do corpo. Para isso é necessário manusear as amostras de maneira a minimizar os artefactos originados no período de pós colheita. (Wamsley & Alleman, 2007)

Consoante as análises que se pretendem realizar na urina, escolhem-se diferentes métodos para a sua colheita, porque estes podem alterar os resultados da análise. Deve obter-se um volume

padrão de urina, para se poderem comparar os resultados obtidos no exame do sedimento. A colheita pode ser feita por jato livre, por cateterização ou por cistocentese (Reine & Langston, 2005).

3.2.1.1 Colheita por jato livre

A colheita por jato livre é uma técnica não invasiva e simples, que pode ser realizada pelos donos e não causa hematúria iatrogénica. No entanto, tem a desvantagem de implicar maior contaminação por bactérias, leucócitos, células epiteliais e espermatozoides. (DiBartola, 2010). Este problema pode ser reduzido ao rejeitar o primeiro jato de urina. O recipiente de recolha deve estar limpo e livre de detergentes para evitar interferências com a análise bioquímica. Este método de colheita raramente é adequado para cultura urinária (Reine & Langston, 2005).

3.2.1.2 Cateterização urinária

A cateterização reduz o problema da contaminação exterior, mas não na totalidade, e exige certos cuidados. Um deles é a limpeza prévia do orifício uretral e da área adjacente para reduzir a contaminação da urina e para evitar a entrada de organismos patogénicos para o trato urinário. O outro é o manuseamento do cateter que, se não for realizado corretamente, pode provocar traumatismo e hemorragia iatrogénica (Tripathi et al., 2011). O risco de infeção urinária provocada pela cateterização é maior em cadelas comparado com os machos (Chew & DiBartola, 1998). Tal como na colheita por jato livre, o primeiro jato de urina deve ser descartado por ser a porção com maior probabilidade de conter detritos provenientes da uretra (Reine & Langston, 2005)

3.2.1.3 Cistocentese

Para evitar a contaminação através do trato genital e trato urinário inferior, deve ser usada a cistocentese que é o método mais adequado para a colheita de urina no cão e no gato. No entanto, esta também pode causar hemorragia iatrogénica ou contaminação se houver perfuração entérica acidental (Tripathi et al., 2011). A cistocentese apresenta menor risco de infeção iatrogénica e é a técnica mais fácil em gatos. A cistocentese tem a desvantagem de necessitar de punção ecoguiada, pois a cistocentese cega não é recomendada. Além disso, pressupõe a existência de um volume adequado de urina na bexiga e resulta numa grande variação do grau de hematúria iatrogénica, que não se distingue de hematúria patológica (Wamsley & Alleman, 2007). Se a urianálise estiver a ser feita para monitorizar a hematúria, então é preferível realizar colheita por jato livre (Reine & Langston, 2005). Se a análise for para cultura, devem realizar-se técnicas de colheita assépticas, como a cistocentese e a cateterização, sendo a cistocentese o método ideal (Archer, 2005).

Num estudo concluiu-se que a concentração de albumina urinária canina não se altera significativamente entre a urina colhida por jato livre e a urina colhida por cistocentese (Smets, Meyer, Maddens, Duchateau, & Daminet, 2010). Também não há diferenças significativas no rácio UPC obtido em urinas colhidas por jato livre e por cistocentese. Esta foi a conclusão de um estudo feito em 115 cães, cujos autores recomendam que, para a avaliação do rácio UPC, se faça a colheita de urina por jato livre por ser o método mais simples (Beatrice, et al., 2010).

3.2.2. Manuseamento da amostra

A urina deve ser colhida antes de ser administrado qualquer tipo de tratamento ou contraste radiográfico. Os recipientes de recolha devem estar limpos, sem reagentes nem detergentes, esterilizados, rotulados, herméticos e opacos. Idealmente, a análise de urina deve ser feita nos primeiros 30 minutos após a colheita. No entanto, se tal não for possível deve ser refrigerada no máximo até 12 horas e estar à temperatura ambiente imediatamente antes de ser analisada (Tripathi et al., 2011). No entanto, na opinião de Steinberg, Drobatz e Aronson (2009) a urina pode ser utilizada até 5 horas após a colheita para avaliação da DUE, pois as alterações que ocorrem não afetam a decisão clínica. Estes autores sugerem ainda que se faça um estudo para avaliar os efeitos do tempo de armazenamento nos outros componentes da análise de urina de rotina.

A urina refrigerada deve voltar à temperatura ambiente e ser bem misturada antes da realização de qualquer análise. Caso se pretenda realizar o exame do sedimento, a urina não deve ser congelada porque os cilindros são vulneráveis e desintegram-se facilmente. Nos casos de doença renal precoce, a presença de cilindros urinários pode ser a única alteração detetada nos exames laboratoriais (Archer, 2005).

Os artefactos associados à refrigeração são a formação *in vitro* de cristais, especialmente oxalato de cálcio, a inibição de reações enzimáticas na tira de urina, dando origem a resultados falsamente diminuídos e o aumento da DUE, porque a urina fria é mais densa que a urina à temperatura ambiente (Wamsley & Alleman, 2007).

Os artefactos associados a um longo período de armazenamento à temperatura ambiente são o aumento da turvação da urina (devido ao sobrecrecimento bacteriano), aumento do pH (se existirem bactérias produtoras de ureases), diminuição do pH (se existirem bactérias que usam a glicose para formar metabolitos ácidos), diminuição da concentração de químicos que podem ser metabolizados por bactérias, aumento do número de bactérias no sedimento urinário ou alteração de resultados da cultura urinária. Além disso, o aumento do pH urinário, que pode ocorrer devido à perda de CO₂ ou ao sobrecrecimento bacteriano, pode causar falsos positivos no parâmetro da proteína na tira de urina, degeneração de células e cilindros e alteração do tipo e quantidade de cristais presentes (Wamsley & Alleman, 2007). Um estudo recente realizado

com cães e gatos mostrou que 28% das amostras armazenadas com cristalúria eram falsos positivos. Os autores desta investigação verificaram ainda que houve maior formação de cristais *in vitro* em amostras refrigeradas do que nas amostras à temperatura ambiente. Para além disso, a formação de cristais foi maior em amostras armazenadas durante 24 horas do que em amostras armazenadas durante 6 hora (Albasan, et al., 2003). Com estes dados, fica mais uma vez demonstrada a importância da realização das análises de urina o mais depressa possível após a colheita.

Albasan et al. (2003) verificaram que o tempo de armazenamento e a temperatura não têm um efeito significativo no pH nem na DUE. Segundos os estudos de Raskin, Murray e Levy (2002) e de Albasan et al. (2003), os valores de pH são estáveis em urinas refrigeradas até 24 horas. As urinas que são armazenadas à temperatura ambiente durante 4 horas não influenciam significativamente o rácio UPC, ao contrário daquelas que são armazenadas durante 12 horas. Assim, para evitar estes artefactos a urina deve ser armazenada a 4°C durante, no máximo, 3 dias ou então ser congelada (Rossi, et al., 2012).

As amostras que são para análise de urina de rotina não devem ser congeladas nem se deve adicionar conservantes químicos, pois estes alteram os diferentes componentes da análise de urina (Wamsley & Alleman, 2007). No entanto, Smets et al. (2010) verificaram que a concentração de albumina canina não sofre alterações na urina armazenada a -20°C durante 6 meses nem na urina armazenada a -80°C durante 12 meses. Contudo, se for armazenada a -20°C durante 12 meses, a concentração de albumina diminui significativamente.

3.2.3. Procedimento de análise de urina de rotina

O primeiro passo da análise de urina consiste na colheita de, pelo menos, 6ml de urina para um recipiente estéril, opaco e hermético. Se a amostra for enviada para um laboratório de referência, deve fazer-se o registo da seguinte informação: método e altura da colheita, volume urinário colhido, método de preservação usado, administração de medicações, dieta ou agentes de diagnóstico e informação sobre se o paciente estava ou não em jejum. Adicionalmente, deve rotular-se o recipiente com os dados do paciente. A amostra deve então ser analisada dentro de uma a duas horas. Se não for possível, pode refrigerar-se a amostra, que deve voltar à temperatura ambiente imediatamente antes de ser analisada. De seguida, deve misturar-se muito bem a amostra e transferir 5ml de urina para um tubo cónico de centrifugação. O volume restante deve ser armazenado no frigorífico para a realização de testes de confirmação adicionais. O primeiro componente da análise de urina é a avaliação das características físicas (registo da cor, aspeto e cheiro), que deve ser realizada dentro do tubo cónico. De seguida, faz-se a avaliação bioquímica com tiras de reagentes colorimétricos e um relógio para indicar os segundos. Mergulhar a

tira na urina ou colocar uma gota de urina em cada reagente da tira. Deve ter-se cuidado para não haver contacto prolongado da tira com a urina nem para haver mistura entre os diferentes reagentes. Para a realização de testes bioquímicos adicionais e do exame microscópico do sedimento, deve proceder-se à centrifugação da urina no tubo cónico durante 5 minutos a 400G (1500 rpm). Após a centrifugação, deve verificar-se se existe camada lipídica a flutuar em cima do sobrenadante e registar o seu volume aproximado. Remover a camada lípica do sobrenadante e descartá-la. Remover e guardar 4ml de sobrenadante noutra tubo para testes bioquímicos adicionais. Guardar o sedimento e o ml restante de sobrenadante para o exame microscópico. Os exames adicionais que se realizam nos 4ml de sobrenadante são a medição da DUE com o refratómetro e a medição das proteínas com o teste ASS. Se o resultado da DUE ultrapassar o limite superior do refratómetro deve medir-se novamente, com uma diluição de 1:1 em água e multiplicar os últimos dígitos da DUE por 2. Para o teste ASS, é necessário misturar bem partes iguais de sobrenadante e ácido sulfossalicílico a 5% num tubo transparente. Numa área bem limpa e contra fundo negro pode avaliar-se a formação de precipitado branco dentro do tubo e interpretar de acordo com a escala padrão. Para a preparação do sedimento para exame microscópico é necessário ressuspender o sedimento no ml de sobrenadante que ficou no tubo cónico. Misturar a solução agitando gentilmente o tubo cónico para evitar a degradação de cilindros. Pipetar uma gota de sedimento na lâmina e cobrir com uma lamela. Realizar o exame microscópico do sedimento urinário usando iluminação reduzida. Isto pode ser conseguido através da redução do condensador ou fechando a abertura do diafragma. Examinar 10 campos de baixa potência (ampliação de 100) para quantificar as seguintes substâncias: cristais, cilindros, células epiteliais e parasitas. Examinar 10 campos de alta potência (ampliação de 400) e confirmar as estruturas observadas no campo de baixa frequência, identificando e quantificando as seguintes substâncias: eritrócitos, leucócitos, microrganismos, lípidos, esperma ou outras estruturas não identificáveis. (Wamsley & Alleman, 2007)

3.2.4. Características físicas

3.2.4.1 Cor

A urina dos mamíferos é amarela devido à presença do pigmento de urocromio e a sua tonalidade pode variar consoante a concentração urinária. As urinas mais concentradas têm cor amarela-âmbar e as urinas diluídas têm uma cor amarela mais clara. A cor da urina nunca deve substituir o exame da DUE para avaliar a concentração urinária. As cores anormais que são mais vezes observadas são vermelho, castanho e preto, e devem-se sobretudo a hematúria, hemoglobinúria, mioglobinúria e bilirrubinúria (Chew & DiBartola, 1998). Se existir hematúria,

a urina aparece turva e, após centrifugação, o sobrenadante aparece translúcido. A urina vermelha ou vermelha acastanhada normalmente é causada por eritrócitos, hemoglobina ou mioglobina. A bilirrubina dá uma cor amarela escura ou castanha à urina. (Tripathi et al., 2011). Pode avaliar-se a cor do soro para descobrir a causa da alteração de cor da urina. Os pacientes com bilirrubinúria normalmente têm hiperbilirubinemia, enquanto os pacientes com hemoglobinúria têm soro rosado e com células que sofreram hemólise. Na presença de soro normal, deve ser realizado o teste de sulfato de amônio para detetar mioglobina (Bartges, 2010).

3.2.4.2 *Aspeto*

A urina normalmente é translúcida. No entanto, devido à precipitação de sais, pode tornar-se turva se for armazenada ou refrigerada durante algum tempo e por isso é recomendado que a avaliação do aspeto seja feita imediatamente a seguir à colheita (Tripathi et al., 2011). Tal como acontece com a cor, a urina pode estar mais turva quando é mais concentrada ou menos turva quando é mais diluída. Outros fatores que aumentam a turvação da urina são os leucócitos, eritrócitos, cristais, bactérias, muco, lípidos e contaminantes. Deve sempre despistar-se a causa de urina turva, através da análise do sedimento (Reine & Langston, 2005).

3.2.4.3 *Cheiro*

O cheiro anormal mais comum é amoniacal e deve-se à libertação de amónia por bactérias produtoras de ureases (DiBartola, 2010).

3.2.4.4 *Densidade urinária específica*

A medição da concentração urinária pode ser medida quer através da osmolalidade, quer através da densidade. A osmolalidade depende apenas do número de partículas presentes na solução e a sua medição é feita através da depressão do ponto de congelação e da redução da pressão de vapor. A densidade depende do número, tamanho e peso molecular das partículas presentes na solução, pois representa o rácio entre o índice refrativo da urina e o índice refrativo da água destilada. Embora a osmolalidade forneça um valor mais real da concentração urinária do que a densidade, esta é mais fácil de medir do que aquela (Archer, 2005). A urina normal é composta por partículas de peso molecular relativamente baixo e, nestes casos, a densidade não difere muito da osmolalidade. No entanto, se a urina tiver substâncias de elevado peso molecular como a glicose ou o manitol, estas substâncias vão ter um efeito muito maior na densidade do que na osmolalidade (DiBartola, 2010).

A DUE também pode ser calculada nas tiras de urina através da mudança de cor de um indicador de pH, o azul de bromotimol, mas este é impreciso na medicina veterinária e não está recomendado. O refratómetro é a melhor técnica para medir a DUE na prática clínica. (Archer, 2005).

Vários autores compararam a osmolalidade da urina de cães com a DUE obtida com o refratômetro e com as tiras urinárias, tendo concluído que o refratômetro deve ser utilizado quando não é possível calcular a osmolalidade e que as tiras de urina nunca devem ser utilizadas para a medição da DUE (Dossin, Germain, & Braun, 2003). A forte correlação entre a osmolalidade e a DUE calculada por refratômetro em urinas de cães com diversas afeções ficou também demonstrada noutro estudo, onde a cetonúria teve um efeito negativo nessa correlação (Ayoub, Beaufriere, & Acierno, 2013). A DUE deve ser medida antes de instituir tratamento, uma vez que a fluidoterapia, os diuréticos e os glucocorticóides podem alterar os resultados (DiBartola, 2010).

A urina pode ser classificada quanto à sua concentração como isostenúrica, hipostenúrica e hiperestenúrica. A definição de cada termo e os valores que lhes correspondem são apresentados na seguinte tabela (DiBartola, 2010).

Tabela 1: Classificação e definição da concentração urinária, avaliada através da osmolalidade e da DUE.

Classificação	Definição	Osmolalidade (mOsm/kg)	DUE
Isostenúria	Concentração de soluto total na urina é igual à concentração do filtrado glomerular	300	1.007-1.015
Hipostenúria	Concentração de soluto total na urina é inferior à concentração do filtrado glomerular	<300	<1.007
Hiperestenúria	Concentração de soluto total na urina é superior à concentração do filtrado glomerular	>300	>1.015

Os valores da DUE podem ir de 1.001 a 1.065 na maioria dos animais e até 1.080 no gato e para interpretá-los é necessário conhecer previamente o estado hídrico do paciente e qual foi a ingestão de água (Tripathi et al., 2011). Geralmente, considera-se que existe capacidade em concentrar urina quando a DUE é superior a 1.030 no cão e 1.035 no gato. Assim, se estes valores forem encontrados em animais azotémicos, indicam azotémia pré-renal. Se o animal estiver azotémico, mas apresentar densidade inferior a estes valores significa que a capacidade em concentrar urina é inadequada e, portanto, tem insuficiência renal aguda (IRA) (Tripathi et al., 2011). No entanto, alguns gatos com azotémia renal, ou seja, com 25% de função renal, mantêm a capacidade de conservar água e conseguem originar urinas concentradas com valores de DUE ≥ 1.035 . No caso da azotémia pós-renal, os valores de DUE são variáveis (Wamsley & Alleman, 2007).

A persistência de valores de densidade inferiores a 1.020 suporta a presença de poliúria e polidipsia (PU/PD) compensatória. Como a glicose e as proteínas podem sobrevalorizar a DUE, é necessário ter sempre em conta os seus resultados na tira de urina (Archer, 2005).

Concentrações urinárias anormais podem indicar insuficiência renal, diabetes *insipidus* central, diabetes *insipidus* nefrogénico ou doenças que causem poliúria e perda de tonicidade medular. Na doença renal, só é possível demonstrar a incapacidade do rim em concentrar urina quando existem mais de 2/3 (67%) de nefrónios disfuncionais. No entanto, a incapacidade em concentrar urina normalmente precede a azotémia, que surge quando 3/4 (75%) da função renal está afetada. No gato e nos estádios iniciais de doença glomerular primária, o aumento da ureia sérica pode ocorrer simultaneamente com concentrações anormais de urina (Tripathi et al., 2011).

A medição da DUE no sobrenadante, usando o refratómetro, é preferível uma vez que a densidade não é sobrevalorizada no caso de estarem presentes células, cristais ou bactérias na urina pois estas são separadas do sobrenadante, ficando depositadas no sedimento (Wamsley & Alleman, 2007). A urina felina é mais refratária que a urina canina e humana e por isso apresenta valores mais elevados de densidade se for usado o refratómetro de medicina humana. Pode usar-se um refratómetro de medicina veterinária que possui escalas para cães e gatos ou pode fazer-se a correção do valor indicado pelo refratómetro humano para o valor equivalente felino (George, 2001). A fórmula de conversão é a seguinte:

$$DUE_f = (0,846 \times DUE_h) + 0,154$$

Em que DUE_f é a densidade urinária felina e DUE_h é a densidade urinária humana.

3.2.5. Características químicas

O pH, a glicose, os corpos cetónicos, as proteínas, a creatinina, a bilirrubina, o sangue, a DUE, o urobilinogénio, os nitritos, e os leucócitos podem ser medidos através da utilização de tiras com reagentes colorimétricos, que fornecem resultados semi-quantitativos. No entanto, como as tiras foram feitas para medir constituintes da urina humana, alguns testes não são apropriados para o uso na urina dos animais, como é o caso da DUE, do urobilinogénio, dos nitritos e dos leucócitos (Archer, 2005). A alteração de cor nos diferentes reagentes do teste indica a presença ou ausência da substância analisada e fornece uma estimativa da sua quantidade. A interpretação dos resultados pode ser feita por análise visual ou através da utilização de aparelhos automatizados (Tripathi et al., 2011).

Os fatores que influenciam a análise da urina com as tiras incluem a exposição à luz ou a desinfetantes, leitura dos resultados num rótulo que não corresponde ao da caixa que contém as

tiras, saturação excessiva da tira com urina, que dilui os reagentes, e arrasto de urina dum reagente para outro. A tira deve ser analisada no tempo indicado porque a mudança de cor continua e as leituras atrasadas são inválidas (Wamsley & Alleman, 2007).

As amostras de urina turvas ou com sangue visível devem ser centrifugadas para se proceder ao exame químico com as tiras de reagentes colorimétricos no sobrenadante (Reine & Langston, 2005).

3.2.5.1 pH

O pH da urina é influenciado pela dieta, equilíbrio ácido-básico, infecção bacteriana e tempo de armazenamento. A urina dos cães e gatos normalmente é ácida, com valores de referência que variam consoante os autores: entre 6 e 7,5 (Tripathi et al., 2011) ou entre 5 e 7,5 (DiBartola, 2010).

A urina pode estar alcalina devido à administração de agentes alcalinizantes. Outras causas de urina alcalina incluem: alimentação recente ou à base de proteínas vegetais, alcalose metabólica ou respiratória, acidose tubular distal renal, infecção do trato urinário (ITU) com bactérias produtoras de ureases ou retenção urinária (decomposição da ureia em amónia). Pode ainda haver contaminação da urina por detergentes ou desinfetantes que provocam a alcalinização da urina. Se a urina for persistentemente alcalina e os artefactos tiverem sido excluídos, deve realizar-se urocultura e exame do sedimento (Archer, 2005).

A diminuição do pH da urina pode ser devida a dietas baseadas em proteína animal, administração de agentes acidificantes, acidose metabólica ou respiratória e estados de catabolismo proteico (Archer, 2005).

A medição do pH urinário é importante em animais com urolitíase, pois o pH afeta a solubilidade de vários tipos de cristais urinários (Reine & Langston, 2005).

Os reagentes utilizados nas tiras para medição do pH incluem o vermelho de metilo, azul de bromotimol e fenolftaleína, e todos eles conseguem detetar valores de pH entre 5 e 9 (Reine & Langston, 2005).

Alguns estudos mostraram que a medição do pH através das tiras é imprecisa quando comparada com a medição feita com medidor de pH. Portanto, deve utilizar-se o medidor de pH devidamente calibrado quando se pretendem valores de pH precisos para a tomada de decisão clínica (DiBartola, 2010). As tiras urinárias estimam o pH em uma unidade acima ou abaixo do valor medido pelo medidor de pH. Nos gatos, esta estimativa é subestimada e nos cães não há consistência de direcção no erro (Heuter, Buffington, & Chew, 1998). Num estudo que comparou a medição do pH da urina felina através do medidor de pH com as tiras de urina, concluiu-se que estas são úteis quando se pretende uma aproximação do pH, como, por exemplo, na análise

de urina de rotina, mas que não devem ser usadas quando se pretende uma monitorização rigorosa do pH (Raskin et al., 2002).

3.2.5.2 Glicose

Como a glicose é filtrada livremente no glomérulo e completamente reabsorvida nos túbulos, a sua presença na urina não é fisiológica. No entanto, se os valores de glicose sanguínea ultrapassarem o limiar renal, que é o valor a partir do qual os túbulos renais deixam de ter capacidade de reabsorção, ocorre glicosúria. A capacidade de transporte é ultrapassada quando a glicose sanguínea é superior a 180mg/dl no cão e superior a 280mg/dl no gato (Tripathi et al., 2011).

As tiras de glicose usam um teste colorimétrico que se baseia na reação enzimática da glicose-oxidase, específico para a glicose, e dão resultados positivos quando a sua concentração é superior a 100mg/dl. O teste da tira tem mais sensibilidade que os testes de redução, mas a deteção de glicose pode ser inibida pelo ácido ascórbico (vitamina C), formalina, e baixas temperaturas da urina. Também podem ocorrer falsos positivos na presença de agentes oxidantes, como por exemplo, o peróxido de hidrogénio ou lixívia (Tripathi et al., 2011).

A causa mais comum de glicosúria é a hiperglicémia que excede a capacidade de transporte de glicose nos túbulos. A hiperglicémia é causada por DM, stresse ou excitação em gatos e administração de dextrose. Também pode ocorrer glicosúria com normoglicémia devido à diminuição da reabsorção tubular de glicose. Nos cães, isto acontece na síndrome de *Fanconi* e na glicosúria renal primária devido a defeitos no transporte tubular (Archer, 2005). A glicosúria também pode estar presente em cães e gatos com DRC ou com lesões tubulares causadas por substâncias nefrotóxicas e ainda em alguns cães com doença renal familiar (DiBartola, 2010). A glicosúria persistente predispõe os pacientes a ITU, porque origina um meio propício ao desenvolvimento de bactérias. A presença de ITU pode não ser aparente no exame do sedimento, sendo por isso necessário realizar cultura urinária para poder excluir infeção. Os pacientes diabéticos podem estar imunodeprimidos e ter uma resposta inflamatória diminuída. Nestes casos, diz-se que a ITU é silenciosa porque não existe evidência de piúria. Além disso, a glicose é um diurético osmótico que origina grandes volumes de urina diluída e por isso pode dificultar a deteção de células e bactérias no exame microscópico do sedimento (Wamsley & Alleman, 2007).

3.2.5.3 *Corpos cetônicos*

À semelhança da glicose, os corpos cetônicos são filtrados livremente no glomérulo e completamente reabsorvidos no túbulo proximal. Os corpos cetônicos que se encontram na urina de cães e gatos são o ácido acetoacético, a acetona e o ácido β -hidroxibutirato. As tiras que medem os corpos cetônicos baseiam-se no método da reacção do nitroprussiato e detetam a acetona e o ácido acetoacético, mas não detetam o β -hidroxibutirato, que é o principal interveniente na cetose. São mais sensíveis para o ácido acetoacético do que para a acetona. Podem ocorrer falsos negativos quando a urina não é fresca ou quando a tira esteve muito tempo exposta à humidade, luz ou calor. Os falsos positivos são causados por grandes quantidades de bilirrubina ou de outras substâncias que alteram a cor da urina (Reine & Langston, 2005).

A cetonúria indica metabolização excessiva de lípidos e/ou deficiências no metabolismo dos hidratos de carbono (balanço energético negativo), não servindo como indicador de doença renal. A cetoacidose diabética (CAD), fome extrema, dietas ricas em gordura e pobres em hidratos de carbono e febre ou hipoglicémia persistentes representam situações que podem causar cetonúria (Tripathi et al., 2011). A cetonúria ocorre mais facilmente em animais jovens e das causas referidas a mais importante em cães e gatos é a CAD (DiBartola, 2010). À semelhança da glicosúria, a cetonúria também exerce um efeito diurético, originando grandes volumes de urina diluída e, por isso, os constituintes visíveis no sedimento podem também estar diluídos (Wamsley & Alleman, 2007).

3.2.5.4 *Proteínas*

A pequena quantidade de proteína que se encontra na urina em condições fisiológicas não é detetada pelos testes clínicos de rotina. A proteína *Tamm Horsfall* e a imunoglobulina A (IgA) sofrem secreção no túbulo, mas também não são detetadas nos testes. O aumento de proteína na urina pode causar a formação persistente de espuma, principalmente se a urina for agitada (Tripathi et al., 2011).

O teste da fita reativa urinária é semi-quantitativo e depende da capacidade de ligação do grupo amina das proteínas ao indicador de pH, o azul de tetrabromofenol, que muda de cor consoante a concentração de proteína. Como a albumina tem mais grupos amina livres, este teste é mais sensível para a albumina e, por isso, pode subestimar a concentração de outras proteínas, como, por exemplo, as globulinas e a hemoglobina. As fitas de reagentes colorimétricos também não detetam as proteínas *Bence Jones* (cadeias leves de imunoglobulinas presentes em animais com mieloma múltiplo) (Elliott & Grauer, 2007). O limite inferior de deteção deste teste é 30mg/dl. Os falsos positivos são frequentes em urinas alcalinas e muito concentradas. Pelo contrário, em urinas ácidas e diluídas podem ocorrer falsos negativos. A baixa concentração de proteína ou a

presença de proteínas *Bence Jones* na urina também podem dar origem a falsos negativos (Segev, 2010).

A albumina, as globulinas e as proteínas de *Bence Jones* são detetadas através do método de precipitação com ASS. Este teste também é semi-quantitativo e envolve a mistura de quantidades iguais de urina e de ácido sulfossalicílico a 5%. Após este processo, as proteínas sofrem desnaturação e formam um precipitado que torna a amostra turva (Archer, 2005). Após avaliação visual ou utilização de espectrofotometria, classifica-se a turvação numa escala de 0 a 4 +. Pode originar falsos positivos em urinas turvas, não centrifugadas ou contaminadas por agentes radiográficos e certos fármacos (penicilinas, cefalosporinas). Comparando com as fitas reativas, origina menos falsos negativos uma vez que tem maior sensibilidade (Elliott & Grauer, 2007). Por esta razão, é utilizado muitas vezes para confirmar resultados positivos na tira de urina. O limite inferior de deteção deste método é 5mg/dl (Segev, 2010).

Tem sido sempre recomendado que um resultado positivo nos testes semi-quantitativos seja avaliado tendo em conta a DUE e o sedimento urinário. Por exemplo, um resultado de proteinúria 1+ numa urina concentrada, normalmente, é atribuído à concentração urinária e não à existência anormal de proteína. Assim como um resultado positivo numa amostra com hematuria ou piúria, normalmente, é atribuído a hemorragia ou inflamação do trato urinário. No entanto, estas interpretações podem não ser as mais corretas, uma vez que um resultado positivo pode ser anormal, independentemente da concentração urinária (Grauer, 2011). Vaden, Pressler, Lappin e Jensen (2004) verificaram num estudo que nem todos os cães com hematuria microscópica e piúria apresentavam albuminúria.

Existe ainda um teste de rastreio relativamente recente (ERD[®] Health Screen, Heska Ltd.) para a deteção de pequenas concentrações de albumina urinária. Este é um teste imunológico muito sensível que utiliza anticorpos específicos para a albumina canina e felina, cujo limite inferior de deteção é 1mg/dl (Elliott & Grauer, 2007).

Se os resultados dos testes de rotina forem positivos para a proteinúria, então esta deve ser quantificada. A sua quantificação deve ser feita, idealmente, na urina colhida em 24 horas para eliminar a influência que a concentração urinária tem nos resultados da proteína. No entanto, este procedimento é dispendioso e difícil de colocar em prática na medicina veterinária, sendo utilizado apenas no âmbito de investigações científicas. Assim, a alternativa é a medição quantitativa das concentrações de proteína e de creatinina na urina. De seguida, calcula-se o rácio UPC (Elliott & Grauer, 2007). O rácio UPC tem uma forte correlação com a excreção de proteína em 24 horas em cães e gatos e pode ser usado para investigação do diagnóstico, intervenção terapêutica e monitorização de resposta ao tratamento (Segev, 2010). Valores abaixo de 0.5

são considerados normais em cães e gatos sem azotémia. Valores superiores a 0.5 no cão azotêmico e 0.4 no gato azotêmico devem conduzir a uma intervenção (Lees, Brown, Elliot, Grauer, & Vaden, 2005).

É possível ainda quantificar a albumina urinária em laboratórios de referência que realizam imunoensaios (Grauer, 2011).

3.2.5.5 Creatinina

Recentemente, foram desenvolvidas tiras urinárias que contêm um reagente que mede, de forma semi-quantitativa, a concentração de creatinina urinária. Aution Sticks 10PA[®], Microalbus-tix[®] e Multistix PRO[®] são algumas das marcas registradas que medem a creatinina na urina e que foram avaliadas em vários estudos de medicina veterinária (Welles, Whatley, Hall & Wright, 2006; Bauer, Rettig & Moritz, 2008; Defontis, Bauer, Failing & Moritz, 2013;). O método utilizado pelas tiras Aution Sticks 10PA[®] é a competição por quelatos, em que a creatinina reage com compostos de paládio, alterando a cor do teste de azul para amarelo. As tiras Microalbus-tix[®] e Multistix PRO[®] baseiam-se na atividade semelhante à peroxidase de um complexo de creatinina e cobre, resultando na alteração de cores de laranja para verde e de verde para azul.

3.2.5.6 Bilirrubina

A bilirrubina é o resultado da desintegração do grupo heme no sistema reticuloendotelial. O grupo heme é obtido principalmente a partir de eritrócitos senescentes na medula óssea e no baço. Nestes órgãos, o complexo enzimático heme oxigenase cataboliza a hemoglobina e origina biliverdina. A biliverdina é convertida em bilirrubina, através da ação da biliverdina reductase, que se conjuga com a albumina e é transportada na circulação. No fígado, a bilirrubina sofre conjugação e excreção para a bÍlis (DiBartola, 2010). A bilirrubina conjugada é excretada principalmente pela bÍlis para o trato gastrointestinal (TGI), onde é desconjugada pela ação bacteriana, dando origem ao urobilinogénio. A maior parte do urobilinogénio é reabsorvido para a circulação enterohepática e a parte restante é excretada nas fezes e na urina (Watson, 2014). Além da excreção no TGI, a bilirrubina também sofre excreção através dos rins para a urina (Wamsley & Alleman, 2007). A bilirrubina conjugada consegue passar através do glomérulo para o filtrado glomerular, ao contrário da bilirrubina não-conjugada, que não é filtrada por estar ligada à albumina. No entanto, se existir doença glomerular tanto a albumina como a bilirrubina não-conjugada podem ser filtradas (Archer, 2005).

Os gatos saudáveis não têm bilirrubina na urina, ao contrário dos cães. Os cães que se apresentam clinicamente normais, para além de terem um limiar renal para a bilirrubina muito baixo, formam bilirrubina conjugada, nas células epiteliais tubulares, a partir da hemoglobina. Esta bilirrubina é excretada em pequena quantidade na urina concentrada (DUE>1.030), na ausência

de doenças associadas a icterícia. Para determinar o significado clínico de bilirrubinúria nos cães é necessário ter em conta a DUE. Se um cão tiver bilirrubinúria e DUE baixa é mais provável que tenha doenças associadas a icterícia do que um cão com bilirrubinúria e DUE normal. É aceite para as duas espécies que, nas doenças que provocam icterícia, o excesso de bilirrubina seja detetado primeiro na urina, depois no plasma e finalmente se torne visível nas mucosas (Wamsley & Alleman, 2007).

Os testes bioquímicos que detetam bilirrubina na urina são realizados como rastreio de doenças hemolíticas ou hepatobiliares. As tiras usam o método de diazotização que reage com a bilirrubina conjugada e é muito insensível à bilirrubina não-conjugada. Os falsos negativos podem surgir em urinas com grande quantidade de ácido ascórbico ou nitritos e se houver um grande atraso na realização da análise. Os falsos positivos podem ocorrer se tiver sido administrada uma dose elevada de fenotiazina. A sensibilidade do reagente para a bilirrubina encontra-se entre os 0,4 e os 0,8 mg/dl (Reine & Langston, 2005).

Um resultado positivo para a bilirrubina indica obstrução ao fluxo de bÍlis e regurgitação de bilirrubina conjugada para o sangue. No entanto, a hemoglobínúria também pode causar um resultado positivo, pois há maior produção de bilirrubina conjugada nas células tubulares. Outra das causas de bilirrubinúria é a hemólise intravascular devido ao aumento de conjugação da bilirrubina no fígado (Tripathi et al., 2011). As doenças hepáticas, a febre e a fome extrema também podem causar bilirrubinúria (DiBartola, 2010). É preciso ter atenção aos resultados negativos, pois há uma grande taxa de falsos negativos e, por isso, não se deve excluir a possibilidade de doenças associadas a icterícia (Wamsley & Alleman, 2007).

3.2.5.7 *Sangue*

A hemoglobina tem que exceder a capacidade de ligação da haptoglobina para se dividir em dímeros e poder ser filtrada no glomérulo. Para ocorrer hemoglobínúria, estes dímeros têm ainda de ultrapassar a capacidade de reabsorção dos túbulos. A mioglobina é 4 vezes mais pequena que a hemoglobina e é filtrada livremente (DiBartola, 2010).

O teste da tira baseia-se nas propriedades tipo peroxidase da hemoglobina e mioglobina que causam alteração de cor no reagente da tira urinária. Este teste é muito mais sensível para a hemoglobina do que para eritrócitos intatos e não distingue eritrócitos, hemoglobina nem mioglobina. Por isso, um resultado positivo tem que ser interpretado com base nos achados do exame do sedimento (DiBartola, 2010). O teste consegue detetar aproximadamente 0,05 até 0,3 mg de hemoglobina por dl de urina, que é o equivalente a 10.000 eritrócitos que sofreram lise por ml de urina ou a 3 eritrócitos que sofreram lise por campo de alta potência (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). Ter em conta que os agentes oxidativos podem originar falsos positivos

(Tripathi et al., 2011). Os falsos negativos podem ocorrer se os eritrócitos ficarem no topo da amostra, levando a divergências entre os resultados na tira e no sedimento (Reine & Langston, 2005).

A hematúria caracteriza-se por urina vermelha e turva, que normalmente fica mais clara após a centrifugação, pela ausência de evidência clínica ou laboratorial de anemia hemolítica ou doença muscular e pela presença de eritrócitos no sedimento (Tripathi et al., 2011). Pode indicar afeções no trato urinário inferior (infecção, inflamação, neoplasia), no trato genital ou no trato urinário superior (pielonefrite, nefropatia com perda de proteína, neoplasia) (Reine & Langston, 2005).

A hemoglobinúria origina urina vermelha a castanha que não fica mais clara após a centrifugação. Além disso, no sedimento não existem eritrócitos e o plasma aparece colorado de vermelho devido à hemoglobinemia. Há evidência de anemia, principalmente do tipo hemolítico, e ausência de evidência clínica e laboratorial de doença muscular (Tripathi et al., 2011). A hemoglobina livre é o pigmento anormal mais comum na urina e é causada por hemólise. A hemólise pode ocorrer devido a uma reação transfusional, a anemia hemolítica autoimune (AHAI), a coagulação intravascular disseminada (CID), a síndrome pós-cava devido a dirofilariose, torção esplênica e golpe de calor. (DiBartola, 2010).

A mioglobínúria caracteriza-se também por uma urina vermelha a castanha que não fica mais clara após centrifugação, pela ausência de eritrócitos no sedimento, pelo plasma claro de cor normal, pela ausência clínica ou laboratorial de anemia e pela evidência clínica ou laboratorial de doença muscular (Tripathi et al., 2011). A mioglobínúria é menos frequente que a hemoglobinúria e pode acontecer devido a rabdomiólise grave (Reine & Langston, 2005). Se for necessário, pode diferenciar-se hemoglobinúria de mioglobínúria através da realização de testes especializados em laboratórios de referência, como a eletroforese ou a precipitação de sulfato de amônio (Wamsley & Alleman, 2007).

3.2.6. Exame do sedimento urinário

O exame do sedimento deve ser feito em amostras de urina frescas porque os cilindros e outros elementos celulares degradam-se rapidamente à temperatura ambiente (DiBartola, 2010).

Para realizar a separação do sedimento da urina tem que se recorrer a velocidades baixas de centrifugação (1000-1500 rpm) para não destruir os componentes da urina. Decanta-se o sobrenadante e mistura-se gentilmente o sedimento com o restante da urina. As tiras de reagentes podem ser utilizadas no sobrenadante obtido. A quantidade de sedimento que se deve obter está relacionada com o volume e concentração da urina que foi centrifugada, por isso deve ser sempre usado um volume certo de urina. Os laboratórios podem usar volumes de urina que variam

(10 ml, 5 ml, 3 ml) ou podem optar por lâminas descartáveis com grelha que suportam um volume constante de urina (0,5 ml) (Tripathi et al., 2011).

É colocada uma gota de sedimento (depois de ser ressuspendido) numa lâmina e é coberta por uma lamela para exame microscópico. Para analisar o sedimento sem estar corado é necessário recorrer à microscopia de contraste de fase, baixando o condensador e fechando o diafragma. No campo de baixa potência (ampliação de 100) devem procurar-se os cilindros urinários. No campo de alta potência (ampliação de 400) conta-se o número de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais e bactérias por campo. É aconselhado contar-se 5 a 10 campos diferentes e fazer-se a média dessas contagens (Archer, 2005).

Os resultados obtidos no exame do sedimento urinário devem ser sempre interpretados tendo em conta o método de colheita, os resultados obtidos na tira e a DUE (Tripathi et al., 2011).

Para evitar erros de diluição, tem que ser usado um volume urinário padrão para centrifugação e o sedimento resultante tem que ser suspenso num volume padrão de sobrenadante. O volume de sobrenadante normalmente representa 20% do volume urinário usado para centrifugação, que, por sua vez, é 5 ml. Há sistemas comerciais de centrifugação de urina (Statspin®) que usam volumes mais pequenos para preparar sedimentos para o exame microscópico. Para avaliar células nucleadas é preferível usar preparações coradas, mas antes de corar deve ser feita a sua contagem porque a adição de corante provoca a diluição do sedimento. Além disso, as preparações coradas podem formar cristais ou estar contaminadas por microrganismos, dando origem a falsos positivos. Para evitar este problema, deve verificar-se se os cristais ou microrganismos também estão presentes em preparações não coradas (Wamsley & Alleman, 2007).

Foram realizados alguns estudos que avaliaram a precisão da deteção de bacteriúria através da análise microscópica do sedimento seco e corado com coloração modificada de *Wright* (Diff-Quick®) e com coloração *Gram* (Harleco® Gram stain kit). Swenson, Boisvert, Gibbons-Burgener e Kruger (2011) concluíram que o método de coloração modificada de *Wright* é um teste de rastreio excelente para a deteção de bacteriúria em cães e gatos. Os dados analisados pelos mesmos autores, mas num estudo anterior (2004), mostraram que a análise do sedimento corado com coloração modificada de *Wright* tem maior especificidade e maior percentagem de classificações corretas da morfologia das bactérias do que a análise do sedimento não corado, facilitando a escolha empírica de antibióticos apropriados. O outro estudo que avaliou a precisão da coloração *Gram* do sedimento na deteção de bacteriúria em cães, obteve resultados semelhantes, com a vantagem de distinguir bactérias *Gram* positivas de *Gram* negativas (Way, Sullivan, Johnson, & Morley, 2013).

3.2.6.1 Células epiteliais

Podem ter origem no rim, ureteres, bexiga, uretra e trato reprodutivo e podem ser escamosas, epiteliais de transição e epiteliais renais (Tripathi et al., 2011).

As células epiteliais escamosas são grandes e apresentam margens irregulares e angulares com núcleos pequenos. Estas células descamam a partir da uretra, vagina ou prepúcio e são indicadoras de contaminação. São comuns em amostras de urina colhidas por jato livre e cateterização e podem ter bactérias na sua superfície (Tripathi et al., 2011).

As células epiteliais de transição têm um núcleo central e citoplasma abundante, variam de tamanho e podem ser ovais, em forma de fuso ou caudadas. Têm origem na uretra proximal, bexiga, ureteres e bacinete renal e não têm grande valor de diagnóstico, a não ser que exista carcinoma das células de transição. O seu número pode aumentar se existir infecção ou irritação do trato urinário (Tripathi et al., 2011).

As células epiteliais renais têm um núcleo grande e pouco citoplasma, são pequenas, redondas e ligeiramente maiores que os leucócitos, originando-se nos túbulos renais. Normalmente são degenerativas e podem ser difíceis de encontrar e de distinguir dos leucócitos (Tripathi et al., 2011). A origem renal destas células só pode ser determinada se forem observadas em cilindros celulares. As células epiteliais neoplásicas são identificadas mais facilmente se forem usados corantes convencionais de células sanguíneas (DiBartola, 2010).

3.2.6.2 Eritrócitos

Os eritrócitos são redondos a bicôncavos, ligeiramente refratários e sem estrutura interna. Os valores normais de eritrócitos são: entre 0-8/campo em urinas colhidas por jato livre, entre 0-5/campo em urinas colhidas por cateterização e entre 0-3/campo em urinas colhidas por cistocentese (DiBartola, 2010). Pode haver um aumento ligeiro do número de eritrócitos na urina colhida por cistocentese ou na urina de fêmeas inteiras colhida por jato livre (Archer, 2005). Se houver suspeita de hematúria iatrogénica, deve repetir-se a colheita de urina passado alguns dias para avaliar a presença de eritrócitos no sedimento (Reine & Langston, 2005).

Um número excessivo de eritrócitos denomina-se hematúria, que pode ser microscópica ou macroscópica. A hematúria macroscópica é facilmente reconhecida pelos donos do paciente, mas para detetar hematúria microscópica é essencial recorrer ao exame do sedimento. A hematúria pode ter origem no trato urinário devido a trauma, urolitíase, neoplasia, doença inflamatória, parasitas, coagulopatias, enfarte renal, hematoma do bacinete renal ou má-formação vascular. O estro ou algumas lesões traumáticas, neoplásicas ou inflamatórias do trato genital podem contaminar a urina e causar hematúria (DiBartola, 2010). Outras situações responsáveis por hemorragias sistémicas, como o exercício físico intenso e o golpe de calor, também podem

causar hematúria. Nos cães da raça *Welsh Corgi Cardigan* com telangiectasia renal e da raça *Weimaraner* com hematúria renal também podem estar presentes eritrócitos no sedimento (Grauer, Urinary tract disorders, 2009)

Em urinas concentradas, os eritrócitos aparecem muitas vezes contraídos e em urinas diluídas podem sofrer lise ou ingurgitar. Em urinas antigas ou alcalinas, os eritrócitos também sofrem deterioração. As gotículas de gordura e leveduras podem ser confundidas com os eritrócitos. No entanto, as gotículas de gordura são mais refratárias e menos densas que os eritrócitos e as leveduras são ovais e muitas vezes apresentam gemulação (Tripathi et al., 2011).

3.2.6.3 Leucócitos

Os leucócitos, principalmente os neutrófilos, são redondos e granulares. São maiores que os eritrócitos, mas mais pequenos que as células epiteliais. Decompõem-se em urinas antigas e podem sofrer lise em urinas alcalinas ou hipotónicas. Existem em pequenos números na urina colhida por jato livre. (Tripathi et al., 2011). Os valores normais de leucócitos são: entre 0-8/campo em urina colhida por jato livre, entre 0-5/campo em urina colhida por cateterização e entre 0-3/campo em urina colhida por cistocentese (DiBartola, 2010).

Um aumento do número de leucócitos no sedimento denomina-se piúria. Mais de 5 leucócitos por campo de alta potência é indicativo de inflamação ou infeção renal ou do trato urogenital. A presença de leucócitos não ajuda a localizar a lesão, a não ser que estejam presentes cilindros leucocitários, que indicam origem renal. A ITU é a causa mais comum de piúria, mas pode haver contaminação da urina pelo trato genital em amostras colhidas por jato livre ou por cateterização (DiBartola, 2010).

3.2.6.4 Cilindros urinários

Os cilindros são estruturas alongadas compostas por uma matriz de proteína *Tamm Horsfall*, uma mucoproteína de peso molecular elevado que é produzida pelas células epiteliais do túbulo distal renal. A secreção e precipitação desta proteína é maior no tubo ascendente da ansa de *Henle* e nos túbulos distais devido à máxima acidez, maior concentração de soluto e menor taxa de fluxo nesta área. O aumento da mucoproteína favorece o aumento da formação de cilindros. A presença de cilindros no sedimento indica o tipo de atividade existente no rim e a localização do problema (DiBartola, 2010). Os cilindros são excretados na urina de forma intermitente e desintegram-se rapidamente em urina alcalina ou antiga, podendo por isso não ser observados. Assim, a ausência de cilindros não exclui doença renal (Tripathi et al., 2011).

Podem existir 1-2 cilindros por campo de baixa potência em urinas normais. A excreção de um número anormal de cilindros na urina é chamada de cilindrúria. Apesar dos cilindros indicarem

alteração tubular, eles não indicam a gravidade da alteração. Os cilindros são classificados de acordo com a composição da substância presente em maior número. Os tipos de cilindros observados no sedimento urinário são hialinos, granuloso, celulares, cerosos e lipídicos (DiBartola, 2010).

Os cilindros hialinos são compostos principalmente pela mucoproteína *Tamm Horsfall* e albumina. São incolores, homogêneos e semitransparentes, sendo difíceis de detectar se não forem corados. A sua presença é comum em doenças renais associadas a proteinúria, como por exemplo, a glomerulonefrite e a amiloidose glomerular. No entanto, podem ser observados pequenos números de cilindros hialinos quando há febre ou exercício intenso (Tripathi et al., 2011). A sua presença não indica a origem da proteína (Reine & Langston, 2005).

Os cilindros granuloso são os mais comuns, compostos por mucoproteína, proteínas plasmáticas, células degeneradas e detritos tubulares, estando presentes em situações de lesão tubular por fármacos nefrotóxicos, por nefropatia induzida por hemoglobínúria ou mioglobínúria e por isquemia renal (Tripathi et al., 2011).

Os cilindros celulares contêm células que sofreram descamação nos túbulos renais e podem ser leucócitos, quando há inflamação renal, eritrócitos, quando há inflamação e hemorragia, ou células epiteliais, quando há lesão grave nos túbulos (Tripathi et al., 2011).

Os cilindros cerosos são estruturas com extremidades quadradas que indicam lesões tubulares crônicas, estase urinária grave e prognóstico fraco. Representam o estágio final da degeneração dos cilindros granuloso (Tripathi et al., 2011).

Os cilindros lipídicos contêm gotículas de gordura que tiveram origem na degeneração das células epiteliais tubulares. Podem ser visualizados quando há síndrome nefrótica, embora sejam mais observados em gatos com lesão tubular e em cães com DM (Tripathi et al., 2011).

Podem ocorrer ainda agregações de cristais amorfo com detritos, bactérias e outras estruturas que não se depositam na matriz proteica e que mimetizam os verdadeiros cilindros (Tripathi et al., 2011).

3.2.6.5 Cristais

A presença de cristalúria é influenciada pelo pH, DUE, saturação urinária com minerais e pela presença de promotores ou inibidores da formação de cristais. Os pacientes com urina muito concentrada, com grande concentração de substâncias cristalogênicas e fluxo urinário diminuído têm maior predisposição para a formação de cristais (Reine & Langston, 2005). A cristalúria indica saturação da urina com minerais, mas nem sempre é indicativa de urolitíase. A solubilidade dos cristais depende do pH da urina, da temperatura e da DUE. Os cristais estão frequentemente presentes na urina de cães e gatos e normalmente não têm valor diagnóstico. Os cristais

são identificados através da sua forma, cor e solubilidade em soluções alcalinas ou ácidas (DiBartola, 2010).

Os cristais que fazem parte dos urólitos são: fosfato de amónio magnesiano (também denominado por fosfato triplo e estruvite), oxalato de cálcio, fosfato de cálcio, urato, cistina, sílica e carbonato de cálcio. Os cristais encontrados no sedimento urinário incluem urato de amónio, uratos ou fosfatos amorfos, bilirrubina, carbonato de cálcio, oxalato de cálcio, colesterol, cistina, fármacos, fosfato de amónio magnesiano, tirosina e ácido úrico (Tripathi et al., 2011).

Os cristais de estruvite e de oxalato de cálcio podem estar presente em animais saudáveis e são os mais comuns. Os cristais de estruvite formam-se em urinas alcalinas que podem ser formadas com a presença de bactérias produtoras de ureases na ITU. Os cristais de fosfato de cálcio e de oxalato de cálcio podem ter origem em hipercalcémias (Archer, 2005). Os cristais de oxalato de cálcio monohidratado são comuns na toxicose por etilenoglicol ou noutras intoxicações por oxalatos. Os cristais de oxalato de cálcio dihidratado encontram-se na urina de indivíduos saudáveis e ocasionalmente na toxicose por etilenoglicol. No entanto, pode ocorrer toxicose por etilenoglicol sem formação de cristalúria por oxalatos. Os cristais de colesterol estão associados à degradação das membranas celulares e com algumas doenças renais. Os cristais de cistina resultam do metabolismo alterado das proteínas e têm forma hexagonal. A sua presença na urina de cães e gatos não é normal e é sugestiva de cistinúria. Os cristais de tirosina podem estar associados a doença hepática no cão. Os cristais de ácido úrico podem ser encontrados na urina de cães e gatos com lesão hepática grave ou *shunts* porto-sistémicos, sendo muito frequentes na urina de Dálmatas devido a um defeito metabólico desta raça. Os uratos de amónio podem estar presentes em doenças que causem aumento nos níveis de amónio e têm aspeto de esfera amarela a castanha com projeções pontiagudas e irregulares. Os uratos e fosfatos amorfos são agregados mal definidos de cristais. Os cristais de bilirrubina são amarelos a âmbar e são muito comuns em urinas concentradas de cães. O carbonato de cálcio tem forma esférica com raios a irradiar (Tripathi et al., 2011).

3.2.6.6 Lípidos

A lipidúria é representada por gotículas de tamanho variável, altamente refratárias e que aparecem num plano de foco diferente do das células e cilindros, porque são menos densas que a água. Podem ser coradas diretamente com o *Sudan III* e normalmente não têm significado patológico. Aparecem frequentemente na urina de gatos devido ao conteúdo altamente lipídico das células epiteliais tubulares (Tripathi et al., 2011).

3.2.6.7 Bactérias

Podem ser bacilos, em forma de bastonete, únicos ou agrupados em cadeia. São identificados facilmente no sedimento não corado e normalmente estão acompanhados de leucócitos. Os cocos, redondos, são mais difíceis de identificar em preparações não coradas, a não ser que estejam agrupados em cadeia. As preparações com coloração modificada de *Wright*, *Gram* ou de *Romanowsky* são preferíveis para detectar bactérias, principalmente se forem cocos. Para detectar bactérias microscopicamente é necessário que existam mais de 30.000 bastonetes por ml e um número ainda maior de cocos. Em condições normais, a urina é estéril desde o rim até meio da uretra, portanto se houver bactérias em amostras de jato livre significa que houve contaminação pela flora normal do trato genital ou da uretra distal. Esta contaminação também pode ocorrer em amostras obtidas a partir de cateterização, principalmente nas fêmeas. No entanto, a contaminação a partir da uretra em amostras colhidas por jato livre ou por cateterização normalmente não causa um número suficientemente grande de bactérias que possam ser visualizadas microscopicamente no exame do sedimento. Se houver bactérias no sedimento de urina colhida por cistocentese, indica infecção significativa. A presença de piúria na mesma amostra apoia a descoberta de bacteriúria. A ausência microscópica de bactérias no sedimento não exclui ITU e, por isso, é necessário recorrer à cultura de urina e obter resultados quantitativos e qualitativos (Tripathi et al., 2011).

As ITU são muito comuns em cães e as que são recorrentes, normalmente, são acompanhadas por algum defeito metabólico ou estrutural que explica a recorrência. Devem ser realizadas análises de urina e urocultura de rotina em cães com DM, hiperadrenocorticismismo e DRC. Ao contrário dos cães, a incidência de ITU em gatos é bastante baixa quando comparada com a incidência de sinais do trato urinário inferior. No entanto, é recomendado que se façam análises de urina e urocultura com alguma frequência em gatos com DM e DRC, independentemente dos sinais clínicos (Reine & Langston, 2005).

3.2.6.8 Outros

Certos organismos como nemátodes, leveduras e fungos podem ser identificados ocasionalmente. Os ovos de parasitas (*Stephanurus dentatus*, *Diocetophyma renale*, e *Capillaria plica*) e as microfilárias (*Dirofilaria immitis*) são observados muito raramente. Podem ser encontradas hifas segmentadas ou leveduras em gemulação. A infecção por *Aspergillus* e as infecções por leveduras normalmente só acontecem em animais com imunossupressão. Podem ser encontrados fungos na bexiga de pacientes com micoses sistêmicas. O esperma pode ser observado em amostras de urina colhida por jato livre em machos ou em fêmeas recentemente inseminadas.

O muco é semelhante a filamentos homogêneos, estreitos e torcidos como uma fita, podendo indicar irritação uretral ou secreções genitais (Tripathi et al., 2011).

3.3. ABORDAGEM CLÍNICA E AVALIAÇÃO LABORATORIAL DE DOENÇA RENAL

Quando ocorre alteração funcional ou morfológica de qualquer tamanho ou gravidade nos rins diz-se que existe doença renal. Na verdade, sabe-se que pode haver doença renal significativa que não se traduz em sinais clínicos nem laboratoriais. Isto acontece devido à grande capacidade de reserva que o rim possui. Quando esta capacidade é ultrapassada e ocorre uma perda substancial de nefrônios funcionais, diz-se que existe insuficiência renal. Na insuficiência renal, surgem os sinais clínicos e as alterações laboratoriais causadas pela diminuição da função renal (Tripathi et al., 2011). A insuficiência renal é uma síndrome clínica caracterizada por retenção de solutos nitrogenados e desequilíbrios hídricos, eletrolíticos ou ácido-básico. Para que isto aconteça, tem que existir a perda de 75% dos nefrônios funcionais. Uma das características clínicas da insuficiência renal é a azotémia. A azotémia é o aumento de concentração de compostos nitrogenados não proteicos no sangue, nomeadamente, a ureia e a creatinina. A azotémia pode ser pré-renal, em que há diminuição da perfusão renal, pode ser pós-renal, em que há diminuição da excreção de urina para fora do organismo, ou pode ser renal, em que há efetivamente alteração do parênquima renal. A urémia refere-se ao conjunto de manifestações clínicas e alterações laboratoriais associadas à perda crítica de nefrônios e inclui as manifestações extra-renais da insuficiência renal (DiBartola, 2010).

Quando se pretende despistar doença renal num animal, a primeira coisa a fazer é o levantamento de dados básicos como a sua idade, raça e sexo. Deve tentar perceber-se se a queixa atual é aguda ou crónica, se está a melhorar, estável ou a piorar e qual a resposta à terapêutica. Relativamente à história clínica do trato urinário, saber quais foram as alterações na ingestão de água, frequência e volume urinários. Sabe-se que a ingestão de água não deve exceder 80ml/kg/dia nos cães nem 40ml/kg/dia nos gatos e que o volume urinário normal em cães e gatos situa-se entre 20 a 40ml/kg/dia. Na anamnese deve ainda abordar-se a possibilidade de existência de polaquiúria, disúria ou hematúria, que representam sinais clínicos característicos de doença do trato urinário inferior. É ainda importante, saber se houve algum contacto com tóxicos ou administração de certos fármacos (glucocorticóides, diuréticos) (DiBartola, 2010). No exame físico geral, deve ver-se o estado de hidratação do animal, a presença ou ausência de edemas ou ascite, analisar-se a cavidade oral e fazer-se o exame do fundo do olho (DiBartola, 2010).

Na palpação dos rins, pode avaliar-se o seu tamanho, forma, consistência, dor e localização. Na palpação da bexiga pretende-se avaliar o grau de distensão, dor, grossura da parede e presença de massas. Nos machos, pode fazer-se o exame retal para avaliar a próstata e uretra pélvica e também a exteriorização do pénis e avaliação dos testículos. Nas fêmeas, pode realizar-se um exame vaginal para avaliar corrimentos, massas e aparência do orifício uretral (DiBartola, 2010).

A distinção entre IRA e DRC às vezes é difícil, mas é muito importante porque a IRA pode ser reversível, ao contrário da DRC (DiBartola, 2010). A IRA desenvolve-se em poucas horas ou dias, os rins estão aumentados, há hemoconcentração, boa condição corporal, sedimento urinário ativo, hipercalémia e acidose metabólica relativamente graves e sinais clínicos graves consoante o grau de azotémia. A DRC desenvolve-se num período de semanas, meses ou anos e os sinais clínicos normalmente são pouco graves para a magnitude da azotémia. Normalmente, há história de perda de peso e PU/PD, má qualidade da pelagem, os rins são pequenos e irregulares e pode haver fibrodistrofia óssea devido a hiperparitiroidismo secundário. A anemia não regenerativa também costuma estar presente na DRC (Grauer, Urinary tract disorders, 2009)

Os testes laboratoriais mais úteis para a investigação de uma suspeita de alteração renal são: perfil bioquímico sérico e análise de urina completa. Devem ser realizados em conjunto, uma vez que o diagnóstico preciso de alterações renais é obtido com informação recolhida quer a partir de análises sanguíneas, quer a partir de análises urinárias (Squires, 2005).

3.3.1. Avaliação da função glomerular

A avaliação precisa da função glomerular é conseguida através da determinação da TFG, porque esta relaciona-se diretamente com a massa renal que é funcional. Todos os testes para determinar a TFG são afetados pela diminuição da perfusão renal. A substância ideal para a medição da TFG deve ser exclusivamente depurada através de filtração glomerular e não pode ser nem reabsorvida nem secretada pelos túbulos renais. A estimativa da TFG através da determinação da depuração de creatinina endógena é imprecisa porque, além desta sofrer secreção tubular e excreção extra-renal, há medição de cromogéneos sanguíneos que mimetizam a creatinina. Também se pode medir a depuração de creatinina exógena e do isohexol. A medição mais precisa da TFG faz-se através da medição da depuração da inulina, mas esta só está disponível em grandes centros de investigação (Tripathi et al., 2011). A taxa de depuração de creatinina endógena varia entre 3-5 ml/min/kg no cão e 2-4 ml/min/kg no gato. A de creatinina exógena varia entre 3,5 e 4,5 ml/min/kg no cão e 2,4 e 3,3 ml/min/kg no gato. A de isohexol varia entre 1,7-4,1 ml/min/kg no cão e 1,3-4,2 ml/min/kg no gato. A depuração do isohexol pode ser calculada através da medição da sua concentração no plasma 5 e 120 minutos após a sua administração nos cães e 20 e 180 minutos após a sua administração em gatos (DiBartola, 2010).

Na prática clínica, a concentração sérica de ureia e creatinina é normalmente usada para avaliação de rotina, enquanto o teste de depuração da creatinina endógena é usado para avaliar a função renal em animais que apresentam valores de ureia e creatinina normais (DiBartola, 2010). A depuração de creatinina endógena é usada também, embora menos frequentemente, para quantificar melhor a função glomerular em animais com azotemia, porque nos estádios avançados de doença renal há aumentos significativos de creatinina sérica que são acompanhados por uma diminuição da TFG pouco significativa (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). A depuração de radioisótopos e cintigrafia renal são técnicas sofisticadas para determinar a TFG que não exigem colheita de urina. A avaliação da excreção de proteína pode ser usada para avaliar doenças glomerulares (glomerulonefrite, amiloidose glomerular). A utilização de radioisótopos e cintigrafia renal é menos precisa que os métodos de depuração plasmática (creatinina exógena, iohexol), mas é mais útil para avaliar a função renal individualmente (DiBartola, 2010).

3.3.1.1 Ureia sérica

A ureia é o principal resíduo azotado dos mamíferos e é excretada quase exclusivamente na urina (Squires, 2005). Existe uma pequena quantidade de ureia que é ingerida e absorvida pelo intestino grosso. No entanto, não é possível encontrá-la nas fezes porque é absorvida ou convertida em amônia pelas bactérias que contêm ureases. A maior parte da ureia plasmática é sintetizada no fígado. Neste órgão ocorre o ciclo de ureia que produz ureia a partir do CO₂ e da amônia, que é um resíduo do catabolismo proteico (Tripathi et al., 2011).

A ureia é uma molécula pequena, sem carga e não se encontra ligada a proteínas. Assim, ao entrar na circulação, difunde-se pelo compartimento hídrico do organismo e em 90 minutos atinge o equilíbrio. Como a ureia é livremente filtrada pela membrana glomerular, a sua concentração no filtrado glomerular é igual à concentração plasmática. A filtração de ureia é um processo que não requer gasto de energia e portanto um aumento da concentração de ureia no sangue é resultado da diminuição da filtração glomerular. Ou seja, a concentração de ureia sérica é inversamente proporcional à TFG (Tripathi et al., 2011). Quando a TFG de cães e gatos diminui 25%, a concentração sérica de ureia ultrapassa o limite superior do intervalo de referência (Squires, 2005). Após a filtração, a ureia difunde-se passivamente com a água a partir do lúmen tubular para o sangue. A quantidade de ureia reabsorvida está inversamente relacionada com a taxa de fluxo urinário nos túbulos. Assim, se o fluxo sanguíneo diminuir (desidratação, obstrução) há mais reabsorção de ureia e a concentração de ureia no sangue aumenta (Tripathi et al., 2011). Pelo contrário, se o fluxo sanguíneo aumentar (fluidoterapia endovenosa) há menos reabsorção de ureia e a concentração sérica diminui, fornecendo uma melhoria artificial da

função renal (Squires, 2005). Por isso, não serve como estimativa da TFG, porque em estados de diminuição do volume intravascular a depuração de ureia diminui sem que haja diminuição da TFG (DiBartola, 2010).

Na presença de vasopressina, a ureia difunde-se a partir dos túbulos do ducto coletor para o interstício, onde participa no gradiente de concentração medular (Tripathi et al., 2011).

Outros métodos de excreção de ureia são a saliva, o TGI e o suor, que aumentam quando a concentração de ureia no sangue aumenta (Tripathi et al., 2011).

As amostras de sangue devem ser obtidas após jejum de 12 horas, uma vez que a ingestão de proteína influencia a concentração de ureia sérica. Existem tiras de reagente que usam a urease para hidrolisar a ureia em amônia e CO₂. Consoante a concentração de amônia presente, este método cromatográfico produz uma alteração de cor, permitindo uma avaliação semi-quantitativa da concentração de ureia. No entanto, este método é impreciso e só deve ser utilizado como ferramenta de diagnóstico preliminar em situações de emergência (Squires, 2005). Os métodos colorimétricos são preferíveis e são quantitativos (Tripathi et al., 2011). O valor normal de ureia sérica (BUN) encontra-se entre 8 e 25 mg/dl no cão e entre 15 e 35 mg/dl no gato (DiBartola, 2010).

A azotémia (aumento da concentração de ureia e outros compostos nitrogenados) pode ser pré-renal, renal ou pós-renal. A azotémia pré-renal pode ser provocada por aumento do catabolismo proteico e, neste caso, a creatinina não está aumentada. Isto acontece com dietas altamente proteicas ou hemorragias gastrointestinais (DiBartola, 2010). Algumas causas específicas do aumento do catabolismo proteico endógeno são a febre, fome grave, exercício prolongado ou vigoroso, administração recente de glucocorticóides, queimaduras ou sepsis. Pelo contrário, a diminuição do catabolismo proteico pode ser devida a esteroides anabólicos, disfunção hepática grave, dieta restrita em proteína ou de proteína de elevada qualidade (Squires, 2005). A azotémia também pode ser causada por diminuição da TFG que ocorre quando há diminuição da perfusão renal em estados como o choque, desidratação e doenças cardiovasculares. Nesta situação a creatinina também aumenta. Na maior parte dos animais, a azotémia pré-renal é mais frequente que a azotémia renal. As doenças que causam azotémia pré e pós-renal podem afetar o rim secundariamente e, eventualmente, causar azotémia renal. Normalmente, a densidade é alta porque a maior parte das causas de azotémia pré-renal também provocam estimulação da excreção de vasopressina, à exceção do hipoadrenocorticism. O rácio da osmolalidade urinária sobre a osmolalidade plasmática é alto, enquanto a concentração de sódio é baixa (Tripathi et al., 2011).

A azotémia renal ocorre quando existem $\frac{3}{4}$ dos nefrónios disfuncionais. A TFG está diminuída e, por isso, há excreção insuficiente de ureia e creatinina. A concentração de ureia sanguínea é

um indicador sensível de doença renal, quando já há redução da massa funcional renal suficiente para provocar azotémia. Assim que a azotémia renal está presente, a concentração de ureia duplica à medida que a massa renal funcional é reduzida para metade. Após o desenvolvimento de azotémia, o rim é incapaz de concentrar urina, à exceção do gato que mantém alguma capacidade de concentração. Animais com alterações glomerulares primárias podem apresentar azotémia antes de desenvolverem alterações na concentração urinária porque a doença tubular desenvolve-se depois da doença glomerular. Os rácios ureia urinária/ureia plasmática e creatinina urinária/creatinina plasmática estão diminuídos. As determinações únicas de BUN não são úteis para o prognóstico, sendo preferível fazer avaliação de concentrações seriadas pois fornecem uma monitorização mais adequada da progressão da doença e um prognóstico clínico mais preciso. Normalmente, a azotémia pré-renal e renal coexistem (Tripathi et al., 2011).

A azotémia pós-renal é causada por obstrução ou rutura pós-renal. Os sinais clínicos normalmente incluem oligúria e anúria. O exame físico ou exames imagiológicos são quase sempre suficientes para diagnosticar azotémia pós-renal. A densidade urinária varia, e pode haver ou não alterações de concentração. A concentração de ureia deve voltar ao intervalo de referência poucos dias após a resolução da obstrução ou rutura (Tripathi et al., 2011).

Valores baixos de ureia podem ser encontrados na insuficiência hepática, dietas pouco proteicas, após a administração de esteroides anabólicos ou nos *shunts* porto-sistémicos (Tripathi et al., 2011).

3.3.1.2 Creatinina sérica

A maior parte da creatinina tem origem endógena, a partir da conversão não enzimática da fosfocreatina presente no músculo. Assim, animais jovens têm valores mais baixos de creatinina do que machos adultos. Os níveis de creatinina sérica não são afetados significativamente pela dieta nem por fatores catabólicos, ao contrário da ureia. Diariamente, há formação constante de creatinina a partir da creatina e não há reutilização da creatinina. (Tripathi et al., 2011).

A creatinina é distribuída pela água presente no organismo, mas difunde-se mais devagar que a ureia (demora cerca de 4 horas para atingir o equilíbrio). No caso de rutura da bexiga, a concentração de creatinina no fluido abdominal é muito maior que no plasma e esta diferença mantém-se durante mais tempo do que a ureia. Assim, a diferença entre as concentrações de creatinina no plasma e no fluido abdominal tem um valor de diagnóstico superior ao das concentrações de ureia (Tripathi et al., 2011).

A creatinina é uma molécula pequena, não está ligada a proteínas, é livremente filtrada no glomérulo e não sofre reabsorção tubular (Squires, 2005). No cão, há uma pequena quantidade de creatinina que é excretada pelos túbulos proximais. Uma pequena quantidade de creatinina é

excretada pelo TGI. A creatinina sérica é uma medida mais precisa da TFG do que a ureia porque não há reabsorção tubular e a secreção tubular é mínima. A redução da TFG provoca aumento da creatinina sérica e a determinação da depuração da creatinina fornece uma estimativa da TFG (DiBartola, 2010). A determinação da concentração de creatinina fornece informação semelhante à da concentração de ureia em doenças renais, assim como em azotémia pós-renal por obstrução ou ruptura. A creatinina, tal como a ureia, tem pouca sensibilidade no diagnóstico de doença renal no cão e gato, uma vez que $\frac{3}{4}$ da função renal tem que estar perdida para ocorrerem alterações nas concentrações de creatinina (Tripathi et al., 2011).

A diurese e a diálise têm um efeito menor na diminuição da creatinina sérica do que na ureia. A taxa de fluxo urinário tem um efeito menor na concentração de creatinina do que na concentração de ureia porque a creatinina difunde-se mais devagar entre os compartimentos de fluidos do que a ureia. Assim, a diurese e a diálise promovem uma excreção maior de ureia do que da creatinina (Tripathi et al., 2011).

A maior parte dos laboratórios mede a creatinina sérica através de um método que envolve a reação de *Jaffé*, na qual a creatinina reage com o picrato, em condições alcalinas, para produzir uma alteração de cor detetável. No entanto, este método não é específico para a creatinina, pois o picrato alcalino reage com outras substâncias sanguíneas cromogêneas. Estas substâncias encontram-se no plasma, podendo constituir até 50% da creatinina sérica medida e normalmente não aparecem na urina. À medida que os níveis séricos de creatinina aumentam, (devido à progressão da doença renal e diminuição da TFG) a quantidade de substâncias cromogêneas mantém-se inalterada e contribui cada vez menos para a medida total da concentração de creatinina sérica. Existem métodos enzimáticos para a quantificação da creatinina sérica, mas não são muito usados devido ao seu elevado custo (Squires, 2005). As concentrações normais de creatinina sérica em cães e gatos são 0,3-1,3 mg/dl e 0,8-1,8 mg/dl, respetivamente (DiBartola, 2010).

A magnitude da ureia e creatinina séricas não pode ser utilizada para prever se a azotémia é pré-renal, renal intrínseca, ou pós-renal, nem pode ser usada para distinguir entre aguda e crónica, reversível e irreversível, ou progressiva e não progressiva. A relação ureia/creatinina sérica pode estar aumentada na azotémia pré-renal e pós-renal, devido ao aumento da reabsorção tubular de ureia em taxas de fluxo tubulares inferiores ou à maior absorção de ureia através do peritoneu em animais com uroabdomen. A diminuição da relação ureia/creatinina ocorre muitas vezes após fluidoterapia e reflete a diminuição da reabsorção tubular de ureia (DiBartola, 2010). No entanto, as experiências clínicas demonstraram que há muitas variáveis que contribuem para este rácio e portanto não serve de parâmetro de diagnóstico em medicina veterinária (Tripathi et al., 2011).

3.3.1.3 *Depuração da creatinina*

A depuração de uma substância que não é reabsorvida nem sofre secreção pelos túbulos é igual à TFG. Para esta substância, a quantidade que é filtrada é igual à quantidade que é excretada. Vários estudos realizados em cães e gatos mostraram que a taxa de depuração da creatinina endógena varia entre 2-5 ml/min/kg. Como já foi dito antes, a capacidade de concentrar urina fica comprometida quando 66% da população de nefrônios funcionais está afetada, enquanto a azotemia só ocorre quando 75% da população de nefrônios se torna disfuncional. Por isso, torna-se importante avaliar a depuração de creatinina endógena em animais em que há suspeita de doença renal com PU/PD, mas que têm valores de ureia e creatinina normais. Os requisitos para a realização deste teste são: medição precisa do volume urinário produzido em 12 ou 24 horas, determinação do peso do animal e das concentrações de ureia e creatinina séricas. Para eliminar a imprecisão associada ao efeito das substâncias cromogêneas, pode usar-se o teste de depuração de creatinina exógena. A depuração da creatinina endógena fornece uma estimativa segura da TFG se for usada metodologia específica que mede a creatinina verdadeira (DiBartola, 2010).

A depuração de creatinina renal pode ser calculada multiplicando a concentração de creatinina urinária pela taxa de produção de urina e dividindo este produto pela concentração de creatinina sérica, como se mostra na seguinte fórmula:

$$TFG = \frac{(U_{cr} \times V_u)}{S_{cr}}$$

Em que, U_{cr} é a concentração de creatinina na urina, V_u é o volume urinário produzido num determinado período de tempo e S_{cr} é a concentração sérica de creatinina (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

3.3.1.4 *Cistatina C*

A cistatina C é um polipéptido pequeno, inibidor de proteases, filtrado livremente pelo glomérulo. Não sofre excreção tubular e é completamente reabsorvido nos túbulos proximais e catabolizado nos seus aminoácidos constituintes. É produzido de forma constante em todos os tecidos e não depende da idade, sexo, nem dieta. Assim, a sua concentração plasmática pode servir como marcador da TFG. Foram conduzidos 2 estudos em cães saudáveis e cães com insuficiência renal em que a cistatina sérica foi medida com um teste para humanos e o valor normal foi de 1 mg/dl (DiBartola, 2010).

3.3.2. Avaliação da função tubular

A capacidade em concentrar urina depende da resposta dos osmoreceptores (presentes no hipotálamo) à osmolaridade plasmática, com consequente liberação de vasopressina pela hipófise, e da resposta a esta hormona no túbulo distal. Além disso, tem que existir um gradiente hipertônico medular, criado e mantido pelo sistema de contracorrente renal, e têm que estar presentes nefrônios funcionais em número suficiente para dar uma resposta adequada à vasopressina (DiBartola, 2010). A poliúria é primária quando está associada à falta total ou relativa de vasopressina e denomina-se por diabetes *insipidus* central ou hipofisária. Quando a produção de vasopressina é normal, mas a resposta a esta hormona é insuficiente diz-se que a proteinúria é causada por diabetes *insipidus* nefrogénica. Os animais com polidipsia primária ou diabetes *insipidus* hipofisária normalmente têm urinas hipostenúricas, enquanto os animais com diabetes *insipidus* nefrogénica apresentam, frequentemente, urina isostenúrica (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

Os testes laboratoriais que avaliam a função tubular renal são a DUE e a osmolalidade, a privação de água repentina e gradual e a depuração fracionária de eletrólitos (DiBartola, 2010).

3.3.2.1 Testes de concentração urinária

A desidratação aumenta a osmolalidade plasmática que por sua vez estimula a liberação da vasopressina pela hipófise. Esta hormona tem a sua ação nas células epiteliais tubulares do ducto coletor, onde causa aumento da reabsorção de água e, consequentemente, concentração da urina (Tripathi et al., 2011). A osmolalidade plasmática normal em cães e gatos situa-se no intervalo entre 280 e 300 mOsm/kg. A osmolalidade plasmática em animais com polidipsia primária normalmente é baixa, refletindo o efeito de diluição provocado pelo excesso de ingestão de água. Pelo contrário, animais com poliúria normalmente têm osmolalidade plasmática elevada devido à incapacidade de concentrar urina e consequente desidratação. A osmolalidade plasmática pode ser medida usando um osmómetro, que está disponível a um preço razoável em hospitais veterinários universitários ou em laboratórios de referência (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

A privação de água origina desidratação e aumento da osmolalidade plasmática, permitindo avaliar a resposta a nível hipofisário e renal (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). Os testes de concentração urinária estão indicados nas seguintes situações: PU/PD em animais não azotémicos e que não apresentam desidratação nem evidência bioquímica de doença; amostras seriadas de urina de animais não azotémicos com densidades persistentemente baixas ou isostenúricas. Não devem ser usados estes testes quando o animal apresenta azotémia ou urémia, ou está desidratado ou gravemente debilitado. Não deve ser usado em animais que apresentam

evidência de outras doenças metabólicas que também provocam PU/PD e deve ser realizado com grande precaução em animais com poliúria grave (Tripathi et al., 2011). Um animal desidratado com falha da capacidade de concentrar urina, não deve ser sujeito a este teste porque esta falha é causada por alterações funcionais ou estruturais no rim ou por administração de fármacos que afetam a capacidade de concentração urinária (DiBartola, 2010). Os testes de privação de água são usados em pacientes com hipostenúria para diferenciar diabetes *insipidus* de polidipsia psicogénica (Archer, 2005).

No início da realização do teste de privação de água, a bexiga tem que estar vazia e devem ser conhecidos os seguintes dados: peso, hematócrito, proteínas plasmáticas, turgidez da pele, osmolalidade sérica, osmolalidade urinária e DUE (DiBartola, 2010).

No teste de privação de água repentino, é retirada a água e procede-se à monitorização destes parâmetros a cada 2-4 horas. Os parâmetros mais importantes para a tomada de decisão durante a ocorrência do teste são a DUE e o peso. A estimulação máxima de libertação de vasopressina ocorre a partir de perdas de peso superiores a 5%. Conclui-se o teste quando o animal demonstra capacidade de concentração ou quando perdeu 5% ou mais do peso inicial. O teste deve ser interrompido se ocorrerem sinais clínicos indesejáveis. Normalmente, a desidratação torna-se evidente após 48 horas em cães e gatos normais, mas cães com diabetes *insipidus* ou polidipsia nefrogénica tornam-se desidratados mais cedo, geralmente, num espaço de tempo inferior a 12 horas (DiBartola, 2010).

O teste de privação gradual de água pode ser usado quando a poliúria está associada a perda de solutos na zona medular, porque nesta situação é necessário restabelecer a tonicidade medular para que os túbulos possam responder à vasopressina e ao teste de privação repentina de água. O procedimento é relativamente simples e consiste em limitar gradualmente o acesso à água cerca de 10 a 14 dias antes de realizar o teste de privação de água repentino. Além disso, também está aconselhado fornecer dietas ligeiramente salgadas, em animais que não são hipertensos, para facilitar o restabelecimento da tonicidade medular (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). À medida que se retira progressivamente o acesso à água, monitoriza-se o peso do animal e depois seguem-se os mesmos procedimentos usados no teste de privação repentina de água (Tripathi et al., 2011). Conclui-se que os animais que não conseguem produzir urina hiperesténica em resposta à privação de água, têm diabetes *insipidus* nefrogénica ou hipofisária (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

Quando se pretende diferenciar entre diabetes *insipidus* nefrogénica e hipofisária ou quando há risco para o paciente em realizar o teste de privação de água, pode realizar-se o teste de concentração de vasopressina. Este teste tem sido usado principalmente em cães para avaliar a

resposta renal à vasopressina exógena. É administrada vasopressina exógena, em doses farmacológicas, para estimular a reabsorção de água e a concentração urinária (Tripathi et al., 2011). Em animais que não respondem ao teste de privação de água, a hormona deve ser administrada antes de a água ficar disponível, ou seja, no final do teste de privação de água. Além disso, também se deve ter o cuidado de esvaziar completamente a bexiga antes de administrar a hormona para que a urina previamente formada não dilua a urina que é produzida em resposta à hormona (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). A capacidade dos rins para concentrar urina parece ser mais eficaz após o teste de privação repentina de água do que após a injeção de vasopressina. Animais com diabetes *insipidus* hipofisária têm túbulos renais normais, mas a hipófise não excreta a vasopressina. Assim, estes animais respondem à administração exógena de vasopressina, concentrando a urina (Tripathi et al., 2011). Isto acontece normalmente passado uma ou duas horas (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). Na diabetes *insipidus* nefrogénica, existem níveis fisiológicos de vasopressina em circulação, mas os túbulos renais são refratários à sua estimulação. Isto pode acontecer devido a um defeito tubular primário ou pode ser um efeito secundário de certas doenças como, por exemplo, o hiperadrenocorticism, hipercalcémia ou endotoxémia. Assim, estes animais não respondem ao teste de privação de água nem ao teste de administração de vasopressina, e apresentam resultados normais para todos os outros testes de função renal. A polidipsia psicogénica pode ser identificada com o teste de privação de água, porque a densidade aumenta imediatamente. (Tripathi et al., 2011).

3.3.2.2 Excreção fracionária de eletrólitos

Excreção fracionária (EF) ou depuração fracionária expressa a proporção de uma substância que é excretada na urina comparada com aquela que é filtrada através do glomérulo. A concentração glomerular é equivalente à concentração sérica da substância. A dieta e a absorção intestinal afetam a interpretação dos resultados. A depuração dos eletrólitos pode ser quantificada se for comparada com a depuração de creatinina endógena para conhecer o grau de reabsorção tubular ou secreção. Este procedimento mede simultaneamente a concentração da creatinina e dos eletrólitos numa única amostra de urina e de sangue, permitindo a determinação da depuração de eletrólitos sem conhecer a taxa de fluxo urinária nem o volume. A fórmula para calcular a depuração do eletrólito é:

$$EF = \left(\frac{U_e}{S_e} \right) \div \left(\frac{U_{cr}}{S_{cr}} \right) \times 100$$

Em que, U_e é a concentração do eletrólito na urina, S_e é a concentração sérica do eletrólito, U_{cr} é a concentração de creatinina na urina e S_{cr} é a concentração sérica de creatinina (Tripathi et al., 2011).

Existem algumas situações em que é útil determinar as EF dos eletrólitos como, por exemplo, para o diagnóstico de hiperparatireoidismo primário em que a excreção fracionária de fósforo (EF_P) está aumentada ou para o diagnóstico de algumas disfunções tubulares como a síndrome de *Fanconi* em que a EF de todos os eletrólitos está aumentada ou para a diferenciação entre azotemia pré-renal, em que a excreção fracionária de sódio (EF_{Na}) está diminuída, e IRA, em que a EF_{Na} está aumentada (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). As EF dos eletrólitos também podem ser medidas diariamente para monitorizar animais que estão a ser tratados com fármacos nefrotóxicos (Squires, 2005).

A EF_{Na} é a mais usada. Está aumentada quando há insuficiência tubular, mas está normal ou diminuída quando há doença glomerular aguda. Pode estar aumentada em animais com azotemia pré-renal, aos quais estão a ser administrados diuréticos. O uso clínico da excreção fracionária de potássio (EF_K) é controverso e os valores não se correlacionam bem com a concentração urinária de potássio em 24 horas. A EF_P também está aumentada na insuficiência renal, desde que não exista oligúria nem anúria. A excreção fracionária de bicarbonato ($EF_{HCO_3^-}$) é útil na medicina humana para a classificação de acidose tubular renal. A variabilidade na ingestão e excreção não urinária de eletrólitos resulta em variabilidade dos rácios de excreção em animais saudáveis. Além disso, existe uma grande variabilidade na excreção de eletrólitos entre indivíduos e entre raças. Estes fatores limitam a utilidade destes testes para detetar doença renal. Além disso, alguns instrumentos de laboratório não conseguem quantificar os eletrólitos urinários (Tripathi et al., 2011). A EF_{Na} é inferior a 1% no cão e no gato. A EF_K é inferior a 20% no cão e inferior a 24% no gato. A EF_{Cl} é inferior a 1% no cão e inferior a 1,3% no gato. A EF_P é inferior a 39% no cão e inferior a 73% no gato (DiBartola, 2010). A excreção fracionária de cálcio (EF_{Ca}) normalmente é inferior a 1% (Squires, 2005).

3.3.2.3 Rácio gamma-glutamyltransferase/creatinina urinário

Se houver suspeita de lesão ou necrose tubular renal grave, por exemplo, devido a tratamento com aminoglicosídeos, pode ser realizado um teste urinário de lesão tubular. A gamma-glutamyltransferase (GGT) é sintetizada nas células epiteliais do túbulo renal e é excretada na urina quando há lesão destas células. Os níveis de GGT plasmática não aumentam. Como a creatinina não é reabsorvida pelos túbulos, a GGT pode relacionar-se com a creatinina para corrigir a variação na DUE. A GGT e a creatinina são medidas através de métodos automáticos na mesma amostra de urina e o seu rácio é calculado (Archer, 2005). Gossett, Turnwald, Kearney, Greco e Cleghorn (1987) reportaram um rácio GGT/creatinina urinário normal em cães adultos de

0.14±0.10, enquanto Grauer et al. (1995) reportaram um valor ligeiramente superior de 0.34±0.53.

Este teste não é comercializado e a sua utilização é feita apenas no âmbito de investigações científicas.

3.4. PROTEINÚRIA

3.4.1. Definição de proteinúria

A proteinúria é definida como o aumento de proteínas na urina. Em condições normais, as proteínas séricas de 70 quilodaltons (kDa) e carga negativa (por exemplo, a albumina) não são filtradas pelo rim devido à constituição da barreira glomerular. A maioria das proteínas com menos de 70kDa e carga positiva que atravessa o glomérulo saudável, é reabsorvida nos túbulos ou catabolizada pelas células epiteliais existentes nos túbulos renais (Harley & Langston, 2012). A concentração de albumina existente no plasma de cães e gatos saudáveis é cerca de 4g/dl, contrastando com valores de 2-3mg/dl no filtrado e com valores inferiores a 1mg/dl na urina (Grauer, 2011). Normalmente, existe uma pequena quantidade de proteína na urina de cães e gatos saudáveis, com rins normais. No entanto, para fins de diagnóstico considera-se proteinúria a deteção de uma quantidade anormal ou excessiva de proteínas na urina (Lees et al., 2005).

3.4.2. Localização da proteinúria

A proteinúria tem inúmeras causas que podem ser incluídas em categorias, com classificações diferentes consoante o autor. A classificação descrita neste trabalho é uma adaptação daquela usada por Segev S. (2010), por ser a que se correlaciona melhor com a sequência utilizada na abordagem ao diagnóstico para localização da proteinúria (Tabela 2). Assim e segundo este autor, a proteinúria pode ser classificada em extra-urinária e urinária. Quanto à proteinúria extra-urinária, é possível ainda dividi-la em duas categorias, pré-renal e genital. A proteinúria urinária pode ser pós-renal ou renal e esta pode ser fisiológica ou patológica. A proteinúria renal patológica pode ainda ser dividida em glomerular, tubular e intersticial. É importante fazer a localização da origem da proteína porque a sua quantificação é útil para o prognóstico. Para animais com proteinúria pré-renal e pós-renal esta quantificação não serve de prognóstico (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

Tabela 2: Causas de proteinúria categorizadas de acordo com a localização da alteração subjacente

	Causas da proteinúria
Extra-urinária pré-renal	Aumento sérico de proteínas que atravessam a parede glomerular, como, por exemplo, a hemoglobina
Extra-urinária genital	Processos exsudativos do trato genital e/ou dos órgãos genitais externos
Urinária pós-renal	Processos exsudativos do bacinete renal, ureteres, bexiga e uretra
Urinária renal fisiológica	Alteração da fisiologia renal devido a processos transitórios
Urinária renal glomerular	Lesões estruturais ou funcionais que alteram a permeabilidade seletiva da parede glomerular
Urinária renal tubular	Lesões estruturais ou funcionais que comprometem a reabsorção tubular das proteínas plasmáticas
Urinária renal intersticial	Lesões inflamatórias que causam a exsudação de proteínas a partir dos capilares peritubulares

3.4.2.1 Proteinúria extra-urinária

A proteinúria é extra-urinária sempre que a sua origem não faz parte do sistema urinário, podendo ainda ser classificada como pré-renal ou genital. A proteinúria pré-renal resulta da presença de quantidades anormais de proteínas plasmáticas de baixo peso molecular (disproteínemias) que, normalmente, atravessam a parede dos capilares glomerulares. Estas podem ser proteínas normais que estão presentes no plasma de forma livre, como a hemoglobina e a mioglobina, ou podem ser proteínas anormais, como as cadeias leves de imunoglobulinas. Um exemplo destas proteínas são as proteínas de *Bence Jones*, produzidas por células plasmáticas neoplásicas. A proteinúria genital resulta da contaminação da urina com proteínas que têm origem no trato genital, quando existem, por exemplo, inflamações ou infeções genitais (Lees et al., 2005).

Para excluir proteinúria extra-urinária pré-renal, deve avaliar-se a concentração plasmática de proteínas e procurar a existência de disproteinémias. Para excluir proteinúria extra-urinária genital, deve colher-se urina por cistocentese (Lees et al., 2005). Apesar de existir contaminação da urina com sangue na cistocentese e dos eritrócitos conterem proteína e contribuírem para a

proteinúria, é necessário que exista sangue em grandes quantidades na urina para causar proteinúria significativa (Vaden et al., 2004). A proteinúria extra-urinária genital não é persistente e resolve-se com o tratamento da condição subjacente (Harley & Langston, 2012).

3.4.2.2 Proteinúria urinária

A proteinúria com origem no sistema urinário pode ser classificada como pós-renal ou renal. A proteinúria pós-renal está relacionada com a entrada de proteínas na urina a partir do bacinete renal, ureteres, bexiga ou uretra e resulta de alterações ao longo do sistema urinário excretor (infecção, inflamação, hemorragia, urolitíase, neoplasia) (Segev, 2010). Normalmente, a proteinúria pós-renal ocorre devido a inflamação ou hemorragia do trato urinário inferior e as alterações observadas no exame do sedimento são compatíveis com essa inflamação (existência de piúria, hematúria, bacteriúria e aumento de células epiteliais de transição) (Grauer, 2012). Para além destes achados, o paciente apresenta, frequentemente, uma história que inclui sintomas como polaquiúria, disúria, estrangúria e/ou hematúria (Grauer, 2011).

Para incluir proteinúria urinária pós-renal, é necessário encontrar evidência de inflamação ou hemorragia, com ou sem sinais de afeção do trato urinário excretor e sem sinais de nefrite ativa. Se a proteinúria for urinária e não estiver associada a sedimento ativo, então a proteinúria é renal (Lees et al., 2005).

3.4.2.3 Proteinúria renal

A proteinúria renal inclui tanto a proteinúria fisiológica como a patológica. A proteinúria fisiológica é transitória, de grau leve ou moderado e resolve-se quando a condição subjacente desaparece. O mecanismo que causa este tipo de proteinúria ainda não é bem conhecido, mas poderá estar relacionado com a vasoconstrição, isquémia ou congestão renal (Grauer, 2012). Pode ser causada por exposição extrema ao calor e/ou frio, stresse, convulsões, congestão venosa, febre e exercício intenso (Harley & Langston, 2012). Os cães confinados em boxes têm níveis de proteinúria mais elevados que os cães com exercício físico regular. Isto pode ser explicado pelos níveis de stresse mais elevados em cães confinados ou poderá indicar que a diminuição da atividade física também causa proteinúria (McCaw, Knapp, & Hewett, 1985).

A proteinúria renal patológica pode resultar de alterações glomerulares, tubulares ou intersticiais. Nas afeções glomerulares, há um aumento da filtração glomerular de proteínas plasmáticas devido a hipertensão intraglomerular ou a lesão estrutural, inflamação e deposição de imunocomplexos nos capilares glomerulares (Grauer, 2012). A presença de proteinúria moderada a grave, com alterações no sedimento e acompanhada de cilindros de hialina é altamente sugestiva de doença glomerular (DiBartola, 2010). As afeções glomerulares mais comuns em cães e

gatos são a glomerulonefrite e amiloidose e, normalmente, originam aumentos na proteína urinária acima dos 50 mg/kg/24h e raios UPC superiores a 2, embora também possam ocorrer raios menores (Harley & Langston, 2012). Nas afeções tubulares, os túbulos proximais estão alterados e não reabsorvem as proteínas filtradas, originando proteinúria de magnitude moderada, com sedimento inativo. Em alguns casos, pode ser acompanhada de glicosúria com níveis normais de glicemia e aumento da excreção de eletrólitos, como, por exemplo, na síndrome de *Fanconi* e na necrose tubular aguda (Grauer, 2011). A proteinúria de origem glomerular pode ser diferenciada da de origem tubular, através do método de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (Littman, 2011). Nas afeções intersticiais, ocorrem alterações infiltrativas ou inflamatórias (pielonefrite, leptospirose, neoplasia) no interstício renal, que causam a exsudação de proteínas para o espaço urinário. Nestas, normalmente, o sedimento é ativo (Grauer, 2012). A presença de sedimento ativo é sugestiva de inflamação renal ou urogenital (DiBartola, 2010).

3.4.3. Importância da avaliação e monitorização da proteinúria

A importância da avaliação da proteinúria está relacionada com a necessidade de conhecer a sua origem, persistência e magnitude. Esta necessidade advém do conhecimento de que a proteinúria persistente é um fator de risco, porque está associada a uma maior frequência de morbidade e mortalidade por causas renais e outras causas. Além disto, sabe-se que o risco de desenvolvimento de efeitos adversos é tanto maior, quanto maior for a magnitude da proteinúria (Jacob, et al., 2005).

Em cães e gatos, a proteinúria persistente de origem renal é um marcador importante de DRC (Grauer, 2012). Em cães com DRC, a redução da proteinúria aumenta o tempo de sobrevivência (Littman, 2011). Alguns estudos mostram também que a utilização de inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA's) em cães e gatos com proteinúria marcada tem um efeito protetor renal e diminui a magnitude da proteinúria (Grauer G. F., et al., 2000).

Para além das complicações clássicas da proteinúria moderada e grave (hipoalbuminémia, edema, ascite, hipercolesterolemia, hipertensão e hipercoagulabilidade), há cada vez mais evidência de que a proteinúria agrava as lesões glomerulares e tubulointersticiais já existentes, contribuindo para a progressão da perda de nefrónios (Grauer, 2012).

A existência de uma associação entre proteinúria grave e a rápida progressão da doença renal tem levado à investigação do papel direto que a proteína poderá desempenhar na lesão glomerular ou tubulointersticial. No entanto, este papel ainda não é bem conhecido e é necessário investigar qual a quantidade e tipo de proteína que causa alterações e qual a duração necessária

para provocar essas alterações. Independentemente de se conhecer ou não o papel desempenhado pela proteína na lesão renal, a proteinúria serve de marcador de risco e de resposta ao tratamento. É importante avaliar a proteína clinicamente, porque a magnitude altera-se consoante a permeabilidade vascular do glomérulo e a capacidade de reabsorção tubular das proteínas filtradas (Lees et al., 2005).

Por todas estas razões, existe uma necessidade crescente em reconhecer, monitorizar e, se necessário, tratar a proteinúria renal, revendo os valores de proteína urinária que, até ao presente, eram considerados normais (Grauer, 2012).

3.4.3.1 Monitorização da proteinúria

A proteinúria transitória não tem consequências clínicas e não necessita de tratamento, ao contrário da proteinúria persistente. Esta resulta da obtenção de resultados positivos em 3 momentos diferentes, com um intervalo mínimo de 2 semanas entre cada medição. As alterações na magnitude têm que ser avaliadas com base em métodos quantitativos de medição da proteinúria e deve ter-se sempre em consideração as concentrações séricas de creatinina, porque a proteinúria pode diminuir com a progressão da doença renal, como consequência da perda de nefrónios funcionais (Grauer, 2011). Desta maneira, pode concluir-se que existe bom prognóstico quando há diminuição da proteinúria e estabilização da creatinina sérica. Pelo contrário, a diminuição da proteinúria e o aumento da creatinina sérica são indicadores de mau prognóstico (Grauer, 2012).

3.4.4. Detecção da proteinúria

A albumina é a proteína principal na maior parte dos pacientes que apresentam proteinúria, sendo detetada pela maioria dos testes comerciais disponíveis. A concentração de albumina urinária normal em cães e gatos é inferior a 1mg/dl. Diz-se que o animal apresenta MA quando a concentração de albumina urinária se situa entre 1 e 30mg/dl. Os animais com proteinúria são aqueles que apresentam concentrações de albumina urinária superiores a 30mg/dl (Harley & Langston, 2012).

3.4.4.1 Teste da fita com reagentes colorimétricos

Normalmente, este é o primeiro teste de rotina utilizado quando se pretende detetar albumina (Harley & Langston, 2012). A deteção baseia-se na reação de erro da proteína do indicador de pH. Ou seja, um aumento da concentração de aniões, proteínas carregadas negativamente, provoca mudança do pH, que altera a cor de amarelo para verde e de verde para azul. A intensidade da cor é proporcional à concentração de proteína. A tira apresenta reações negativas, vestigiais, 1+, 2+, 3+ e 4+, que correspondem a um resultado semi-quantitativo que varia entre 15 e 2000 mg/dl (Tripathi et al., 2011).

Como as tiras foram desenvolvidas para a urina humana (menos concentrada que a do cão e do gato), se a amostra for muito concentrada ou pigmentada, pode dar origem a falsos positivos (baixa especificidade), embora os resultados sejam quase sempre vestigiais ou 1+ (Harley & Langston, 2012). As urinas alcalinas ou a ocorrência de um contato prolongado das tiras com a urina também podem originar falsos positivos. Os falsos positivos ocorrem mais em gatos que em cães, mas ocorrem frequentemente nas duas espécies. Este método pode originar falsos negativos (baixa sensibilidade) quando existem proteínas de *Bence Jones* na urina, baixa concentração de albumina urinária ou quando a urina é ácida ou diluída (Grauer, 2012). Como este teste mede, principalmente, a albumina, para detetar globulinas e proteínas de *Bence Jones* na urina, é necessário usar o método turbidimétrico do ASS (Archer, 2005). Além disso, não é recomendado que se recorra apenas a este teste, porque tem baixa especificidade, ou seja, existe uma grande frequência de falsos positivos. Assim, os resultados positivos devem ser confirmados pelo método ASS ou com a quantificação da albumina através de ELISA (Lees et al., 2005).

3.4.4.2 Teste turbidimétrico do ácido sulfossalicílico (ASS)

O método ASS é mais sensível e específico e não origina falsos positivos quando a urina é alcalina (Tripathi et al., 2011). Pode originar falsos positivos se a urina tiver agentes de contraste radiográfico, penicilina, cefalosporinas, sulfisoxazol ou timol. (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). Em muitos laboratórios de referência, quando existem resultados positivos na tira para a proteinúria procede-se à confirmação com o teste ASS. No entanto, como a classificação da mudança de cores em ambos os testes é subjetiva, obtêm-se resultados variáveis entre indivíduos e laboratórios (Grauer, 2012). Um resultado positivo com o teste ASS deve seguir-se pela quantificação da proteinúria através da determinação do rácio UPC (Harley & Langston, 2012).

3.4.4.3 Rácio proteína/creatinina urinário (Rácio UPC)

Se os resultados das tiras e do ASS revelarem a presença de proteinúria persistente e se o exame do sedimento não mostrar alterações, há grande probabilidade da proteína ser de origem renal e por isso deve ser quantificada. A quantificação da perda de proteína ajuda na determinação da gravidade das lesões e na avaliação da resposta à terapêutica. Os métodos mais usados para quantificar a proteína urinária são o azul de *Coomassie*, *Ponceau S.*, cloreto de benzetónio e vermelho de pirogalol (Grauer, Urinary tract disorders, 2009). É necessário avaliar a proteinúria tendo em conta o volume e densidade urinários porque um resultado de 1+ numa urina diluída (volume urinário aumentado) é mais significativo do que o mesmo resultado numa urina concentrada (volume urinário diminuído) (Tripathi et al., 2011).

Para quantificar a perda de proteína na urina pode medir-se a quantidade total de proteína produzida em 24 horas, que em condições normais é inferior a 20mg/kg/dia (DiBartola, 2010). No entanto, como este método é impraticável na prática clínica pode recorrer-se ao cálculo do rácio da proteína na urina relativamente à creatinina na urina. Para determinar o rácio, mede-se a proteína e a creatinina na mesma amostra de urina e faz-se a sua divisão. O rácio UPC tornou-se o teste *gold standard* para detetar proteinúria em cães e gatos (Harley & Langston, 2012). Outro método alternativo para quantificar a proteinúria é a realização de ELISA para medir a albuminúria, cujo resultado se expressa em rácio albumina/creatinina urinário (rácio UAC) ou em mg/dl (Grauer, 2012). Estudos realizados mostram que a determinação do rácio UPC e do rácio UAC numa amostra única e aleatória tem uma grande correlação com a excreção urinária de proteína e albumina em 24 horas (Grauer, 2012).

Estão disponíveis tiras de reagentes (Multistix PRO[®]; Aution 10PA[®]) que medem as concentrações de proteína e creatinina na urina. As tiras Multistix PRO[®] mostraram uma boa correlação com os métodos quantitativos em cães, mas uma correlação fraca no caso dos gatos (Welles et al., 2006).

A interpretação do rácio UPC só pode ser feita se não houver evidência de inflamação no sedimento, nem hematúria macroscópica e após se ter excluído proteinúria pré-renal. Se houver evidência de inflamação (piúria ou bacteriúria) no sedimento, a concentração de proteína deve ser medida novamente após o tratamento da inflamação. O rácio UPC não pode ser usado para diferenciar entre proteinúria renal e proteinúria associada à inflamação ou hemorragia do trato urinário (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

Em relação à interpretação dos resultados, existe uma discrepância temporal e entre autores. Alguns registos classificam valores de rácio UPC inferiores a 0.5 como normais, valores entre 0.5 e 1.0 como questionáveis e valores superiores a 2.0 como proteinúria significativa (Archer, 2005). Elliot e Grauer (2007) consideram que um rácio UPC inferior a 0.4 deve ser interpretado como proteinúria normal em gatos, sendo que em gatos machos este valor pode ir até 0.6, e que valores entre 0.4 e 2.0 indicam proteinúria ligeira e superiores a 2.0 indicam proteinúria grave. Grauer (2009) considera normais todos os valores de rácio UPC que sejam inferiores a 0.4 no gato e inferiores a 0.5 no cão. Segev (2010) considera que o rácio UPC inferior a 0.2 nos cães e gatos é normal e que o rácio UPC entre 0.2 e 0.4 nos gatos e entre 0.2 e 0.5 nos cães indica proteinúria no limite. Algumas investigações sugerem que se usem os seguintes valores de referência para considerar os animais proteinúricos: rácio UPC ≥ 0.5 para animais não azotémicos, rácio ≥ 0.5 para cães azotémicos e rácio ≥ 0.4 para gatos azotémicos (Lees et al., 2005).

Devido às variações diárias biológicas que ocorrem em animais com proteinúria, é importante distinguir a variação aleatória fisiológica da proteinúria das alterações relacionadas com a progressão da doença ou com a terapêutica. Para isso, é necessário realizar várias medições do rácio UPC para obter uma avaliação fidedigna. Um estudo feito mostrou que em cães com doença estabilizada ou proteinúria moderada (rácio UPC < 8.0), pode medir-se o rácio UPC a partir de uma amostra que resulta da junção de várias urinas colhidas em diferentes alturas, em alternativa à realização de várias medições do rácio UPC nas diferentes amostras de urina (LeVine, Zhang, Harris, & Vaden, 2009). Para concluir, com um nível de confiança elevado, que houve alteração da magnitude da proteinúria, os valores do rácio UPC têm que divergir, pelo menos, 40% no cão e 90% no gato (Lees et al., 2005).

Existem certos fatores extra-renais que podem aumentar a permeabilidade glomerular e, consequentemente, causar proteinúria moderada e transitória, como por exemplo, a febre, as doenças cardíacas, doenças do sistema nervoso central (SNC) e o choque. Além destes fatores, também pode haver um aumento de proteínas de baixo peso molecular no sangue que passam no glomérulo e excedem a capacidade de reabsorção dos túbulos, como é o caso das proteínas *Bence Jones*, dos dímeros de hemoglobina e da mioglobina. As hemorragias no trato urinário podem ocorrer devido a neoplasias, trauma ou inflamação e originam mais de 5 eritrócitos por campo, no exame do sedimento. Quando ocorrem inflamações do trato urinário, é possível encontrar mais de 5 leucócitos no exame de sedimento, que normalmente não causam resultados de proteinúria superiores a 2+, a não ser que exista hemorragia concomitante. Quando existe doença renal os achados típicos são ausência de sangue e presença de sedimento celular. Rácios UPC superiores a 8.0 estão frequentemente associados a amiloidose (Archer, 2005). A doença glomerular primária provoca proteinúria intensa, com resultados na tira de 3+ ou 4+ e rácio UPC superior a 3.0, sendo a albumina a proteína mais representada. Na doença tubular primária, existe uma grande quantidade de globulinas de baixo peso molecular que originam proteinúria moderada, com resultados na tira de 2+ e rácio UPC inferior a 3.0. No entanto, esta distinção não é muito fácil na prática, porque as doenças glomerulares e tubulares costumam ocorrer simultaneamente no mesmo indivíduo. A ausência de proteinúria não exclui doença renal, especialmente se esta for não glomerular (Tripathi et al., 2011).

Apesar de as concentrações de proteína e de creatinina na urina serem influenciadas pela concentração total de soluto, o seu rácio não é. A piúria e a contaminação sanguínea acentuada das amostras de urina pode ou não resultar em rácios UPC anormais, na ausência de doença glomerular (DiBartola, 2010).

3.4.4.4 *Microalbuminúria (MA)*

A MA é definida como a presença de concentrações de albumina na urina superiores ao normal ($>1.0\text{mg/dl}$), mas abaixo do limite inferior de detecção do teste convencional das tiras de reagentes ($\leq 30.0\text{mg/dl}$) (Grauer, 2011).

Nos humanos, a MA é um indicador de progressão da nefropatia diabética. No cão e no gato, não se conhecem bem as implicações da MA precoce, mas sabe-se que pode indicar lesão glomerular não detetável por outros métodos (Whittemore, Miyoshi, Jensen, Radecki, & Lappin, 2007). A MA está elevada em cães e gatos com doenças subjacentes e pode servir de teste de rastreio para doenças subclínicas, principalmente as nefropatias hereditárias (Whittemore, Gill, Jensen, Radecki, & Lappin, 2006). Estudos realizados mostraram que nem sempre existe correlação entre a MA e o rácio UPC em gatos. Revelaram ainda que o aumento do rácio UPC pode acontecer sem que haja aumento da MA (Mardell & Sparkes, 2006).

O teste para a MA deve ser usado quando os testes de rotina convencionais para a proteinúria são negativos ou quando se pretendem resultados com maior sensibilidade, em animais predispostos ou com suspeita de doença renal, hipertensão ou condições sistémicas que se complicam com a proteinúria (Harley & Langston, 2012).

Um resultado positivo para MA que se suspeita ter origem renal deve ser vigiado através do paradigma de 3 passos: monitorização, investigação e intervenção. A primeira etapa de monitorização consiste em saber se a albuminúria é persistente ou passageira. Se for passageira não tem grande importância. Contudo se for persistente, ou seja, se houver resultados positivos em duas ou mais ocasiões, separadas por duas ou mais semanas, deve ser monitorizada e medida quantitativamente para determinar o curso da doença e a resposta ao tratamento. A análise quantitativa da albuminúria ou o rácio UPC são usados para avaliar as alterações na magnitude da albuminúria. As alterações na magnitude da proteinúria devem ser sempre avaliadas em conjunto com a creatinina sérica porque nos estádios avançados da doença renal a albuminúria pode diminuir pois há menos nefrónios funcionais. A segunda etapa de investigação consiste em realizar testes adicionais para diagnosticar doenças concomitantes. A etapa final da intervenção consiste no tratamento da proteinúria (Grauer, Urinary tract disorders, 2009).

Na medicina humana, existem tiras (Clinitek Microalbumin[®]; Micral[®]) que detetam MA, porque é um indicador de lesão glomerular associado a doença renal precoce (Tripathi et al., 2011). Um estudo avaliou o desempenho das tiras Clinitek Microalbumin[®] e das tiras Micral[®] na urina de cães e concluiu que não são suficientemente precisas para poderem ser utilizadas como teste de rastreio para a MA (Pressler, Vaden, Wayne, & Simpson, 2002). Existem tiras (ERD – Health Screen[®]) que medem a MA ao usarem anticorpos específicos para a albumina canina e felina, cujo limite inferior de detecção é 1 mg/dl. Estes testes semi-quantitativos foram avaliados

por Mardell e Sparkes (2006) e por Lyon et al. (2010), revelando uma grande correlação com o rácio UPC. A concentração de albumina urinária pode ser ajustada tendo em conta as diferenças na concentração da urina, através da divisão pela concentração de creatinina urinária ou através da diluição da urina numa concentração padrão, como, por exemplo, 1.010 (Grauer, 2011). A MA pode ainda ser medida em laboratórios de referência, de forma quantitativa, através da realização de imunoensaio (ELISA) (Grauer, 2012).

3.4.4.5 Método de eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

O SDS-PAGE é usado para distinguir a proteinúria glomerular da proteinúria tubular através da eletroforese em gel que diferencia os tamanhos das proteínas presentes na urina. As proteínas maiores (>69 kDa) estão associadas a afeções glomerulares, enquanto que as proteínas mais pequenas são indicativas de afeções tubulares. Este teste não está disponível a nível comercial (Littman, 2011).

4. OBJETIVOS

Como objetivo do trabalho pretendeu-se avaliar o desempenho das tiras Aution 10PA[®] enquanto teste de diagnóstico para proteinúria e rácio UPC anormal (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo - VPP e valor preditivo negativo - VPN) e avaliar o seu poder discriminatório (*likelihood* ratio positivo – LR+, *likelihood* ratio negativo – LR– e curva ROC) em amostras de urina canina e felina, enviadas para o laboratório.

Foi determinada a concordância entre o resultado do rácio UPC obtido nas tiras Aution 10PA[®] e o resultado do rácio UPC no analisador químico, tendo em conta os valores da DUE, do pH e a presença ou ausência de hematúria e piúria.

Foi determinada a correlação entre a análise semi-quantitativa nas tiras e a medição quantitativa das proteínas, da creatinina, do rácio UPC, dos eritrócitos e dos leucócitos nos respetivos métodos de referência.

Para uma interpretação da correlação mais correta e completa, as diferenças entre os resultados obtidos com as tiras e os respetivos métodos de referência também foram avaliadas.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAS DE URINA E DESENHO DO ESTUDO

O estudo foi realizado de Setembro a Outubro de 2014 no laboratório VetinLab, situado em Lisboa. Todos os exemplares de urina, canina e felina, enviados para o laboratório para a determinação do rácio UPC foram incluídos na amostra (n=34), sem ter em conta a idade, o sexo, a doença subjacente, a administração de fármacos, o método de colheita nem o tempo de armazenamento. O critério de inclusão utilizado foi um volume suficiente de urina para a realização da análise.

A análise de urina tipo II, a análise química com as tiras reativas urinárias 10PA (Aution Sticks 10PA[®], Arkray) e a análise bioquímica quantitativa foram realizadas dentro de 72 horas após colheita. Os exemplares de urina que não puderam ser analisados até 2 horas após colheita, foram refrigerados à temperatura de 4°C. Todas as análises foram realizadas apenas uma vez e foram todas incluídas na amostra, independentemente das alterações na urianálise.

5.2. ANÁLISE DE URINA TIPO II

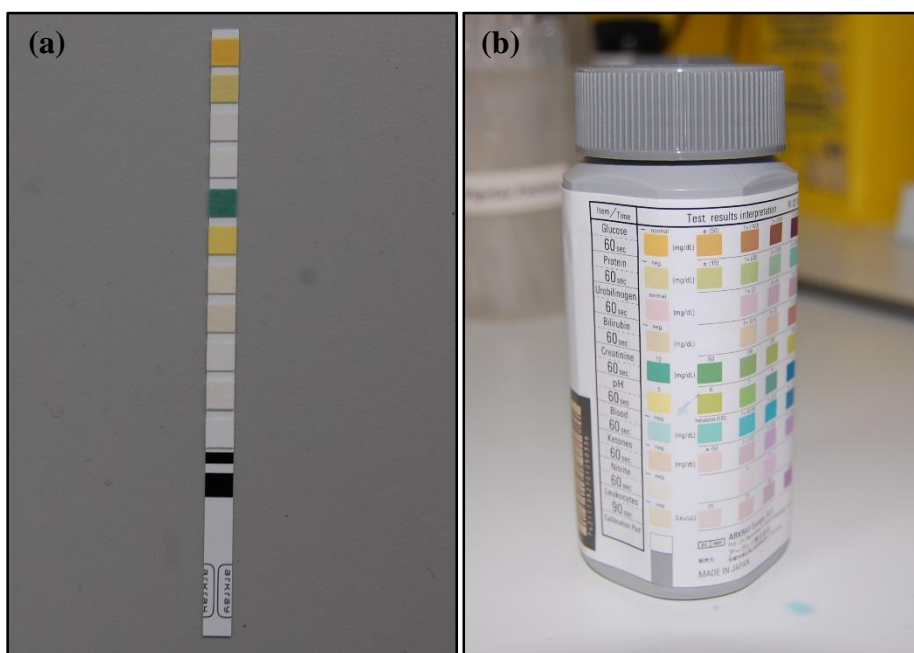
Após a homogeneização da amostra, transferiram-se 5 ml de urina à temperatura ambiente para um tubo de ensaio de 15 ml (Figura 1). Procedeu-se à realização do exame físico da urina, constituído pelos seguintes parâmetros: cor, aspeto, cheiro e DUE (a leitura da densidade foi feita no sobrenadante da amostra centrifugada).

De seguida, realizou-se o exame químico da amostra com as fitas reativas urinárias 10PA (Aution Sticks 10PA[®], Arkray) (Figura 2). No exame químico da urina avaliaram-se os seguintes parâmetros: glucose, proteínas, bilirrubina, urobilinogénio, pH, sangue, corpos cetónicos, nitritos, leucócitos, creatinina e rácio UPC.

Figura 1: Amostra de urina canina dentro de um tubo de ensaio de 15 ml, antes da realização de qualquer procedimento analítico.



Figura 2: (a) Tira urinária de reagentes colorimétricos Aution 10PA® (Arkray). (b) Embalagem das tiras urinárias Aution 10PA®, com a escala padrão para interpretação visual dos resultados.



Centrifugou-se, na centrífugadora Z383K® (Figura 3), o tubo de ensaio de 15 ml com urina, durante 5 min a baixa rotação (1500rpm). No sobrenadante mediu-se a DUE das amostras, através da utilização de um refratômetro clínico (Figura 4), devidamente calibrado com água destilada.

Figura 3: Centrifugadora Z383K® (Hermle) utilizada neste estudo para centrifugar as amostras de urina.



Figura 4: Refratômetro clínico handrefractometer (Euromex®) utilizado neste estudo.



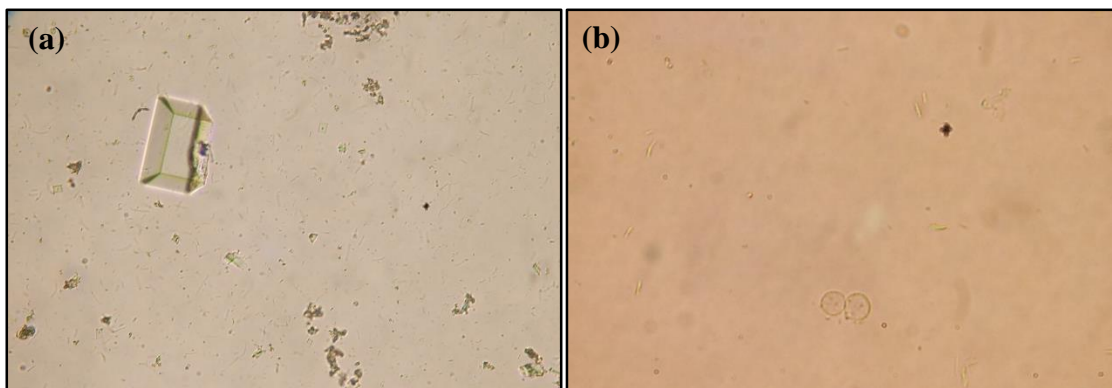
De seguida, desprezou-se o sobrenadante até se obter um volume aproximado de 1 ml. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, fez-se a resuspensão do sedimento no sobrenadante. Aspirou-se uma parte com o auxílio da pipeta e depositou-se uma ou duas gotas sobre a lâmina, colocando uma lamela por cima da gota. A lâmina foi colocada num M.O. (Figura 5) com o condensador baixo, a luz diminuída e o diafragma fechado para se proceder à visualização do sedimento não corado.

Figura 5: Microscópio ótico Nikon Eclipse E400®, utilizado neste estudo para o exame do sedimento urinário.



Realizou-se o exame do sedimento urinário, começando com a ampliação mais baixa (objetiva de 10) e prosseguindo com o aumento progressivo da ampliação até 400x (objetiva de 40). Na objetiva de 10, fez-se a observação de cilindros urinários e na objetiva de 40, fez-se a qualificação e quantificação de eritrócitos, leucócitos, células epiteliais, cristais e outros achados (Figura 6).

Figura 6: Exame microscópico do sedimento urinário. (a) Cristal de estruvite no sedimento urinário de gato. (sem corante; ampliação de 100x) (b) Leucócitos no sedimento urinário canino (sem corante; ampliação de 400x).



5.3. ANÁLISE DE URINA COM AS TIRAS AUTION 10PA

Foram utilizadas fitas reativas urinárias 10PA (Aution Sticks 10PA[®], Arkray) para analisar as amostras de urina dos pacientes incluídos no estudo, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Os resultados das análises foram obtidos através da leitura automática no refletômetro Aution Micro[™] PU-4010 (Figura 7), utilizando as instruções fornecidas pelo fabricante.

Figura 7: Refletômetro Aution Micro[™] PU-4010 (Arkray[®]) utilizado neste estudo para a leitura automática das tiras Aution 10PA[®].



Com o auxílio de uma pipeta, foi colocada uma gota de urina em cada reagente da tira urinária. De seguida, retirou-se o excesso e colocou-se dentro do refletômetro que iniciou a análise após 60 segundos. Os resultados foram impressos em papel pelo refletômetro (Figura 8).

Figura 8: Exemplo de uma impressão da análise feita pelo refletômetro Aution Micro[™] numa tira urinária Aution 10PA[®]. GLU indica a glicose; PRO, proteínas; URO, urobilinogénio; BIL, bilirrubina; CRE, creatinina; BLD, sangue; KET, corpos cetónicos; NIT, nitritos; LEU, leucócitos; P/C, rácio UPC.

```

#MEAS No 1234
ID# -----
2014-10-16 11:49 10PA 23° C
*****
GLU - mg/dL
*PRO 2+ 100 mg/dL
URO NORMAL mg/dL
BIL - mg/dL
CRE 100 mg/dL
PH 5.5
*BLD 2+ 0.2 mg/dL
KET - mg/dL
NIT -
*LEU 500 Leu/uL
*P/C 2+ >500 mg/gCr
  
```

É possível obter resultados sem a utilização do refletómetro, através da visualização e comparação com a escala presente na caixa, mas esta avaliação não foi realizada neste estudo.

A detecção de glicose é feita através da reação cromogénea oxidase-peroxidase, podendo os resultados ser negativo (<50 mg/dl), \pm (50-99 mg/dl), 1+ (100-199 mg/dl), 2+ (200-499 mg/dl), 3+ (500-999 mg/dl) e 4+ (\geq 1000 mg/dl).

O teste para a detecção da proteína baseia-se na reação de erro da proteína do indicador de pH (azul de tetrabromofenol), fornecendo resultados negativos (<15 mg/dl), \pm (15-29 mg/dl), 1+ (30-99 mg/dl), 2+ (100-299 mg/dl), 3+ (300-999 mg/dl) e 4+ (\geq 1000 mg/dl).

A bilirrubina reage com um sal de diazónio, originando uma coloração castanha avermelhada com a seguinte escala: negativo (<0,5 mg/dl), 1+ (0,5-1,9 mg/dl), 2+ (2-5,9 mg/dl), 3+ (\geq 6 mg/dl) e 4+ (over).

O urobilinogénio reage da mesma forma que a bilirrubina e origina resultados negativos (<2 mg/dl), 1+ (2-3,9 mg/dl), 2+ (4-7,9 mg/dl), 3+ (\geq 8 mg/dl) e 4+ (over). Deve ser recordado que este parâmetro não tem validade na medicina veterinária.

Ocorre desenvolvimento de coloração amarela quando a creatinina reage com o cloreto de paládio presente na tira. Os resultados obtidos podem ser 10, 50, 100, 200 e 300 mg/dl, sendo que os resultados de 10 mg/dl indicam diluição da urina e, como fornecem resultados incorretos, devem ser repetidos.

Para a detecção do pH, a tira contém indicadores, verde de bromocresol e azul de bromoxilenol, que se alteram de cor com o pH entre 5 e 9.

O sangue é detetado com base na atividade que a hemoglobina tem semelhante à peroxidase e os resultados variam consoante a presença ou ausência de hemólise. Sem hemólise, os resultados são 1+ ou 2+. Com hemólise, os resultados podem ser \pm (0,03-0,05 mg/dl ou 10-19 eritrócitos/ μ L), 1+ (0,06-0,19 mg/dl ou 20-59 eritrócitos/ μ L), 2+ (0,2-0,9 mg/dl ou 60-299 eritrócitos/ μ L) e 3+ (\geq 1,0 mg/dl ou \geq 300 eritrócitos/ μ L).

O teste para detetar corpos cetónicos baseia-se no princípio da prova de *Legal*, em que os corpos cetónicos reagem com o nitroprussiato de sódio e provocam uma alteração de cor. Os resultados obtidos com este teste podem ser negativo, \pm , 1+ (15-39 mg/dl), 2+ (40-79 mg/dl), 3+ (80-149 mg/dl) e 4+ (\geq 150 mg/dl).

Os nitritos são detetados com base no princípio da reação de *Griess* e os resultados possíveis do teste são: negativo, 1+ e 2+.

A detecção de leucócitos baseia-se na atividade da esterase dos leucócitos, podendo fornecer resultados negativos, 25, 75, 250 e 500 leucócitos/ μ L.

Deve ser recordado que a avaliação dos nitritos e dos leucócitos com as tiras de reagentes não tem validade em medicina veterinária.

O fabricante das tiras disponibiliza uma tabela que permite obter o rácio UPC com base nos resultados de proteína e creatinina urinária obtidos por interpretação visual. Os valores do rácio UPC determinados através da tabela podem ser classificados como normal, normal-diluído, 1+ e 2+. Tendo em conta que neste estudo não foi feita a interpretação visual dos resultados, então a determinação do rácio UPC com recurso à tabela não foi realizada.

O refletómetro Aution Micro™ PU-4010 (Arkray) calcula automaticamente o rácio UPC e apresenta o resultado em mg de proteína por g de creatinina. Os valores são classificados como normais (<80 mg proteína/g creatinina), 1+ (200 mg proteína/g creatinina), 1+ (400 mg proteína/g creatinina) e 2+ (>500 mg proteína/g creatinina).

5.4. ANÁLISE BIOQUÍMICA QUANTITATIVA

Foi feita a quantificação da proteína e da creatinina num analisador químico presente no laboratório (Figura 9). Foram realizados controlos de qualidade no analisador todos os dias. Os métodos analíticos que se utilizaram para a medição da proteína e da creatinina foram, respetivamente, o vermelho de pirogalol e o método enzimático peroxidase-antiperoxidase. O rácio UPC foi calculado automaticamente pelo analisador químico, através da divisão da concentração de proteína urinária, em mg/dl, pela concentração de creatinina urinária, em mg/dl.

Figura 9: Analisador químico clínico RX Monaco® (Randox) utilizado neste estudo para a medição quantitativa da proteína, creatinina e rácio UPC urinários.



5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com recurso ao programa de *software* estatístico IBM SPSS Statistics 20[®]. Os valores de DUE que ultrapassaram o limite superior de deteção do refratómetro de 1.050 foram analisados como 1.052, porque o intervalo mínimo possível de detetar é 0.02. Os valores de creatinina urinária obtidos na tira Aution 10PA[®] que ultrapassaram o limite superior de deteção de 300 mg/dl foram analisados como sendo 500 mg/dl. Os valores do rácio UPC obtidos na tira Aution 10PA[®] que indicaram um rácio normal foram alterados para 80mg de proteína/g de creatinina. Os resultados do rácio UPC de 2+ (>500 mg/g) na tira Aution 10PA[®] foram alterados para 600mg/g e os resultados de 2+ (OVER) foram alterados para 1000mg/g.

Para o desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA[®] foram calculadas a sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, LR+ e LR-. As fórmulas utilizadas para o cálculo destes valores são apresentadas de seguida:

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{VP}{VP + FN} \times 100$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{VN}{VN + FP} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo positivo (\%)} = \frac{VP}{VP + FP} \times 100$$

$$\text{Valor preditivo negativo (\%)} = \frac{VN}{VN + FN} \times 100$$

$$\text{Likelihood ratio positivo} = \frac{\text{Sensibilidade}}{(1 - \text{Especificidade})}$$

$$\text{Likelihood ratio negativo} = \frac{(1 - \text{Sensibilidade})}{\text{Especificidade}}$$

O *gold standard* utilizado para o cálculo destes parâmetros foi o método de referência respetivo de cada variável. No caso da proteinúria e do rácio UPC, o *gold standard* utilizado foi a análise quantitativa do rácio UPC no analisador químico do laboratório. Para a hematúria e piúria, o *gold standard* utilizado foi o número de eritrócitos e leucócitos encontrados na análise microscópica do sedimento.

Para a proteinúria, utilizando um *cut-off* de 15 mg/dl, foram considerados verdadeiros positivos os resultados $\geq \pm$ na tira e ≥ 0.5 (cão) ou 0.4 (gato) no analisador químico. Os resultados $< \pm$ na tira e < 0.5 (cão) ou 0.4 (gato) no analisador químico foram considerados verdadeiros negativos. Os falsos positivos foram todos os resultados positivos na tira ($\geq \pm$) e negativos no analisador químico [< 0.5 (cão) ou 0.4 (gato)]. Os falsos negativos foram todos os resultados negativos na

tira ($< \pm$) e positivos no analisador químico [≥ 0.5 (cão) ou 0.4 (gato)]. Foi realizado o mesmo procedimento, mas com um *cut-off* de 30 mg/dl , ou seja, os resultados na tira $\geq 1+$ foram considerados positivos e os resultados $< 1+$ foram considerados negativos.

Para o rácio UPC anormal, foram considerados verdadeiros positivos os resultados $\geq 1+$ na tira e ≥ 0.5 (cão) ou 0.4 (gato) no analisador químico. Os resultados $< 1+$ na tira e < 0.5 (cão) ou 0.4 (gato) no analisador químico foram considerados verdadeiros negativos. Os falsos positivos foram todos os resultados positivos na tira ($\geq 1+$) e negativos no analisador químico [< 0.5 (cão) ou 0.4 (gato)]. Os falsos negativos foram todos os resultados negativos na tira ($< 1+$) e positivos no analisador químico [≥ 0.5 (cão) ou 0.4 (gato)].

Para a hematúria, foram considerados verdadeiros positivos os resultados $\geq \pm$ na tira e ≥ 5 eritrócitos/campo no M.O. Os resultados $< \pm$ na tira e < 5 eritrócitos/campo no M.O. foram considerados verdadeiros negativos. Os falsos positivos foram todos os resultados positivos na tira ($\geq \pm$) e negativos no M.O. (< 5 eritrócitos/campo). Os falsos negativos foram todos os resultados negativos na tira ($< \pm$) e positivos no M.O. (≥ 5 eritrócitos/campo).

Para a piúria, foram considerados verdadeiros positivos os resultados ≥ 25 leucócitos/ μL na tira e ≥ 5 leucócitos/campo no M.O. Os resultados < 25 leucócitos/ μL na tira e < 5 leucócitos/campo no M.O. foram considerados verdadeiros negativos. Os falsos positivos foram todos os resultados positivos na tira (≥ 25 leucócitos/ μL) e negativos no M.O. (< 5 leucócitos/campo). Os falsos negativos foram todos os resultados negativos na tira (< 25 leucócitos/ μL) e positivos no M.O. (≥ 5 leucócitos/campo).

A sensibilidade e especificidade foram utilizadas para desenhar as curvas ROC para estimar o poder discriminatório das tiras urinárias em detetar proteinúria e rácio UPC alterado em cães e gatos. Para a curva ROC, o *gold standard* (resultado quantitativo do rácio UPC no analisador químico do laboratório) foi classificado como positivo (≥ 0.5 em cães ou ≥ 0.4 em gatos) ou negativo (< 0.5 em cães ou < 0.4 em gatos). Os resultados da proteína na tira urinária foram expressos em $0, 15, 30, 100, 300$ ou 1000 mg/dl e os resultados do rácio UPC na tira urinária foram expressos em $80, 200, 400, 600$ ou 1000 mg/g .

A concordância entre resultados da proteína e do rácio UPC obtidos na tira Aution 10PA[®] e no analisador químico foi verificada através do cálculo do coeficiente κ de Cohen. A concordância entre os resultados da proteína e do rácio UPC obtidos através dos dois métodos foi avaliada considerando as amostras com resultados negativos na tira ($< 1+$) como negativas e aquelas com resultados positivos na tira ($\geq 1+$) como positivas. Os resultados obtidos com o analisador químico foram usados para classificar as amostras como negativas (rácio UPC < 0.4 em gatos e < 0.5 em cães) ou positivas (rácio UPC ≥ 0.4 em gatos e ≥ 0.5 em cães). A análise foi feita em todos os dados sem classificação e após agrupar os dados consoante o valor da DUE (< 1.030

vs ≥ 1.030 no cão e < 1.035 vs ≥ 1.035 no gato; < 1.015 vs ≥ 1.015) e do pH (< 7.5 vs ≥ 7.5). O valor máximo de κ é 1 e corresponde a uma concordância perfeita entre os métodos analisados. Quando o κ é 0 significa que a concordância entre os métodos é igual à concordância por acaso. Valores de κ negativos, apesar de serem muito raros, indicam que a concordância entre métodos é inferior à concordância por acaso. A concordância pode ser classificada da seguinte maneira: fraca se $\kappa \leq 0.20$; razoável se $0.21 \leq \kappa \leq 0.40$; moderada se $0.41 \leq \kappa \leq 0.60$; substancial se $0.61 \leq \kappa \leq 0.80$ e boa se κ for superior a 0.80 (Petrie & Watson, 2013).

Realizou-se o teste de *Wilcoxon* para avaliar as diferenças entre as tiras Aution 10PA® e os respectivos métodos de referência. As variáveis que se compararam foram a proteína e creatinina obtidas com as tiras (mg/dl) e com o analisador químico (mg/dl) e o rácio UPC obtido com o refletómetro Aution Micro™ (mg/g) e com o analisador químico (mg/g).

Calculou-se o coeficiente de correlação de *Spearman* (ρ) para determinar a correlação entre a análise semi-quantitativa com as tiras Aution 10PA® e a medição quantitativa da proteína, creatinina, rácio UPC, eritrócitos e leucócitos. A correlação foi classificada como excelente quando $\rho = 0.93 - 0.99$; boa quando $\rho = 0.80 - 0.92$; razoável quando $\rho = 0.59 - 0.79$ e fraca quando $\rho < 0.59$ (Defontis et al., 2013). Foram realizados gráficos de dispersão para ilustrar a correlação.

Para se proceder à comparação entre os resultados do rácio UPC com o analisador químico do laboratório e os resultados do refletómetro Aution Micro™, foi necessário apresentar os resultados do analisador químico em mg de proteína por g de creatinina. Isto foi feito apresentando a concentração de creatinina urinária em g/dl, em vez de mg/dl, através da seguinte fórmula:

$$Creatinina (g/dl) = \frac{Creatinina (mg/dl)}{1000}$$

6. RESULTADOS

6.1. ESTATÍSTICA DESCRITIVA

6.1.1. Alterações gerais das amostras de urina

Foram avaliadas amostras de urina de 17 cães e 17 gatos. Os resultados pré-analíticos e analíticos das variáveis analisadas estão discriminados nos Anexos 1 e 2. O número de casos que apresentaram alterações na urina estão apresentados na tabela 3 e a prevalência das alterações está esquematizada no seguinte gráfico.

Gráfico 1: Prevalência das alterações registadas na urina tipo II realizada em 17 cães e 17 gatos.

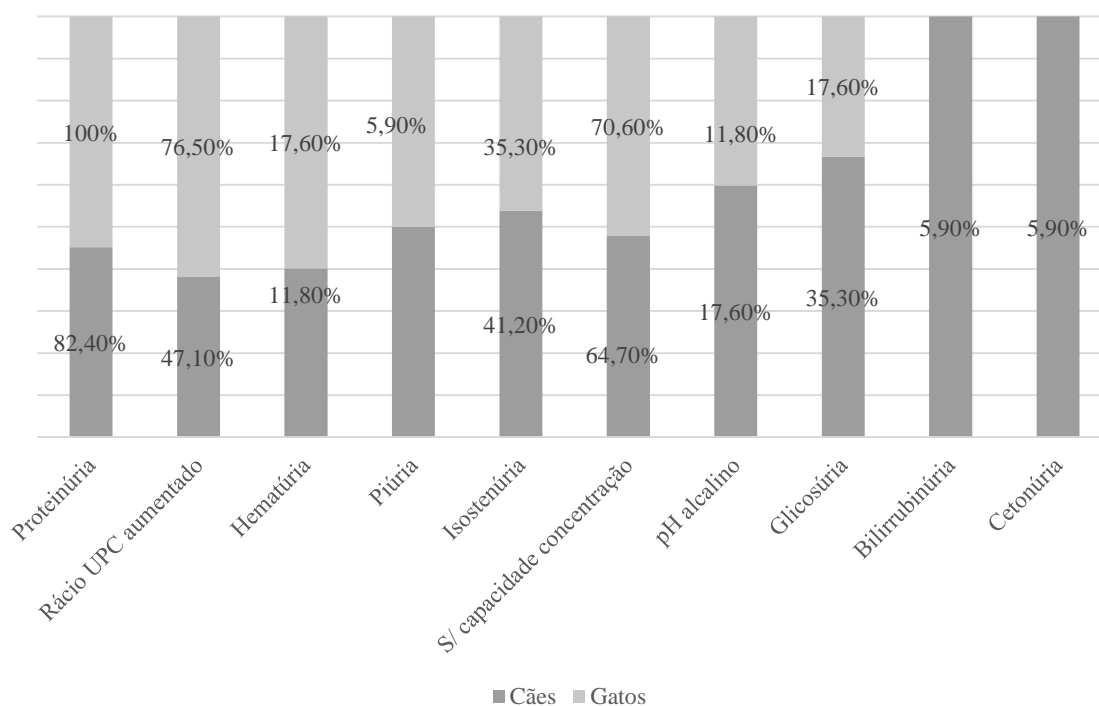


Tabela 3: Número de casos que apresentaram glicosúria, proteinúria, bilirrubinúria, isostenúria, hematúria, cetonúria, piúria e rácio UPC alterado.

		Cães (n = 17)	Gatos (n = 17)
Glicosúria (≥ 50 mg/dl)		6	3
Proteinúria	Aution 10PA (≥ 15 mg/dl)	14	16
	Analizador (≥ 15 mg/dl)	14	17
Bilirrubinúria (≥ 0.5 mg/dl)		1	0
Isostenúria (< 1.015)		7	6
Hematúria	Aution 10PA (≥ 0.03 mg/dl)	5	8
	M.O. (≥ 5 eritrócitos/campo)	2	3
Cetonúria (≥ 5 mg/dl)		1	0
Piúria	Aution 10PA (≥ 25 leucócitos/ μ L)	8	17
	M.O. (≥ 5 leucócitos/campo)	1	1
Rácio UPC	Aution 10PA ≥ 0.2 (≥ 200 mg/g)	5	7
	Analizador (≥ 0.5 cão e ≥ 0.4 gato)	8	13

6.1.2. Densidade urinária específica e pH

Como se pode consultar na tabela 3, 7 (41,2%) cães e 6 (35,3%) gatos apresentaram urinas com isostenúria. Das 17 urinas caninas, 11 (64,7%) apresentaram DUE inferior a 1.030 e 6 (35,3%) igual ou superior a 1.030. Nas 17 urinas felinas, 12 (70,6%) apresentaram DUE inferior a 1.035 e 5 (29,4%) igual ou superior a 1.035. Em relação ao pH, nos cães houve 3 (17,6%) amostras de urina com pH igual ou superior a 7.5 e nos gatos houve apenas 2 (11,8%).

6.1.3. Proteinúria

A frequência dos resultados semi-quantitativos da proteinúria obtidos com as tiras Aution 10PA[®] em cães e gatos estão apresentados no gráfico 2.

Os resultados semi-quantitativos do rácio UPC obtidos com as tiras Aution 10PA[®] e calculados automaticamente pela máquina Aution Micro[™], que apresenta os resultados em mg de proteína por g de creatinina, estão ilustrados no gráfico 3.

Gráfico 2: Frequência dos resultados semi-quantitativos da proteinúria obtidos com as tiras Aution 10PA® em cães e gatos.

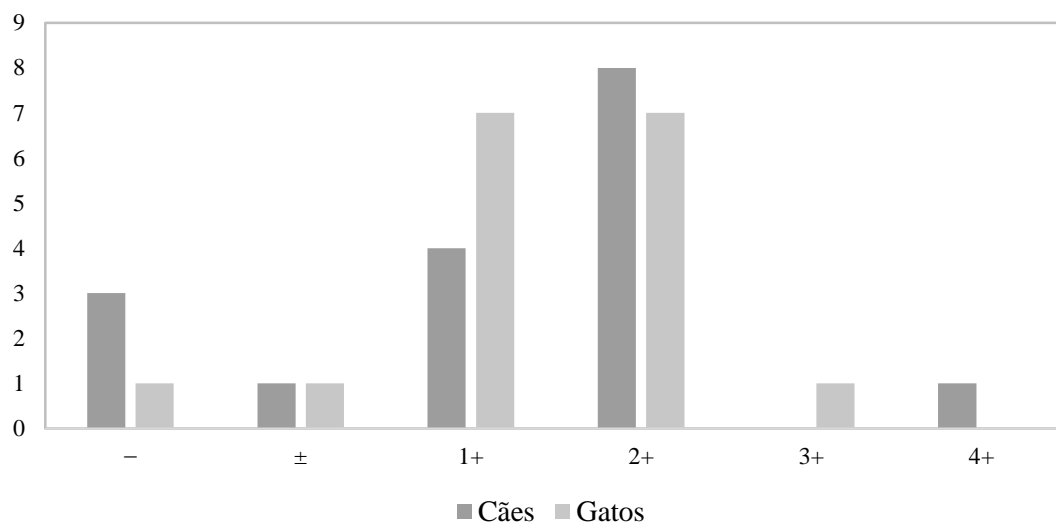
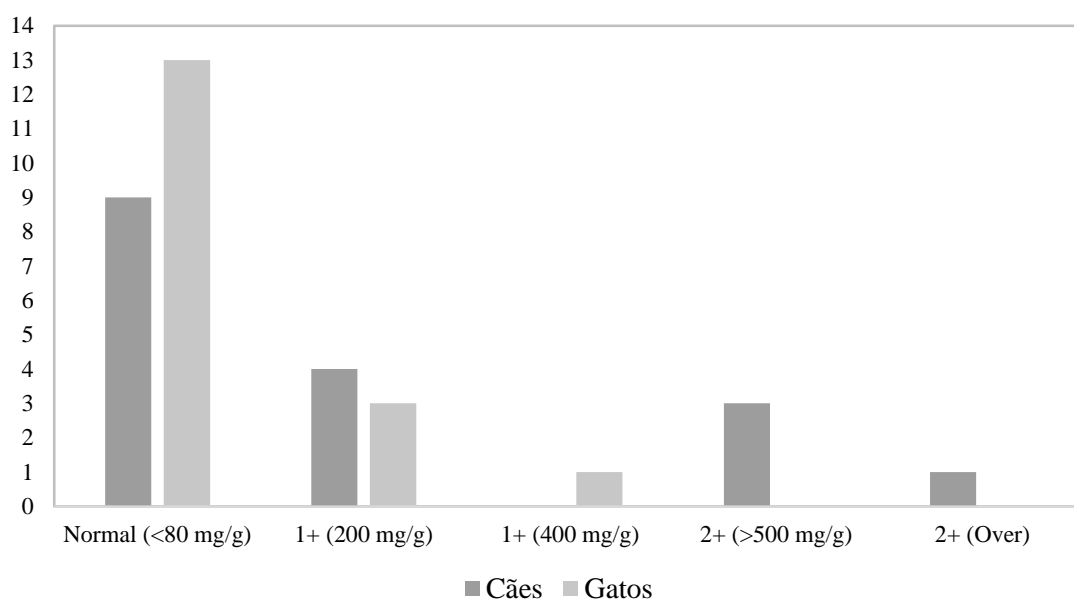


Gráfico 3: Frequência dos resultados semi-quantitativos do rácio UPC, calculados automaticamente pela máquina Aution Micro™, em cães e gatos.



6.2. PRECISÃO DO DIAGNÓSTICO COM AS TIRAS AUTION 10PA®

6.2.1. Desempenho diagnóstico das tiras

Os resultados do desempenho diagnóstico podem ser consultados na tabela 4. Os dados utilizados para calcular o desempenho diagnóstico podem ser consultados em tabelas presentes nos Anexos 3 a 12. A detecção de proteinúria foi muito sensível para os dois valores de *cut-off* (15 mg/dl e 30 mg/dl) em cães e gatos, mas teve baixa especificidade. Com o aumento do valor de *cut-off* de 15 mg/dl para 30 mg/dl, a sensibilidade manteve-se e a especificidade aumentou, tanto nos cães como nos gatos. O rácio UPC teve uma sensibilidade e especificidade perfeita no cão, mas uma baixa sensibilidade no gato.

Tabela 4: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA® com a leitura automática na máquina Aution Micro™ para a detecção de proteinúria e rácio UPC alterado em cães e gatos.

	Cães (n = 17)			Gatos (n = 17)		
	Proteinúria		Rácio UPC (<i>cut-off</i> : 0.5)	Proteinúria		Rácio UPC (<i>cut-off</i> : 0.4)
	(<i>cut-off</i> : 15mg/dl)	(<i>cut-off</i> : 30mg/dl)		(<i>cut-off</i> : 15mg/dl)	(<i>cut-off</i> : 30mg/dl)	
S (95% IC)	100	100	100	92.3 (77.8-100)	92.3 (77.8-100)	30.8 (5.68-55.86)
E (95% IC)	33.3 (2.5-64.1)	44.4 (12.0-76.9)	100	0	25 (17.4-67.4)	100
VPP (%)	57.1	61.5	100	75	80	100
VPN (%)	100	100	100	0	50	30.8
LR+	1.5	1.8	imp	0.9	1.2	imp
LR-	0	0	0	imp	0.3	0.69

Em relação à precisão do diagnóstico de hematúria com as tiras Aution 10PA®, estas mostraram 100% sensibilidade em cães e gatos, comparado com o método de referência (análise microscópica). A especificidade foi de 80% em cães e 64.3% em gatos. Na detecção de piúria com as tiras Aution 10PA®, obteve-se uma sensibilidade de 50% em cães e de 100% em gatos e uma especificidade de 53.3% em cães e 0% em gatos. Os VPP e VPN e os LR+ e LR-, relativos à detecção de hematúria e piúria, estão descritos na tabela 5.

Tabela 5: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA® com a leitura automática na máquina Aution Micro™ para a detecção de hematúria e piúria em cães e gatos.

	Cães (n = 17)		Gatos (n = 17)	
	Hematúria (<i>cut-off</i> : ≥ 5 eritrócitos/campo)	Piúria (<i>cut-off</i> : ≥ 5 leucócitos/campo)	Hematúria (<i>cut-off</i> : ≥ 5 eritrócitos/campo)	Piúria (<i>cut-off</i> : ≥ 5 leucócitos/campo)
S (95% IC)	100	50 (19.3-100)	100	100
E (95% IC)	80 (59.8-100)	53.3 (28.1-78.6)	64.3 (39.2-89.4)	0
VPP (%)	40	12.5	37.5	5.9
VPN (%)	100	88.9	100	imp
LR+	5	1.07	2.8	1
LR-	0	0.94	0	imp

Como se pode ver na tabela 6, quando a análise foi feita com a exclusão dos casos com pH igual ou superior a 7.5, a especificidade aumentou em cães nos dois valores de *cut-off* e aumentou nos gatos no valor de *cut-off* de 30mg/dl. Com a exclusão dos casos com pH igual ou superior a 7.0, a especificidade aumentou nos dois valores de *cut-off* em cães e apenas no valor de *cut-off* de 30mg/dl em gatos.

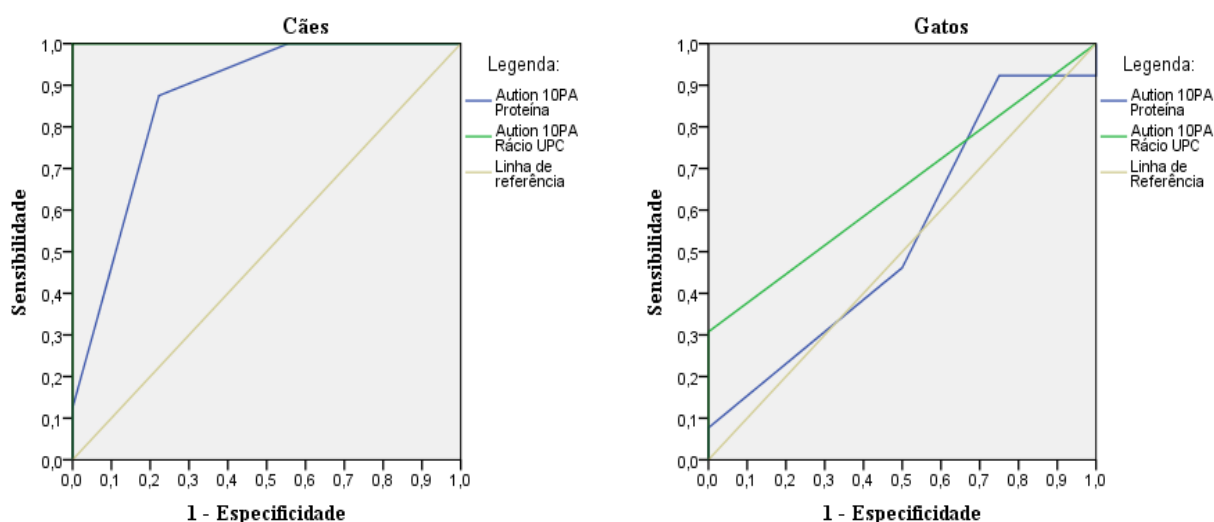
Tabela 6: Desempenho diagnóstico das tiras Aution 10PA® com a leitura automática na máquina Aution Micro™ para a detecção de proteinúria em cães e gatos, em urinas com diferentes valores de pH.

		Cães		Gatos	
		S (95% IC)	E (95% IC)	S (95% IC)	E (95% IC)
Proteinúria (<i>cut-off</i> : 15mg/dl)	pH<7.5	100	50 (10.0-90.0)	90.9 (73.9-100)	0
	pH<7.0	100	60 (17.1-100)	90 (71.4-100)	0
Proteinúria (<i>cut-off</i> : 30mg/dl)	pH<7.5	100	66.7 (55.2-100)	90.9 (73.9-100)	25 (17.4-67.4)
	pH<7.0	100	80.0 (44.9-100)	90.0 (71.4-100)	33.3 (20.0-86.7)

6.2.2. Curva ROC e poder discriminatório das tiras

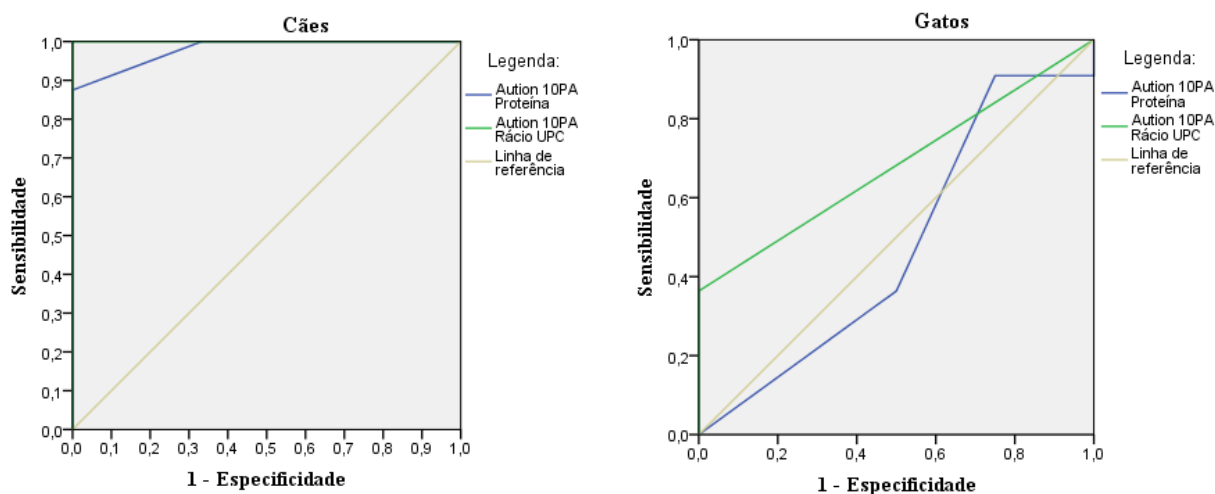
Na análise realizada em todos os casos incluídos na amostra para avaliar o poder discriminatório das tiras Aution 10PA® na detecção de proteinúria, obteve-se uma área sob a curva ROC de 0.87 (IC 95%, 0.69 a 1; $p < 0.05$) nos cães e de 0.54 (IC 95%, 0.20 a 0.88; $p = 0.82$) nos gatos. Na análise realizada em todos os casos incluídos na amostra para avaliar o poder discriminatório das tiras Aution 10PA® na detecção de rácio UPC aumentado, obteve-se uma área sob a curva ROC de 1.0 (IC 95%, 1 a 1; $p < 0.01$) nos cães e de 0.65 (IC 95%, 0.37 a 0.93; $p = 0.37$) nos gatos. As curvas ROC desta análise estão apresentadas na seguinte figura.

Figura 10: Curvas ROC construídas com os resultados obtidos com as tiras Aution 10PA® em amostras de urina de 17 cães e 17 gatos, utilizando o rácio UPC calculado no analisador químico como critério de referência para a identificação de proteinúria e de rácio UPC alterado.



Quando se excluíram da análise as urinas com pH igual ou superior a 7.5 para avaliar a detecção de proteinúria, a área sob a curva subiu para 0.98 (IC 95%, 0.92 a 1; $p < 0.01$) nos cães, mas desceu nos gatos para 0.48 (IC 95%, 0.11 a 0.84; $p = 0.90$). Para a detecção do rácio UPC aumentado, a área sob a curva ROC manteve-se 1.0 (IC 95%, 1 a 1; $p < 0.01$) nos cães e subiu nos gatos para 0.68 (IC 95%, 0.40 a 0.96; $p = 0.30$). As curvas ROC desta análise estão apresentadas na figura 11.

Figura 11: Curvas ROC construídas com os resultados obtidos com as tiras Aution 10PA® em amostras de urina de cães e gatos com pH inferior a 7.5, utilizando o rácio UPC calculado no analisador químico como critério de referência para a identificação de proteinúria e rácio UPC alterado.



6.2.3. Concordância do rácio UPC com diferenças na DUE e pH

Os valores do coeficiente de *Cohen* (κ) calculados para avaliar a concordância entre os resultados do rácio UPC nas tiras Aution 10PA® e no método de referência, consoante os valores de DUE e do pH, encontram-se discriminados na tabela 7. Em cães, a concordância foi perfeita na análise realizada na amostra completa, como na análise realizada consoante os valores de DUE e de pH. Em gatos, a análise da amostra completa resultou numa concordância fraca. Quando se excluíram as amostras com $\text{pH} \geq 7.5$, a concordância foi razoável, assim como quando se analisaram as urinas com $\text{DUE} \geq 1.015$. Em todas as outras análises a concordância foi 0.

Tabela 7: Concordância do diagnóstico entre a proteinúria e o rácio UPC medido nas tiras Aution 10PA® e no analisador químico em cães, tendo em conta os valores da DUE e do pH.

	Coeficiente de <i>Cohen</i> (κ)			
	Cães (n = 17)		Gatos (n = 17)	
	Proteinúria	UPC	Proteinúria	UPC
Toda a amostra	0.43 (p < 0.05)	1.0 (p < 0.01)	0.21 (p = 0.35)	0.17 (p = 0.21)
DUE < 1.030/1.035	0.79 (p < 0.01)	1.0 (p < 0.01)	0	0
DUE ≥ 1.030/1.035	0.08 (p = 0.62)	1.0 (p < 0.05)	0.12 (p = 0.58)	0
DUE < 1.015	1.0 (p < 0.01)	1.0 (p < 0.05)	.	0
DUE ≥ 1.015	0.19 (p = 0.30)	1.0 (p < 0.01)	0.12 (p = 0.66)	0.23 (p = 0.24)
pH < 7.5	0.70 (p < 0.01)	1.0 (p < 0.01)	0.19 (p = 0.42)	0.23 (p = 0.16)
pH ≥ 7.5	0	.	.	0

6.2.4. Concordância do rácio UPC em amostras com/sem hematúria e piúria

Os valores do coeficiente de *Cohen* (κ) calculados para avaliar a concordância entre os resultados do rácio UPC nas tiras Aution 10PA® e no método de referência, em amostras com hematúria e piúria, encontram-se discriminados na tabela 8. Nas amostras de urina sem hematúria e sem piúria a concordância foi perfeita nos cães, mas fraca nos gatos. Os gatos com hematúria revelaram concordância razoável.

Tabela 8: Concordância do diagnóstico entre o rácio UPC medido nas tiras Aution 10PA® e o rácio UPC obtido com o analisador químico em cães, tendo em conta a presença ou ausência de hematúria e piúria

	Coeficiente de <i>Cohen</i> (κ)			
	Cães (n = 17)		Gatos (n = 17)	
	Proteinúria	UPC	Proteinúria	UPC
Sem hematúria	0.39 (p = 0.06)	1.0 (p < 0.001)	0.28 (p = 0.29)	0.14 (p = 0.31)
Hematúria	.	.	0	0.4 (p = 0.39)
Sem piúria	0.41 (p < 0.05)	1.0 (p < 0.001)	0.20 (p = 0.38)	0.14 (p = 0.27)
Piúria

6.3. COMPARAÇÃO ENTRE AS TIRAS AUTION 10PA E OS MÉTODOS DE REFERÊNCIA

6.3.1. Teste de *Wilcoxon*

Como os valores de significância do teste de *Wilcoxon* foram maiores que 0.05 para a variável proteinúria em cães (p = 0.16) e gatos (p = 0.59), aceita-se a hipótese nula, ou seja, não existem diferenças significativas entre a distribuição da proteinúria medida pelas tiras e a distribuição da proteinúria medida pelo analisador químico. Em relação às variáveis creatinina urinária e rácio UPC urinário, todas elas tiveram valores de significância menores que 0.05 e, por isso, rejeita-se a hipótese nula, ou seja existem diferenças significativas entre a distribuição da creatinina e do rácio UPC medidos com as tiras e a distribuição da creatinina e do rácio UPC medidos com o analisador químico. Estes valores podem ser consultados no Anexo 13.

6.3.2. Correlação de *Spearman*

Os coeficientes de correlação de *Spearman* estão apresentados na tabela 9. Houve uma correlação boa para as variáveis proteína e creatinina medidas na urina de cães. Para a variável proteinúria em gatos a correlação foi razoável. Em gatos, a creatinina urinária e o rácio UPC tiveram uma correlação fraca.

A correlação entre os valores de eritrócitos e de leucócitos obtidos com as tiras e com o M.O. foi fraca em cães e gatos. As figuras 12, 13 e 14 foram obtidas através da realização de um gráfico de dispersão de pontos e ilustram a correlação entre os valores da proteína, creatinina e rácio UPC obtidos com as tiras (eixo das abcissas) e aqueles obtidos com os métodos de referência (eixo das ordenadas).

Tabela 9: Coeficientes de correlação de *Spearman* entre a análise semi-quantitativa nas tiras e a medição quantitativa das proteínas, da creatinina, do rácio UPC, do sangue e dos leucócitos.

	Cão (n = 17)	Gato (n=17)
Proteínas (mg/dl)	0.88 (p < 0.01)	0.75 (p < 0.01)
Creatinina (mg/dl)	0.90 (p < 0.01)	0.40 (p = 0.11)
Rácio UPC (mg/g)	0.82 (p < 0.01)	0.44 (p = 0.07)
Sangue	0.57 (p < 0.05)	0.49 (p < 0.05)
Leucócitos	0.27 (p = 0.30)	.

Figura 12: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições da proteína urinária com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).

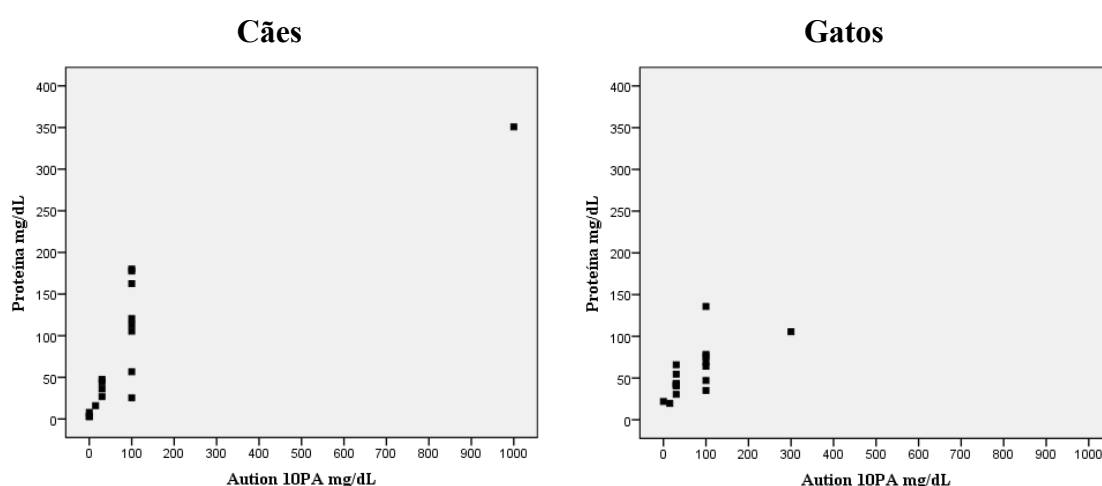


Figura 13: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições da creatinina urinária com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).

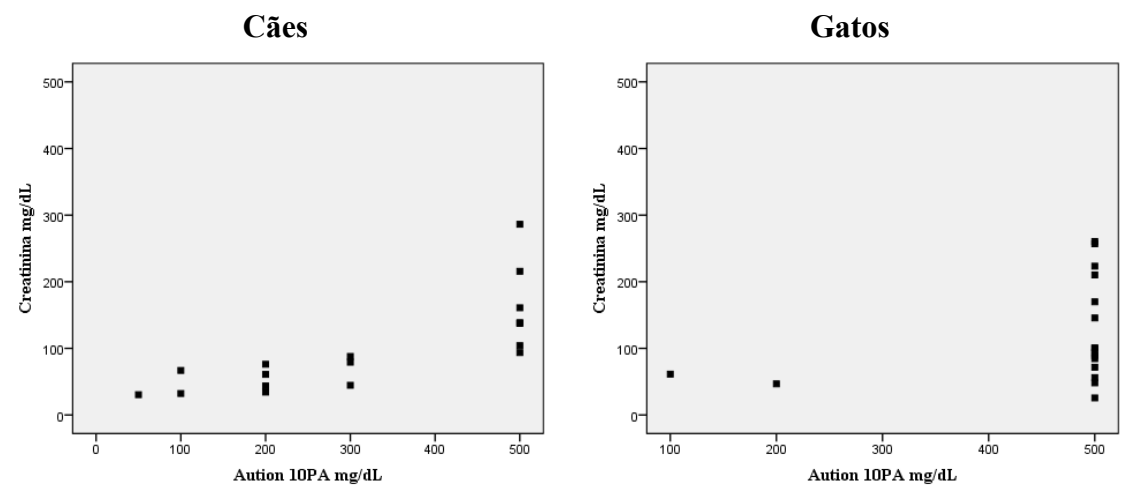
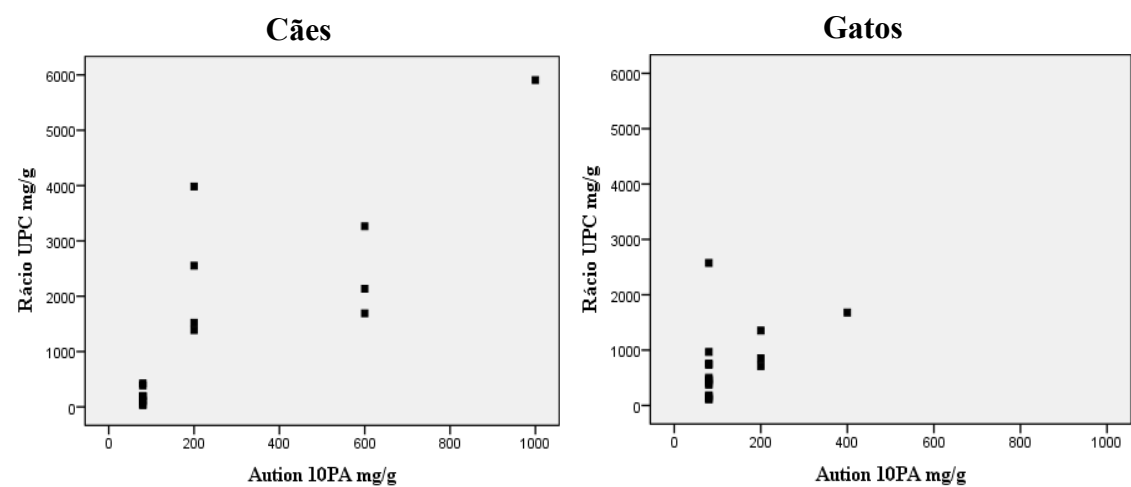


Figura 14: Gráficos de dispersão mostrando a relação entre as medições do rácio UPC (mg/g) com as tiras Aution 10PA® (eixo das abcissas) e com o método de referência (eixo das ordenadas).



7. DISCUSSÃO

A prevalência da proteinúria e do rácio UPC anormal (acima do valor considerado normal pela IRIS) em cães e gatos encontrada nesta amostra não reflete a verdadeira prevalência desta alteração clínica na população e encontra-se, muito provavelmente, sobrestimada. Isto porque os dados foram recolhidos de urinas enviadas para o laboratório provenientes de animais com suspeita de serem proteinúricos, em vez de uma amostra aleatória. É possível que este efeito também tenha influência na elevada prevalência de animais sem capacidade de concentrar urina, ou seja, com DUE inferior a 1.030 no cão e inferior a 1.035 no gato, uma vez que normalmente os animais com proteinúria renal têm comprometimento da função renal.

O VPP e o VPN são afetados pela prevalência do atributo e, como tal, só fazem sentido se forem utilizados em estudos transversais, onde o número de indivíduos com e sem o atributo reflete a probabilidade desse atributo na população. O primeiro representa a probabilidade de um indivíduo ter efetivamente o atributo quando o modelo previu ele ter o atributo e o segundo a probabilidade de não ter o atributo quando o modelo previu não ter o atributo (Oliveira, 2009). Neste caso particular, em que a prevalência da proteinúria na amostra não reflete a verdadeira prevalência na população, não faz sentido interpretar os valores preditivos, mas sim a sensibilidade e a especificidade.

A sensibilidade e a especificidade são medidas do desempenho de um teste, em que a primeira representa a percentagem de casos classificados corretamente entre os que têm o atributo e a segunda representa a percentagem de casos classificados corretamente nos que não têm o atributo (Carneiro, 2001). Baseado nos resultados obtidos, pode utilizar-se o parâmetro da proteína nas tiras Aution 10PA[®] como rastreio de diagnóstico de proteinúria em cães e gatos, mas é necessária alguma precaução na interpretação de resultados positivos, uma vez que a taxa de falsos positivos é relativamente alta (baixa especificidade). Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos em estudos científicos publicados até à data. Na verdade, o que está descrito é que os falsos positivos que ocorrem no teste das tiras com reagentes para a proteinúria estão associados a urinas concentradas e alcalinas e, normalmente, originam resultados vestigiais. Por isso, quando se aumentou o valor de *cut-off* do teste para 30 mg/dl, a especificidade também aumentou. Neste estudo, não foi possível determinar o efeito que as urinas concentradas teriam na especificidade do teste devido à frequência baixa de casos com DUE superior a 1.030 no cão (6) ou 1.035 (5) no gato. No entanto, prevê-se que nas urinas mais concentradas exista uma maior taxa de falsos positivos e, consequentemente, diminuição da especificidade.

Excluindo da análise os animais com pH urinário igual ou superior a 7.5, a especificidade aumentou em cães para os dois valores de *cut-off* e em gatos, apenas no valor de *cut-off* de 30mg/dl. O mesmo aconteceu quando se excluíram as urinas com pH igual ou superior a 7.0, mas com um aumento mais significativo. Ou seja, neste estudo a elevada taxa de falsos positivos ocorreu devido ao pH alcalino das urinas. Assim, com base nestes resultados, as tiras Aution 10PA[®] podem ser usadas com confiança em cães como teste de rastreio e confirmação de diagnóstico de proteinúria, quando o resultado é igual ou superior a 30mg/dl e quando o pH urinário é inferior a 7.0. Nos gatos, como tem uma grande sensibilidade, pode ser utilizado como teste de rastreio de proteinúria, mas não é aconselhável utilizar-se como teste de confirmação de diagnóstico devido à elevada taxa de falsos positivos. O facto de a especificidade ser menor em gatos do que em cães, para todos os valores de *cut-off* e de pH, também está de acordo com a literatura, uma vez que está descrita uma maior taxa de falsos positivos em gatos do que em cães.

Em relação à deteção de rácio UPC anormal, os dados deste estudo mostraram que as tiras Aution 10PA[®] podem ser utilizadas com grande confiança para o rastreio e confirmação de diagnóstico de proteinúria em cães. Em gatos, o teste teve especificidade perfeita, mas sensibilidade baixa (muitos falsos negativos). Por isso, em gatos é indicado que se usem as tiras apenas quando se pretende a confirmação de diagnóstico. Ou seja, um resultado positivo no parâmetro do rácio UPC é indicativo de proteinúria e a amostra deve ser enviada para o laboratório se se pretender a quantificação.

Foram realizados diversos estudos que avaliaram o desempenho diagnóstico das tiras urinárias de diferentes fabricantes. Para fins comparativos, os resultados obtidos nestes estudos podem ser consultados na tabela 10. Num estudo realizado por Defontis et al. (2013) para avaliar o desempenho das tiras Aution 10PA[®], obtiveram-se resultados bastante semelhantes aos deste estudo. Na deteção de proteinúria, utilizando um *cut-off* de 30mg/dl, o teste teve uma sensibilidade de 94.7% e especificidade de 73.0% em cães e uma sensibilidade de 100% e especificidade de 63.2% em gatos. Na deteção de rácio UPC anormal, utilizando um *cut-off* de 400mg/g em cães e 200mg/g em gatos, o teste teve uma sensibilidade de 84.6% e especificidade de 91.2% em cães e uma sensibilidade de 76.0% e especificidade de 100% em gatos.

Os resultados de um estudo de Welles et al. (2006) mostraram que as tiras Multistix PRO[®] têm especificidade comparável e maior sensibilidade que o teste ASS para diagnosticar proteinúria em cães e gatos. Concluíram também que as tiras Multistix PRO[®] podem ser usadas para cal-

cular manualmente o rácio UPC, constituindo uma boa alternativa para o diagnóstico de proteinúria significativa em cães, mas não em gatos. Os autores do estudo que utilizou as tiras Multistix PRO® não têm explicação plausível para os resultados do rácio UPC em gatos.

Tabela 10: Desempenho diagnóstico de tiras urinárias de diferentes fabricantes na deteção de proteinúria e de rácio UPC alterado em cães e gatos, publicadas anteriormente em estudos científicos.

Autor e ano do estudo		Proteína		Rácio UPC	
Tira urinária		S (%)	E (%)	S(%)	E(%)
Defontis et al. (2013)	Cães	94.7	73.0	84.6	91.2
	Aution 10PA® Gatos	100.0	63.2	76.0	100.0
Zatelli et al. (2010)	Cães	94.3	50.8	-	-
	Combur 10® Gatos	-	-	-	-
Bauer et al. (2008)	Cães	-	-	78.6	76.2
	Multistix 10 SG® e Microalbustix® Gatos	-	-	-	-
Welles et al. (2006)	Cães	93.3	87.5	90.3	66.7
	Multistix PRO® Gatos	100.0	90.0	100.0	34.1

Tendo em conta a boa sensibilidade e especificidade das tiras em detetar hematúria em cães, poderia aconselhar-se a sua utilização na prática clínica. No entanto, os valores apresentados neste estudo não são fidedignos, uma vez que o número de cães com hematúria no exame do sedimento foi muito pequeno (2). Em gatos ocorreu a mesma limitação, ou seja, apenas 3 gatos foram diagnosticados com hematúria no exame do sedimento, e, para além disso, a especificidade do teste foi baixa.

Em relação à deteção de piúria, os resultados são ainda menos fidedignos, uma vez que apenas um cão e um gato foram diagnosticados com piúria através do exame do sedimento urinário. Num estudo de Defontis et al. (2013) relativo às tiras Aution 10PA®, verificou-se que a análise da tira urinária é mais sensível que a microscopia na deteção de sangue. Os autores deste estudo consideram que os falsos positivos foram provavelmente causados por pigmentos na urina (bilirrubinúria), hemólise (urina diluída ou alcalina) ou contaminação da amostra com agentes oxidantes ou desinfetantes. Recomendam ainda que se utilizem as tiras Aution 10PA® na urina de cães e gatos para a deteção de hematúria, mas não para a deteção de piúria. A utilização das tiras urinárias para medir leucócitos também não foi recomendada por Bauer et al. (2008).

Na literatura está descrita baixa especificidade das tiras em detetar leucócitos em gatos, que pode ser devido à lise dos leucócitos na urina, à reação cruzada com esterases não específicas

dos leucócitos, ou uma atividade de esterase leucocitária em urinas de gatos superior à dos humanos (Holan, Kruger, Gibbons, & Swenson, 1997).

A curva ROC relaciona a sensibilidade (eixo das ordenadas) com a taxa de falsos positivos ou 1-Especificidade (eixo das abscissas), e cada ponto do gráfico corresponde à probabilidade do atributo previsto pelo modelo ocorrer. A área sob a curva ROC reflete o desempenho do teste, sendo 1.0 num teste perfeito e 0.50 num teste sem qualquer capacidade discriminatória. Para um teste ter interesse clínico, a área sob a curva ROC deve exceder 0.80 (Oliveira, 2009). Com base nos resultados obtidos com a curva ROC, pode dizer-se que as tiras Aution 10PA[®] têm um poder discriminatório elevado para detetar proteinúria e rácio UPC alterado em cães, mas não em gatos. Verificou-se ainda, em relação aos cães, que o parâmetro do rácio UPC medido nas tiras Aution 10PA[®] tem maior capacidade preditiva que o parâmetro da proteinúria. Tal como aconteceu com a sensibilidade e especificidade, a área debaixo da curva ROC aumentou com a exclusão de urinas alcalinas da análise ($\text{pH} \geq 7.5$). Estudos anteriores que analisaram o poder discriminatório de tiras urinárias na deteção de proteinúria ou de rácio UPC alterado apresentaram valores de área sob a curva ROC superiores a 0.80 em cães, mas não em gatos (Lyon, et al., 2010) (Zatelli, Paltrinieri, Nizi, Roura, & Zini, 2010).

O coeficiente de *Cohen* (κ) analisa a concordância geral, relacionando a concordância observada com aquela que seria de esperar se a categorização tivesse sido feita ao acaso. Os valores de κ obtidos neste estudo podem estar sobrestimados porque só foram utilizadas duas categorias (positivo ou negativo) para classificar as urinas. Em cães, a concordância entre os dois métodos foi perfeita quando a análise foi feita em toda a amostra e quando foi analisada consoante os valores de pH e DUE. Foi também perfeita na análise de urinas sem hematuria e sem piúria. Não foi possível calcular o valor de κ em urinas de cães com $\text{pH} \geq 7.5$ porque só existiam 3 casos e todos eles apresentavam resultados negativos quer nas tiras, quer no analisador químico. Também não foi possível calcular o valor de κ em urinas de cães com hematuria nem com piúria porque só existiam 2 casos (2 casos de hematuria e 1 caso de piúria) e todos eles apresentavam resultados positivos nas tiras e no analisador químico. Em gatos o coeficiente κ foi 0 na maior parte das análises devido às frequências de cada categoria. Por exemplo, para as amostras com $\text{DUE} < 1.030$, só existiam resultados positivos no analisador químico. No entanto, foi possível calcular o coeficiente quando a análise foi feita em toda a amostra, quando a $\text{DUE} \geq 1.015$ e quando o $\text{pH} < 7.5$. Em gatos a concordância razoável ou fraca entre o rácio UPC obtido com as tiras e com o analisador está de acordo com os resultados do desempenho das tiras. Num estudo de Zatelli et al. (2010) em cães, avaliou-se a concordância entre a proteinúria nas tiras

urinárias e o rácio UPC no analisador e verificou-se que a concordância era maior em urinas com $DUE < 1.030$ e $DUE < 1.012$.

Quando se comparou a distribuição dos valores da proteinúria, creatinúria e do rácio UPC medidos com as tiras Aution 10PA[®] com a distribuição dos valores daqueles parâmetros medidos com o analisador químico verificou-se que a distribuição foi idêntica para a proteinúria, mas não para a creatinúria nem para o rácio UPC.

Quando se pretende analisar a correlação entre duas variáveis que não seguem uma distribuição normal deve recorrer-se ao coeficiente de correlação ordinal de *Spearman* (ρ), que mede a intensidade da relação entre variáveis ordinais. Este coeficiente assume o valor 1 quando as observações tiverem exatamente a mesma ordem e o valor -1 quando tiverem ordem inversa. Assume o valor de 0 quando as ordens se dispuserem de uma forma aleatória uma relativamente à outra (Cunha, Martins, Sousa, & Oliveira, 2007).

Este estudo indicou que a correlação entre a leitura automática da proteína, creatinina e rácio UPC nas tiras urinárias e o resultado quantitativo no analisador químico foi boa em cães. Em gatos a correlação foi razoável para a variável proteína, mas fraca para todas as outras variáveis. Por isso, para estimar o valor da creatinina e do rácio UPC na urina de gatos não se aconselha a utilização destas tiras.

A correlação entre o sangue e os leucócitos obtidos na tira e os valores obtidos no exame do sedimento foi fraca em cães e gatos e, como tal, não é aconselhável estimar o valor destes parâmetros com as tiras Aution 10PA[®]. No entanto, a fraca correlação do sangue e dos leucócitos neste estudo tem que ser interpretada com muito cuidado devido ao limitado número de amostras com hematúria e piúria.

Na tabela seguinte, podem ser consultados os coeficientes de correlação de *Spearman* que foram calculados em vários estudos, utilizando tiras urinárias de vários fabricantes.

Tabela 11: Coeficientes de correlação de *Spearman* entre os resultados semi-quantitativos das tiras urinárias de diferentes fabricantes e os resultados quantitativos dos métodos de referência.

		Proteína	Creatinina	UPC	Sangue	Leucócitos
Defontis et al. (2013)	Cães	0.88	0.86	0.75	0.64	0.44
Aution 10PA [®]	Gatos	0.91	0.83	0.89	0.75	0.11
Bauer et al. (2008)	Cães	0.90	0.76	0.67	-	-
Multistix 10 SG [®] e Microalburstix [®]	Gatos	-	-	-	-	-
Welles et al. (2006)	Cães	0.78	0.78	0.37	-	-
Multistix PRO [®]	Gatos	0.87	0.76	0.12	-	-

Os coeficientes de correlação de *Spearman* obtidos neste estudo entre os resultados obtidos nas tiras Aution 10PA® e os métodos de referência em cães foram muito semelhantes a um estudo anterior de Defontis et al. (2013). Em cães, o coeficiente que diferiu mais entre os estudos foi o que avaliava a correlação entre os leucócitos na tira e no exame do sedimento, tendo sido menor e sem significância estatística no presente estudo. Este resultado deve-se provavelmente ao número reduzido de amostras caninas com piúria (uma se considerarmos o exame do sedimento e 8 se considerarmos as tiras).

Em gatos, os coeficientes de *Spearman* obtidos neste estudo diferiram substancialmente do estudo de Defontis et al. (2013), tendo sido inferiores para todas as variáveis analisadas. O coeficiente de correlação entre o resultado semi-quantitativo da creatinina e o resultado quantitativo não foi estatisticamente significativo, provavelmente devido ao elevado número de amostras com concentrações de creatinina de 500mg/dl nas tiras (15). O rácio UPC também não teve uma boa correlação, possivelmente como consequência dos valores da creatinina obtidos na tira, pois no estudo de Defontis et al. (2013) a correlação foi boa. O facto de existir um grande número de resultados de creatinina com concentração de 500mg/dl (além do limite superior de deteção das tiras) pode ser explicado pelas características da urina felina, que é mais concentrada que a urina humana e canina. De facto, após se ter diluído (1:20) uma urina felina onde se obteve um resultado “over” (que foi classificado para efeitos estatísticos como 500mg/dl), o resultado da creatinina foi 100mg/dl. Seria interessante estudar este aspeto da urina felina em estudos posteriores. No estudo de Defontis et al. (2013), também existiu um grande número de amostras com valores de creatinina de 500mg/dl, mas como a amostra era maior ($n = 50$), também ocorreram concentrações de creatinina com valores inferiores. No presente estudo, apenas a proteína teve uma boa correlação entre os dois métodos em gatos ($p = 0.75$; $p < 0.05$).

Os estudos de Welles et al. (2006) e de Bauer et al. (2008) revelaram uma boa correlação entre a proteína calculada com as tiras e o método de referência. No entanto, a correlação entre a creatinina calculada com as tiras e o método de referência foi razoável e inferior à do presente estudo. Esta diferença entre o presente estudo e os estudos referidos anteriormente pode ser explicada pela presença de diferentes reagentes nas tiras para a medição de creatinina urinária. As tiras Aution 10PA® [utilizadas no presente estudo e no estudo de Defontis et al. (2013)] utilizam um composto de paládio, alterando a cor da fita de azul-esverdeado para amarelo, enquanto as tiras Multistix PRO® [utilizadas no estudo de Welles et al. (2006)] e as tiras Multistix 10 SG® e Microalbumistix® [utilizadas no estudo de Bauer et al. (2008)] utilizam um complexo

de cobre que altera a cor de laranja para azul. Possivelmente, esta diferença nos reagentes produziu resultados diferentes na correlação da creatinina. No entanto, são necessários estudos futuros para comparar os dois tipos de tiras urinárias. O rácio UPC também teve uma correlação superior neste estudo e no estudo de Defontis et al. (2013), provavelmente como consequência da concentração da creatinina urinária.

As limitações deste estudo foram o tamanho e a seleção da amostra. Devido ao pequeno número de animais pertencentes a cada espécie (17 cães e 17 gatos), a prevalência das alterações na urina foi menor, o que limitou a interpretação de vários cálculos estatísticos como, por exemplo, o coeficiente de *Cohen* (κ) consoante os valores de DUE e pH ou a correlação do sangue e dos leucócitos entre os diferentes métodos. Além disso, o facto de a amostra não ter sido recolhida aleatoriamente da população (animais doentes e saudáveis) e ter sido recolhida de animais que à partida têm a condição (tendo a urina sido enviada para o laboratório para confirmação de diagnóstico), não nos permite tirar conclusões sobre o valor preditivo das tiras, nem sobre a prevalência das alterações urinárias na população.

O facto de existirem muitas amostras felinas com concentrações de creatinina que ultrapassam o valor máximo de deteção das tiras urinárias afetou os resultados estatísticos. Seria interessante tentar perceber em estudos futuros e numa amostra maior, qual a prevalência de urinas felinas com concentrações de creatinina superiores ao limite superior de deteção. Se a prevalência for significativa, talvez a utilização de tiras urinárias não sejam de grande utilidade nesta espécie.

Outra limitação deste estudo foi não ter sido realizada a análise urinária com tiras de diferentes fabricantes para comparar os valores de proteinúria e do rácio UPC entre os vários testes e calcular o poder discriminatório de cada teste. Seria interessante realizar curvas ROC com os resultados dos vários testes e comparar as áreas debaixo da curva ROC, sabendo que quanto maior fosse a área, maior seria a capacidade preditiva do teste. Também teria sido útil comparar as várias tiras urinárias de diferentes fabricantes presentes no mercado nacional e analisar o seu custo/benefício.

Para além dos parâmetros que foram estudados no presente trabalho, teria sido interessante medir os restantes parâmetros que fazem parte das tiras Aution 10PA[®], através dos respetivos métodos de referência para comparação de resultados.

8. CONCLUSÕES

Em cães e gatos, é necessária alguma precaução na interpretação de resultados positivos obtidos com as tiras Aution 10PA[®] no parâmetro da proteína urinária, principalmente quando o resultado for vestigial. As tiras podem ser usadas com confiança em cães como teste de rastreio e confirmação de diagnóstico de proteinúria, quando o resultado é igual ou superior a 30mg/dl e quando o pH urinário é inferior a 7.0. No entanto, este parâmetro pode ser utilizado com grande confiança para rastreio de diagnóstico em cães e gatos. Ou seja, um resultado negativo indica fortemente que o cão ou o gato não têm proteinúria.

Os resultados do rácio UPC obtidos nas tiras Aution 10PA[®] podem utilizar-se, com grande confiança, como teste de rastreio e confirmação de diagnóstico de proteinúria em cães. Em gatos, a medição do rácio UPC nas tiras é indicada para confirmar o diagnóstico, mas não como rastreio (muitos falsos negativos).

Em cães e gatos, os valores da proteína urinária obtidos com as tiras distribuem-se de forma idêntica aos valores obtidos de maneira quantitativa.

Pode concluir-se que as tiras podem ser usadas para estimar a concentração da proteína na urina de cães e gatos e para estimar a concentração de creatinina e de rácio UPC na urina de cães. Em gatos, não se podem utilizar as tiras Aution 10PA[®] para estimar o valor da creatinina nem do rácio UPC.

As tiras Aution 10PA[®] não devem ser utilizadas para estimar o número de eritrócitos nem de leucócitos na urina de cães e gatos, devendo por isso recorrer-se sempre ao exame do sedimento urinário.

9. BIBLIOGRAFIA

- Albasan, H., Lulich, J. P., Osborne, C. A., Lekcharoensuk, C., Ulrich, L. K., & Carpenter, K. A. (2003). Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 176-179.
- Archer, J. (2005). Urine analysis. Em E. Villiers, & L. Blackwood (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline clinical pathology* (pp. 149-168). London: BSAVA.
- Ayoub, J. A., Beaufriere, H., & Acierno, M. J. (2013). Association between urine osmolality and specific gravity in dogs and the effect of commonly measured urine solutes on that association. *American Journal of Veterinary Research*, 1542-1545.
- Bartges, J. W. (2010). Hematuria and other conditions causing discolored urine. Em S. J. Ettinger, & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine, volume 1. (7th ed.)*. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Bauer, N., Rettig, S., & Moritz, A. (2008). Evaluation of the clinitek status automated dipstick analysis device for semiquantitative testing of canine urine. *Research in Veterinary Science*, 467-472.
- Beatrice, L., Nizi, F., Callegari, D., Paltrinieri, S., Zini, E., D'Ippolito, P., & Zatelli, A. (2010). Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1221-1224.
- Carneiro, A. V. (2001). Princípios de seleção e uso de testes diagnósticos: propriedades intrínsecas dos testes. *Revista Portuguesa de Cardiologia*, 1267-1274.
- Chew, D. J., & DiBartola, S. P. (1998). *Interpretation of canine and feline urinalysis*. St. Louis: Ralston Purina Company.
- Cunha, G., Martins, M. R., Sousa, R., & Oliveira, F. F. (2007). *Estatística aplicada às ciências e tecnologias da saúde*. Lisboa: Lidel.
- Defontis, M., Bauer, N., Failing, K., & Moritz, A. (2013). Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. *Research in Veterinary Science*, 440-445.
- DiBartola, S. P. (2010). Clinical approach and laboratory evaluation of renal disease. Em S. J. Ettinger, & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine, volume 2. (7th ed.)*. (pp. 1755-1786). Missouri: Saunders Elsevier.
- Dossin, O., Germain, C., & Braun, J. P. (2003). Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *Journal of Veterinary Medicine*, 322-325.

-
- Dukes, H. H., & Reece, W. O. (2004). *Dukes' physiology of domestic animals*. Ithaca and London: Cornell University Press.
- Elliott, J., & Grauer, G. F. (2007). Proteinuria. Em J. Elliott, & G. F. Grauer (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline nephrology and urology* (pp. 69-78). London: BSAVA.
- Fettman, M. J. (1989). Comparison of urinary protein concentration and protein/creatinine ratio vs routine microscopy in urinalysis of dogs: 500 cases (1987-1988). *Journal of the american veterinary medical association*, 195(7), 972-976.
- George, J. W. (2001). The usefulness and limitations of hand-held refractometers in veterinary laboratory medicine: a historical and technical review. *Veterinary Clinical Pathology*, 201-210.
- Gossett, K. A., Turnwald, G. H., Kearney, M. T., Greco, D. S., & Cleghorn, B. (1987). Evaluation of gamma-glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio from spot samples of urine supernatant, as an indicator of urinary enzyme excretion in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, (48) 455-457.
- Grauer, G. F. (2009). Proteinuria: implications for management. Em J. D. Bonagura, & D. C. Twedt, *Kirk's current veterinary therapy*. (14th ed.). (pp. 860-863). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Grauer, G. F. (2009). Urinary tract disorders. Em R. W. Nelson, & C. G. Couto (Eds.), *Small animal internal medicine*. (4th ed.). (pp. 607-694). St. Louis, Missouri: Mosby Elsevier.
- Grauer, G. F. (2011). Proteinuria: measurement and interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 121-127.
- Grauer, G. F. (21 de Outubro de 2012). *Nuts and bolts of proteinuria*. Obtido de International Veterinary Information Service: <http://www.ivis.org/proceedings/sevc/2012/lectures/eng/103.pdf>
- Grauer, G. F., Greco, D. S., Behrend, E. N., Mani, I., Fettman, M. J., & Allen, T. A. (1995). Estimation of quantitative enzymuria in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicosis using urine enzyme/creatinine ratios from spot urine samples. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, (9) 324-327.
- Grauer, G. F., Greco, D. S., Getzy, D. M., Cowgill, L. D., Vaden, S. L., Chew, D. J., Barsanti, J. A. (2000). Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *Journal of veterinary internal medicine*, 526-533.
- Harley, L., & Langston, C. (2012). Proteinuria in dogs and cats. *The Canadian Veterinary Journal*, 631-638.
- Heuter, K. J., Buffington, C., & Chew, D. J. (1998). Agreement between two methods for measuring pH in cats and dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 996-998.

- Holan, K. M., Kruger, J. M., Gibbons, S. N., & Swenson, C. L. (1997). Clinical evaluation of a leukocyte esterase test-strip for detection of feline pyuria. *Veterinary Clinical Pathology*, 126-131.
- Jacob, F., Polzin, D. J., Osborn, C. A., Neaton, J. D., Kirk, C. A., Allen, T. A., & Swanson, L. L. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the american veterinary medical association*, 393-400.
- Kinnear, P. R., & Gray, C. D. (2000). *SPSS for windows made simple*. East Sussex: Psychology Press.
- Lees, G. E., Brown, S. A., Elliot, J., Grauer, G. F., & Vaden, S. L. (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (small animal). *Journal of veterinary internal medicine*, 377-385.
- LeVine, D. N., Zhang, D., Harris, T., & Vaden, S. L. (2009). The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein:creatinine ratios. *Veterinary Clinical Pathology*, 53-56.
- Littman, M. P. (2011). Protein-losing nephropathy in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 31-62.
- Lyon, S. D., Sanderson, M. W., Vaden, S. L., Lappin, M. R., Jensen, W. A., & Grauer, G. F. (2010). Comparison of urine dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein-to-creatinine ratio, and species-specific ELISA methods for detection of albumin in urine samples of cats and dogs. *Journal of the american veterinary medical association*, 874-879.
- Mardell, E. J., & Sparkes, A. H. (2006). Evaluation of a commercial in-house test kit for the semi-quantitative assessment of microalbuminuria in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 269-278.
- Maroco, J. (2010). *Análise estatística - com utilização do spss (3ªed.)*. Lisboa: Edições sílabo.
- McCaw, D. L., Knapp, D. W., & Hewett, J. E. (1985). Effect of collection time and exercise restriction on the prevention of urine protein excretion, using urine protein/creatinine ratio in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 1665-1669.
- Oliveira, A. G. (2009). *Bioestatística, epidemiologia e investigação*. Lisboa: Lidel.
- Petrie, A., & Watson, P. (2013). *Statistics for veterinary and animal science (3rd ed.)*. West Sussex: Willey-blackwell.
- Pressler, B. M., Vaden, S. L., Wayne, J. A., & Simpson, D. (2002). Detection of canine microalbuminuria using semiquantitative test strips designed for use with human urine. *Veterinary Clinical Pathology*, 56-60.
- Raskin, R. E., Murray, K. A., & Levy, J. K. (2002). Comparison of home monitoring methods for feline urine pH measurement. *Veterinary Clinical Pathology*, 51-55.

-
- Reine, N. J., & Langston, C. E. (2005). Urinalysis interpretation: how to squeeze out the maximum information from a small sample. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, 2-10.
- Rossi, G., Giori, L., Campagnola, S., Zatelli, A., Zini, E., & Paltrinieri, S. (2012). Evaluation of factors that affect analytic variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 779-788.
- Segev, G. (2010). Proteinuria. Em S. J. Ettinger, & E. C. Feldman (Eds.), *Textbook of veterinary internal medicine, volume 1. (7th ed.)*. (pp. 168-171). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.
- Smets, P. M., Meyer, E., Maddens, B., Duchateau, L., & Daminet, S. (2010). Effect of sampling method and storage conditions on albumin, retinol-binding protein, and N-acetyl-b-D-glucosaminidase concentrations in canine urine samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 896-902.
- Squires, R. A. (2005). Laboratory evaluation of renal disorders. Em E. Villiers, & L. Blackwood (Eds.), *BSAVA Manual of canine and feline clinical pathology* (pp. 169-183). London: BSAVA.
- Steinberg, E., Drobatz, K., & Aronson, L. (2009). The effect of substrate composition and storage time on urine specific gravity in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 536-539.
- Stockham, S. L., & Scott, M. A. (2002). Urinary system. Em S. L. Stockham, & M. A. Scott, *Fundamentals of veterinary clinical pathology* (pp. 277-336). Iowa: Blackwell Publishing.
- Swenson, C. L., Boisvert, A. M., Gibbons-Burgener, S. N., & Kruger, J. M. (2011). Evaluation of modified wright-staining of dried urinary sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 256-264.
- Swenson, C. L., Boisvert, A. M., Kruger, J. M., & Gibbons-Burgener, S. N. (2004). Evaluation of modified wright-staining of urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1282-1289.
- Tripathi, N. K., Gregory, C. R., & Latimer, K. S. (2011). Urinary system. Em K. S. Latimer (Ed.), *Duncan & Prasse's veterinary laboratory medicine : clinical pathology. (5th ed.)*. (pp. 253-282). West Sussex: Wiley-Blackwell.
- Vaden, S. L., Pressler, B. M., Lappin, M. R., & Jensen, W. A. (2004). Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Veterinary clinical pathology*, 14-19.
- Verlander, J. W. (2007). Renal Physiology. Em J. G. Cunningham, & B. G. Klein, *Textbook of veterinary physiology. (4th ed.)*. (pp. 527-563). St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier.

- Wamsley, H., & Alleman, R. (2007). Complete urinalysis. Em J. Elliot, & G. F. Grauer, *BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology*. (2nd ed.). (pp. 87-116). London: BSAVA.
- Watson, P. J. (2014). Clinical manifestations of hepatobiliary disease. Em R. W. Nelson, & C. G. Couto, *Small animal internal medicine*. (5th ed.) (pp. 501-511). St Louis, Missouri: Mosby Elsevier .
- Way, L. I., Sullivan, L. A., Johnson, V., & Morley, P. S. (2013). Comparison of routine urinalysis and urine gram stain for detection of bacteriuria in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 23-28.
- Welles, E. G., Whatley, E. M., Hall, A. S., & Wright, J. C. (2006). Comparison of multistix PRO dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein (UP), urine creatinine (UC), and UP:UC ratio in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 31-36.
- Whittemore, J. C., Gill, V. L., Jensen, W. A., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2006). Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumin-creatinine ratio and systemic disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 958-963.
- Whittemore, J. C., Miyoshi, Z., Jensen, W. A., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2007). Association of microalbuminuria and the urine albumin-to-creatinine ratio with systemic disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1165-1169.
- Zatelli, A., Paltrinieri, S., Nizi, F., Roura, X., & Zini, E. (2010). Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 235-240.

10. ANEXOS

Anexo 1: Tabela com os fatores pré-analíticos das amostras de urina recolhidas no laboratório.

n	Nº processo	T arma-zen (h)	Temp (°C)	Espécie
1	9859	<24	4	Canídeo
2	9861	<2	24	Felídeo
3	9890	<2	24	Felídeo
4	9889	<2	24	Canídeo
5	9956	<2	24	Felídeo
6	10042	24	4	Felídeo
7	10171	24	4	Felídeo
8	10167	<2	24	Canídeo
9	10227	<2	24	Canídeo
10	10240	<2	24	Felídeo
11	10239	24	4	Canídeo
12	10242	24	4	Canídeo
13	10215	48	4	Felídeo
14	10143	144	4	Felídeo
15	10263	72	4	Canídeo
16	10324	<2	24	Canídeo
17	10333	<2	24	Felídeo
18	10424	72	4	Canídeo
19	10436	48	4	Canídeo
20	10471	24	4	Canídeo
21	10468	<2	24	Felídeo
22	10486	24	4	Canídeo
23	10533	24	4	Canídeo
24	10469	48	4	Felídeo
25	10496	24	4	Canídeo
26	10461	48	4	Felídeo
27	10559	24	4	Felídeo
28	10552	24	4	Felídeo
29	10567	24	4	Felídeo
30	10584	24	4	Canídeo
31	10569	24	4	Canídeo
32	10521	48	4	Felídeo
33	10746	24	4	Canídeo
34	10691	24	4	Felídeo

Anexo 2: Tabela com os valores das variáveis analisadas no laboratório com as tiras Aution 10PA® e os métodos de referência disponíveis (analisador químico, M.O. e refratômetro).

n	Nº pro- cesso	glucose Tiras (mg/dl)	proteínas		bilirrubina Tiras (mg/dl)	urobilinogénio Tiras (mg/dl)
			Tiras (mg/dl)	Analísador (mg/dl)		
1	9859	–	2+ (100)	25,47	–	1+ (2)
2	9861	–	1+ (30)	41,2	–	Normal
3	9890	–	2+ (100)	64,1	–	2+ (4)
4	9889	± (50)	4+ (1000)	350,77	–	2+ (4)
5	9956	–	1+ (30)	65,94	–	1+ (2)
6	10042	–	2+ (100)	47,03	–	1+ (2)
7	10171	–	1+ (30)	54,67	–	1+ (2)
8	10167	± (50)	1+ (30)	27,02	–	1+ (2)
9	10227	–	± (15)	16,0	–	1+ (2)
10	10240	–	2+ (100)	35,19	–	1+ (2)
11	10239	± (50)	2+ (100)	177,61	–	1+ (2)
12	10242	± (50)	1+ (30)	44,33	–	1+ (2)
13	10215	± (50)	–	21,91	–	1+ (2)
14	10143	± (50)	2+ (100)	69,25	–	1+ (2)
15	10263	± (50)	1+ (30)	36,16	–	1+ (2)
16	10324	–	1+ (30)	47,61	–	Normal
17	10333	± (50)	1+ (30)	40,59	–	1+ (2)
18	10424	–	–	7,91	–	Normal
19	10436	–	2+ (100)	120,51	–	Normal
20	10471	1+ (100)	2+ (100)	180,08	–	Normal
21	10468	–	2+ (100)	78,41	–	Normal
22	10486	–	2+ (100)	162,54	–	Normal
23	10533	–	2+ (100)	113,15	–	Normal
24	10469	–	2+ (100)	76,05	–	Normal
25	10496	–	2+ (100)	56,66	2+ (2)	2+ (4)
26	10461	–	1+ (30)	43,14	–	Normal
27	10559	–	2+ (100)	135,73	–	Normal
28	10552	–	3+ (300)	105,49	–	Normal
29	10567	–	1+ (30)	30,52	–	Normal
30	10584	–	–	2,84	–	Normal
31	10569	–	–	2,77	–	Normal
32	10521	–	1+ (30)	43,66	–	Normal
33	10746	–	2+ (100)	105,3	–	Normal
34	10691	–	± (15)	19,55	–	Normal

Anexo 2 (continuação): Tabela com os valores das variáveis analisadas no laboratório com as tiras Aution 10PA® e os métodos de referência disponíveis (analisador químico, M.O. e refratômetro).

n	Nº processo	pH Tiras	sangue		Corpos cetônicos Tiras (mg/dl)	Nitritos Tiras
			Tiras (mg/dl)	M.O. (eritrócitos)		
1	9859	7,5	—	Raros	—	—
2	9861	5,5	—	Raros	—	—
3	9890	7,5	1+ (0,06)	4	—	—
4	9889	7,0	—	Raros	—	—
5	9956	5,0	2+ (0,2)	Raros	—	—
6	10042	6,5	1+ (0,06)	150	—	—
7	10171	7,0	2+ (0,2)	Raros	—	1+
8	10167	7,0	—	4	—	—
9	10227	5,5	—	Raros	—	—
10	10240	7,0	—	Raros	—	—
11	10239	5,5	—	Raros	—	1+
12	10242	6,0	—	Raros	—	—
13	10215	6,5	—	Raros	—	—
14	10143	6,0	—	Raros	—	—
15	10263	7,5	—	Raros	+ - (5)	1+
16	10324	5,5	+ - (0,03)	10	—	—
17	10333	5,5	1+ (0,06)	4	—	1+
18	10424	5,5	—	Raros	—	—
19	10436	5,5	3+ (1)	4	—	—
20	10471	6,0	1+ (0,06)	10	—	—
21	10468	6,0	2+ (0,2)	4	—	—
22	10486	5,5	1+ (0,06)	Raros	—	—
23	10533	5,5	—	Raros	—	—
24	10469	6,5	—	Raros	—	—
25	10496	7,5	—	Raros	—	—
26	10461	5,5	2+ (0,2)	10	—	—
27	10559	6,0	3+ (1)	>250	—	—
28	10552	7,5	—	Raros	—	—
29	10567	6,5	—	Raros	—	—
30	10584	6,0	—	4	—	—
31	10569	5,0	—	Raros	—	—
32	10521	5,5	—	Raros	—	—
33	10746	5,5	2+ (0,2)	Raros	—	—
34	10691	6,5	—	Raros	—	—

Anexo 2 (continuação): Tabela com os valores das variáveis analisadas no laboratório com as tiras Au-tion 10PA® e os métodos de referência disponíveis (analisador químico, M.O. e refratômetro).

n	Nº pro-cesso	Leucócitos		Creatinina		DUE	P/C	
		Tiras (leu/uL)	M.O.	Tiras	Analisador (mg/dl)		Tiras (mg/gCr)	Anali-sador
1	9859	250	Ausentes	Over	215,7	>1.050	Normal (<80)	0.1
2	9861	500	Ausentes	Over	56,13	1.012	Normal (<80)	0.7
3	9890	500	Ausentes	Over	84,51	1.012	Normal (<80)	0.8
4	9889	500	4	Over	137,43	1.038	1+ (200)	2.6
5	9956	500	Ausentes	Over	25,6	1.008	Normal (<80)	2.6
6	10042	500	Ausentes	Over	257,01	>1.050	Normal (<80)	0.2
7	10171	500	Ausentes	Over	145,67	1.028	Normal (<80)	0.4
8	10167	500	Ausentes	Over	138,61	>1.050	Normal (<80)	0.2
9	10227	250	Ausentes	Over	160,91	1.036	Normal (<80)	0.1
10	10240	500	Ausentes	Over	223,35	>1.050	Normal (<80)	0.2
11	10239	250	Ausentes	300	44,59	1.020	1+ (200)	4.0
12	10242	250	Ausentes	Over	104,06	>1.050	Normal (<80)	0.4
13	10215	500	Ausentes	Over	48,19	1.022	Normal (<80)	0.5
14	10143	500	Ausentes	Over	71,63	1.014	Normal (<80)	1.0
15	10263	250	Ausentes	Over	93,63	1.020	Normal (<80)	0.4
16	10324	–	4	200	34,32	1.012	1+ (200)	1.39
17	10333	500	Ausentes	Over	100,54	1.017	Normal (<80)	0.4
18	10424	–	Ausentes	200	43,55	1.012	Normal (<80)	0.2
19	10436	–	Ausentes	300	79,21	1.018	1+ (200)	1.5
20	10471	–	Ausentes	50	30,48	1.010	2+ (Over)	5.9
21	10468	500	4	200	46,71	1.008	1+ (400)	1.7
22	10486	–	Ausentes	200	76,13	1.014	2+ (>500)	2.1
23	10533	–	Ausentes	100	66,88	1.012	2+ (>500)	1.7
24	10469	500	Ausentes	Over	89,2	1.018	1+ (200)	0.9
25	10496	–	4	Over	286,28	>1.050	Normal (<80)	0.2
26	10461	500	Ausentes	Over	93,5	1.028	Normal (<80)	0.5
27	10559	500	30	Over	100,25	1.030	1+ (200)	1.4
28	10552	500	Ausentes	Over	210,19	>1.050	Normal (<80)	0.5
29	10567	500	Ausentes	Over	260,38	>1.050	Normal (<80)	0.1
30	10584	–	Ausentes	300	87,88	1.016	Normal (<80)	0
31	10569	–	Ausentes	200	60,91	1.010	Normal (<80)	0
32	10521	500	Ausentes	100	61,28	1.012	1+ (200)	0.7
33	10746	500	25	100	32,26	1.010	2+ (>500)	3.3
34	10691	500	Ausentes	Over	169,89	>1.050	Normal (<80)	0.1

Anexo 3: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados da proteína obtidos com as tiras Aution 10PA® (*cut-off*:15 mg/dl) na urina de cães.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq \pm$)	8	6	14
Tira-negativo ($< \pm$)	0	3	3
Total	8	9	17

Anexo 4: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados da proteína obtidos com as tiras Aution 10PA® (*cut-off*:30 mg/dl) na urina de cães.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq 1+$)	8	5	13
Tira-negativo ($< 1+$)	0	4	4
Total	8	9	17

Anexo 5: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados da proteína obtidos com as tiras Aution 10PA® (*cut-off*:15 mg/dl) na urina de gatos.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq \pm$)	12	4	16
Tira-negativo ($< \pm$)	1	0	1
Total	13	4	17

Anexo 6: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados da proteína obtidos com as tiras Aution 10PA® (*cut-off*:30 mg/dl) na urina de gatos.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq 1+$)	12	3	15
Tira-negativo ($< 1+$)	1	1	2
Total	13	4	17

Anexo 7: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados do rácio UPC obtidos com as tiras Aution 10PA[®] (*cut-off*: 200mg/g) na urina de cães.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq 1+$)	8	0	8
Tira-negativo ($< 1+$)	0	9	9
Total	8	9	17

Anexo 8: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo dos resultados do rácio UPC obtidos com as tiras Aution 10PA[®] (*cut-off*: 200mg/g) na urina de gatos.

	Proteinúrico	Não-proteinúrico	Total
Tira-positivo ($\geq 1+$)	4	0	4
Tira-negativo ($< 1+$)	9	4	13
Total	13	4	17

Anexo 9: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo das tiras Aution 10PA[®] (*cut-off*: 0.03mg/dl) para detetar hematúria em cães.

	Hematúria	Sem hematúria	Total
Tira-positivo ($\geq \pm$)	2	3	5
Tira-negativo ($< \pm$)	0	12	12
Total	2	15	17

Anexo 10: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo das tiras Aution 10PA[®] (*cut-off*: 0.03mg/dl) para detetar hematúria em gatos.

	Hematúria	Sem hematúria	Total
Tira-positivo ($\geq \pm$)	3	5	8
Tira-negativo ($< \pm$)	0	9	9
Total	3	14	17

Anexo 11: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo das tiras Aution 10PA® (*cut-off*: 25leucócitos/ μ L) para detetar piúria em cães.

	Piúria	Sem piúria	Total
Tira-positivo ($\geq 25\text{leuc}/\mu\text{L}$)	1	7	8
Tira-negativo ($<25\text{leuc}/\mu\text{L}$)	1	8	9
Total	2	15	17

Anexo 12: Dados usados para calcular a sensibilidade, a especificidade, o valor preditivo positivo e o valor preditivo negativo das tiras Aution 10PA® (*cut-off*: 25leucócitos/ μ L) para detetar piúria em gatos.

	M.O. ($\geq 5\text{leuc}/\text{campo}$)	M.O. ($< 5\text{leuc}/\text{campo}$)	Total
Tira-positivo ($\geq 25\text{leuc}/\mu\text{L}$)	1	16	17
Tira-negativo ($<25\text{leuc}/\mu\text{L}$)	0	0	0
Total	1	16	17

Anexo 13: Valores de Z e de significância obtidos com o teste de *Wilcoxon* para avaliar as diferenças da distribuição das variáveis proteinúria, creatinúria e rácio UPC obtidas com as tiras Aution 10PA® e com os métodos de referência.

		Proteinúria (mg/dl)	Creatinúria (mg/dl)	Rácio UPC (mg/g)
Cães	Z	-1,396 ^a	-3,621 ^b	-2,722 ^a
	Valor de significância	,163	,000	,006
Gatos	Z	-,544 ^b	-3,621 ^b	-2,959 ^a
	Valor de significância	,586	,000	,003

a. Valor baseado nos ranks negativos.

b. Valor baseado nos ranks positivos.