

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO ABDOMINAL E  
BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE  
SEPSE E LESÃO HEPÁTICA EM CADELAS COM  
PIOMETRA**

**Beatriz Gasser**

**Médica Veterinária**

**2023**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO ABDOMINAL E  
BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE  
SEPSE E LESÃO HEPÁTICA EM CADELAS COM  
PIOMETRA**

**Discente: Beatriz Gasser**

**Orientador: Prof. Dr. Marcus Antônio Rossi Feliciano**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.**

**2023**

G251a Gasser, Beatriz  
Avaliação da perfusão abdominal e biomarcadores para diagnóstico precoce de sepse e lesão hepática em cadelas com piometra / Beatriz Gasser. -- Jaboticabal, 2023  
56 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Marcus Antônio Rossi Feliciano  
Coorientador: Ricardo Andrés Ramirez Uscategui

1. Ultrassonografia veterinária. 2. Falência de múltiplos órgãos. 3. Choque séptico. 4. Ultrassonografia Doppler. 5. Infecção. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO ABDOMINAL E BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO PRECOZE DE SEPSE E LESÃO HEPÁTICA EM CADELAS COM PIOMETRA

AUTORA: BEATRIZ GASSER

ORIENTADOR: MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO

COORIENTADOR: RICARDO ANDRES RAMIREZ USCATEGUI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Cirurgia Veterinária, área: Saúde Animal pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. MARCUS ANTÔNIO ROSSI FELICIANO (Participação Presencial)  
Diagnostico por Imagem / Universidade de Sao Paulo USP FZEA PirassunungaSP



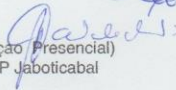
Profª. Dra. DANUTA PULZ DOICHE (Participação Presencial)  
Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



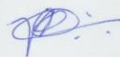
Pesquisadora Dra. EDNA MIREYA GÓMES ORTIZ (Participação Presencial)  
Médica Veterinária Autônoma / Jaboticabal/SP



Prof. Dr. CARLOS AUGUSTO ARAÚJO VALADÃO (Participação Presencial)  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal



Prof. Dr. PAULO FERNANDES MARCUSSO (Participação Presencial)  
Depto. Clínica Veterinária / FMVZ Unesp Botucatu



Jaboticabal, 06 de janeiro de 2023

**Impacto esperado:** Esta tese aborda a sepse como tema frequente e atual, de relevância mundial tanto na medicina quanto na veterinária e a piometra, uma infecção comum na espécie canina. Almeja-se que seus resultados sejam usados para a detecção precoce de alterações na perfusão e resposta inflamatória na sepse, visando agilizar o tratamento do paciente, reduzindo o risco de sequelas e óbito.

**Expected impact:** This thesis addresses sepsis as a frequent and current topic, of worldwide relevance both in medicine and in veterinary medicine, and pyometra, a common infection in dogs. It is hoped that its results will be used for the early detection of alterations in perfusion and inflammatory response in sepsis, aiming to speed up patient treatment, reducing the risk of sequelae and death.

## DADOS CURRICULARES DA AUTORA

**Beatriz Gasser** - nascida em Campinas (SP), 07 de janeiro de 1991. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", câmpus de Jaboticabal (2010 - 2015). Especialista Lato Sensu na Modalidade Residência no Programa de Medicina Veterinária e Saúde pelo MEC/SUS, na área de Reprodução Animal e Obstetrícia Veterinária da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP/Jaboticabal (2015 - 2017). Mestre pelo programa de Medicina Veterinária, na área de Ultrassonografia e Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP/Jaboticabal (2017 - 2019). Atualmente é doutoranda do programa de Ciências Veterinárias, atuando na linha de pesquisa novas técnicas ultrassonográficas para avaliação de disfunções orgânicas oriundas da sepse, sob orientação do Prof. Dr. Marcus Feliciano e coorientação do Prof. Dr. Ricardo Andres Ramirez Uscategui.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, aos meus pais, Sandra e Walter, por sempre estarem disponíveis e não medirem esforços para ajudar no que for e permitir que eu alcançasse meus objetivos. Ao meu irmão Erich (Eiri) e minha cunhada Camila (Camis), por todo apoio e encorajamento em todos os momentos. Ao meu namorado Diego (Tofu) por estar sempre presente, dando apoio e me aconselhando nos momentos difíceis, por perder finais de semana para anestesiá-los os animais do grupo controle, sempre fazendo seu melhor e até mesmo usando seus próprios materiais para garantir a segurança dos animais. Agradeço aos meus orientadores Ricardo e Marcus, por acreditarem em mim, pela parceria e amizade que tornaram tudo possível.

Agradeço aos funcionários do HV por sempre estarem dispostos e ajudaram durante a execução do projeto, sem eles definitivamente eu não teria conseguido, especialmente ao Arnildo e Josi, por sempre me fornecerem os materiais esterilizados para que eu pudesse utilizar nos finais de semana e terem o trabalho de lavar tudo na segunda-feira, além de me ouvirem e ajudarem nos dias difíceis. Ao Marcelo (que também me ajudou com os materiais da esterilização) e Fabinho, por confiarem no meu projeto e indicarem à amigos que trouxeram cadelas para participar e compor o grupo controle. À Maria Luísa e Lidiane que autorizaram a utilização do setor de Silvestres nos finais de semana, à Isildinha, Marina e Rose, que ajudaram com os materiais, ao Fred do Lab, pelas análises da hemogaso.

Agradeço ao Júlio, do Laboratório Novolabvet, pela parceria e disponibilidade em receber minhas amostras para realizar o histopatológico. Aos residentes que contribuíram e “dançaram conforme a música” nos dias de coleta que atrapalhava a rotina, Aninha, Jennifer, Paulinha, Nath, Fer, Pedro, Nayara e Giovanna. À equipe de pós-graduandos que tinha que sair correndo nos dias de coleta para descer e me ajudar: Luíz, Pri, Igor, Bruna e Rafael e ao prof. Jeffrey e os membros da APA pela disponibilização do centro cirúrgico e por toda ajuda.

Por último, mas não menos importante, agradeço à todas as cadelas e proprietários por confiarem em mim e possibilitarem a execução do projeto que contribuirá em melhorar o diagnóstico e atendimento de tantos outros no futuro.

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: bolsa produtividade 305182/2020-0 e CNPq: bolsa de pós-graduação 140307/2019-2

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais</b> .....	1
<b>Introdução</b> .....	1
<b>Revisão de Literatura</b> .....	2
<b>Referências</b> .....	8
<b>CAPÍTULO 2 – Abdominal perfusion in canine patients with pyometra and sepsis evaluated by Doppler and Contrast-Enhanced Ultrasound<sup>1</sup></b> .....	12
<b>Abstract</b> .....	13
<b>Background</b> .....	14
<b>Methods</b> .....	16
<b>Results</b> .....	21
<b>Discussion</b> .....	25
<b>Conclusions</b> .....	31
<b>Abbreviations</b> .....	31
<b>Declarations</b> .....	31
<b>References</b> .....	33
<b>CAPÍTULO 3 – Potenciais biomarcadores para compor uma nova escala para detecção precoce de disfunção orgânica em cães com sepse</b> .....	38
<b>Resumo</b> .....	38
<b>Introdução</b> .....	39
<b>Materiais e métodos</b> .....	40
<b>Resultados</b> .....	44
<b>Discussão</b> .....	47
<b>Conclusão</b> .....	52
<b>Referências</b> .....	52

**CAPÍTULO 4 – Considerações finais ..... 56**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da perfusão renal, hepática e intestinal de cães em sepse por meio da ultrassonografia contrastada e Doppler**", protocolo nº 06499/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcus Antonio Rossi Feliciano, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de junho de 2019.

Vigência do Projeto	30/06/2019 a 30/11/2020
Espécie / Linhagem	<i>Canis familiaris</i>
Nº de animais	50 cães com sepse e 10 saudáveis
Peso / Idade	Adultos e idosos, pesos variados
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Animais trazidos para consulta no setor de Obstetrícia Veterinária

Jaboticabal, 13 de junho de 2019.

*Fabiana Pilarski*  
**Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil  
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

## AVALIAÇÃO DA PERFUSÃO ABDOMINAL E BIOMARCADORES PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE SEPSE E LESÃO HEPÁTICA EM CADELAS COM PIOMETRA

**RESUMO** – A sepse ocasiona alta morbimortalidade, principalmente devido ao desenvolvimento da síndrome de disfunção multiorgânica (MODS), complicação decorrente principalmente de má perfusão tecidual. As técnicas utilizadas atualmente para o diagnóstico precoce destas alterações são pouco acuradas, invasivas, de alto risco ou não têm sido provadas em animais. Por estes motivos, este projeto de doutorado objetivou avaliar a perfusão abdominal e intestinal, pelas técnicas de ultrassonografia contrastada (CEUS) e Doppler, os parâmetros físicos, hematológicos e os biomarcadores inflamatórios, de função hepática e renal em cadelas saudáveis e cadelas com piometra, comparar estas variáveis entre os grupos, pacientes em sepse ou não determinada pelos critérios da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) ou Sequential Organ Failure Assessment (SOFA); correlacionar estas variáveis com os achados do exame histopatológico hepático; com o intuito de desenvolver critérios acurados para o diagnóstico da sepse, das alterações de perfusão intestinal e lesão hepática na espécie canina. Assim, foram utilizadas 17 cadelas com piometra de origem espontânea e 10 cadelas saudáveis, em cada uma delas foram avaliados os parâmetros de perfusão abdominal e intestinal, por meio das técnicas CEUS e Doppler espectral, os parâmetros fisiológicos e laboratoriais rotineiramente utilizados para a monitoração da sepse, função hepática e renal, assim como análise histopatológica de biópsia hepática por Trucut. Após realizar todas estas avaliações, observou-se que a piometra causa redução no volume do fluxo sanguíneo, no pico da velocidade sistólica e no índice de resistividade da aorta abdominal avaliados pelo Doppler espectral; que os pacientes em sepse identificados pelo SOFA apresentaram apenas menor pressão arterial sistólica (PAS), enquanto que os animais em sepse identificados pelo escore SIRS apresentaram menor PAS, picos de velocidade sistólica, volume de fluxo sanguíneo e índices de resistividade da aorta abdominal, assim como na avaliação CEUS maiores intensidades do pico de contraste em pixels do parênquima duodenal. As variáveis identificadas como marcadores de sepse foram: baixa temperatura, leucocitose, neutrofilia, hipoalbuminemia, hiperglobulinemia, aumento da fosfatase alcalina, da relação creatinina-proteína urinária e redução da relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , com estas variáveis o critério diagnóstico foi alteração de no mínimo quatro parâmetros resultando em sensibilidade de 92%, especificidade 87%, valor preditivo positivo 85% e valor preditivo negativo 93%, sendo estes resultados similares aos critérios SIRS com infecção confirmada (75%, 93%, 90% e 82%; respetivamente) e superiores a escala SOFA (75%, 100%, 100% e 63%; respetivamente), e a SIRS sem infecção confirmada (75%, 33%, 47%, 63%; respetivamente). Diante disso, determinou-se que a infecção e em pior grau a sepse ocasiona redução do fluxo sanguíneo abdominal, com aumento da perfusão intestinal, adicionalmente que o critério proposto permite a identificação acurada da sepse, o que possibilita uma abordagem mais assertiva da sepse na espécie canina.

**Palavras-chave:** CEUS, disfunção orgânica, Doppler, resposta inflamatória ultrassonografia

## **EVALUATION OF ABDOMINAL PERFUSION AND BIOMARKERS FOR EARLY DIAGNOSIS OF SEPSIS AND LIVER INJURY IN BITCHES WITH PIOMETRA**

**ABSTRACT** – Sepsis causes high morbidity and mortality, mainly due to the development of multiorgan dysfunction syndrome (MODS), a complication mainly due to poor tissue perfusion. The techniques currently used for the early diagnosis of these alterations are inaccurate, invasive, high risk or have not been proven in animals. For these reasons, this doctoral project aimed to evaluate abdominal and intestinal perfusion by contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and Doppler techniques, physical, hematological parameters and inflammatory biomarkers, liver and kidney function in healthy bitches and bitches with pyometra, compare these variables between groups, between patients with sepsis or not determined by the criteria of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) or Sequential Organ Failure Assessment (SOFA); to correlate these variables with the findings of the liver histopathological examination; aiming to develop accurate criteria for the diagnosis of sepsis, alterations in intestinal perfusion and liver injury in dogs. Thus, 17 bitches with spontaneous pyometra and 10 healthy bitches were used, in each of them the parameters of abdominal and intestinal perfusion were evaluated using the CEUS and spectral Doppler techniques, the physiological and laboratory parameters routinely used for monitoring sepsis, liver and kidney function, as well as histopathological analysis of liver biopsy by Trucut. After performing all these evaluations, it was observed that pyometra causes a reduction in blood flow volume, peak systolic velocity and abdominal aorta resistivity index evaluated by spectral Doppler; that sepsis patients identified by SOFA had only lower systolic arterial pressure (SAP), while sepsis animals identified by the SIRS score had lower SAP, peak systolic velocity, blood flow volume and abdominal aorta resistivity indices, as well as higher peak contrast intensities in pixels in the CEUS evaluation of duodenal parenchyma. The variables identified as sepsis indicators were: low temperature, leukocytosis, neutrophilia, hypoalbuminemia, hyperglobulinemia, increased alkaline phosphatase, urinary creatinine-protein ratio and reduction in the PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> ratio, with these variables the diagnostic criterion was a change of at least four parameters resulting in sensitivity of 92%, specificity 87%, positive predictive value 85% and negative predictive value 93%, these results being similar to the SIRS criteria with confirmed infection (75%, 93%, 90% and 82%; respectively) and above the SOFA scale (75%, 100%, 100% and 63%; respectively), and the SIRS without confirmed infection (75%, 33%, 47%, 63%; respectively). In view of this, it was determined that infection and, to a worse degree, sepsis, causes a reduction in abdominal blood flow, with an increase in intestinal perfusion, in addition that the proposed criterion allows the accurate identification of sepsis, which enables a more assertive approach to sepsis in the canine species.

**Keywords:** CEUS, Doppler, organ dysfunction, inflammatory response, ultrasonography

## CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

### Introdução

A sepse é uma condição clínica que gera alta morbimortalidade em humanos e animais, sendo sua incidência estimada por volta de 6 a 10% na espécie canina, com taxa de sobrevivência entre 25 e 50% (Otto, 2007). Esta afecção ocasiona complicações decorrentes principalmente de má perfusão tecidual e pode conduzir ao desenvolvimento da síndrome de disfunção multiorgânica (MODS) que afeta aproximadamente 50% dos cães com sepse e aumenta a taxa de mortalidade de 25% para 70% (Kenney et al., 2010).

Dentre as disfunções orgânicas documentadas em cães, estima-se que a lesão renal aguda (LRA) ocorra em 12% dos pacientes com sepse, dos quais apenas 14% sobrevivem; a disfunção hepática em 20-49% dos pacientes, com taxa de sobrevivência de 38%; e a disfunção gastrointestinal em 59% dos pacientes internados em estado grave (Bakker et al., 2004; Reintam et al., 2009; Kenney et al., 2010; Keir e Kellum, 2015), ademais, se reconhece que a sepse compromete a função da barreira intestinal, ocasionando translocação bacteriana e piorando significativamente o quadro clínico (Gatt et al., 2007).

Diversos métodos foram propostos na medicina para a identificação da sepse na rotina hospitalar, dentre eles os critérios de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) e o *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (Evans et al., 2021). Na medicina veterinária, o critério SIRS avalia a resposta inflamatória do paciente à infecção e apresenta alta sensibilidade (97%), mas baixa especificidade (64%) (Hauptman et al., 1997). Além de pouco específico, o critério SIRS não utiliza marcadores para avaliar disfunções orgânicas. Diante disso, foi proposto o escore SOFA, que tenta identificar a disfunção renal, hepática, circulatória, pulmonar, do sistema nervoso central e da coagulação oriundas da sepse. Este escore já foi estudado como fator prognóstico de cães em estado crítico (Ripanti et al., 2012), no entanto esta escala não avalia a função de outros sistemas orgânicos e os estudos na veterinária não avaliaram sua capacidade para identificar sepse nem lesões orgânicas, na espécie canina.

Neste contexto, considerando a indiscutível importância da função intestinal e a dificuldade de identificação de alterações neste sistema, a avaliação da perfusão intestinal por meio da ultrassonografia contrastada (CEUS) tem sido considerada uma técnica diagnóstica promissora, uma vez que permite detectar alterações na vascularização e microcirculação, imperceptíveis por outros métodos, de forma não invasiva e segura (Girlich et al., 2011). Embora a técnica CEUS ainda se encontre em fase experimental, estudos preliminares já descreveram sua acurácia na identificação de afecções intestinais em humanos e caninos (Medellin et al., 2018; Linta et al., 2021), mas nenhum deles em quadros de sepse.

Além disso, a identificação precoce das alterações orgânicas na sepse permite a instituição do tratamento mais rápido, melhorando o prognóstico e reduzindo as taxas de mortalidade (Evans et al., 2021). No entanto, sabe-se que os critérios para diagnóstico de sepse apresentam limitações na medicina veterinária; por exemplo o SIRS avalia apenas a resposta inflamatória e apresenta baixa especificidade por utilizar parâmetros subjetivos e que se alteram sob diversas circunstâncias, como frequência cardíaca e respiratória, que podem aumentar simplesmente por estresse (Hauptman et al., 1997); já o SOFA, apesar de ter sido estudado com uma escala adaptada para cães (Ripanti et al., 2012), apresenta aplicabilidade controversa na avaliação da disfunção orgânica na sepse, visto que utiliza marcadores tardios e com baixa sensibilidade nos pacientes em sepse (Cobrin et al., 2013; Bastos et al., 1993; Schlesinger e Rubin, 1993).

Com estes preceitos, o objetivo desta revisão, foi fazer um levantamento literário, abordando a avaliação da perfusão abdominal e intestinal na sepse ou infecções consideráveis, a acurácia dos critérios SIRS ou SOFA e as variáveis do exame físico, hematológico, biomarcadores inflamatórios, de função hepática e renal, no diagnóstico precoce da sepse na espécie canina, a partir de alterações de função orgânica e resposta inflamatória.

## **Revisão de Literatura**

Atualmente, a sepse é definida como disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção capaz de aumentar a

mortalidade substancialmente (Evans et al., 2021). De acordo com o ACVECC a incidência da sepse na espécie canina gira em torno de 6 a 10% e apresenta uma taxa de mortalidade de 50 a 75% (Otto, 2007).

Considera-se que a identificação precoce de alterações da perfusão ou lesões dos principais sistemas orgânicos em pacientes com sepse permite reduzir as taxas de morbidade e mortalidade. Diversos métodos foram propostos na medicina para diagnóstico de sepse na rotina hospitalar, dentre eles os critérios de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), critérios de *Quick Sequential Organ Failure Assessment* (qSOFA) ou *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (Evans et al., 2021), são os mais estudados.

Na medicina veterinária, o critério SIRS já foi estudado em cães e, até hoje, é considerado o sistema de eleição para determinação de sepse nessa espécie. Ele se baseia na identificação de: alterações na temperatura retal ( $<38,1^{\circ}\text{C}$  ou  $>39,2^{\circ}\text{C}$ ), na frequência cardíaca ( $>120$  bpm), respiratória ( $>20$  rmpm) e nos leucócitos ( $<6$  ou  $>16 \times 10^3/\mu\text{L}$  e/ou bastonetes  $>3\%$ ) como critérios de identificação da resposta inflamatória, sendo considerados em sepse animais que apresentarem duas ou mais destas alterações, associadas a uma infecção suspeita ou confirmada. Esse escore apresenta alta sensibilidade (97%), mas baixa especificidade (64%), resultando em uma excelente identificação de verdadeiros positivos, porém uma alta taxa de falsos positivos (Hauptman et al., 1997). Além de pouco específico, o critério SIRS não utiliza marcadores para avaliar a disfunção orgânica.

Diante disso, o escore SOFA foi proposto para avaliar a disfunção dos principais sistemas (respiratório, coagulação, hepático, renal, cardiovascular e nervoso), respectivamente através dos marcadores: relação entre a pressão parcial arterial de oxigênio e a fração inspirada deste gás ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ); concentração sanguínea de plaquetas; concentração sérica de bilirrubina total; creatinina sérica e/ou produção urinária; pressão arterial média e/ou necessidade de vasopressores; e a escala de coma modificada de Glasgow como indicador de função neurológica, sendo que a disfunção orgânica é identificada em animais com uma pontuação igual ou superior a 2 neste escore e, quando associado a uma infecção, considera o paciente em sepse (Tabela 1).

**Tabela 1.** Escore SOFA adaptado para a espécie canina (RIPANTI et al, 2012).

Variáveis	SOFA score				
	0	1	2	3	4
<b>Respiração</b> PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	>400	≤400	≤300	≤200 <sup>#</sup>	≤100 <sup>#</sup>
<b>Coagulação</b> Plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μl)	>150	≤150	≤100	≤50	≤20
<b>Fígado</b> Bilirrubina total (mg/dl)	<0,6	0,6-1,4	1,5-5,0	5,1-11	>11,1
<b>Cardiovascular</b> PAM (mmHg) <sup>#</sup>	PAM>65	nore≤0,1	nore>0,1	nore>0,1 + epi ou vaso	nore>0,1 + epi ou vaso + dobu
<b>SNC</b> Escore de coma Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b> Creatinina (mg/dl)	<1,4	1,4-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5,0

<sup>#</sup>Com suporte respiratório. PAM=pressão arterial média e quando <65 mmHg, nore=norepinefrina, epi=epinefrina, dobu=dobutamina, vaso=vasopressina, agentes vasopressores ou inotrópicos administrados pelo menos uma hora (doses em mg/kg/minuto).

Já o qSOFA (SOFA rápido) foi proposto na medicina para avaliação à beira leito de pacientes em estado crítico, utilizando parâmetros de rápida obtenção, sendo eles o aumento da frequência respiratória, redução do estado mental (pela escala de coma de Glasgow) e redução da pressão arterial sistólica, neste teste alterações em ao menos 2 desses parâmetros indicam maior risco de mortalidade (Singer et al., 2016).

O SOFA e o qSOFA já foram estudados para predição de prognóstico de cães em estado crítico em unidade de terapia intensiva (Ripanti et al., 2012; Osgood et al., 2022), no entanto estes estudos não avaliaram a capacidade desses critérios em determinar as lesões orgânicas, nem sua capacidade no diagnóstico da sepse na espécie canina.

Além disso, sabe-se que os critérios para diagnóstico de sepse apresentam limitações na medicina veterinária, no qual o SIRS avalia apenas a resposta inflamatória e apresenta baixa especificidade por utilizar parâmetros subjetivos como frequência cardíaca e respiratória, que podem estar aumentados em situações de estresse (Hauptman et al., 1997); o SOFA, apesar de já ter sido estudado em cães com uma escala adaptada para a espécie (Ripanti et al., 2012), apresenta aplicabilidade controversa na avaliação da disfunção orgânica na sepse, visto que utiliza aumento da creatinina sérica para determinar lesão renal, e já foi provado que a produção de creatinina está reduzida durante a sepse (Doi et al., 2009), além de ser

um marcador tardio que só se apresenta aumentado após perda de pelo menos 75% dos néfrons funcionais (Cobrin et al., 2013).

Um estudo avaliando 20 cadelas com piometra demonstrou que todos os animais com infecção apresentavam lesão histológica renal compatível com LRA, no entanto o escore SOFA só acusou alteração renal em 4 animais (Gasser et al., 2020), o que também comprova sua característica tardia na detecção de LRA. Somado a isso, a escala de coma Glasgow tem baixa sensibilidade em animais com pontuação mediana na escala, sendo a pontuação mais comumente encontrada nos pacientes em sepse (Bastos, 1993) e a bilirrubina total sérica tem baixa sensibilidade e grande variabilidade na doença hepática, não sendo considerada um marcador fidedigno da função hepática (Gornal e Bardawill, 1951; Schlesinger et al., 1993).

Já o qSOFA, além de também utilizar parâmetros subjetivos como a frequência respiratória e estado mental, não foi validado na veterinária, sendo que os estudos deste critério em cães não apresentavam grupo controle e utilizaram a escala de humanos, sem adaptá-la à espécie canina, havendo a necessidade de desenvolver uma escala qSOFA adaptada para a veterinária (Statsny et al., 2022; Osgood et al., 2022). Além disso, é evidente que nenhuma dessas escalas ou critérios avalia a função intestinal para a identificação ou avaliação de progressão da sepse, embora seja uma complicação muito comum.

A disfunção gastrointestinal causa hiporexia ou anorexia, incapacidade de tolerar alimentação enteral, diminuição da motilidade intestinal, diarreia hemorrágica, aumento da permeabilidade intestinal e/ou translocação bacteriana (Osterbur et al., 2014). A sepse por sua vez, além de comprometer a função da barreira intestinal, desencadeia a translocação bacteriana, piorando significativamente o quadro clínico e também causa alterações na motilidade intestinal e na absorção de nutrientes (Gatt et al, 2007; Osterbur et al., 2014). A incidência de disfunção gastrointestinal em animais não é bem documentada devido à dificuldade para sua avaliação, no entanto, é considerada comum (Osterbur et al., 2014).

A sepse provoca mudanças severas no fluxo sanguíneo da microcirculação em todos os órgãos esplâncnicos que não podem ser notados a partir de mudanças nos fluxos sistêmicos ou regionais e poucos estudos avaliaram a microcirculação intestinal na sepse para determinar alterações isquêmicas que poderiam levar à translocação

bacteriana, sendo que as técnicas descritas são invasivas e envolvem risco pela necessidade de anestesiá-lo o paciente. Hildebrand et al. (2000) demonstraram que, durante o choque séptico em porcos com peritonite fecal, o fluxo da artéria mesentérica superior e da microcirculação hepática diminuíam em aproximadamente 50%, no entanto, a ressuscitação com fluidos resultou em um aumento de três vezes no fluxo sistêmico e mesentérico, mas a perfusão hepática microvascular aumentou apenas 16%, indicando um padrão heterogêneo das mudanças hemodinâmicas em ambas as fases hiper e hipodinâmica da sepse.

Neste mesmo estudo, pela colocação de transdutores de laser Doppler fluxométrico na mucosa da parede de jejuno e cólon dos porcos em sepse, encontraram redução de 47% na perfusão do cólon e não observaram alterações na perfusão do jejuno. Jacquet-lagrèze et al. (2014) implantaram um fotopletismógrafo laser no duodeno de porcos em sepse e encontraram redução da microcirculação duodenal com o avanço do quadro séptico. Maconi et al. (1996) avaliaram o índice de resistividade (IR) pelo Doppler espectral da artéria mesentérica cranial em humanos com diferentes afecções inflamatórias intestinais, encontrando valores de 0,81 no grupo controle e redução nesse parâmetro nos quadros inflamatórios intestinais.

A falência gastrintestinal é um fator importante na sepse, mas de difícil diagnóstico pela falta de marcadores válidos de função intestinal. Entretanto é uma afecção relacionada a um pior prognóstico e aumento do risco de mortalidade (Reintam et al., 2009), estando associada a alterações na barreira intestinal que leva a translocação bacteriana e agravamento do quadro séptico (Thuijls et al., 2011). A barreira intestinal é composta por um revestimento de células justapostas por complexos de junção apical. A perda da barreira intestinal em pacientes em sepse pode ocorrer devido a hipoperfusão ou isquemia que leva à depleção de adenosina trifosfato (ATP), resultando em uma série de alterações no complexo de junção apical (Puleo et al., 2011; Thuijls et al., 2011). Ocorre a translocação bacteriana, na qual bactérias e antígenos presentes no lúmen intestinal atravessam a parede devido ao aumento da permeabilidade. Além disso, o epitélio e o sistema imune intestinal podem gerar uma resposta inflamatória, fazendo com que o intestino atue como agravante do quadro séptico (Puleo et al., 2011).

A CEUS é um método diagnóstico consideravelmente novo, utiliza microbolhas como contraste para aumentar a refração dos ecos e quantificar a perfusão orgânica. Por serem altamente refletoras, as microbolhas são capazes de aumentar o sinal Doppler, permitindo a detecção de fluxos dificilmente detectáveis por métodos tradicionais (Nogueira et al., 2002). As microbolhas geralmente contêm um gás de elevado peso molecular (ex. perfluorocarbonos). Esses agentes têm um diâmetro entre 1 a 6  $\mu\text{m}$ , permitindo sua passagem por meio dos leitos capilares, permanecem estritamente em região intravascular, sem difusão intersticial ou excreção em urina e sua utilização é segura e livre de efeitos hemodinâmicos (Kalantarinia e Okusa, 2007).

As características visualizadas por meio deste método estabelecem parâmetros relacionados ao preenchimento tecidual a partir da sequência de imagens em software que são convertidas automaticamente em curvas de tempo-intensidade (TIC), obtendo-se os parâmetros de perfusão orgânica: número de pixels (Pixel), pico de intensidade (PI em %), tempo para o pico de intensidade ( $T_p$  em s), tempo médio de transmissão ( $T_{mT}$  em s) e a área sob a curva (AUC) (Gasser et al, 2020).

Esta técnica tem sido utilizada em medicina para a avaliação da viabilidade miocárdica, na detecção de neoplasias mamárias, isquemia intestinal, doença arterial periférica, enfermidades vasculares hepáticas, no estudo da perfusão renal em pacientes normais (Kalantarinia e Okusa, 2007) e após transplante (Zeisbrich et al., 2015). O estudo realizado por Wei et al. (2001) em cães permitiu a avaliação acurada da macro e microcirculação renal e abriu as portas para estudos fisiológicos e patológicos usando esta ferramenta para a estimativa da perfusão em humanos e animais.

Neste contexto, Schneider et al. (2012) demonstraram em voluntários humanos saudáveis queda de 20% na perfusão renal, induzida pela infusão de angiotensina II. Em cães saudáveis, Waller et al. (2007) determinaram o tempo de entrada, pico de realce e tempo de saída deste contraste nas diferentes regiões renais (córtex e medula), padronizando os parâmetros de perfusão renal nesta espécie. Adicionalmente, Dong et al. (2013), em um modelo de isquemia renal induzida em cães, objetivando determinar a utilidade diagnóstica da CEUS na lesão renal isquêmica, identificaram alterações nos parâmetros de perfusão renal até 30 dias antes de serem detectadas anormalidades nos parâmetros bioquímicos de rotina para

a determinação de lesão renal. Estes promissores resultados quanto a acurácia diagnóstica da técnica de CEUS, tornou-a indicada para a avaliação da perfusão renal em pacientes humanos criticamente enfermos, com sepse e na avaliação dos rins transplantados (Langenberg et al., 2005; Schneider et al., 2013).

Porém, apenas em 2018 um modelo experimental em porcos induzindo sepse pela injeção de lipopolisacarídeos permitiu usar a CEUS para identificar alterações microvasculares renais decorrentes do choque séptico e sua melhora após ressuscitação com fluidos, acompanhando a análise concomitante da microcirculação sublingual, considerada padrão na avaliação da microcirculação no curso desta entidade clínica (Lima et al., 2018).

Na avaliação de perfusão intestinal, a CEUS foi utilizada em humanos com doença de Crohn para comparar suas variáveis com os achados histológicos da alça intestinal, sendo verificada diminuição do tempo para o pico do contraste de acordo com o aumento no grau de inflamação do tecido intestinal (Girlich et al., 2011).

A CEUS foi indicada como método para a avaliação da perfusão de diferentes órgãos em pacientes criticamente enfermos com comprometimento hemodinâmico, pelas suas características e precocidade na identificação de alterações (Wu e Chen, 2018), no entanto, não foram encontrados estudos que avaliem a perfusão destes ou outros tecidos por meio da CEUS nem em modelos experimentais nem em casos de sepse espontânea, em nenhuma espécie.

Diante destes preceitos, a ultrassonografia contrastada por microbolhas mostra-se uma ferramenta promissora para a avaliação da macro e microcirculação renal, hepática e intestinal em pacientes de diversas espécies, podendo ser aplicada em indivíduos em estado crítico, de maneira rápida, segura e pouco invasiva, otimizando o diagnóstico e entendimento das alterações de perfusão orgânica em entidades clínicas como a sepse, o choque séptico ou a hipovolemia entre outras patologias associadas com hipoperfusão e, consequente, MODS (Schneider et al., 2013; Wu e Chen, 2018).

## **Referências**

Bakker J, Grover R, Mcluckie A, Holzapfel L, Andersson J, Lodato R, Watson D (2004). Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of

shock in patients with severe sepsis: Results of a randomized, double-blind, placebo. **Critical Care Medicine**, 32:1–12.

Bastos PG, Sun X, Wagner DP, Wu AW, Knaus WA (1993). Glasgow Coma Scale score in the evaluation of outcome in the intensive care unit: Findings from the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation III study. **Critical Care Medicine**, 21:1459–1465.

Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C (2013). Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, 54:647–655.

Doi K, Yuen PST, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Star RA (2009). Reduced Production of Creatinine Limits Its Use as Marker of Kidney Injury in Sepsis. **Journal of the American Society of Nephrology**, 20:1217–1221.

Dong Y, Wang W, Cao J, Fan P, Lin X (2013). Quantitative Evaluation of Contrast-Enhanced Ultrasonography in the Diagnosis of Chronic Ischemic Renal Disease in a Dog Model. **PLoS ONE**, 8:1–7.

Evans L, Rhodes A et al (2021). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. **Critical Care Medicine**, 4:e1063–e1143.

Gasser B, Uscategui RAR, Maronezi MC, Pavan L, Simões APR, Martinato F, Silva P, Crivellenti LZ, Feliciano MAR (2020). Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. **Scientific Reports**, 10:1–12.

Gatt M, Reddy BS, Macfie J (2007). Review article: bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, 25:741–757.

Girlich C, Jung E, Huber E, Ott C, Iesalnieks I, Schreyer A, Schacherer D (2011). Comparison between Preoperative Quantitative Assessment of Bowel Wall Vascularization by Contrast-Enhanced Ultrasound and Operative Macroscopic Findings and Results of Histopathological Scoring in Crohn's Disease. **Ultraschall in der Medizin**, 32:154–159, 2011.

Gornall AG, Bardawill CJ (1951). The Study of Liver Function in Dogs. **Canadian Journal of Medical Science**, 1:255–262.

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB (1997). Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Diagnostic Criteria for Sepsis in Dogs. **Veterinary Surgery**, 26:393–397.

Hiltebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH (2000). Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. **Critical Care Medicine**, 28:3233–3241.

Jacquet-Lagrèze M, Bonnet-Garin JM et al. (2014). A new device for continuous assessment of gut perfusion: proof of concept on a porcine model of septic shock. **Critical Care**, 18:1–11.

- Kalantarinia K, Okusa MD (2007). Ultrasound contrast agents in the study of kidney function in health and disease. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, 4:153–158.
- Keir I, Kellum JA (2015). Acute kidney injury in severe sepsis: Pathophysiology, diagnosis, and treatment recommendations. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 25:200–209.
- Kenney EM, Rozanski EA et al. (2010). Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 236:83–87.
- Langenberg C, Bellomo R, May C, Wan L, Egi M, Morgera S (2005). Renal blood flow in sepsis. **Critical Care**, 9:R363-374.
- Lima A, Rooij TV et al (2018). Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound Identifies Microcirculatory Alterations in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. **Critical Care Medicine**, 20:1–9.
- Linta N, Pey P, Toaldo MB, Pietra M, Felici M, Bettini G, Cipone M, Diana A (2021). Contrast-enhanced ultrasonography in dogs with inflammatory bowel disease. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 35:2167–2176.
- Maconi G, Imbesi V, Bianchi Porro G (1996). Doppler ultrasound measurement of intestinal blood flow in inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 31:590–593.
- Medellin A, Merrill C, Wilson SR (2018). Role of contrast-enhanced ultrasound in evaluation of the bowel. **Abdominal Radiology**, 43:918–933.
- Nogueira A, Morcerf F, Moraes A, Carrinho M, Medeiros C, Dohmann H (2002). Ultrasonografia com Agentes de Contrastes por Microbolhas na Avaliação da Perfusão Renal em Indivíduos Normais. **Revista Brasileira de Ecocardiografia**, 1:74–78.
- Osgood A, Hollenbeck D, Yankin I (2022). Evaluation of quick sequential organ failure scores in dogs with severe sepsis and septic shock. **Journal of Small Animal Practice**, 1–8.
- Osterbur K, Mann FA, Kuroki K, Declue A (2014). Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 28:1141–1151.
- Otto CM (2007). Sepsis in veterinary patients: What do we know and where can we go? **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 17:329–332.
- Puleo F, Arvanitakis M, Gossum AV, Preiser J (2011). Gut Failure in the ICU. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 32:626–638.
- Reintam A, Parm P, Kitus R, Kern H, Starkopf J (2009). Gastrointestinal symptoms in intensive care patients. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, 53:318–324.
- Ripanti D, Dino G, Piovano G, Farca AM (2012). Application of the Sequential Organ Failure Assessment Score to predict outcome in critically ill dogs: Preliminary results. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, 152:325–330.

Schlesinger DP, Rubin SI (1993). Serum bile acids and the assessment of hepatic function in dogs and cats. **The Canadian Veterinary Journal**, 34:215–20.

Schneider AG, Hofmann L, Wuerzner G, Glatz N, Maillard M, Meuwly JY, Eggimann P, Burnier M, Vogt B (2012). Renal perfusion evaluation with contrast-enhanced ultrasonography. **Nephrology Dialysis Transplantation**, 27:674–681.

Schneider A, Goodwin M, Bellomo R (2013). Measurement of kidney perfusion in critically ill patients. **Critical Care**, 17:1–10.

Singer M, Deutschman CS et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of American Medical Association**, 315:801–810.

Stastny T, Koenigshof AM, Brado GE, Chan EK, Levy NA (2022). Retrospective evaluation of the prognostic utility of quick sequential organ failure assessment scores in dogs with surgically treated sepsis (2011-2018): 204 cases. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 32:68–74.

Thuijls G, Derikx JPM, Grootjans J, Buurman WA, Waardenburg DAV (2011). Intestinal barrier loss in sepsis. **Netherlands Journal of Critical Care**, 15:199–203.

Waller KR, O'Brien RT, Zagzebski JA (2007). Quantitative contrast ultrasound analysis of renal perfusion in normal dogs. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, 48:373–377.

Wei K, Le E, Bin J, Coggins M, Thorpe J, Kaul S (2001). Quantification of Renal Blood Flow With Contrast-Enhanced Ultrasound. **Journal of the American College of Cardiology**, 37:1135–1140.

Wu J, Chen DC (2018). Contrast - Enhanced Ultrasonography: A Promising Method for Blood Flow and Perfusion Evaluation in Critically Ill Patients. **Chinese Medical Journal**, 131:1135–1137.

Zeisbrich M, Kihm LP, Drüschler F, Zeier M, Schwenger V (2015). When is contrast-enhanced sonography preferable over conventional ultrasound combined with Doppler imaging in renal transplantation? **Clinical Kidney Journal**, 8:1–9.

## **CAPÍTULO 2 – Abdominal perfusion in canine patients with pyometra and sepsis evaluated by Doppler and Contrast-Enhanced Ultrasound<sup>1</sup>**

Beatriz Gasser<sup>1\*</sup>, Ricardo Andres Ramirez Usategui<sup>2</sup>, Luiz Paulo Nogueira Aires<sup>1</sup>, Diego Iwao Yamada<sup>3</sup>, Priscila Del’Aguila-Silva<sup>1</sup>, Bruna Bressianini Lima<sup>1</sup>, Priscila Silva<sup>1</sup>, Igor Cezar Kniphoff da Cruz<sup>4</sup>, Rafael Kretzer Carneiro<sup>1</sup>, Marcus Antônio Rossi Feliciano<sup>5</sup>

<sup>1</sup>School of Agricultural and Veterinarian Sciences, São Paulo State University (FCAV/UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brazil. <sup>2</sup>Research Group INCA-CES, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, CES University, Medellín, Antioquia, Colombia. <sup>3</sup>Marília University (UNIMAR), Marília, São Paulo, Brazil. <sup>4</sup>Center for Agricultural Sciences and Engineering (CCAIE), Federal University of Espírito Santo (UFES), Alegre, Espírito Santo, Brazil. <sup>5</sup>Faculty of Animal Science and Food Engineering (FZEA), São Paulo University (USP), Pirassununga, São Paulo, Brazil.

\*Corresponding author: ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1551-8369>. E-mail: [beatrizgasser@hotmail.com](mailto:beatrizgasser@hotmail.com). Address: Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n - Vila Industrial CEP 14884-900 - Jaboticabal/SP - UNESP - Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária do Hospital Veterinário "Governador Laudo Natel".

---

<sup>1</sup> Este capítulo corresponde a artigo científico submetido à revista *BMC Veterinary Research* e encontra-se em avaliação para publicação.

## **Abstract**

**Background:** Sepsis is an organic dysfunction that generates hemodynamic instability and high morbidity and mortality in humans and animals. Early identification of perfusion changes and appropriate management of sepsis improve patients' prognosis. Currently, the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scores are the most studied for the identification of sepsis and evaluation of the organ dysfunction arising from it, however these scores do not assess the gastrointestinal involvement, which is frequent in this condition. Given the difficulty in identifying changes in this system, contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and Doppler have been considered promising diagnostic techniques, as they allow the detection of changes in vascularization and microcirculation in a non-invasive and safe way. The aim of this study was to evaluate duodenal perfusion by CEUS, blood flow of the abdominal aorta and cranial mesenteric artery by Doppler ultrasound, and systolic arterial pressure (SAP) of 17 bitches with pyometra in sepsis or not and in 10 healthy animals.

**Results:** The variables were compared between pyometra and control groups, and between patients in sepsis or not determined by SOFA or SIRS scores. Pyometra causes a reduction in abdominal aortic blood flow volume, aortic peak systolic velocity and in resistivity index evaluated by Doppler ultrasound. Patients in sepsis by SOFA only presented lower systolic arterial pressure, while septic animals identified by SIRS score showed lower SAP, aortic peak systolic velocity, aortic blood flow volume and aortic resistivity index, whereas, CEUS evaluation revealed that the peak intensity of contrast in pixels of duodenal parenchyma was higher.

**Conclusions:** Apparently, the SIRS score is the best indicator of sepsis, as it allowed early identification of a reduction in arterial blood pressure and flow, as well as an increase in intestinal perfusion and probably inflammation. Finally, CEUS may be useful in the identification of duodenal alterations not evident by conventional exams in septic animals.

**Keywords:** blood flow, intestinal hemodynamic, CEUS, SIRS, SOFA, infection.

## Background

Sepsis is a potentially fatal organ dysfunction caused by a dysregulated immune response to an infection [1], which can result in complications mainly due to poor tissue perfusion. The hemodynamic instability and uncontrolled inflammatory response resulting from sepsis can lead to the development of multiorgan dysfunction syndrome (MODS), which affects approximately 50% of dogs in sepsis and increases the mortality rate from 25% to 75% [2]. Among organ dysfunctions documented in humans, gastrointestinal was reported in 59% [3].

Gastrointestinal dysfunction causes hyporexia or anorexia, inability to tolerate enteral feedings, decreased intestinal motility, hemorrhagic diarrhea, increased intestinal permeability and/or bacterial translocation [4]. Sepsis may lead to intestinal barrier dysfunction, triggers bacterial translocation, significantly worsening the clinical status and promoting changes in intestinal motility and nutrient absorption [4,5]. The incidence of gastrointestinal dysfunction in infected animals is not well documented due to the difficulty of assessment, however it is considered common [4]. Additionally, the lack of valid gastrointestinal dysfunction biomarkers makes diagnosis of its alteration difficult in patients with infection.

Early identification of organic perfusion alterations and adequate management of sepsis in the first hours after its development improve the patient's prognosis, therefore sepsis screening systems or scales must have high sensitivity, which reduces the chance of false negative, allowing the institution of adequate treatment as early as possible. Several criteria have already been proposed for the diagnosis of sepsis, among them, the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) criteria,

and the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) score are the most studied [1,6].

Currently in veterinary medicine, SIRS score is the standard method to determine sepsis in dogs. It evaluates the inflammatory response to infection, using alteration in rectal temperature ( $<38.1^{\circ}\text{C}$  or  $>39.2^{\circ}\text{C}$ ), heart rate ( $>120$  bpm), respiratory rate ( $>20$  rmpm) and leukocytes ( $<6$  or  $>16 \times 10^3/\mu\text{L}$  and/or bands  $>3\%$ ) as identification criteria, being considered in sepsis animals that present two or more of these alterations, associated with a suspected or confirmed infection. Although this score has high sensitivity (97%), it has low specificity (64%), which means that it results in excellent identification of true septic animals and a very high rate of false positives [7].

In humans, the SOFA score was proposed to identify common organ dysfunctions in sepsis, such as: the respiratory system assessed by oxygen arterial partial pressure and oxygen inspired fraction ratio ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ); the coagulation system through blood platelets count; the hepatic system assessed by serum total bilirubin concentration; the renal system by serum creatinine; the cardiovascular system by mean or systolic arterial pressure and the central nervous system by the Glasgow coma scale. The SOFA score assesses the presence of sepsis and the severity of the patient according to the degree of organ dysfunction, and it is proposed that individuals with two or more points in this score, associated with suspected or confirmed infection be diagnosed with sepsis [6]. This score has already been evaluated in dogs and has been considered a useful prognostic indicator in the intensive care unit [8], however, its accuracy for sepsis identification or staging in veterinary has not yet been evaluated.

It is important to note that none of these screening systems assess gastrointestinal function for sepsis identification or staging. Considering the intestinal function and the difficulty to identify changes in this system, the evaluation of intestinal perfusion by contrast-enhanced ultrasound (CEUS) has been considered a promising diagnostic technique, since it allows detecting changes in vascularization and microcirculation, imperceptible by other methods, in a non-invasive and safe way [9]. This technique has already been described to detect changes in renal perfusion in bitches with pyometra and acute kidney injury derived of sepsis [10] and preliminary studies have already described its accuracy in identifying intestinal disorders in humans and canines [11,12], but none evaluated intestinal perfusion in patients with infection.

In view of this problem, the objective of this study was to evaluate duodenal perfusion, blood flow in the abdominal aorta and cranial mesenteric artery (CMA) using CEUS and Doppler techniques and the systolic arterial pressure (SAP) in healthy bitches and bitches with pyometra, in sepsis or not determined by SIRS or SOFA criteria.

## **Methods**

Twenty-seven bitches were included: 10 healthy adult bitches, composing the control group; and 17 with pyometra diagnosed clinically and by ultrasound, posteriorly confirmed with Gram staining of uterine contents obtained with sterile syringe after ovariohysterectomy and without other comorbidities. Based on the results of an experimental model in pigs inducing sepsis by injection of lipopolysaccharides evaluating perfusion through CEUS [13], the sample size was calculated (G\*Power®

Version, Universität Kiel, Germany) for the sick group (n = 20) and for the control group (n = 10), aiming at a significance of 1% ( $\alpha = 0.01$ ) and statistical power of 70% ( $1-\beta = 0.70$ ), of which 3 animals from the pyometra group were excluded for not meeting the inclusion criteria. All animals were treated at the Obstetrics and Animal Reproduction sector of the Veterinary Hospital "Governador Laudo Natel" of FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, Brazil and included in the study with the voluntary authorization of the owners to be surgically sterilized.

Patients in both groups were previously physical, laboratory and ultrasound examined to certify the inclusion and exclusion criteria. In the control group, the results of laboratory tests were awaited to confirm the patients' health before the experiment was carried out. In animals with suspected pyometra, abdominal ultrasound was performed to diagnose the condition before being included in the research.

On the day of the experimental evaluation, a physical examination was performed and the following measurements were taken: heart rate (HR), respiratory rate (RR), rectal temperature ( $T^{\circ}\text{C}$ ), degree of dehydration, level of consciousness by the modified Glasgow Coma Scale for dogs [14], systolic arterial pressure (SAP) obtained by the indirect vascular Doppler method [15]; and collection of venous and arterial blood for laboratory tests: blood gas analysis, blood count, serum concentration of creatinine (mg/dL) and total bilirubin (mg/dL). All these parameters used to classify animals in sepsis or not by the SIRS or SOFA criteria [7,8].

After physical evaluation, a wide ventral abdominal shaving was performed, the patients then received an intravenous catheter (22G) in the left cephalic vein and were positioned for ultrasound evaluation. In the ultrasound examination, the dog was

physically restrained in the supine position on a padded triangular trough, with the head towards the monitor and the body parallel to the ultrasound device. Before the exam, specific gel was applied to improve the contact between the transducer and the skin.

The ultrasound examinations were performed with an ACUSON S2000/SIEMENS device (Siemens Company. Munich, Germany) and a linear multifrequency matrix transducer from 4 to 9 MHz. The uterine diameter, wall and luminal thickness were measured in its largest portion in pyometra group. In control group, the uterus and ovaries were evaluated to confirm normal ultrasonographic appearance [16]. The abdominal ultrasound examination in B-mode was started by evaluating a portion of the descending duodenum in the longitudinal section, identifying the presence or absence of motility and measuring the thickness of the wall [17].

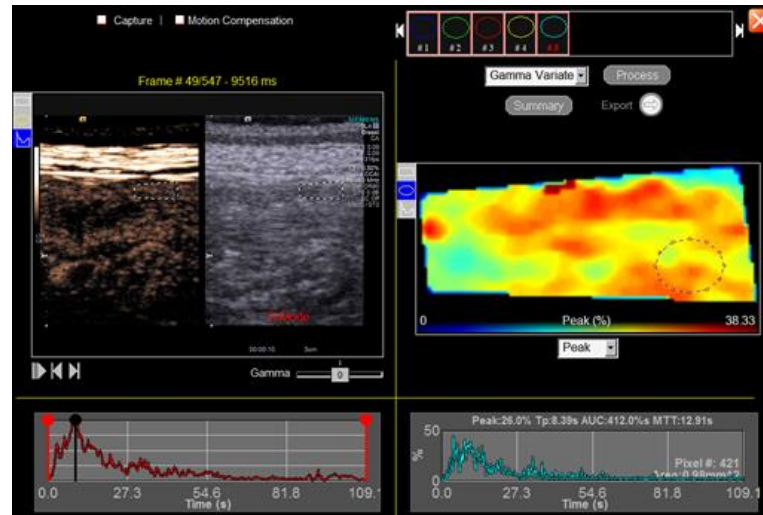
Subsequently, the cranial mesenteric artery (CMA) and abdominal aorta were located using the color Doppler mode and, later, color mapping was performed to measure during diastole and systole in triplicate the middle area in cross-section of each artery (A). The cranial mesenteric artery measurements were acquired close to its origin, and those of the aorta were obtained in the portion caudal to the left kidney. The pulsed Doppler was activated, and the cursor was positioned in the central portion of each artery (the axis of the sound beam and the axis of the vessel should be parallel to each other, with an angle of insonation lower than  $60^\circ$  and sample volume measuring  $2/3$  the diameter of the vessel) aiming to obtain clean flowmetric tracings in each of the vessels. When the tracing was free of artifacts, the image was frozen, and the peak systolic velocity (PS), end-diastolic velocity (ED), time-averaged maximum velocity (TaMax), Time-averaged minimum velocity (TaMin) and the resistivity (RI) and pulsatility (PI) indices, were collected through automatic selection of the equipment.

Subsequently, the blood flow volumes (BFV ml/min/kg) of the cranial mesenteric artery and abdominal aorta were calculated using: the mean velocity ( $V_{mean} = \frac{PS+ED}{2}$  cm/s), the mean vessel area ( $A$  cm<sup>2</sup>) and the weight of the animal ( $W$  kg) using the following formula [18]:  $BFV = \frac{V_{mean} \times 60 \times A}{W}$ .

Once the Doppler exam is completed, CEUS was performed using harmonic imaging software (CADENCE, Siemens Company. Munich, Germany). Therefore, the ultrasound image of a duodenal portion was centered on the screen, trying to obtain a clear and isolated image in the longitudinal section of this organ. The acoustic power (MI) was set at 0.07, with gain, depth, dynamic range, frequency, and focus optimized in the initial evaluation, aiming to ensure excellent image quality and kept constant throughout the experiment. Ultrasound contrast agent SonoVue® (Bracco, São Paulo, SP, Brazil) was then administered as a 0.01 mL/kg bolus intravenously, followed by a 5 mL saline flush. The time of contrast application was considered as T0, starting the recording in video format of the images resulting from the static ultrasound assessment of the duodenum for a period of 180 seconds for further analysis, as described and validated in the literature [12,19].

After completing the acquisition, the images saved as videos were transferred to an offline analysis module (DICOM® Digital Imaging and Communications in Medicine, Rosslyn, VA, USA), defining the area of interest, including the largest possible portion of the intestinal wall filled with contrast and later defined 5 regions of interest (ROI) of approximately 1 mm<sup>2</sup>, trying not to include blood vessels. After assembling the sequence of images in the software, they were automatically converted into time-intensity curves (TIC, Figure 1), from which the software calculated the parameters of organic perfusion: number of pixels (Pixel), peak of intensity (Peak in

%), time to peak intensity ( $T_p$  in s), mean transmission time (MTT in s) and area under the curve (AUC) [10].



**Figure 1.** A representative contrast-enhanced ultrasound image of a portion of the duodenum with the area of interest defined (left image - dashed line) including the largest area of its wall, with the regions of interest defined inside (right image - dashed circle with dots) 5 subareas of 1 mm<sup>2</sup> approximately. The corresponding time-intensity curve of each area is below each image in red and blue lines.

The peak of intensity in % corresponds to the percentage the contrast filled out of the total pixels in the evaluated ROI, and there may be variation in the total amount of pixels, depending on the size of the image made of the target organ during ultrasound evaluation, therefore, this value also was converted to peak intensity in pixels (Peak pixel) by the formula:  $Peak\ pixel = \frac{Peak\ \% \times Pixels}{100}$ .

The statistical analysis of all these variables was performed using the R software (R Foundation for Statistical Computing, Austria). The variables were compared between the pyometra group and the control group; and among patients

classified as sepsis or not by the SOFA and SIRS scores, using the Kruskal Wallis test, the results are presented as the median  $\pm$  interquartile range (IQR) and the significance was set at  $p < 0.05$ .

## Results

The control group consisted of 5 Shih Tzu, 1 Border Collie, 1 Bull Terrier, 1 Dachshund, 1 Lhasa Apso and 1 Mongrel, aging between 1 - 9 years, mean weight 9.37 kg. The pyometra group consisted of 6 Mongrels, 5 Shih Tzu, 2 Labrador Retriever, 1 Pinscher, 1 Pitbull Terrier, 1 Poodle and 1 Pug, aging between 3 - 12 years, mean weight 15.78 kg. The mean diameter, wall and luminal thickness of the uterus in the pyometra group were 2.19cm, 0.36cm and 1.64cm, respectively and no animal presented any comorbidities in both groups. The Gram staining of the uterine content revealed that in 8/17 the bacterial type could not be identified due to the great number of inflammatory cells, 7/17 presented mostly Gram-negative bacilli and 2/17 were mostly Gram-positive cocci.

When comparing the control ( $n=10$ ) with pyometra ( $n=17$ ) animals, pyometra showed lower values of aortic blood flow volume ( $p=0.001$ ), aortic peak systolic velocity ( $p=0.006$ ) and aortic resistivity index ( $p=0.042$ ) evaluated by Doppler ultrasound. The other clinical, B-mode and CEUS variables were similar between groups (Table 1).

**Table 1.** Median  $\pm$  IQR of aorta, CMA and duodenal perfusion of healthy and pyometra bitches.

Variables	Control	Pyometra	P-value
SAP (mmHg)	176 $\pm$ 35.8	178 $\pm$ 45.3	0.342
<b>B-mode</b>			
Duodenal thickness (cm)	0.39 $\pm$ 0.12	0.35 $\pm$ 0.11	0.632
<b>Aorta Doppler</b>			

<b>BFVaorta (ml/min/kg)</b>	132 ± 96.5	98.1 ± 28.6	0.001*
<b>PSaorta (cm/s)</b>	117 ± 22,5	90.7 ± 22.5	0.006*
<b>RIaorta</b>	0.9 ± 0,05	0.84 ± 0.07	0.042*
<b>PIaorta</b>	3.64 ± 3,83	2.86 ± 1.63	0.209
<b>TaMinaorta (cm/s)</b>	15.1 ± 6,91	13.1 ± 5.75	0.436
<b>EDaorta (cm/s)</b>	12.4 ± 8,05	14.4 ± 8.38	0.547
<b>TaMaxaorta (cm/s)</b>	30.1 ± 13,5	27.6 ± 12.2	0.620
<b>Cranial Mesenteric Artery Doppler</b>			
<b>BFVcma (ml/min/kg)</b>	44.6 ± 16.6	42,2 ± 27.4	0.798
<b>PScma (cm/s)</b>	105 ± 30.9	115 ± 41.8	0.551
<b>RIcma</b>	0.83 ± 0.03	0.81 ± 0.05	0.388
<b>PIcma</b>	3.12 ± 1.6	2.54 ± 0.71	0.202
<b>TaMincma (cm/s)</b>	16.8 ± 8.68	19.2 ± 8.03	0.475
<b>EDcma (cm/s)</b>	17.6 ± 6.22	20.6 ± 8.45	0.344
<b>TaMaxcma (cm/s)</b>	33 ± 14.9	39.3 ± 16.3	0.328
<b>CEUS</b>			
<b>PeakDuodenum (Pixel)</b>	28.9 ± 39.4	42.2 ± 56.9	0.175
<b>PeakDuodenum (%)</b>	11.2 ± 9.29	19.9 ± 12.3	0.132
<b>AUCDuodenum (%s)</b>	271 ± 279	432 ± 777	0.340
<b>TpDuodenum (s)</b>	11.6 ± 16.6	11.5 ± 21.4	0.422
<b>MTTDuodenum (s)</b>	23.9 ± 24.9	19.6 ± 32.5	0.841
<b>PixelDuodenum</b>	361 ± 227	408 ± 240	0.980

SAP: Systolic Arterial Pressure, BFV: Blood Flow Volume; aorta: abdominal aorta artery; cma: cranial mesenteric artery; PS: peak systolic velocity; RI: resistivity index; PI: pulsatility index; ED: end diastolic velocity; TaMin: time-averaged minimum velocity; TaMax: time-averaged maximum velocity; Peak: peak intensity of contrast; AUC: area under the curve; Tp: time to peak intensity; MTT: mean transit time. \*Considered statistically significant by t-Student test  $p \leq 0.05$ .

When SOFA score was applied to identify “sepsis” by organic dysfunction, of the 27 animals, only 4 (23.50%) had a SOFA score greater than 2 and, consequently, were diagnosed with sepsis by this score, all belonging to the pyometra group, presenting dysfunction of the following systems: 3/27 (11.11%) presented renal alteration (elevated creatinine), 3/27 (11.11%) had thrombocytopenia, 1/27 (3.70%) had respiratory dysfunction (lower  $PaO_2/FiO_2$ ), 1/27 (3.70%) had change in level of consciousness. No hepatic dysfunction nor hypotension were observed according to the SOFA criteria. When compared patients in sepsis by SOFA with no sepsis patients, only the SAP resulted lower in the sepsis animals ( $p=0.005$ ). The other variables did not differ (table 2).

**Table 2.** Median  $\pm$  IQR of aorta, CMA and duodenal perfusion of septic bitches classified by SOFA.

Variables	Non Septic	Sepsis SOFA	P-value
SAP (mmHg)	187 $\pm$ 35.3	120 $\pm$ 23.9	0.005*
<b>B-Mode</b>			
Duodenal thickness (cm)	0.39 $\pm$ 0.09	0.37 $\pm$ 0.19	0.732
<b>Aorta Doppler</b>			
BFVaorta (ml/min/kg)	109 $\pm$ 40.6	114 $\pm$ 82	0.838
PSaorta (cm/s)	103 $\pm$ 25.6	85.5 $\pm$ 23.6	0.280
RIaorta	0.87 $\pm$ 0.06	0.83 $\pm$ 0.08	0.408
PIaorta	3.07 $\pm$ 2.32	2.79 $\pm$ 2.04	0.585
TaMinaorta (cm/s)	14.1 $\pm$ 6.45	12.6 $\pm$ 4.43	0.672
EDaorta (cm/s)	13.7 $\pm$ 8.45	13.8 $\pm$ 7.3	0.976
TaMaxaorta (cm/s)	28.9 $\pm$ 13.2	26.3 $\pm$ 8.64	0.709
<b>Cranial Mesenteric Artery Doppler</b>			
BFVcma (ml/min/kg)	39 $\pm$ 39.3	42.8 $\pm$ 26.9	0.747
PScma (cm/s)	109 $\pm$ 74.1	113 $\pm$ 41.7	0.816
RIcma	0.82 $\pm$ 0.06	0.81 $\pm$ 0.08	0.550
PIcma	2.32 $\pm$ 1.26	2.46 $\pm$ 0.59	0.550
TaMincma (cm/s)	15.3 $\pm$ 12.7	20.4 $\pm$ 8.4	0.739
EDcma (cm/s)	16.3 $\pm$ 11.5	21.8 $\pm$ 5.85	0.600
TaMaxcma (cm/s)	31.9 $\pm$ 30.7	42.4 $\pm$ 14.4	0.786
<b>CEUS</b>			
PeakDuodenum (Pixel)	34.9 $\pm$ 44.5	71.8 $\pm$ 51.5	0.375
PeakDuodenum (%)	14.8 $\pm$ 12.6	18.7 $\pm$ 16.9	0.539
AUCDuodenum (%s)	299 $\pm$ 302	321 $\pm$ 950	0.733
TpDuodenum (s)	11.5 $\pm$ 22.1	10.9 $\pm$ 5.62	0.580
MTTDuodenum (s)	23.8 $\pm$ 37.1	18.9 $\pm$ 11.9	0.453
PixelDuodenum	409 $\pm$ 240	321 $\pm$ 224	0.838

SAP: Systolic Arterial Pressure, BFV: Blood Flow Volume; aorta: abdominal aorta artery; cma: cranial mesenteric artery; PS: peak systolic velocity; RI: resistivity index; PI: pulsatility index; ED: end diastolic velocity; TaMin: time-averaged minimum velocity; TaMax: time-averaged maximum velocity; Peak: peak intensity of contrast; AUC: area under the curve; Tp: time to peak intensity; MTT: mean transit time. \*Considered statistically significant by t-Student test  $p \leq 0.05$ .

When SIRS score was applied to identify “sepsis” by Systemic Inflammatory Response Syndrome, of the 27 animals, 15 were considered in sepsis (55.50%), all belonging to the pyometra group, although 9 animals in the control group had a score  $\geq 2$ , did not show signs of infection and therefore were not considered in sepsis. Of the control group, elevation of RR was the most frequent alteration in 9/10 animals (90%),

followed by elevated of HR in 7/10 animals (70%), rectal temperature was elevated in 3/10 (30%) animals and leukopenia was observed in 1/10 (10%). In pyometra group, all animals 17/17 (100%) presented elevated RR, 11/17 (64.70%) had altered leukocytes, 10 leukocytosis and 1 leukopenia, 10/17 (58.82%) presented elevated HR and 6/17 (35.29%) altered rectal temperature, 4 with  $T < 38.0^{\circ}\text{C}$  and 2 with  $T > 39.2^{\circ}\text{C}$ . Comparing the septic and not septic animals identified by SIRS score, sepsis animals showed lower systolic blood pressure ( $p=0,042$ ), aortic peak systolic velocity ( $p=0,009$ ), aortic blood flow volume ( $p=0,014$ ) and aortic resistivity index ( $p=0,038$ ), whereas, CEUS evaluation revealed that the peak intensity of contrast in pixels of duodenal parenchyma was higher ( $p=0,049$ ). The other variables did not differ between groups (table 3).

**Table 3.** Median  $\pm$  IQR of aorta, CMA and duodenal perfusion of septic bitches classified by SIRS.

<b>Variables</b>	<b>Non Septic</b>	<b>Sepsis SIRS</b>	<b>P-value</b>
<b>SAP (mmHg)</b>	195 $\pm$ 25.3	170 $\pm$ 45.1	0.042*
<b>B-Mode</b>			
<b>Duodenal thickness (cm)</b>	0.39 $\pm$ 0.09	0.35 $\pm$ 0.12	0.524
<b>Aorta Doppler</b>			
<b>BFVaorta (ml/min/kg)</b>	148 $\pm$ 54.6	99.9 $\pm$ 26.1	0.014*
<b>PSaorta (cm/s)</b>	115 $\pm$ 22.9	89.5 $\pm$ 22.6	0.009*
<b>Rlaorta</b>	0.89 $\pm$ 0.05	0.84 $\pm$ 0.07	0.038*
<b>Plaorta</b>	4.00 $\pm$ 1.68	3.27 $\pm$ 1.84	0.294
<b>TaMinaorta (cm/s)</b>	14.9 $\pm$ 6.52	13 $\pm$ 5.92	0.448
<b>EDaorta (cm/s)</b>	12.7 $\pm$ 7.57	14.5 $\pm$ 8.78	0.562
<b>TaMaxaorta (cm/s)</b>	30 $\pm$ 12.9	27.4 $\pm$ 12.4	0.599
<b>Cranial Mesenteric Artery Doppler</b>			
<b>VFScma (ml/min/kg)</b>	43.8 $\pm$ 15.2	42.5 $\pm$ 29.3	0.881
<b>PScma (cm/s)</b>	109 $\pm$ 29.1	113 $\pm$ 44.4	0.742
<b>Rlcma</b>	0.83 $\pm$ 0.03	0.81 $\pm$ 0.05	0.206
<b>Plcma</b>	3.05 $\pm$ 1.47	2.51 $\pm$ 0.73	0.263
<b>TaMincma (cm/s)</b>	17.3 $\pm$ 8.04	19.1 $\pm$ 8.51	0.578
<b>EDcma (cm/s)</b>	18.1 $\pm$ 5.93	20.7 $\pm$ 8.91	0.366
<b>TaMaxcma (cm/s)</b>	34.2 $\pm$ 14.2	39.3 $\pm$ 17.2	0.411
<b>CEUS</b>			
<b>PeakDuodenum (Pixel)</b>	28.9 $\pm$ 33.9	63.9 $\pm$ 58.6	0.049*
<b>PeakDuodenum (%)</b>	11.2 $\pm$ 12.5	19.9 $\pm$ 11.6	0.143
<b>AUCDuodenum (%s)</b>	288 $\pm$ 289	350 $\pm$ 408	0.884

<b>TpDuodenum (s)</b>	13.5 ± 21.6	10.8 ± 5.65	0.770
<b>MTTDuodenum (s)</b>	27.9 ± 39.9	18.2 ± 13.1	0.188
<b>PixelDuodenum</b>	361 ± 269	408 ± 240	0.981

SAP: Systolic Arterial Pressure, BFV: Blood Flow Volume; aorta: abdominal aorta artery; cma: cranial mesenteric artery; PS: peak systolic velocity; RI: resistivity index; PI: pulsatility index; ED: end diastolic velocity; TaMin: time-averaged minimum velocity; TaMax: time-averaged maximum velocity; Peak: peak intensity of contrast; AUC: area under the curve; Tp: time to peak intensity; MTT: mean transit time. \*Considered statistically significant by t-Student test  $p \leq 0.05$ .

## Discussion

In this study we were able to include 10 healthy bitches of middle and advanced age constituting a control with characteristics like the 17 bitches with pyometra included. The diagnosis of pyometra was defined on the clinical, ultrasonographic and cytological characteristics of this disease. To exemplify, normal bitch uterus ultrasound characteristics have been described during early diestrus with a diameter of  $1.31 \pm 0.09$  cm and without anechoic fluid in the lumen [16], being coincident with pyometra our findings that describe a uterine diameter of  $2.19 \pm 1.40$  cm, with intraluminal thickness of  $1.64 \pm 1.47$  cm filled with echoic and anechoic fluid. Additionally, the cytological exam of the uterine fluid during pyometra reveals the presence of neutrophils in large numbers, with the variable presence of intra and/or extracellular bacteria [20], also corroborating our diagnosis, as we observed a great number of inflammatory cells, Gram-negative bacilli and Gram-positive cocci in the cytological exam of the bitches with pyometra.

In the included patients and as an essential part of this study, it was necessary to determine if they were in sepsis, for this we used the most studied diagnostic protocols in the area, SIRS and SOFA [1,6]. SIRS criteria are based on body's inflammatory response to infection, using physical and hematological parameters

(rectal temperature, heart rate, respiratory rate, leukocytes and bands) to determine patients in sepsis. When using the SIRS criteria, it can be noted that it has a high sensitivity and low specificity as described in the literature [6], probably due to very nonspecific assessments, as was the case in this study, in which tachypnea, tachycardia and hyperthermia were the most frequent changes, even in healthy animals, however, these animals did not show signs of infection, which excludes them from the diagnosis of sepsis, indicating that these changes are related to the environment, while pyometra animals showed tachypnea, leukocytosis, leukopenia, tachycardia and low temperature, with a clear suspicion of infection, which indicates sepsis in 15 of the 27 animals evaluated in this study.

On the other hand, the SOFA criteria were proposed to identify sepsis, as an organ dysfunction in humans [6] and its applicability in dogs admitted to an intensive care unit (ICU) has been suggested to predict the outcome [8]. However, SOFA is widely discussed for using late parameters; and its applicability in dogs is controversial, as it is based on findings such as: increased creatinine concentration and it has been proven that creatinine production is reduced during sepsis [21]; low scores on the modified Glasgow coma scale developed for dogs with head trauma [14], but this scale lacks sensitivity at mid-points, which are the ones that are evidenced in sepsis [22]; increase in total serum bilirubin, that has been shown to be insensitive and very variable in liver disease [23,24]. With these precepts and as expected, SOFA application to identify sepsis in this study resulted in a very low diagnosis rate, identifying only 4 of the 27 animals, the organic dysfunction observed were: renal, coagulation, respiratory and central nervous system; no hepatic dysfunction or

hypotension were observed. These results compromising the representativeness of the analyzes carried out on these patients.

When comparing the variables studied between animals with pyometra and healthy, aortic blood flow volume, aortic peak systolic velocity and aortic resistivity index were lower in bitches with pyometra. When comparing animals in sepsis or not according to SIRS criteria, systolic blood pressure, aortic peak systolic velocity, aortic blood flow volume and aortic resistivity index were lower in septic animals, while the peak intensity of contrast in pixels of duodenal parenchyma was higher. Although with low representation, when comparing animals in sepsis or not according to SOFA criteria, only the systolic blood pressure was lower in animals with sepsis.

One of the main systemic and most clinically applicable result that should be discussed is the statistical reduction of systolic arterial pressure in animals with sepsis (identified by both the SIRS and SOFA criteria), even still within the reference range (SAP<90mmHg is considered hypotension in dogs [25]). This result corroborates with a study in rats with induced sepsis, which showed that SAP did not differ in the first 2 days, but after, fell significantly [26]. These assertions may explain the fact that we did not find a drop in blood pressure in animals with pyometra, but in animals with sepsis and may be related to the time of evolution and escalation of this entity.

Arterial hypotension, described as one of the main criteria for evaluating human sepsis, does not seem to be so constant in dogs. A study that retrospectively evaluated 144 dogs with sepsis concluded that 17.5% of them expressed hypotension that required treatment (not defining the cut-off blood pressure), ranking fourth in the observed organ dysfunctions, after coagulation, hepatic and respiratory dysfunction [2]. Even in a study carried out by our research group previously, which evaluated 20

bitches with pyometra, who had acute kidney injury, we did not detect hypotension in any of them and the mean SAP was  $115\pm 32.5$  mmHg [10].

In this context, it is known that vasodilation is one of the main cardiovascular alterations triggered by sepsis, leading to a reduction in blood flow volume and in the aortic resistivity index, much more evident in animals in sepsis by the SIRS criteria and which is well exposed in the literature [27]. The drop in vascular resistance was evidenced in our animals by the reduction in the aortic resistivity index and, consequently, reduction in systolic velocity and blood flow volume in bitches with pyometra and more markedly in those with sepsis identified by SIRS. This change in aortic blood flow reflected in a significant drop in systolic blood pressure (without having hypotension) only in animals with sepsis, representing the loss of vasomotor tone in the central resistance vessels, as well as a strong ability to maintain the mechanisms that regulate peripheral blood pressure in dogs.

Doppler vascular parameters of the aorta artery of rabbits with induced sepsis were evaluated for a period of 4 hours after infection and showed that the resistance and velocity changed in the first 3 - 4 hours and then returned to normal, indicating an effective compensatory mechanism to maintain tissue perfusion [28]. It is possible that the absence of alterations in cranial mesenteric artery Doppler parameters evidenced in this study was related to the evolution time of pyometra, since the infection of these animals was spontaneous and, consequently, the interval between infection development and search for veterinary care usually takes several days. It is worth mentioning at this point that cranial mesenteric artery Doppler values found in healthy animals corroborate the literature for the species, as well as the abdominal aorta

variables [29], however, no studies of these parameters were found in dogs with infections to compare with our findings.

At this point, we identified in patients with pyometra a reduction in aortic blood flow that is not reflected in a reduction of cranial mesenteric blood flow; and when we examined the duodenal perfusion of these patients using CEUS, we found that this function was also maintained, without reflecting either the change in systemic blood flow. This discrepancy was already observed in septic rats [30], but these authors additionally described a tendency to increase duodenal and to decrease ileum and colon blood flow in these animals. Something that is not far from the results that we evidenced in patients with sepsis identified by the SIRS criteria, who, in addition to the reduction in aortic flow had reduction in systolic blood pressure and presented an increase in duodenal perfusion evident by elevation of contrast enhancement peak in CEUS. Increase in jejunal flow was described in pigs in septic shock [31], indicating that microcirculatory flow in this tissue was actively maintained by local mechanisms during sepsis, while gastric and colonic flow were reduced. It should be borne in mind that apparently there is a heterogeneity in the hemodynamic response of the different intestinal regions' microcirculation to infection, emphasizing the importance of specific studies for each region.

In this thread, the blood flow of the small intestine of rats with induced peritonitis was evaluated by radioactive microspheres for 4 days, evidencing an increase in septic animals when compared to control [26]. These findings were reproduced in the present study using the CEUS which does not involve radioactivity, patients' risk or invasiveness; and may be related to one study in dogs with inflammatory bowel disease, which discovered an increase in contrast enhancement peak and area under

the curve during CEUS evaluation [12]. At this point, it is possible to infer that the change in the intestinal flow of patients with sepsis is due to inflammation or dysfunction of this organ, because when it is above the values found in healthy or pyometra patients, there is no longer any way to think about physiological compensation.

Within the parameters we use to assess intestinal functionality, it is worth mentioning that B-mode duodenal wall thickness was similar in healthy, pyometra and sepsis patients, studies [27] showed that the intestinal wall thickened in the first 3 hours after sepsis induction in rabbits, returning to basal thickness after 4 hours. This leaves a doubt, “does this thickening occur in dogs?”, as there is no way to know the evolution time of the infection in our study. However, a study conducted in dogs demonstrated that duodenal thickness did not differ between normal animals and dogs with inflammatory bowel disease [17], which corroborates our results.

Finally, this study has some limitations: during CEUS exam it was found difficulty in obtaining quality images, since target organ must be stable in the sonographic beam for 3 minutes and the intestinal loops present peristalsis and movement; the sepsis studies generally used animals with induced sepsis and, in our study, some bitches with pyometra were in sepsis and others were not, this makes analysis a little difficult because practically forms three groups, healthy, infected and in sepsis; the SOFA criteria does not allow the identification of sepsis in animals that apparently have important alterations in systemic and tissue hemodynamics identified by SIRS, leading to a low accuracy that can translate into a late treatment and poor outcome, in this way it also compromises the statistical comparisons carried out.

## **Conclusions**

With this study, it can be concluded that pyometra, as a severe infection, causes reduction in abdominal aortic blood flow, that is more evident in animals in sepsis identified by the SIRS criteria, those who also had reduction in systolic blood pressure and increase in duodenal perfusion evident by CEUS, factors that were not identified in patients with sepsis defined by the SOFA criteria. The changes identified in intestinal perfusion of sepsis animals indicate probably inflammation or dysfunction. In this last point, CEUS can be considered as a useful technique for the detection of discreet hemodynamics tissue changes not evident by conventional exams, in a vital complication such as sepsis.

## **Abbreviations**

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome, SOFA: Sequential Organ Failure Assessment, CEUS: contrast-enhanced ultrasound, CMA: cranial mesenteric artery, SAP: Systolic Arterial Pressure, MODS: multiorgan dysfunction syndrome, HR: heart rate, RR: respiratory rate, T: rectal temperature, PS: peak systolic velocity, ED: end-diastolic velocity, TaMax: time-averaged maximum velocity, TaMin: Time-averaged minimum velocity, RI: resistivity index, PI: pulsatility index, BFV: blood flow volume, ROI: regions of interest, TIC: time-intensity curves, Tp: time to peak intensity, MTT: mean transmission time, AUC: area under the curve, IQR: interquartile range.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

This study is reported in accordance with ARRIVE guidelines and followed the recommendations of the National Council for Animal Experimentation (CONCEA)

(normative resolution nº32 of september 6, 2016) and was approved by the Institutional Committee on Ethics in the Use of Animals (Protocol Nº06499/19). The owners of the animals selected for this study were consulted, informed, and clarified of all the details of the experiment and expressed their agreement in an informed consent form.

### **Consent for publication**

Not applicable.

### **Data availability**

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

### **Competing interests**

The authors declare no competing interests.

### **Funding**

This study was financed by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq process: 424885/2018-2).

### **Authors contribution**

RARU, BG and MARF conceived, designed the study and participated in manuscript writing. BG, LPNA, DIY, PDAS, BBL, PS, ICKC and RKC executed the experiment, collected and interpreted data. RARU statistical analyzed data. All authors

interpreted the data, critically revised the manuscript for important intellectual contents and approved the final version.

### **Acknowledgments**

The authors thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq: productivity scholarship 305182/2020-0 and CNPq: postgraduate scholarship 140307/2019-2).

### **References**

1. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med.* 2021;49:e1063–1143.
2. Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, DeLaforcade-Buress AM, Berg JR, Silverstein DC, et al. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003-2007). *J Am Vet Med Assoc.* 2010;236(1):83–87.
3. Reintam A, Parm P, Kitus R, Kern H, Starkopf J. Gastrointestinal symptoms in intensive care patients. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2009;53:318–324.
4. Osterbur K, Mann FA, Kuroki K, Declue A. Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Humans and Animals. *J Vet Intern Med.* 2014;28:1141–1151.

5. Gatt M, Reddy BS, Macfie J. Review article : bacterial translocation in the critically ill – evidence and methods of prevention. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;25:741–757.
6. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *J Am Med Assoc.* 2016;315(8):801–810.
7. Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Diagnostic Criteria for Sepsis in Dogs. *Vet Surg [Internet].* 1997;26(5):393–397.
8. Ripanti D, Dino G, Piovano G, Farca AM. Application of the Sequential Organ Failure Assessment Score to predict outcome in critically ill dogs: Preliminary results. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2012;152(8):325–330.
9. Girlich C, Jung EM, Huber E, Ott C, Iesalnieks I, Schreyer A, et al. Comparison between preoperative quantitative assessment of bowel wall vascularization by contrast-enhanced ultrasound and operative macroscopic findings and results of histopathological scoring in crohn's disease. *Ultraschall der Medizin.* 2011;32(2):154–159.
10. Gasser B, Uscategui RAR, Maronezi MC, Pavan L, Simões APR, Martinato F, et al. Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. *Sci Rep.* 2020;10(1).
11. Medellin A, Merrill C, Wilson SR. Role of contrast-enhanced ultrasound in evaluation of the bowel. *Abdom Radiol [Internet].* 2018;43(4):918–933.

12. Linta N, Pey P, Toaldo MB, Pietra M, Felici M, Bettini G, et al. Contrast-enhanced ultrasonography in dogs with inflammatory bowel disease. *J Vet Intern Med.* 2021;35:2167–2176.
13. Lima A, et al. Dynamic Contrast-Enhanced Ultrasound Identifies Microcirculatory Alterations in Sepsis-Induced Acute Kidney Injury. *Crit Care Med*, 2018;20:1:1–9.
14. Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. The Prognostic Value of the Modified Glasgow Coma Scale in Head Trauma in Dogs. *J Vet Intern Med.* 2001;15:581–584.
15. Mucha CJ. Determinación de la presión arterial. *REDVET Rev Electrónica Vet [Internet]*. 2007;VIII(7).
16. Aires LPN, Gasser B, Silva P, Del Aguila Da Silva P, Silveira MV, Carneiro RK, et al. High-definition ultrasonography in the evaluation of the reproductive tract of bitches during the follicular phase of the estrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2021;234(July).
17. Rudorf H, Van Schaik G, O'Brien RT, Brown PJ, Barr FJ, Hall EJ. Ultrasonographic evaluation of the thickness of the small intestinal wall in dogs with inflammatory bowel disease. *J Small Anim Pract.* 2005;46(7):322–326.
18. Kantrowitz BM, Nyland TG, Fisher P. Estimation of portal blood flow using duplex real-time and pulsed doppler ultrasound imaging in the dog. *Vet Radiol.* 1989;30(5):222–226.

19. Diana A, Specchi S, Toaldo MB, Chiocchetti R, Laghi A, Cipone M. Contrast-enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats. *Vet Radiol Ultrasound*. 2011;52(5):555–559.
20. Pretzer SD. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. *Theriogenology*. 2008;70(3):359–363.
21. Doi K, Yuen PST, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Star RA. Reduced Production of Creatinine Limits Its Use as Marker of Kidney Injury in Sepsis. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1217–1221.
22. Bastos PG, Sun X, Wagner DP, Wu AW, Knaus WA. Glasgow Coma Scale score in the evaluation of outcome in the intensive care unit: Findings from the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation III study. *Crit Care Med*. 1993;21(10):1459–1465.
23. Gornall AG, Bardawill CJ. The Study of Liver Function in Dogs. *Can J Med Sci*. 1951;(October 1950):255–262.
24. Schlesinger DP, Rubin SI. Serum bile acids and the assessment of hepatic function in dogs and cats. *Can Vet J [Internet]*. 1993;34(4):215–220.
25. Silverstein DC, Kleiner J, Drobatz KJ. Effectiveness of intravenous fluid resuscitation in the emergency room for treatment of hypotension in dogs: 35 cases (2000-2010). *J Vet Emerg Crit Care*. 2012;22(6):666–673.
26. Lang CH, Bagby GJ, Ferguson JL, Spitzer JJ. Cardiac output and redistribution of organ blood flow in hypermetabolic sepsis. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 1984;15(3).

27. Greer JR. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. *BJA Educ.* 2015;15(6):316–321.
28. Kim HY, Kim IO, Kim WS, Kang GH. Bowel sonography in sepsis with pathological correlation: An experimental study. *Pediatr Radiol.* 2011;41(2):237–243.
29. Riesen S, Schmid V, Gaschen L, Busato A, Lang J. Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. *Vet Radiol Ultrasound.* 2002;43(6):554–560.
30. Klemm K, Moody FG. Regional intestinal blood flow and nitric oxide synthase inhibition during sepsis in the rat. *Ann Surg.* 1998;227(1):126–133.
31. Hildebrand LB, Krejci V, Banic A, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. *Crit Care Med.* 2000;28(9):3233–3241.

### **CAPÍTULO 3 – Potenciais biomarcadores para compor uma nova escala para detecção precoce de disfunção orgânica em cães com sepse**

#### **Resumo**

O diagnóstico precoce da sepse agiliza a instituição do tratamento adequado e reduz mortalidade. Os critérios atualmente propostos para seu diagnóstico utilizam parâmetros subjetivos, tardios e ainda não completamente validados na medicina veterinária. O objetivo deste trabalho foi identificar parâmetros clínicos e laboratoriais relacionados com lesões hepáticas e renais derivadas da sepse e avaliar a acurácia diagnóstica destes para o diagnóstico precoce de sepse em cães, mediante a comparação com os atuais critérios de SIRS e SOFA. Foram utilizadas 10 cadelas saudáveis e 17 com piometra. Quarenta e oito variáveis clínicas e paraclínicas coletadas destas cadelas foram submetidas a uma análise de componentes principais para identificar aquelas que explicassem a variabilidade entre os pacientes com e sem sepse, definindo a sepse como disfunção orgânica hepática e renal. Posteriormente, as variáveis que representassem no mínimo 60% da variabilidade, foram submetidas à análise de poder discriminativo para identificação de sepse utilizando o modelo de regressão logística. Finalmente com estas variáveis identificadas foi construído um critério para identificação de sepse e foram calculadas e comparadas a sensibilidade, especificidade, prevalência, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN), deste critério, dos critérios da SIRS e da escala SOFA. As variáveis identificadas como marcadores de sepse foram: temperatura, leucócitos, neutrófilos, albumina, globulinas, fosfatase alcalina, relação creatinina-proteína urinária e PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, com estas variáveis o critério diagnóstico foi alteração de no mínimo quatro parâmetros resultando em sensibilidade de 92%, especificidade 87%, VPP 85% e VPN 93%, sendo estes resultados similares aos critérios SIRS com infecção confirmada (75%, 93%, 90% e 82%; respetivamente) e superiores a escala SOFA (75%, 100%, 100% e 63%; respetivamente), e a SIRS sem infecção confirmada (75%, 33%, 47%, 63%; respetivamente). Diante disso, o critério proposto permitiu a identificação acurada e precoce da sepse com menor taxa de falsos-positivos e falsos-negativos que os critérios utilizados na rotina, o que possibilita uma abordagem mais assertiva da sepse na espécie canina.

**Palavras-chave:** lesão hepática, lesão renal, piometra, resposta inflamatória, SIRS, SOFA.

## Introdução

A sepse é definida hoje como uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do paciente frente a uma infecção; diversos métodos foram propostos para sua identificação na rotina hospitalar, dentre eles os critérios mais utilizados são os da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), o *Quick Sequential Organ Failure Score* (qSOFA) e o *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) (Evans et al., 2021).

Na medicina veterinária, o critério SIRS já foi estudado em cães e é considerado o de eleição para determinação de sepse na espécie. Ele se baseia na detecção de redução ou aumento da temperatura retal ( $<38,1^{\circ}\text{C}$  ou  $>39,2^{\circ}\text{C}$ ), aumento das frequências cardíaca ( $>120$  bpm) e respiratória ( $>20$  rmpm) e leucopenia, leucocitose e/ou desvio à esquerda no hemograma (Leucócitos  $<6$  ou  $>16 \times 10^3/\mu\text{L}$  e/ou bastonetes  $>3\%$ ). O princípio deste critério é a identificação da resposta inflamatória e se considera em sepse o paciente que apresente duas ou mais destas alterações, associadas a uma infecção suspeita ou confirmada. Este escore apresenta alta sensibilidade (97%), mas baixa especificidade (64%), resultando em excelente identificação de pacientes positivos, porém alta taxa de falsos positivos (Hauptman et al., 1997). Além de pouco específico, o critério SIRS não utiliza marcadores que identifiquem disfunções orgânicas.

Neste contexto, foi proposto a avaliação SOFA que pretende identificar a disfunção dos principais sistemas orgânicos funcionais (respiratório, hepático, renal, cardiovascular, nervoso e da coagulação), por meio dos marcadores: relação pressão parcial arterial de oxigênio e fração inspirada ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ), concentração sérica de bilirrubina total, creatinina sérica, pressão arterial média, escala de coma modificada de Glasgow e a concentração sanguínea de plaquetas. Se considera em disfunção orgânica e conseqüentemente em sepse se há suspeita ou confirmação de infecção, animais com pontuação igual ou superior a 2 nesta avaliação. Já o qSOFA foi proposto na medicina para avaliação à beira do leito de pacientes em estado crítico, utilizando

parâmetros de rápida obtenção, frequência respiratória, estado mental e pressão arterial sistólica, a alteração em 2 desses parâmetros indicam maior risco de mortalidade (Singer et al., 2016).

O SOFA e qSOFA já foram estudados para prever prognóstico em cães em estado crítico (Ripanti et al., 2012; Osgood et al., 2022), no entanto estes estudos não avaliaram a capacidade destes critérios para determinar realmente lesões orgânicas, nem sua capacidade diagnóstica da sepse na espécie canina.

O diagnóstico precoce de disfunção orgânica oriunda de sepse agiliza a instituição do tratamento adequado e melhora o prognóstico (Evans et al., 2021), portanto a identificação de critérios diagnósticos que identifiquem precocemente lesões orgânicas é de suma importância para melhorar o atendimento de pacientes críticos. A avaliação da função renal já foi realizada em cadelas em sepse, correlacionando biomarcadores séricos e urinários com lesões histológicas renais, nestas avaliações a razão entre proteína e creatinina urinária (UPC) e a albumina sérica se mostraram acurados na identificação de lesão renal aguda na sepse (Gasser et al., 2020), no entanto, a avaliação da disfunção de outros órgãos ainda não foi descrita. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar variáveis resultantes do exame físico, hematológico, biomarcadores inflamatórios, de função hepática e renal em cadelas com piometra e saudáveis, e correlacionar estes marcadores com os resultados da análise histopatológica hepática e renal, de forma a desenvolver uma escala eficaz para a determinação precoce de alterações da função orgânica, resposta inflamatória e conseqüentemente da sepse ao tratar-se de animais com infecção, comparando estes marcadores na forma de um critério com os critérios SIRS e SOFA.

## **Materiais e métodos**

Este estudo seguiu as recomendações do Conselho Nacional de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão Institucional de Ética no Uso de Animais (Protocolo N°06499/19). Os proprietários das cadelas selecionadas foram consultados, informados e esclarecidos de todos os detalhes do experimento e expuseram sua concordância em termo de consentimento. Foram incluídas 27 cadelas: 17 com piometra diagnosticadas clínica e ultrassonograficamente, atendidas

no setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da FCAV-UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil; e 10 cadelas adultas saudáveis, compondo o grupo controle, que participaram com a autorização voluntária dos proprietários para serem esterilizadas cirurgicamente.

Os animais de ambos os grupos passaram por exames prévios necessários para certificação dos critérios de inclusão e exclusão, além de descartar comorbidades, incluindo-se: exame físico, laboratorial e ultrassonografia abdominal. Nos animais do grupo controle, aguardava-se os resultados dos exames laboratoriais para confirmar sua saúde antes da realização do experimento.

Durante o exame físico foram aferidas: frequência cardíaca (Fc) e respiratória (Fr) por auscultação torácica; temperatura retal (T°C) por termômetro de mercúrio (1 minuto); tempo de preenchimento capilar (TPC) através da oclusão por pressão digital da mucosa oral (Goucher et al., 2019); nível de consciência pela escala de coma de Glasgow modificada para cães (Platt et al, 2001); pressão arterial sistólica (PAS) obtida em triplicata pelo método indireto Doppler vascular (Mucha, 2007).

Foi coletado sangue venoso da veia jugular, armazenado em tubo com EDTA para realização de hemograma (eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio [VCM], hemoglobina corpuscular média [HCM], concentração de hemoglobina corpuscular média [MCHC], plaquetas, leucócitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos), realizada por impedância em um analisador hematológico automático (ABX-MICROS-ESV60, Horiba Medical, São Paulo, Brasil); em tubo simples para realização dos bioquímicos (concentração sérica de creatinina (mg/dL), ureia (mmol/L), alanina aminotransferase (ALT - U/L), aspartato aminotransferase (AST - U/L), fosfatase alcalina (FA - U/L), gamaglutamiltransferase (GGT - U/L), bilirrubinas total (mg/dL), direta (mg/dL) e indireta (mg/dL), proteína total (g/dL), albumina (g/dL); e em tubo com EDTA/fluoreto de sódio para avaliação da concentração de glicose (mg/dL), realizados em espectrofotômetro automático (LABMAX PLENNO, Labtest, Minas Gerais, Brasil) utilizando kits comerciais deste equipamento, de acordo com as orientações do fabricante.

O sangue arterial foi coletado da artéria femoral utilizando-se seringa para gasometria (BD A-Line™, Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, EUA) e foi realizado exame de gases e eletrólitos, utilizando kit comercial e

analisador automático de gases sanguíneos de acordo com as orientações do fabricante (OPTI CCA-TS, OPTI Medical Systems, Roswell, EUA), obtendo a pressão parcial arterial de oxigênio ( $\text{PaO}_2$ ), dióxido de carbono ( $\text{PaCO}_2$ ), a saturação de oxigênio ( $\text{SaO}_2$ ), o pH, o cálculo da concentração de bicarbonato ( $\text{CHCO}_3$ ), de bases efetivas (BE) e da relação  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ , sódio, potássio, cálcio, cloro Ânion GAP. Além disso, foi coleta urina por cistocentese guiada por ultrassom para avaliação da urinálise (URIQUEST PLUS, Labtest, São Paulo, Brazil) e cálculo da UPC, dividindo a proteína urinária pela creatinina urinária (dosada em diluição 1:25), ambas dosadas pelo espectrofotômetro automático (LABMAX PLENNO, Labtest, Minas Gerais, Brasil). Todos esses parâmetros foram utilizados para realizar a classificação dos animais em sepse ou não pelos critérios SIRS ou SOFA (Hauptman et al., 1997; Ripanti et al., 2012) e avaliação da disfunção renal (Gasser et al., 2020).

Durante a ultrassonografia abdominal, todos os animais passaram por varredura abdominal e aqueles com suspeita de piometra, eram diagnosticados antes de sua inclusão na pesquisa, medindo-se o diâmetro uterino, espessura da parede e espessura luminal em sua maior porção, bem como o aspecto ultrassonográfico do conteúdo uterino. No grupo controle, o útero e os ovários também foram visibilizados para confirmar a aparência ultrassonográfica normal (Aires et al., 2021).

Após realização dos exames, prosseguia o atendimento clínico para estabilização necessária em cada caso e posterior abordagem cirúrgica. Durante o ato cirúrgico as cadelas de ambos os grupos passaram por ovariectomia (eletiva no grupo controle e terapêutica nos animais com piometra) sob anestesia geral. Finalizada a castração, a incisão da linha média era ampliada até a cartilagem xifoide para facilitar o acesso ao fígado e a realização de biópsia hepática com agulha trucut 16G, coletando-se um total de 3 fragmentos em regiões de lobos hepáticos lateral e medial esquerdo, seguido da contenção da hemorragia por pressão durante 7 minutos (Rockey et al., 2009, Rothuizen e Twedt, 2009). A amostra era, então, fixada em formalina 10% para posterior preparo e análise histológica. Pelo exame histopatológico eram considerados com lesão hepática derivada de sepse os animais que apresentassem colestase, diferentes graus de ativação de células de Kupffer, infiltrado inflamatório com ou sem áreas de necrose, como achados comuns no tecido hepático de indivíduos em sepse (Lefkowitz, 2020). Além disso, nas cadelas com

piometra, após a ovariectomia era realizada a coleta do conteúdo uterino de maneira estéril com seringa de 5ml para posterior avaliação microscópica com coloração de Gram, correlacionando os achados da citologia uterina com a literatura (Pretzer, 2008).

A análise estatística foi realizada com a ajuda do software R (R® Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). As variáveis coletadas foram submetidas à análise de componentes principais tentando identificar aquelas que explicassem a variabilidade dos parâmetros entre os pacientes com e sem sepse (classificados a partir da disfunção em ambos os sistemas renal e hepático, caracterizados pela  $UPC > 0,15$  e presença de alterações no histopatológico da biópsia de fígado) filtrando as variáveis com maior contribuição em cada uma das duas dimensões estudadas até obter uma contribuição total de no mínimo 60% em ambas dimensões. Posteriormente as variáveis selecionadas eram submetidas à análise de poder discriminativo para identificação de sepse, através de curvas ROC e calculado o valor de corte (VC), sensibilidade, especificidade, likelihood ratio, utilizando o modelo de regressão logística. As variáveis que apresentassem significância ( $P < 0,05$ ) diagnóstica na análise de curvas ROC foram submetidas ao teste de função discriminatória, obtendo a proporção diagnóstica das variáveis reunidas para a identificação de sepse. Finalmente foram calculadas e comparadas a sensibilidade, especificidade, prevalência, valor preditor positivo (VPP), valor preditor negativo (VPN), coeficiente de probabilidade positivo (CoefProb+), coeficiente de probabilidade negativo (CoefProb-), PriorOdds, PostOdds+ e PostOdds-; do diagnóstico de sepse pelos critérios de SIRS, SOFA e pelos critérios resultantes do estudo. Posterior à coleta de dados e completadas 12, 15 e 17 unidades experimentais no grupo piometra, foi realizado estudo de poder estatístico “a-posteriori” (G\*Power® Version, Universität Kiel, Alemanha) com base em estudo prévio em cadelas avaliando a acurácia diagnóstica de diversas variáveis para identificação de lesão renal aguda (Gasser et al, 2020), o cálculo com 17 pacientes indicou que objetivando significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ) o poder estatístico ficava em 75% ( $1 - \beta = 0,90$ ) para diversas variáveis clínicas.

## Resultados

As cadelas que compunham o grupo controle tinham idade entre 1 e 9 anos e peso médio de 9.37 kg. O grupo piometra era composto por cadelas com idade entre 3 e 12 anos e peso médio 15.78 kg. As médias do diâmetro, parede e espessura luminal do útero no grupo piometra foram de 2.19cm, 0.36cm e 1.64cm, respectivamente e nenhum animal apresentou comorbidades em nenhum dos grupos. A coloração de Gram do conteúdo uterino revelou que em 8/17 cadelas o tipo bacteriano não pôde ser identificado devido ao grande número de células inflamatórias, 7/17 apresentaram bacilos em sua maioria Gram-negativos e 2/17 cocos Gram-positivos.

O exame histopatológico hepático foi realizado em todos os animais do grupo controle e em 15 animais do grupo piometra (Tabela 1). No grupo controle, 6/10 (60%) animais apresentavam infiltrado inflamatório discreto e 1/10 (10%) apresentou discreta área de necrose portal, sem presença de infiltrado inflamatório. No grupo piometra, 13/15 (86.67%) animais apresentavam infiltrado inflamatório moderado e difuso, 10/15 (66.67%) apresentaram áreas multifocais de necrose centrolobular, 10/15 (66.67%) apresentaram células de Kupffer e 5/15 (33.34%) apresentaram grumos de bilirrubina nos canalículos biliares (colestase), sendo que 13/15 (93.34%) animais apresentavam duas ou mais dessas alterações concomitantemente e 1/15 (6.67%) apresentou evidência das células de Kupffer e discreto infiltrado inflamatório. 1/15 (6.67%) apresentou apenas infiltrado inflamatório discreto, sem outras alterações, portanto 14/15 (93.34%) animais foram considerados com alterações hepáticas oriundas da infecção.

**Tabela 1.** Principais alterações histológicas encontradas em biopsia hepática com agulha trucut (16G) de cadelas saudáveis (controle) e acometidas por piometra.

<b>Alterações histológicas</b>	<b>Controle (%)</b>	<b>Piometra (%)</b>
<b>Infiltrado inflamatório discreto</b>	6 (60)	2 (13.33)
<b>Infiltrado inflamatório moderado e difuso</b>	0 (0)	13 (86.67)
<b>Células de Kupffer</b>	0 (0)	10 (66.67)
<b>Áreas de necrose</b>	1 (10)	10 (66.67)
<b>Colestase</b>	0 (0)	5 (33.34)

Comparando os parâmetros avaliados no exame de urina, a UPC dos animais com piometra ( $0.28 \pm 0.76$ ) foi maior ( $p=0.019$ ) do que do grupo controle ( $0.07 \pm 0.11$ ) e a creatinina urinária foi menor ( $p=0.05$ ) nos animais com piometra do que no controle ( $193 \pm 143.80$  e  $237.2 \pm 64.50$ , respectivamente), os outros parâmetros não diferiram entre os grupos. No grupo controle, 2/10 (20%) animais apresentaram  $UPC > 0.15$  e no grupo piometra, 11/17 (64.70%) animais apresentaram  $UPC > 0.15$ , sendo considerados com lesão renal aguda pela infecção. Utilizando o histopatológico hepático e a UPC para determinar lesão nos sistemas hepático e renal das cadelas com piometra, 10/17 (58.82%) animais apresentavam alterações em ambos os sistemas, sendo, portanto, considerados em sepse.

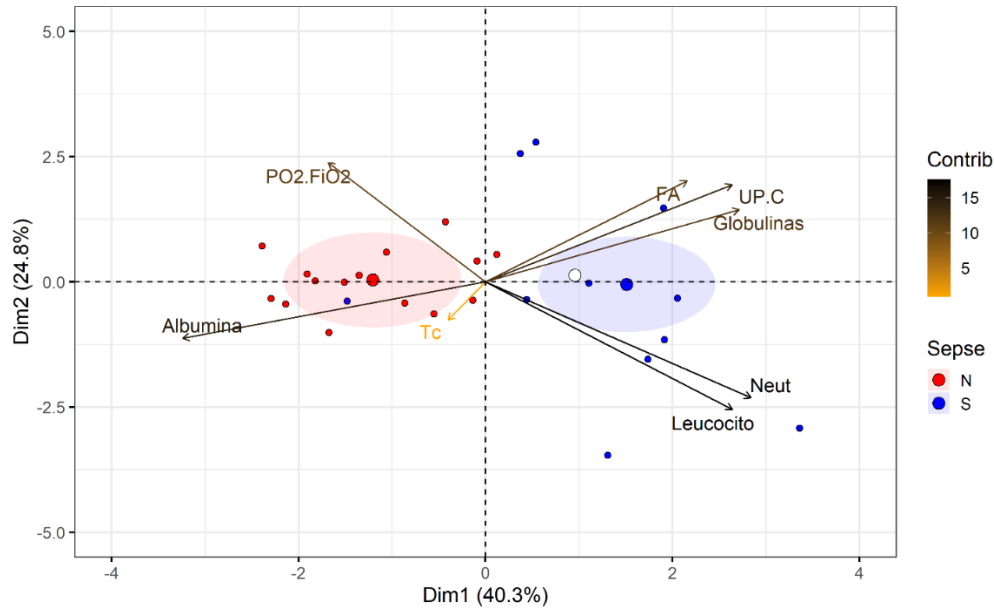
Dentre todas as variáveis clínicas e laboratoriais estudadas, 10 se destacaram apresentando alta sensibilidade e especificidade para explicar individualmente a variabilidade dos parâmetros entre os pacientes com e sem sepse: temperatura retal; leucócitos; neutrófilos; monócitos; níveis séricos de albumina, globulinas, ALT e FA; UPC e  $PaO_2/FiO_2$  (Tabela 2).

**Tabela 2.** Desempenho diagnóstico individual de variáveis clínicas e laboratoriais para prever sepse em cadelas com piometra.

Variáveis	Valor de Corte	Sens (%)	Espec (%)	Likelihood ratio	Valor-P
T (°C)	<39.05	90	82	5.10	0.0053
Leucócitos ( $\times 10^3/UL$ )	>10.40	70	88	5.95	0.0042
Neutrófilos ( $\times 10^3/UL$ )	>5.930	70	88	5.95	0.0019
Monócitos ( $\times 10^3/UL$ )	>0.540	80	82	4.53	0.0022
Albumina (g/dL)	<3.110	100	58	2.43	0.0017
Globulinas (g/dL)	>3.310	70	82	3.97	0.0446
ALT (U/L)	<24.50	100	65	2.83	0.0120
FA (U/L)	>45.00	80	71	2.72	0.0171
UPC	>0.150	80	75	3.20	0.0204
$PaO_2/FiO_2$ (mmHg)	<445.2	70	69	2.27	0.0486

Sens: sensibilidade; Espec: especificidade; T: temperatura; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; UPC: razão creatinina/proteína urinárias;  $PaO_2/FiO_2$ : razão entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio.

Filtrando essas variáveis, 8 foram selecionadas em 6 grupos de função orgânica por apresentarem melhor contribuição para diferenciar animais com e sem sepse, sendo que, em conjunto, somaram uma contribuição de, no mínimo, 65% (Figura 1).



**Figura 1.** Representação gráfica da análise de componentes principais que avalia e mostra a contribuição das variáveis na diferenciação de cadelas em sepse ou não por piometra em duas dimensões geométricas vertical e horizontal.

Desta forma, desenvolveu-se uma tabela com critérios de diagnóstico de sepse que combina as avaliações da resposta inflamatória e da função orgânica, através de parâmetros clínicos (temperatura retal), hematológicos (leucócitos, neutrófilos), proteínas séricas (albumina e globulinas), marcador de lesão hepática (FA), renal (UPC) e de função respiratória ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Tabela de critérios de diagnóstico da sepse e seu desempenho diagnóstico agrupadas em parâmetros clínicos, hematológicos, proteínas séricas, marcador de lesão hepática (FA), renal (UPC) e de função respiratória.

Parametro	Variáveis	Valor de Corte	Sens (%)	Espec (%)	Odds ratio	Valor-P
<b>Clínico</b>	T (°C)	<39.05	60	75	56	0.0053
<b>Hematológico</b>	Leucócitos ( $\times 10^3/\text{UL}$ )	>10.40	83	47	56	0.0042
	Neutrófilos ( $\times 10^3/\text{UL}$ )	>5.930				0.0019
<b>Proteínas séricas</b>	Albumina (g/dL)	<3.110	83	53	59	0,0017
	Globulinas (g/dL)	>3.310				0,0446
<b>Hepático</b>	FA (U/L)	>45.00	92	80	79	0.0171
<b>Renal</b>	UPC	>0.150	100	87	86	0.0204
<b>Respiratório</b>	$\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (mmHg)	<445.2	67	73	66	0.0486

Sens: sensibilidade; Espec: especificidade; T: temperatura; ALT: alanina aminotransferase; FA: fosfatase alcalina; UPC: razão creatinina/proteína urinárias; PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>: razão entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio.

Finalmente foi avaliado o desempenho diagnóstico desta tabela utilizando como critério a alteração em no mínimo 3 ou 4 dos parâmetros descritos (Tabela 3) para determinar sepse e foi comparado com o desempenho da escala SOFA e o critério SIRS com ou sem infecção confirmada. Ao utilizar pelo menos 3 alterações nos marcadores para diagnosticar sepse, o critério proposto apresentou 100% de sensibilidade, 60% de especificidade, VPP de 67% e VPN de 100%. Considerando alterações em 4 marcadores, este critério apresentou 92% de sensibilidade, 87% de especificidade, 85% de VPP e 93% de VPN. Ao comparar este último critério com o desempenho da escala SOFA e do SIRS com e sem infecção confirmada, a escala SOFA apresentou sensibilidade de 75%, especificidade de 100%, VPP de 100% e VPN de 63%. Utilizando o SIRS em casos de infecção confirmada, seu poder diagnóstico da sepse apresentou 75% de sensibilidade, 93% de especificidade, 90% de VPP e 82% de VPN. No entanto, ao aplicar os critérios SIRS sem infecção confirmada, a sensibilidade foi de 75%, a especificidade foi de 33%, VPP foi 47% e VPN foi 63%.

## **Discussão**

Neste estudo, o diagnóstico de piometra foi definido pelas características clínicas, ultrassonográficas e citológicas desta doença. O útero normal durante o início do diestro apresenta diâmetro de  $1,31 \pm 0,09$ cm, sem presença de líquido no lúmen (Aires et al., 2021), sendo então coincidentes com piometra nossos achados que descrevem um diâmetro uterino de  $2,19 \pm 1,40$ cm, com espessura intraluminal de  $1,64 \pm 1,47$ cm preenchida com fluido de aspecto ecogênico e anecogênico. Além disso, o diagnóstico do processo infeccioso é feito pelo exame citológico do líquido uterino que, durante a piometra, revela a presença de neutrófilos em grande número, com evidência variável de bactérias intra e/ou extracelulares (Pretzer, 2008), também corroborando nosso diagnóstico, pois foram observados grande número de células inflamatórias, bacilos Gram-negativos e cocos Gram-positivos no exame citológico do conteúdo uterino das cadelas com piometra.

O diagnóstico de sepse no presente estudo foi feito pela comprovação de lesão hepática no exame histopatológico e  $UPC > 0,15$  como indicativo de lesão renal (Gasser et al., 2020), uma vez que a sepse é definida hoje como disfunção orgânica oriunda da infecção e o escore SOFA utilizava pontuação igual ou superior a 2 pontos na escala de falência orgânica para seu diagnóstico (Evans et al., 2021).

Das 17 cadelas com piometra, 14 apresentaram alterações histológicas associadas à sepse no fígado: presença de células de Kupffer, presença de grumos de bilirrubina nos canalículos biliares (colestase), áreas de necrose e infiltrado inflamatório, sendo, portanto, consideradas com alteração hepática oriunda da infecção. A presença de rara ou discreta quantidade de células inflamatórias não foi considerada como alteração, visto que é descrita também em tecido hepático normal em biópsias feitas durante procedimento cirúrgico, como foi realizado no presente estudo (Lefkowitz, 2020).

A disfunção renal já foi investigada em cadelas com piometra, e a UPC acima de 0,15 se reporta como relacionada a piores graus de necrose tubular aguda, degeneração tubular, fibrose intersticial e infiltrado inflamatório, diagnosticando a lesão renal aguda com 91% de acurácia (Gasser et al., 2020). Além da UPC também já ter sido indicada como marcador para detectar dano renal antes do desenvolvimento de azotemia em cadelas com piometra (Sant'anna et al., 2019). Diante disso, a  $UPC > 0,15$  foi usada como parâmetro para determinação da disfunção renal, sendo observada em 11/17 cadelas com piometra das quais, associando com a lesão hepática, 10/17 apresentaram alteração em ambos os órgãos, sendo, portanto, consideradas em sepse.

Comparando todas variáveis coletadas, criou-se um critério de disfunção orgânica e resposta inflamatória (DORI) para diagnóstico de sepse a partir de 6 variáveis de avaliação das funções fisiológicas, hematológicas, das proteínas séricas e das funções hepática, renal e respiratória, respectivamente: temperatura retal abaixo de  $39,05^{\circ}\text{C}$ , leucócitos acima de  $10,40 \times 10^3/\text{UL}$ , neutrófilos acima de  $5,93 \times 10^3/\text{UL}$ , albumina abaixo de  $3,11\text{g/dL}$ , globulinas acima de  $3,31\text{g/dL}$ , FA acima de  $45\text{U/L}$ , UPC acima de 0,15 e  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  abaixo de  $445,20\text{mmHg}$ ; e determinou-se que a presença de no mínimo quatro destas alterações identificava sepse com uma acurácia acima dos critérios atuais.

Analisando o desempenho de cada parâmetro individualmente, a temperatura retal  $<39,05^{\circ}\text{C}$  apresentou sensibilidade de 60% e especificidade de 75%. Os critérios SIRS utilizaram valores de corte  $<38,1^{\circ}\text{C}$  e  $>39,2^{\circ}\text{C}$  e encontraram sensibilidade e especificidade semelhantes, de 63% e 72%. A temperatura retal normal de cães é considerada  $38,9^{\circ}\text{C}$ , no entanto, um estudo que avaliou a variabilidade diária da temperatura de cães da raça beagle ao longo dos dias observou oscilação rítmica da temperatura, cuja média se manteve em  $39,13\pm 0,01^{\circ}\text{C}$ , corroborando com nossos resultados (Reffinetti e Piccione, 2003).

Os leucócitos  $<6000\text{U/L}$  ou  $>16000\text{U/L}$  associados com bastonetes  $>3\%$  foram utilizados na composição dos critérios SIRS, apresentando 87% de sensibilidade e 69% de especificidade (Hauptman et al., 1993). No presente estudo foram encontrados valores mais altos de leucócitos, neutrófilos e monócitos nos animais com sepse e não foi observada diferença nos bastonetes. Na resposta inflamatória, os macrófagos e neutrófilos são os componentes primários do sistema imune inato, liberando mediadores inflamatórios que irão recrutar mais monócitos e neutrófilos, portanto, o aumento da concentração destas células indica fase inicial da infecção (Nystrom, 1998, Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). A persistência da infecção e da liberação de citocinas leva a medula óssea a liberar neutrófilos maduros e imaturos, os bastonetes (Goyette et al., 2004). No presente estudo, objetivou-se o diagnóstico precoce das disfunções hepática e renal como determinantes da sepse, diante disso, encontrou-se alterações hematológicas compatíveis com o estado inicial da resposta inflamatória, portanto, a utilização dos leucócitos  $>10,40\times 10^3/\text{UL}$  e neutrófilos  $5,93\times 10^3/\text{UL}$  foi proposta para diagnóstico de sepse, apresentando 83% de sensibilidade e 47% de especificidade.

A redução da albumina e aumento das globulinas já foi descrita em cães com infecção induzida por *Staphylococcus aureus* (Zapryanova et al., 2013) e em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, estando relacionada à lesão renal aguda secundária a sepse em cadelas com piometra (Gasser et al., 2020) e também pode ser associado a alteração da função hepática diante da infecção, no qual os hepatócitos mudam sua via metabólica aumentando a síntese de proteínas de fase aguda e reduzindo a síntese de albumina (Nessler et al., 2012). A albumina  $<3,11\text{g/dL}$  e globulinas  $>3,31\text{g/dL}$  foram consideradas como marcadores para

diagnóstico de sepse no critério proposto, apresentando sensibilidade de 83% e especificidade de 53%.

Ao avaliar a disfunção hepática, o presente estudo demonstrou que a bilirrubina não foi diferente entre os animais com e sem sepse, enquanto a ALT  $<24,5\text{U/L}$  e a FA  $>45\text{U/L}$  foram preditores de sepse nas cadelas. O escore SOFA utiliza a bilirrubina total como marcador de disfunção hepática, no entanto sabe-se que o SOFA apresenta aplicabilidade controversa na sepse, visto que a bilirrubina total sérica tem baixa sensibilidade e grande variabilidade na doença hepática, não sendo considerada um marcador fidedigno da função hepática (Gornal e Bardawill, 1951; Schlesinger e Rubin, 1993).

Estudo utilizando ratos com sepse induzida por ligadura e punção cecal e grupo controle realizou a biopsia hepática encontrando lesões necróticas, inflamatórias e de colestase no exame histopatológico dos animais doentes, corroborando com nossos achados e comparou a ALT, FA e bilirrubina total, sem encontrar diferença na ALT e bilirrubina entre os grupos, mas sim aumento da FA nos animais em sepse (Muftuoglu et al., 2006). A ALT é uma enzima presente no citosol dos hepatócitos e, geralmente, lesões hepáticas com morte de hepatócitos levam ao extravasamento desta enzima, sendo encontrado aumento por volta de 5 a 10 vezes o valor superior de referência da concentração de ALT no sangue (Giannini et al., 2005). Ainda assim, o presente estudo indica que a redução nos valores de ALT é sugestivo de sepse e lesão hepática nas cadelas com piometra.

Estudo em cadelas com piometra encontrou valores semelhantes aos nossos de ALT nas cadelas com piometra e foi menor que o grupo controle, além de estar correlacionado com valores maiores de leucócitos e a presença de crescimento bacteriano na cultura do conteúdo uterino, sendo sugerido que esses achados estejam associados a ação de endotoxinas no fígado (De Schepper et al., 1987). Além disso, outro estudo também avaliou cadelas com piometra em sepse identificada pelo critério SIRS, observando que o valor médio da ALT foi de  $25\text{U/L}$  nos pacientes mais graves, o que corrobora com nossos resultados (Sant'anna et al., 2014). Devido a essa particularidade observada nos casos de piometra, optou-se pela inclusão da FA como marcador de disfunção hepática na sepse, que apresentou 90% de sensibilidade e 80% de especificidade. Estudo em humanos demonstrou que os pacientes em sepse

apresentavam FA aumentada e mais de 70% destes pacientes apresentou bilirrubina normal (Nargis et al., 2014).

Com relação a avaliação renal, o SOFA utiliza o aumento da creatinina sérica para determinar lesão renal, já sendo provado que a produção de creatinina está reduzida durante a sepse (Doi et al., 2009), além de ser um marcador tardio que só se apresenta aumentado após perda de pelo menos 75% dos néfrons funcionais (Cobrin et al., 2013). No presente estudo a creatinina não apresentou diferença entre os grupos e uma UPC  $>0,15$  foi usada como marcador da disfunção renal na sepse com 100% de sensibilidade e 87% de especificidade, baseados na sua correlação com a presença de lesão renal aguda oriunda da sepse no exame histopatológico renal de cadelas com piometra (Gasser et al., 2020).

A relação  $PaO_2/FiO_2$  é o padrão ouro para monitorar oxigenação e diagnosticar falência respiratória aguda (Carvalho et al., 2022), valores  $<300\text{mmHg}$  e  $<200\text{mmHg}$  indicam lesão pulmonar aguda e síndrome de angústia respiratória aguda, respectivamente (DeClue e Cohn, 2007). Os critérios atuais para diagnóstico de sepse indicam um valor de corte  $<400\text{mmHg}$  em humanos, no entanto o presente estudo associou valores  $<445,20\text{mmHg}$  com a presença de disfunção hepática e renal, sendo necessário estudos para determinação de disfunção pulmonar oriunda da sepse em animais e a aplicabilidade e valores de corte da  $PaO_2/FiO_2$  neste contexto.

Ao utilizar alteração em pelo menos 4 parâmetros, a acurácia deste critério para detectar sepse foi extremamente alta (sensibilidade: 92%, especificidade 87%), com valor preditivo positivo de 85% e valor preditivo negativo de 93%. Sua capacidade diagnóstica foi superior ao SOFA (sensibilidade: 25%, especificidade: 100%, VPP: 100% e VPN: 63%) e ao SIRS, mesmo considerando o SIRS com infecção confirmada (sensibilidade 75%, especificidade: 93%, VPP: 90% e VPN: 82%).

Como citado anteriormente, a capacidade diagnóstica do escore SOFA em cães não é fidedigna, pois, além da baixa sensibilidade dos parâmetros de disfunção hepática e renal, a escala de coma Glasgow também apresenta baixa sensibilidade em animais com pontuação mediana na escala, sendo a pontuação mais comumente encontrada nos pacientes em sepse (Bastos et al., 1993). De fato, a característica tardia do SOFA em diagnosticar sepse foi observada neste estudo, no qual 25% dos animais realmente doentes apresentariam alterações na escala e 75%

verdadeiramente em sepse não pontuariam alterações na escala. E de acordo com a especificidade e VPP, todos os animais que forem negativos na escala, realmente não estariam em sepse, ou seja, o SOFA não é um critério sensível para diagnosticar sepse, mas os animais que derem positivo neste critério, realmente estarão em sepse.

O estudo que utilizou critério SIRS em cães diagnosticou sepse a partir da confirmação histológica, microbiológica e/ou macroscópica (exsudato purulento) de infecção e doença sistêmica, encontrando sensibilidade de 97% e especificidade de 64% para diagnosticar sepse (Hauptman et al., 1997). Considerando a disfunção hepática e renal como diagnóstico de sepse, a capacidade do critério SIRS para determinar sepse nos animais verdadeiramente em sepse foi mais baixa que o descrito anteriormente, mas seu desempenho para identificar os animais verdadeiramente negativos foi melhor. Entretanto, o critério proposto no presente estudo apresentou melhor sensibilidade e especificidade, sendo capaz de diagnosticar os animais em sepse com menor porcentagem de falsos-positivos e falsos-negativos.

## **Conclusão**

A partir da análise multivariada dos parâmetros clínicos e laboratoriais estudados, propõe-se um critério de disfunção orgânica e resposta inflamatória (DORI) para diagnóstico precoce de sepse em cães a partir de 6 variáveis de avaliação das funções fisiológicas, hematológicas, das proteínas séricas e das funções hepática, renal e respiratória, respectivamente: temperatura retal abaixo de 39,05°C, leucócitos acima de  $10,40 \times 10^3/\text{UL}$ , neutrófilos acima de  $5,93 \times 10^3/\text{UL}$ , albumina abaixo de 3,11g/dL, globulinas acima de 3,31g/dL, FA acima de 45U/L, UPC acima de 0,15 e  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  abaixo de 445,20mmHg; e determinou-se que a presença de no mínimo quatro destas alterações identificava sepse com uma acurácia diagnóstica superior aos critérios SIRS e SOFA utilizados atualmente para este fim.

## **Referências**

Aires LPN, Gasser B, Silva P, Del Aguila Da Silva P, Silveira MV, Carneiro RK, Iwaoyamada D, Padilha-Nakaghi LC, Uscategui RAR, Spada S, Russo M, Feliciano MAR (2021). High-definition ultrasonography in the evaluation of the reproductive tract of bitches during the follicular phase of the estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, 234:1-14.

- Bastos PG, Sun X, Wagner DP, Wu AW, Knaus WA (1993). Glasgow Coma Scale score in the evaluation of outcome in the intensive care unit: Findings from the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation III study. **Critical Care Medicine**, 21:1459–1465.
- Carvalho EBD, Leite TRS, Sacramento RFM, Nascimento PRL, Samary CS, Rocco, PRM, Silva PL (2022). Rationale and limitations of the SpO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> as a possible substitute for PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> in different preclinical and clinical scenarios. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, 34:185–196.
- Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C (2013). Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice**, 54:647–655.
- De Schepper J, Van Der Stock J, Capiou E (1987). The characteristic pattern of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase in the bitch with the cystic hyperplasia-pyometra complex: Effect of medical or surgical treatment. **Veterinary Research Communications**, 11:65–75.
- DeClue AE, Cohn LA (2007). Acute respiratory distress syndrome in dogs and cats: A review of clinical findings and pathophysiology: State-of-the-Art Review. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 17:340–347.
- Doi K, Yuen PST, Eisner C, Hu X, Leelahavanichkul A, Star RA (2009). Reduced Production of Creatinine Limits Its Use as Marker of Kidney Injury in Sepsis. **Journal of the American Society of Nephrology**, 20:1217–1221.
- Evans L, Rhodes A et al (2021). Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. **Critical Care Medicine**, 4:e1063–e1143.
- Gasser B, Uscategui RAR, Maronezi MC, Pavan L, Simões APR, Martinato F, Silva P, Crivellenti LZ, Feliciano MAR (2020). Clinical and ultrasound variables for early diagnosis of septic acute kidney injury in bitches with pyometra. **Scientific Reports**, 10:1–12.
- Giannini EG, Testa R, Savarino V (2005). Liver enzyme alteration: A guide for clinicians. **CMAJ. Canadian Medical Association Journal**, 172:367–379.
- Gornall AG, Bardawill CJ (1951). The Study of Liver Function in Dogs. **Canadian Journal of Medical Science**, 1:255–262.
- Goucher TK, Hartzell AM, Seales TS, Anmuth AS, Zanghi BM, Otto CM (2019). Evaluation of skin turgor and capillary refill time as predictors of dehydration in exercising dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 80:123–128.
- Goyette RE, Key NS, Ely EW (2004). Hematologic changes in sepsis and their therapeutic implications. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, 25:645–659.
- Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB (1997). Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Diagnostic Criteria for Sepsis in Dogs. **Veterinary Surgery**, 26:393–397.

- Lefkowitz JH (2020). The Liver in Systemic Disease and Pregnancy. In: Lefkowitz JH (Ed). **Scheuer's Liver Biopsy Interpretation**. Tenth edition. Amsterdã:Elsevier, p. 341-379.
- Mucha CJ (2007). Determinación de la presión arterial. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, 8:1–4.
- Muftuoglu MAT, Aktekin A, Ozdemir NC, Saglam A (2006). Liver injury in sepsis and abdominal compartment syndrome in rats. **Surgery Today**, 36:519–524.
- Nargis W, Ahamed B, Hossain M, Biswas S, Ibrahim M (2014). Pattern of Elevated Serum Alkaline Phosphatase (ALP) Levels in Hospitalized Patients: A Single Centre Study. **Pulse**, 6:20–26.
- Nessler N, Launey Y, Aninat C, Morel F, Mallédant Y, Seguin P (2012). Clinical review: The liver in sepsis. **Critical care**, 16:1–8.
- Nyström PO (1998). The systemic inflammatory response syndrome: Definitions and aetiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 41:1–7.
- Osgood A, Hollenbeck D, Yankin I (2022). Evaluation of quick sequential organ failure scores in dogs with severe sepsis and septic shock. **Journal of Small Animal Practice**, 1–8.
- Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ (2001). The Prognostic Value of the Modified Glasgow Coma Scale in Head Trauma in Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 15:581–584.
- Pretzer SD (2008). Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**, 70:359–363.
- Refinetti R, Piccione G (2003). Daily rhythmicity of body temperature in the dog. **Journal of Veterinary Medical Science**, 65:935–937.
- Ripanti D, Dino G, Piovano G, Farca AM (2012). Application of the Sequential Organ Failure Assessment Score to predict outcome in critically ill dogs: Preliminary results. **Schweizer Archiv Fur Tierheilkunde**, 152:325–330.
- Rockey DC, Caldwell SH, Goodman ZD, Nelson RC, Smith AD (2009). Liver Biopsy. **Hepatology**, 49:1017–1044.
- Rothuizen J, Twedt DC (2009). Liver Biopsy Techniques. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, 39:469–480.
- Sant'anna MC, Giordano LGP, Flaiban KKMC, Muller EE, Martins MIM (2014). Prognostic markers of canine pyometra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, 66:1711–1717.
- Sant'anna MC, Martins GF, Flaiban KKMC, Trautwein LGC, Martins MIM (2019). Protein-to-creatinine urinary in the early diagnosis of renal injury in canine pyometra. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, 39:186–191.
- Schlesinger DP, Rubin SI (1993). Serum bile acids and the assessment of hepatic function in dogs and cats. **The Canadian Veterinary Journal**, 34:215–20.

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T (2004). Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, 18:385–405.

Singer M, Deutschman CS et al. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of American Medical Association**, 315:801–810.

Stastny T, Koenigshof AM, Brado GE, Chan EK, Levy NA (2022). Retrospective evaluation of the prognostic utility of quick sequential organ failure assessment scores in dogs with surgically treated sepsis (2011-2018): 204 cases. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 32:68–74.

Zapryanova D, Mircheva T, Denev SA (2013). Plasma protein profiles and fibrinogen concentrations in dogs with experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. **Revue de Medecine Veterinaire**, 164:150–155.

## **CAPÍTULO 4 – Considerações finais**

Esta tese de doutorado aborda um tema atual de relevância mundial e frequente na rotina veterinária, sendo a sepse uma afecção subdiagnosticada no atendimento de pequenos animais e que traz prejuízos à saúde do paciente, a longo prazo. A piometra é uma afecção frequente na espécie canina e sua utilização como modelo experimental possibilita o direcionamento mais assertivo no atendimento desta afecção. Ainda se faz necessário a investigação das técnicas e exames propostos às outras espécies domésticas, bem como abranger outras enfermidades como modelo experimental de sepse, a fim de consolidar seu potencial diagnóstico, no entanto, os resultados obtidos em associação com achados histológicos de lesão orgânica que se relaciona com a literatura, reforça sua aplicabilidade para o diagnóstico da sepse.

A ultrassonografia já é uma técnica de diagnóstico bastante empregada, sendo que o Doppler está presente na maioria dos aparelhos e os resultados obtidos indicam sua utilização para investigação mais acurada de alterações hemodinâmicas em pacientes com infecção. A técnica contrastada por microbolhas ainda se encontra em fase experimental e os resultados que vêm sendo obtidos demonstram sua aplicabilidade para detecção de alterações sutis na perfusão orgânica na sepse que não seriam obtidas por outros métodos de forma pouco invasiva.

Esta tese demonstrou que a aplicação sinérgica do atendimento clínico, diagnóstico por imagem e exames laboratoriais expande a capacidade diagnóstica das lesões orgânicas a partir da detecção precoce de alterações na perfusão e da resposta inflamatória sistêmica, de forma a agilizar o tratamento do paciente séptico, melhorando o prognóstico e reduzindo a taxa de mortalidade.