

PĂUN LIVIA-CĂTĂLINA

LUCRĂRI PRACTICE DE FIZIOLOGIE



EDITURA
EVOMIND

LUCRĂRI PRACTICE DE FIZIOLOGIE

Copyright © 2021
Autor: PĂUN LIVIA CĂTĂLINA

Toate drepturile rezervate.

ISBN 978-606-9734-14-8

Editura Evomind, 2021

<https://evomind.org/>

CUPRINS

Instrucțiuni și reguli de desfășurare a activității în laborator	1
Contenția animalelor de laborator	2
Microscopul optic	3
Fenomene biofizice	6
Disociația electrolitică	6
Difuziunea	7
Osmoza	9
Tensiunea superficială	12
Adsorbția	13
Enzime	15
Demonstrarea capacității catalitice pronunțate a enzimelor	16
Demonstrarea specificității de substrat a enzimelor	16
Efectul temperaturii	18
Influența pH-ului	19
Concentrația substratului și concentrația enzimei	20
Prođuși de reacție, lumină și ioni	21
Inhibitori enzimatici	23
Sistemul nervos	25
Actul și arcul reflex	25
Testarea reflexelor spinale la animalele de companie	28
Laboratorul virtual de neurofiziologie	30
Hematologie	33
Recoltarea probelor de sânge	34
Hemoleucograma	38
Determinarea numărului de hematii	38
Determinarea cantității de hemoglobină	43
Determinarea hematocritului	46
Calcularea parametrilor eritrocitari derivați	48
Determinarea numărului de reticulocite și a lărgimii de distribuție eritocitară	50
Determinarea numărului de leucocite	53
Realizarea frotiului din sânge periferic	56
Formula leucocitară	60
Estimarea numărului de plachete sangvine	67
Determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor	69
Testul de fragilitate osmotică a hematiilor	70
Hemostaza	73
Timpul de sângerare	73

Timpul de coagulare	74
Grupele de sânge	76
Măduva osoasă hematogenă	80
Sistemul digestiv	84
Studiul salivei	84
Sucul gastric	86
Secreția biliară	89
Sucul pancreatic	94
Sistemul cardio-circulator	97
Demonstrarea prezenței țesutului excitoconducător – Ligaturile lui Stannius	98
Înregistrarea activității electrice a cordului	100
Sistemul excretor	103
Rata de filtrare glomerulară	103
Parametrii serici asociați sistemului urinar	104
Recoltarea probelor de urină	105
Determinarea proprietăților organoleptice ale urinei	109
Determinarea proprietăților fizico-chimice ale urinei	110
Determinarea compoziției chimice a urinei	112
Sedimentul urinar	114
Metabolismul	121

INSTRUCȚIUNI PENTRU STUDENȚI

1. Verificați programul lucrărilor practice și citiți materialul scris din caietul de lucrări practice înainte de LP-ul de fiziologie. În acest mod, veți avea informațiile necesare pentru derularea unui dialog și veți fi capabili să va organizați cu ușurință experimentele.
2. Fiți atenți la explicațiile cadrului didactic în legătură cu modul de desfășurare al experimentului.
3. Este obligatorie consultarea manualului de lucrări practice. Acesta trebuie adus la fiecare laborator: formă printată sau o copie electronică.
4. Înainte de utilizarea aparaturii de laborator, verificați dacă aceasta este în stare bună de funcționare. În cazul în care observați o defecțiune, anunțați imediat cadrul didactic supraveghetor.
5. Majoritatea experimentelor vor fi realizate de către grupe mici de studenți, însă fiecare student trebuie să fie capabil să realizeze experimentul individual. Totodată, fiecare student din grup trebuie să aibă o contribuție egală în realizarea experimentului și să fie capabil de a interpreta rezultatele obținute.

REGULI DE DISCIPLINĂ ÎN LABORATOR

1. Este obligatorie purtarea unui halat de protecție.
2. Spațiul de lucru trebuie menținut curat pe parcursul și la finalul desfășurării experimentului.
3. Studenții sunt responsabili de spălarea instrumentarului de lucru (pipete, eprubete, instrumente pentru disecție etc.)
4. Substanțele chimice vor fi manipulate cu grijă, conform instrucțiunilor primite la disciplinele conexe de Chimie. Este interzisă folosirea pipetelor pentru aspirarea oricărei substanțe chimice.
5. Este necesară purtarea unui echipament de protecție adecvat (mănuși, mască) atunci

când se utilizează produse biologice pentru realizarea experimentelor.

6. În cazul manipulării broaștelor se vor folosi doar mănuși confecționate din nitril.
7. Studenții sunt responsabili de procurarea propriului echipament de protecție.
8. Studenții vor fi anunțați din timp în situația în care este necesar un instrumentar individual (ex. instrumentar pentru disecție).
9. În cazul recoltării probelor de sânge, se vor utiliza doar ace și lancete sterile.
10. În cazul utilizării animalelor vii pentru realizarea experimentelor, se va încerca limitarea factorilor stresori și se vor respecta cu rigoare regulile de contenție pentru prevenirea accidentelor (atât pentru siguranța animalului, cât și pentru cea a examinatorului).
11. Înainte de utilizarea microscopului din laboratorul de fiziologie, este necesară consultarea ghidului de utilizare.
12. În cadrul laboratorului de fiziologie sunt încurajate discuțiile libere și schimbul de idei. În cazul nelămuririlor, studenții sunt încurajați să se adreseze în mod direct cadrului didactic pentru explicații suplimentare.
13. Studenții sunt responsabili pentru instrumentele pe care le utilizează. În cazul distrugerii, acestea vor fi înlocuite de către student.
14. Este necesară menținerea unei igiene corespunzătoare pe parcursul lucrărilor practice – spălarea mâinilor și utilizarea substanțelor dezinfectante.
15. În cazul unor afecțiuni cu potențial infecțios (ex. gripă), studenții sunt îndrumați să nu participe la lucrările practice (și să procure documentele corespunzătoare pentru motivarea absenței – ex. scutire medicală, urmând ca la sfârșitul semestrului să participe la sesiunea de refacere a lucrărilor practice pentru validarea motivării absențelor). Dacă studentul alege să participe la lucrările practice, se recomandă folosirea

unei măști medicale de protecție pentru limitarea riscului de transmitere a afecțiunii.

16. Este interzisă utilizarea reactivilor din flacoane ce nu prezintă o etichetă pe care este înscrisă identificarea clară a conținutului.

17. Materialele didactice și aparatele de uz medical vor fi folosite numai în conformitate cu instrucțiunile primite de la cadrul didactic.

OBIECTIVE

Înainte de abordarea subiectului de studiu, este necesară consultarea segmentului de Obiective prezentat la începutul fiecărui subcapitol. În acest segment vor fi prezentate punctele de interes necesare a fi parcurse pentru o bună înțelegere a materialului didactic.

EVALUARE

Evaluarea studenților va fi realizată pe parcursul semestrului, prin aprecierea gradului de implicare în activitatea de laborator (atât activitate practică de realizare a experimentelor, cât și activitate în dialogul de prezentare a secțiunii teoretice).

O altă parte a evaluării studenților va fi legată de realizarea fișelor de lucru (în care vor fi înscrise rezultatele obținute la experimentele realizate și modul de participare al fiecărui student din grupa de lucru).

Evaluarea finală va fi sub formă de test scris și va verifica cunoștințele acumulate pe tot parcursul semestrului. Pentru evaluarea finală, toate informațiile teoretice necesare vor fi cuprinse în manualul de lucrări practice.

CONȚENȚIA ANIMALELOR DE EXPERIENȚĂ

Broasca – nu prezintă un pericol activ pentru examinator (prin mușcare sau zgâriere). Este necesară o singură mână pentru realizarea conținutului. Corpul broaștei se fixează în palma mâinii și poziția se adaptează în funcție de

manopera ce urmează a fi realizată. De reținut, broasca nu reprezintă un vector activ pentru transmiterea unor boli, dar în cazuri rare pot apărea iritații ale pielii. Pentru prevenirea acestora se recomandă utilizarea unor mănuși confecționate din nitril.

Câinele – prezintă un risc crescut pentru examinator, prin mușcare sau zgâriere și necesită o abordare prudentă.

Este recomandată aplicarea unei botnițe, sau prinderea botului cu ajutorul unei feșe de tifon (cu nod dublu, unul în partea superioară a botului, și unul realizat la nivelul cefei, înapoia urechilor).

Pentru câinii de talie mică, imobilizarea se poate realiza și prin prinderea pielii de la nivelul cefei.

După eliminarea riscului de accidentare, animalul poate fi așezat și menținut în poziția necesară realizării procedurii urmărite (decubit ventral, dorsal, lateral).

Pisică – prezintă un risc foarte crescut pentru examinator, prin mușcare sau zgâriere și necesită o manipulare prudentă.

Este recomandată imobilizarea prin prinderea pielii de la nivelul cefei pentru limitarea mișcărilor capului, urmată de prinderea membrilor (poate fi necesară participarea unui al doilea examinator în cazul pisicilor foarte agresive).

O altă posibilitate este înfășurarea animalului într-un material textil rezistent (ex. prosop).

Iepure – prezintă un risc minor pentru examinator, prin zgâriere (atenție la membrele posterioare).

Iepurele se prinde de pielea de la nivelul cefei, apoi cu a doua mână se imobilizează membrele posterioare. Animalul poate fi ținut în brațele studentului care realizează

contenția, sau poate fi menținut într-o poziție fixă pe masa de examinare.

Șoarecele - prezintă un risc crescut pentru examinator prin mușcare.

Șoarecele se contenționează prin prinderea cozii la nivelul vârfului acesteia, apoi cu a doua mână prinderea pielii de la nivelul cefei. Coada poate fi transferată și prinsă în aceeași mână cu care s-a realizat prinderea pielii.

Șobolanul - prezintă un risc crescut pentru examinator, prin mușcare.

Șobolanul se prinde cu mâna sau cu ajutorul unei pense la nivelul pielii din zona cefei, apoi cu mâna opusă se va prinde coada animalului.

Găina – prezintă un risc minor pentru examinator, prin zgâriere.

Găina este prinsă și susținută în zona pieptului, apoi cu aceeași mână se prind picioarele. Cu mâna opusă se vor fixa aripile.

Microscopul optic

Cunoașterea modului de utilizare a microscopului optic este obligatorie pentru participarea activă în cadrul lucrărilor practice de Fiziologie. Veți utiliza microscopul în cadrul capitolului Hematologie, Sistem cardio-circulator, Sistem excretor și Sistem reproducător. Microscopul mai este utilizat în mod frecvent în cadrul disciplinelor de Histologie, Fiziopatologie, Anatomie Patologică, Microbiologie, Parazitologie etc. Astfel, utilizarea corespunzătoare a acestui instrument medical de bază este indispensabilă pentru un viitor practician, indiferent de domeniul de activitate al viitoarei cariere medicale.

Acest subcapitol are ca scop o scurtă rememorare a componentelor unui microscop și listarea modului de utilizare și de realizare a reglajelor pentru confortul utilizatorului.

Microscopul are ca scop mărirea unei imagini pentru a observa detalii ce nu pot fi surprinse cu ochiul liber. Pentru a realiza acest lucru, microscopul folosește două lentile: prima este reprezentată de oculare, iar a doua este reprezentată de obiective. Componentele principale ale microscopului sunt prezentate în figura 1.

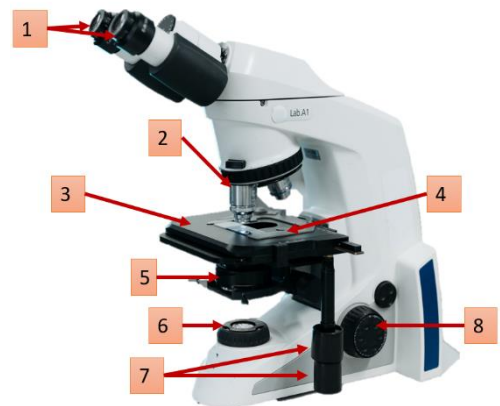


Fig. 1 Principalele componente ale microscopului optic. ¹ 1 – oculare, 2 – revolver cu obiective, 3 – măsuța microscopului, 4 – călăreți reglabili pentru fixarea lamei, 5 – condensator cu diafragmă, 6 – sursă de lumină, 7 – dispozitiv de deplasare a lamei (stânga – dreapta și sus – jos), 8 – macroviză.

Puterea de mărire a microscopului este legată în mod direct de obiectivul utilizat pentru examinarea preparatului. Obiectivele uzuale sunt prezentate în figura 2.

Puterea de mărire a microscopului se poate calcula prin înmulțirea puterii de mărire a ocularului (10x) cu puterea de mărire a obiectivului (4x, 10x, 20x, 40x, 60x, 90x, 100x). Dacă se folosește un obiectiv 100x, atunci puterea de mărire a microscopului va fi $10 \times 100 = 1000$, adică preparatul de pe lamă este mărit de 1000 de ori.

În mod obișnuit, obiectivele 4x și 10x sunt utilizate pentru orientare, localizarea zonelor

de interes în preparat, sau depistarea unor modificări cu întindere mare, paraziți de dimensiuni mari etc. Obiectivele medii 20x și 40x sunt utilizate pentru diagnosticul histologic și pentru unele teste de hematologie. Obiectivele cu putere mare de mărire 60x, 90x, 100x sunt utilizate pentru diagnostic citologic și hematologie, deoarece permit observarea detaliilor.



Fig. 02 Obiective fixate pe revolver, 4x, 10x, 40x și 100x.²

Puterea de mărire a diferitelor tipuri de obiective poate fi observată în figurile 3 – 6.

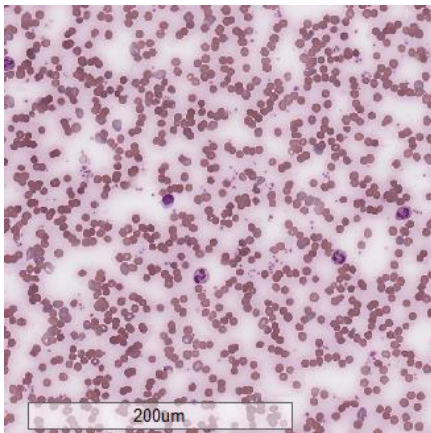


Fig. 03 Sânge 10x

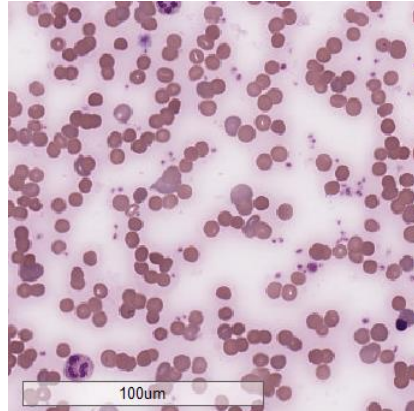


Fig. 04 – Sânge 20x

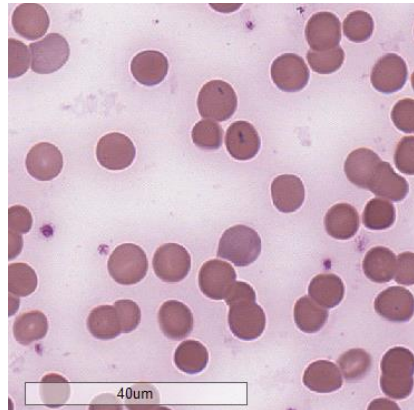


Fig. 05 – Sânge 50x

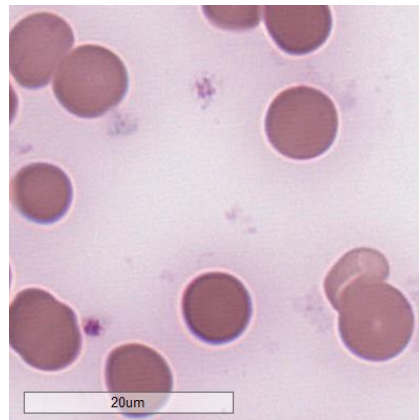


Fig. 06 – Sânge 100x

Modul de lucru

Înainte de utilizare, se recomandă ștergerea ocularelor, a obiectivelor și a sursei de lumină.

Examinarea preparatului va începe întotdeauna cu un obiectiv mic. Prin rotirea revolverului, se va selecta un obiectiv cu putere mică de mărire (4x, 10x).

Lama se așază pe masa microscopului cu lamela/ preparatul în sus, înspre lentila obiectivului (în caz contrar, imaginea poate fi obținută cu un obiectiv mic, dar nu și cu obiectivele mari). Lama este prinsă între călăreții suportului port-lamă, iar cu ajutorul dispozitivului de deplasare a lamei, se aduce în câmpul optic (zona luminată) porțiunea din lamă ce conține preparatul.

Se focalizează imaginea cu ajutorul macroviziei și ulterior al microviziei. Pentru schimbarea obiectivului (ex. 40), se rotește revolverul pentru selectarea obiectivului, apoi focalizarea poate fi făcută DOAR din microviză pentru a evita spargerea lamei și deteriorarea lentilelor.

Poziția corectă pentru utilizarea microscopului este exemplificată în figura 7.



Fig. 07 Poziționarea corectă a examinatorului în momentul utilizării microscopului.³

Pentru utilizarea obiectivelor 90x sau 100x, este necesară utilizarea uleiului de imersie. Înainte de glisarea obiectivului, se adaugă o picătură de ulei pe porțiunea destinată examinării (aflată în zona luminată). Lama va rămâne întotdeauna pe poziție iar focalizarea se va face cu ajutorul microviziei.

Odată cu prinderea imaginii pot fi făcute și reglaje pentru confortul examinării:

- Distanța dintre oculare trebuie să fie adaptată pentru fiecare utilizator în parte. Acestea vor fi apropiate sau depărtate până la obținerea unei imagini unice.

- Examinarea se face prin ambele oculare simultan și fără ochelari de vedere.

- Unul dintre oculare are un dispozitiv propriu de microvizare pentru adaptarea lentilei (în cazul în care utilizatorul are dioptrii diferite pentru corectarea vederii).

- În cazul examinării preparatului cu obiective mici, lumina trebuie ajustată la o intensitate mai redusă. Lumina va fi ajustată din nou în cazul utilizării unor obiective cu putere mare de mărire. Ajustarea intensității luminii poate fi realizată din diafragmă (închidere și deschidere), sau de la nivelul dispozitivului dedicat (există diferențe între modelele de microscop utilizate).

Înainte de începerea aplicației practice se recomandă studierea microscopului și familiarizarea cu componentele acestuia și modul de funcționare.

Imagini realizate de:

- 1.Pavel Danilyuk ,Pexels (imagine modificată)
- 2.Roberto Carrafa , Pexels (imagine modificată)
- 3.Pavel Danilyuk , Pexels

Biofizica reprezintă știința ce aplică teoriile și metodele fizicii pentru studierea și înțelegerea sistemelor biologice.

Această ramură științifică studiază organismul începând cu procese simple precum difuziunea, până la cercetări complexe ale sistemelor de țesuturi și organe, cu implicarea unor discipline precum matematică, fizică, chimie, inginerie și farmacologie, cu scopul final de a înțelege modul de funcționare a materiei vii.

Acest capitol abordează câteva fenomene biofizice simple, ce pot fi explorate și demonstrate în contextul unui laborator didactic.

Disociația electrolică

Obiective:

1. Definirea termenilor
2. Cunoașterea materialelor necesare și a modului de lucru
3. Explicarea fenomenului observat în experiment
4. Enumerarea proceselor biologice ale organismului ce implică fenomenul de disociație electrolică

Disociația reprezintă fenomenul de descompunere a unui compus chimic în elemente mai simple. Disociația electrolică sau ionică (ionizare) reprezintă descompunerea unei substanțe în ioni, cu ajutorul unui solvent sau a unei surse de energie. Ionii reprezintă particule încărcate electric, iar disociația ionică explică fenomenul de conductivitate electrică.

Electrolizii pot fi definiți ca substanțe care scindează în ioni la dizolvarea în apă. Electrolizii sunt formați din două tipuri de ioni: pozitivi (cationi) și negativi (anioni). Electroliza reprezintă o metodă de separare a unor molecule sau compuși cu ajutorul curentului electric.

Materiale necesare: vas transparent din sticlă sau material plastic, soluție NaCl 10%, fenolftaleină 1%, sursă de curent electric (baterie), fire conductoare.

Mod de lucru și interpretare

Se adaugă o cantitate suficientă de soluție de clorură de sodiu în recipientul transparent. Se poate folosi în acest sens o sticlă de ceas sau o placă Petri.

Se introduc electrozii în soluție și se observă formarea bulelor de gaz în jurul acestora ce semnifică disocierea apei și a clorurii de sodiu. Electrocul negativ este numit catod iar electrocul pozitiv este numit anod. Fiecare electrocul va atrage ionii cu sarcini opuse, astfel ionii cu sarcină pozitivă (cationi) vor migra spre catod, iar ionii cu sarcină negativă (anioni) vor migra spre anod (Figura 1).

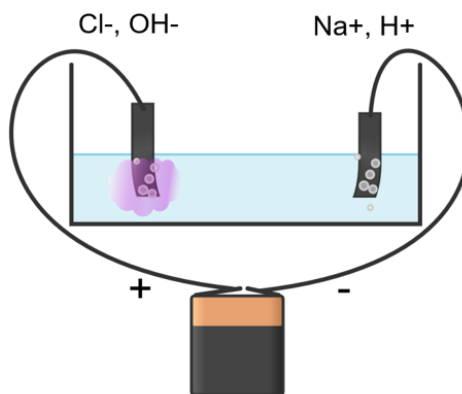
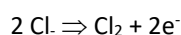
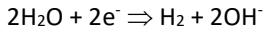


Fig. 01. Schema experimentului pentru observarea disociației electrolice.

La nivelul anodului va avea loc procesul de oxidare (pierderea de electroni), iar datorită faptului că apa este mai greu de oxidat decât clorul, bulele de gaz de la nivelul electrocului pozitiv vor fi reprezentate de clor gazos.



La nivelul catodului va avea loc procesul de reducere (pierderea de electroni), iar datorită faptului că apa este mai ușor de redus decât ionii de sodiu, bulele de gaz de la nivelul electrodului negativ vor fi reprezentate de hidrogen.



Pentru a verifica aceste procese, se pot adăuga 2 – 3 picături de fenolftaleină în vas, observându-se virarea zonei din dreptul anodului în roz – mov, indicând un pH alcalin dat de prezența ionilor OH^- .

La nivelul organismului, disociația ionilor este vitală, aceste molecule fiind responsabile de stabilirea presiunii osmotice, formarea și transmiterea potențialului electric, activarea enzimelor, contracția mușchilor etc.

Difuziunea

Obiective:

1. Definierea fenomenului de difuziune
2. Cunoșterea modului de lucru și a materialelor necesare realizării experimentului
3. Cunoșterea factorilor ce influențează viteza de difuziune
4. Exemplificarea unor procese biologice bazate pe fenomenul de difuziune

Difuziunea reprezintă procesul prin care o substanță trece dintr-o zonă cu concentrație mare într-o zonă cu concentrație mică, până când cele două concentrații se egalizează.

De exemplu, dacă într-o încăpere este deschisă o sticlă cu clor, mirosul specific va fi perceput inițial doar în vecinătatea sticlei, după un timp însă putând fi perceput același miros chiar și în cel mai îndepărtat punct față de recipient (cu o intensitate mai redusă). Dacă se închide sticla, intensitatea

mirosului va fi percepută la un moment dat la fel în orice punct al încăperii.

La nivel celular, citoplasma are o consistență vâscoasă, ceea ce încetinește difuziunea particulelor în comparație cu difuziunea în apă. Observarea mișcării de difuziune poate fi realizată pe medii vâscoase precum gelatina sau agarul, în care se introduc substanțe colorate.

Materiale necesare

Pentru realizarea acestui experimenta va fi nevoie de placă Petri cu agar sau gelatină, pipete Pasteur, soluție de permanganat de potasiu, soluție de albastru de metilen, termostat, gheață, riglă și cronometru.

Mod de lucru

Într-o placă Petri cu gelatină sau agar se face o adâncitură în centru (cu vârful unei pipete). În spațiul creat, se depune o picătură de soluție de albastru de metilen și se pornește cronometrul (Figura 2).

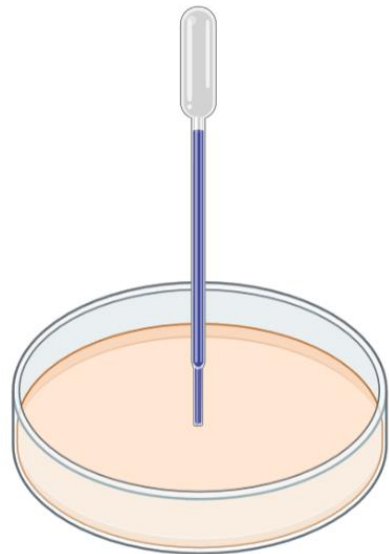


Fig. 02. Depunerea unei picături de albastru de metilen în centrul plăcii Petri.

Se măsoară cu ajutorul riglei diametrul punctului de culoare și se notează. Placa se menține pe tot parcursul experimentului la temperatura laboratorului. După 5, 10, 15, 30 și 60 de minute, se măsoară diametrul petei de culoare (Figura 3) iar valoarea obținută se împarte la 2 pentru obținerea distanței parcurse de albastru de metilen în mediul vâcos.

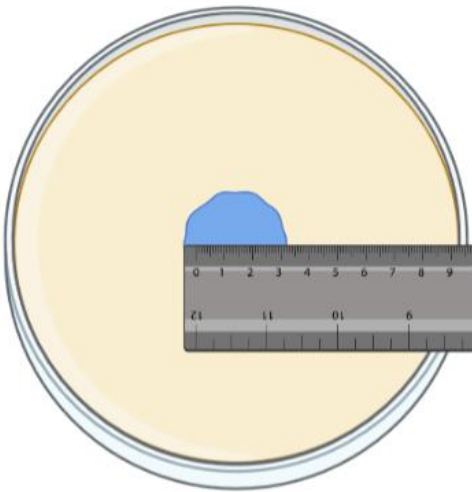


Fig. 03. Măsurarea diametrului petei de culoare, corespunzătoare distanței parcurse de albastru de metilen în gelatină sau agar.

A. Influența temperaturii

Asemănător cu primul experiment, se adaugă câte o picătură de albastru de metilen în adâncitura realizată în două placi Petri cu agar sau gelatină. Se pune capacul cutiei Petri și se introduce la termostat la 37°C. Se calculează distanța parcursă de colorant la 5, 10, 15, 30 și 60 de minute. A doua placă Petri se va așeza pe un pat de gheață, unde se va menține pe toată durata experimentului. Se calculează distanța parcursă de substanța colorantă la 5, 10, 15, 30 și 60 de minute.

B. Influența dimensiunii moleculei difuzante

Pe altă placă Petri pot fi depuse concomitent o picătură de soluție de albastru de metilen și o picătură de soluție de permanganat de potasiu. Se vor măsura diametrele și se va calcula distanța și apoi viteza pentru cele două substanțe, la 5, 10, 15, 30 și 60 de minute (Figura 4).

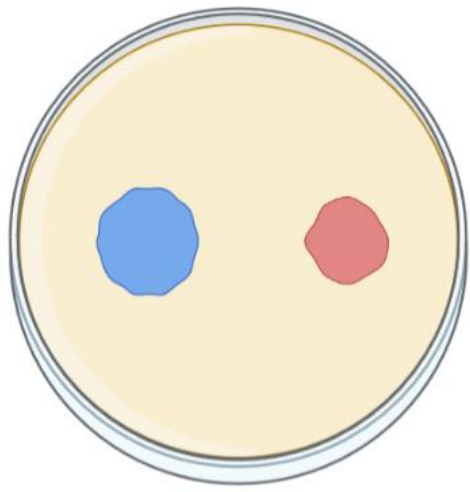


Fig. 04. Difuzarea albastrului de metilen (albastru) și a permanganatului de potasiu (roșu) în mediu vâcos (agar sau gelatină).

C. Influența vâscozității mediului de difuziune

Într-o placă Petri cu gelatină și sirop de zahăr, se va realiza o adâncitură centrală în care se depune o picătură de soluție de albastru de metilen. Se va măsura diametrul inițial al picăturii, apoi diametrul petei de culoare la 5, 10, 15, 30 și 60 de minute. Placa se menține pe tot parcursul experimentului la temperatura laboratorului.

D. Influența concentrației substanței difuzante

Pe o placă Petri cu gelatină sau agar se depune o picătură de albastru de metilen

Într-o adâncitură realizată central cu vârful unei pipete. Soluția de albastru de metilen va avea o concentrație mai mică decât cea utilizată la primul experiment. Se va calcula distanța parcursă de substanța colorată la 5, 10, 15, 30 și 60 de minute. Alternativ, se pot plasa pe aceeași placă câte o picătură de soluție de albastru de metilen cu concentrație mare și o picătură de soluție de albastru de metilen cu concentrație mică.

Interpretare

Viteza de difuziune este foarte mare în mediile gazoase și este mare între două medii lichide miscibile (datorită prezenței curenților de convecție). Această viteză scade direct proporțional cu densitatea mediului de difuziune.

Viteza de difuziune scade odată cu distanța parcursă. Particulele difuzează rapid pe distanțe scurte, fiind necesar un timp mult mai lung pentru a parcurge distanțe mai mari. Timpul necesar difuzării unei distanțe calculat ca pătratul distanței. Dacă în 2 ore distanța parcursă de substanța colorată a fost de 1 cm, atunci pentru a difuza pe o distanță de 2 cm, timpul va fi de 2 ore $\times 2^2$ (cm), adică 8 ore.

Viteza de difuziune este direct proporțională cu temperatura mediului de difuziune, astfel, distanța difuzată va fi maximă în placa menținută la termostat și minimă în placa ținută pe pat de gheață.

Un factor de influență al vitezei de difuziune este reprezentat de dimensiunea moleculei difuzante. Moleculele mici precum permanganatul de potasiu vor difuza mai rapid decât moleculele mari precum albastrul de metilen.

Viteza de difuziune este invers proporțională cu densitatea mediului de difuziune, astfel că distanța de difuziune va fi mai mică în placa cu gelatină și sirop de zahăr.

În organism, procesul de difuziune participă la derularea unor procese biologice și chimice importante. Un exemplu ar fi transportul gazelor respiratorii. Oxigenul se găsește în concentrații mult mai mari în arteriole față de mediul intern celular. La nivelul capilarelor, prin procesul de difuziune pasivă, oxigenul trece prin membrana capilarului și pătrunde în celule.

În afară de schimburile gazoase, procesul de difuziune facilitează absorbția intestinală a nutrienților, propagarea potențialului de acțiune și pentru aproape toate evenimentele dezvoltării embrionare.

Osmoza

Obiective:

1. Definirea procesului de osmoză
2. Definirea presiunii osmotice
3. Stabilirea diferențelor între osmolaritate și tonicitate
4. Însușirea noțiunilor de soluții hipotone, izotone și hipertone și cunoașterea efectelor acestora asupra hematiilor
5. Stabilirea importanței procesului de osmoză în organism

Osmoza reprezintă un fenomen biofizic întâlnit în cadrul sistemelor biologice și descrie difuziunea unui solvent (apă) printr-o membrană semipermeabilă (membrana celulară), în sensul gradientului de concentrație.

La nivelul celulei, apa migrează din compartimentul cu concentrație mai mare în compartimentul cu concentrație mai mică, cu scopul de a egaliza concentrația moleculelor active osmotice în cele două compartimente separate de membrană.

Presiunea osmotică reprezintă presiunea hidrostatică necesară opririi trecerii apei printr-o membrană semipermeabilă ce

desparte compartimente ce conțin soluții cu compoziții diferite. În contextul organismului, membrana poate fi reprezentată de un strat de celule sau de către membrana celulară.

Osmolaritatea unei soluții este determinată de numărul total de particule active osmotice. Osmolaritatea este calculată ca fiind suma concentrațiilor molare a solviților, înmulțite cu coeficientul osmotic al acestora. Coeficientul osmotic reprezintă la rândul său gradul de disociație a solvitului în solvent.

Tonicitatea face referire la efectul unei soluții asupra volumului celular ca o consecință a permeabilității membranei pentru solvit. Tonicitatea este determinată de osmolaritate și de permeabilitatea membranei față de solvit.

Tonicitatea soluțiilor poate avea trei consecințe:

⇒ trecerea apei din interiorul celulei spre exterior (soluții hipertone),

⇒ trecerea apei din exteriorul celulei în interiorul acesteia (soluții hipotone)

⇒ și situația în care nu se produc mișcări ale volumului de apă prin membrană (soluții izotone).

Două soluții izoosmotice pot să nu fie și izotonice. Un astfel de exemplu fiind comparația dintre clorura de sodiu și uree, ambele soluții sunt izoosmotice, dar membrana celulară este permeabilă pentru uree (nu și pentru clorura de sodiu), astfel, ureea este o soluție hipotonă.

Materiale necesare realizării experimentului: probă de sânge (recoltat pe anticoagulant sau sânge proaspăt recoltat prin puncție capilară, lame de microscop, lamele, soluție de clorură de sodiu de concentrații diferite (0,9%, 0,4% și 10%) și microscop optic.

Mod de lucru și interpretare

Pe trei lame de microscop sunt depuse 2 – 3 picături din cele 3 soluții de concentrații diferite de clorură de sodiu peste care se adaugă o picătură mică de sânge. Soluția se acoperă apoi cu o lamelă și se examinează la microscop cu obiectiv mare (x40 sau x100).

În cazul soluției izotone de clorură de sodiu (0,9%), concentrația ionilor de clor și sodiu din exteriorul celulei este identică cu cea din interiorul celulei (figura 5). Prin urmare, nu este exercitată presiune osmotică iar apa trece în nicio direcție a membranei celulare.

Aspectul hematiilor observate la microscop va fi de celule întregi, cu aspectul tipic de discocite (formă de disc – aplatizate), cu o zonă centrală de concavitate bine evidențiată.

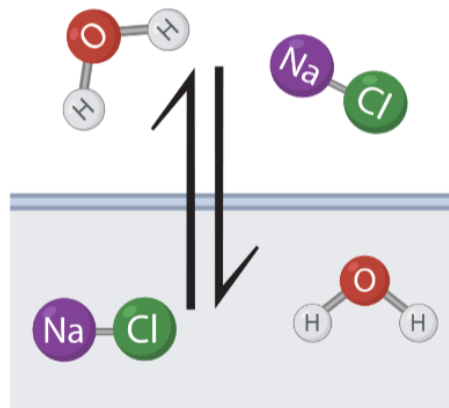


Fig. 05. Soluție izotonă de clorură de sodiu și spațiu intracelular, separate de membrana celulară. Se observă un echilibru al concentrațiilor particulelor osmotice și lipsa transferului de apă prin membrană.

Soluția hipertona de clorură de sodiu (10%) va determina trecerea apei din spațiul intracelular în spațiul extracelular, adică de la o concentrație mai mică (0,9%) la o concentrație mai mare, cu scopul egalizării celor două concentrații (figura 6).

Aspectul microscopic va fi de celule micșorate, cu modificarea formei celulare. Hematiile vor avea un aspect „deshidratat”, cu exces de membrană celulară dispus sub formă de cute sau proeminențe. Termenul folosit este de **ratatinare**. Nu se mai observă zona de concavitate centrală.

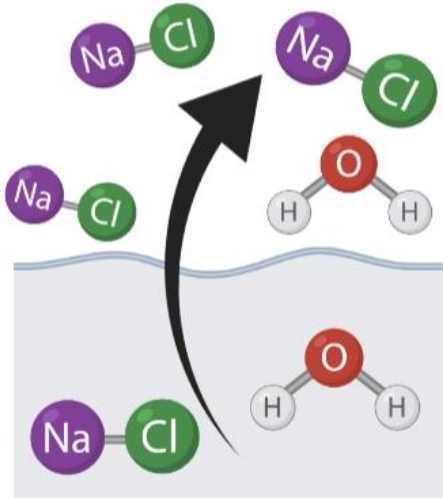


Fig. 06. Soluție hipertona, unde se observă o concentrație mai mare de molecule active osmotice în afara celulei. Datorită faptului că membrana celulară este impermeabilă pentru NaCl, apa va trece din interiorul celulei, în exterior, după cum este indicat sensul săgeții.

Soluția hipotona de clorură de sodiu (0,4%) va determina trecerea apei din exteriorul celulei în spațiul intracelular, adică de la concentrația mai mică, la concentrația mai mare (0,9%) (figura 7).

Forma hematiilor de disc biconcav, precum și proprietățile acestora de elasticitate și plasticitate permit modificarea semnificativă a volumului hematiilor și aportul unui volum semnificativ de apă. Însă, după atingerea unui punct de rezistență, membrana celulară se va rupe, producându-se liza osmotică.

Acest aspect poate fi observat microscopic prin prezența unor hematii cu dimensiuni crescute și fără zonă centrală de concavitate vizibilă. În cazul producerii lizei osmotice, hematiile vor fi dificil de vizualizat, observându-se prezența celulelor fantomă (hematii lizate - membrană celulară fără conținut).

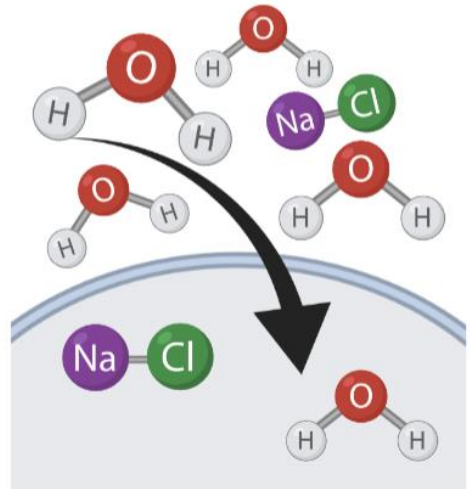


Fig. 07. Soluție hipertona în spațiul extracelular, ce va determina trecerea apei în sensul concentrației mai mari (0,9%), în spațiul intracelular.



Procesul de osmoză are rol în reglarea trecerii apei prin membrana celulară, influențează funcționarea sistemului digestiv, excretor, nervos etc. Osmoza are astfel rol în menținerea homeostaziei (tendința sistemelor de a atinge un echilibru dinamic stabil). Cunoașterea efectelor soluțiilor active osmotice are implicații clinice, un exemplu fiind utilizarea soluțiilor pentru rehidratare, ce trebuie să fie izotonice, izosmotice pentru a nu modifica volumul intracelular de apă.

Tensiunea superficială

Obiective:

1. Definirea tensiunii superficiale
2. Cunoașterea termenilor de substanță tensioactivă și surfactant
3. Studiarea comparativă a tensiunii superficiale pentru diferite substanțe
4. Interpretarea rezultatelor obținute prin studiarea modificării tensiunii superficiale a urinei
5. Stabilirea importanței tensiunii superficiale în organism

Moleculele unui fluid sunt atrase de moleculele vecine, pe care le atrag la rândul lor cu forțe egale. În masa fluidului, aceste forțe de atracție dintre molecule din toate direcțiile se vor anula reciproc. La suprafața fluidului, de exemplu în contact cu aerul, forța de atracție va fi mai mare în direcția fluidului decât spre aer, ceea ce va face ca moleculele de suprafață să fie trase spre interior (figura 8)

Această tensiune superficială reprezintă o forță cu aspect elastic ce face ca moleculele fluidului să fie mai atrase între ele decât de suprafețele din jur. Datorită acestei proprietăți se poate observa formarea picăturilor de apă pe un geam (coeziune), formarea picăturilor de rouă etc.

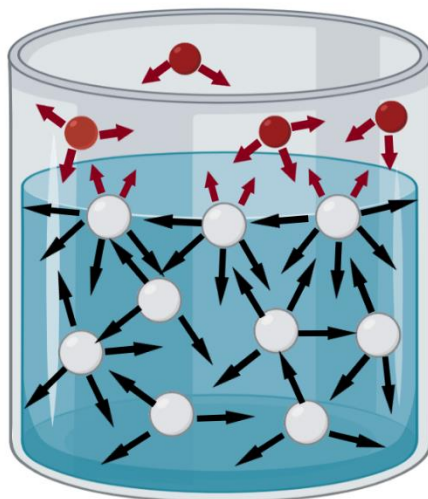


Fig. 08. Moleculele de apă aflate la suprafața de contact cu aerul sunt trase spre interiorul paharului deoarece forța exercitată de moleculele din aer este mult mai mică.

Tensiunea superficială poate fi studiată comparativ pentru a observa caracteristicile diferitelor fluide. Materialele necesare sunt reprezentate de: pipetă, monede și lichide de studiat (apă, alcool etilic, lapte, ulei vegetal etc.). Cu ajutorul unei pipete se picură pe suprafața unei monede câte o picătură din lichidul de studiat. Se va observa confluența picăturilor și formarea unui dom pe suprafața monedei.

După un număr de picături, forța gravitațională va învinge forța de coeziune dintre moleculele fluidului și va învinge tensiunea superficială, observându-se curgerea lichidului de pe suprafața monedei. Pentru acest experiment se va urmări numărul de picături necesare învingerii tensiunii superficiale pentru fiecare fluid studiat, cu stabilirea unei ierarhii și căutarea unor explicații pentru rezultatele obținute.

Studiul efectului substanțelor tensioactive

Substanțele tensioactive modifică valoarea tensiunii superficiale. Sunt reprezentate de substanțe chimice cu o structură hidrofobă și o structură hidrofilă, ce se orientează la limita de delimitare dintre apă și aer, fluid sau solid, scăzând tensiunea superficială. Aceste substanțe mai sunt cunoscute sub denumirea de surfactanți.

Primii surfactanți descoperiți au fost detergenții, iar cercetări ulterioare au descoperit prezența și rolul substanțelor tensioactive în organism. Printre acestea se pot enumera sărurile biliare și surfactantul pulmonar.

Materiale necesare: două eprubete, probă de urină provenită de la un individ sănătos, probă de urină patologică (glomerulonefrită cronică – scade tensiunea superficială, sau cu conținut de bilă) și pudră de talc sau pudră de cărbune vegetal.

Mod de lucru: în prima eprubetă se adaugă 5 mL de urină normală iar în a doua eprubetă se adaugă 5 mL de urină patologică. În ambele eprubete se presară pe suprafață pudră de talc sau pudră de cărbune. În eprubeta cu urină normală se observă persistarea pudrei pe suprafața lichidului. În a doua eprubetă ce conține urină patologică, se va observa scufundarea pudrei la fundul eprubetei datorită prezenței substanțelor tensioactive în probă.

Tensiunea superficială poate fi măsurată cu ajutorul unui tensiometru de forță sau a unui tensiometru optic. Tensiometru de forță măsoară forța exercitată de o probă poziționată la limita dintre un lichid și un gaz sau la limita dintre două lichide. Tensiometrul optic poate fi folosit pentru măsurarea valorilor tensiunii superficiale statice și semi-dinamice folosind o cameră

de înregistrat, un dispensor pentru picături și o sursă de lumină.

Adsorbția

Obiective:

1. Definierea termenului de adsorbție
2. Stabilirea importanței acestui fenomen fizic în organism
3. Cunoașterea materialelor necesare realizării experimentului și a modului de lucru
4. Interpretarea rezultatului obținut

Adsorbția reprezintă fenomenul prin care o substanță se acumulează pe suprafața unui solid. Substanța adsorbită poate fi un lichid sau un gaz, iar legăturile formate sunt în general de tip slab (electrostatice, van der Waals - reversibile).

Una dintre cele mai cunoscute substanțe adsorbante este carbonul activ (folosit pentru confecționarea filtrelor). În medicină se folosește cărbunele medicinal (intoxicații, flatulență etc.). Mai puțin cunoscută este adsorbția proteinelor pe suprafața implanturilor osoase sau dentare ce au ca o consecință finală promovarea osteogenezei.¹

Fenomenul de adsorbție poate fi demonstrat folosind granule sau praf de carbon activ sau cărbune activat. Materialele necesare sunt reprezentate de eprubete, pahare Erlenmeyer, pâlnii, hârtie de filtru, carbon activ sau cărbune activat, soluție de albastru de metilen.

Mod de lucru

Într-un pahar Erlenmeyer se introduce o pâlnie cu hârtie de filtru. În pâlnie se depun câteva grame de carbon activ sau cărbune medicinal (sub formă de granule sau

pulbere), peste care se va turna soluția de albastru de metilen (figura 09).



Fig. 09. Filtrarea unei soluții de albastru de metilen.

Soluția filtrată va fi incoloră datorită adsorbției colorantului pe structura cărbunelui. Pentru verificare, se poate folosi aceeași soluție de albastru de metilen, filtrată fără prezența cărbunelui, sau prin introducerea unui alt material (ex. pudră de talc). În cea de-a doua situație, filtratul va fi colorat.

În organism, adsorbția poate fi întâlnită în fenomenul de fixare a proteinelor pe diverse structuri (ex.: fixarea anticorpilor, fixarea enzimelor pe substrat).

Bibliografie

1. Brberi J, Spriano S, 2021, Titanium and protein adsorption: an overview of mechanisms and effects of surface features. *Materials*, vol. 14, 1590.

Imagini realizate cu ajutorul aplicațiilor Biorender și Chemix (<https://chemix.org/>)

Enzimele reprezintă un grup de biocatalizatori de natură proteică cu rol în eficientizarea reacțiilor chimice din organism. În funcție de proprietățile reacțiilor catalizate, enzimele au fost divizate în 7 clase principale:

⇒ Oxidoreductaze – enzime ce catalizează reacții de oxidoreducere (ex.: reductaze, peroxidaze, oxidaze, dehidrogenaze)

⇒ Transferaze – enzime ce catalizează transferul sau schimbul unei grupări funcționale de la o moleculă la alta (ex.: transaminaze, fosfotransferaze, metiltransferaze)

⇒ Hidrolaze – enzime hidrolitice ce utilizează apa pentru a descompune o moleculă mare în două molecule mai mici (ex.: lipaza, proteaza, amilaza, colinesteraza)

⇒ Liaze – enzime ce catalizează ruperea unor legături chimice pe baza unei reacții de „eliminare”, diferită față de hidroliză și oxidare. Această reacție are ca rezultat frecvent formarea unei structuri ciclice sau a unei legături duble (ex.: aldolaze, decarboxilaze, anhidraza carbonică)

⇒ Izomeraze - enzime ce catalizează izomerizarea unei molecule; proces ce implică o modificare la nivelul legăturii chimice sau o rearanjare spațială a unei molecule, generând un produs de reacție cu aceeași formulă chimică (ex.: racemaze, epimeraze, beta-caroten izomeraza)

⇒ Ligaze / Sintetaze – enzime ce catalizează sinteza a două substraturi moleculare într-un compus unic, cu eliberare de energie (ex.: piruvat carboxilaza, chelatasa de cobalt, ciclo – ligaze)

⇒ Translocaze – enzime ce catalizează mișcarea ionilor sau moleculelor prin

membrane, sau catalizează separarea lor în membrane (ex.: citocrom-c oxidaza, carboxibiotin decarboxilaza)

Într-o reacție enzimatică, enzima acționează asupra unui substrat, cu formarea unui produs de reacție și eliberarea enzimei, după cum este ilustrat în figura 1.



Fig. 01. Interacțiunea enzimei cu substratul și formarea unui produs de reacție cu eliberarea enzimei.

FACTORI CARE INFLUENȚEAZĂ ACTIVITATEA ENZIMELOR

Demonstrarea capacității catalitice pronunțate a enzimelor

Obiective:

1. Explicarea proprietății de capacitate catalitică pronunțată
2. Realizarea experimentului și interpretarea rezultatelor
3. Cunoașterea acțiunii peroxidazelor
4. Cunoașterea implicațiilor clinice pentru reacția obținută în cadrul experimentului

Capacitatea catalitică pronunțată constă în particularitatea enzimelor de a acționa asupra unui volum foarte mare de substrat. Acest lucru este posibil datorită faptului că enzima este eliberată nemodificată din reacție odată cu transformarea substratului în produs de reacție.

Experiment

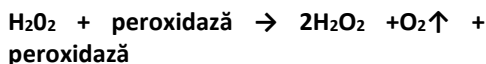
Demonstrarea capacității catalitice pronunțate a peroxidazei

Sub acțiunea peroxidazei, peroxidul de hidrogen este descompus cu degajare vizibilă de oxigen molecular.

Peroxidazele reprezintă o familie de izoenzime din clasa oxidoreductazelor, implicate în oxidarea speciilor reactive de oxigen, procese imune, biosinteza hormonală și patogeniza unor afecțiuni. La mamifere, peroxidazele pot fi întâlnite în diferite țesuturi și celule, îndeplinind funcții specifice (leucocite – eozinofile și monocite, lapte, salivă, glanda tiroidă etc.)

Într-o eprubetă se adaugă apă oxigenată (substrat) și o picătură de sânge proaspăt. După omogenizare, se observă formarea unei spumozități abundente, reprezentate

de fragmente de celule sangvine și oxigen molecular degajat. Schema reacției este ilustrată mai jos.



Reacția de descompunere a peroxidului de hidrogen sub acțiunea elementelor figurate sangvine are utilitate practică în desprinderea pansamentelor aderente sau pentru îndepărtarea impurităților și a celulelor moarte din plăgi.

Demonstrarea specificității de substrat a enzimelor

Obiective:

1. Explicarea specificității de substrat a enzimelor
2. Exemplificarea unor enzime cu specificitate absolută și specificitate relativă
3. Realizarea experimentului și interpretarea rezultatelor

Specificitatea de substrat reprezintă proprietatea enzimelor de a acționa asupra unui singur substrat sau a mai multor substraturi (obișnuit cu structură asemănătoare).

Specificitatea absolută este atribuită enzimelor care acționează asupra unui singur substrat (ureaza, catalaza, aspartaza, glutamat dehidrogenaza). Specificitatea relativă este atribuită enzimelor care acționează asupra unei anumite legături chimice (ex.: D-aminoacid oxidaza), asupra unei grupări specifice (ex.: amilaza, pepsina,

tripsina) sau asupra unui stereoisomer (ex.: celuloza, succinat dehidrogenaza).

Experiment

Demonstrarea specificității de substrat a α -amilazei salivare

Pentru realizarea acestui experiment, sunt necesare următoarele materiale: salivă, amidon fiert (soluție 1%), zahăr, hârtie de filtru, eprubete, reactivi Fehling sau soluție NaOH 10% și soluție CuSO_4 10%, termostat, instalație pentru fierberea apei.

Schema experimentului a fost prezentată în figura 2. În trei eprubete se recoltează salivă (ce conține α -amilază salivară). Se poate suplimenta cu o cantitate redusă de soluție salină pentru a facilita observarea. În prima eprubetă se introduc câteva cristale de zahăr (substrat – sucroză), în a doua eprubetă se introduc câteva fragmente de hârtie (substrat – celuloză), iar în a treia eprubetă se introduce 1 mL de amidon fiert (substrat – amidon). Eprubetele se introduc

în baia de apă, la o temperatură de 37 - 38°C pentru 10 – 15 minute.

După trecerea timpului alocat, se realizează reacția Fehling în toate cele 3 eprubete (recunoașterea ozelor reducătoare).

Se va constata apariția precipitatului roșu-cărmiziu (verde, brun, galben) doar în cea de-a treia eprubetă, unde sunt prezente enzima cu substratul corespunzător. În eprubeta 3, α -amilaza salivară a descompus amidonul până la maltoză, demonstrându-se astfel că sucroza și celuloza nu sunt substraturi specifice pentru amilază. Amilaza are ca substraturi specifice amidonul, glicogenul și alte polizaharide și oligozaharide înrudite.

Factorii care influențează viteza de reacție a enzimelor sunt reprezentați de: temperatură, pH, concentrația substratului, concentrația enzimei, concentrația produșilor de reacție, lumină și ioni.

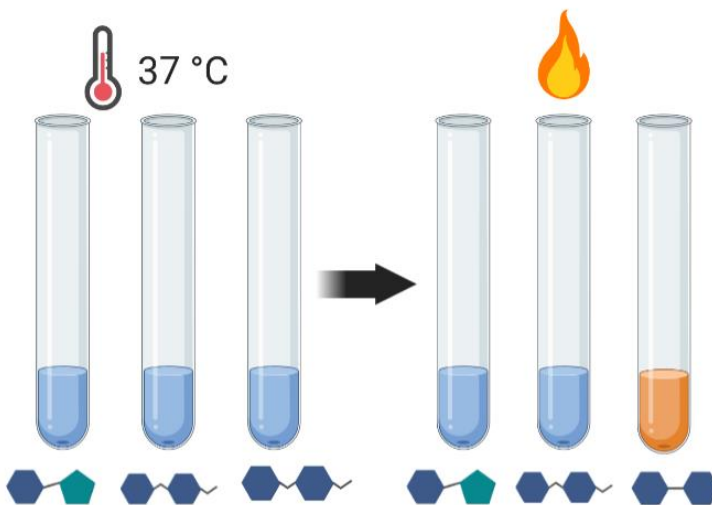


Fig. 02. Schema experimentului pentru demonstrarea specificității de substrat a α -amilazei salivare

Temperatura

Obiective:

1. Cunoașterea influenței temperaturii scăzute asupra activității enzimelor
2. Cunoașterea influenței temperaturii crescute asupra activității enzimelor
3. Stabilirea unei temperaturi optime pentru activitatea enzimatică
4. Realizarea experimentului și interpretarea rezultatelor

Când toți ceilalți factori sunt menținuți în parametri optimi, viteza de reacție a enzimelor va crește direct proporțional cu temperatura până la atingerea unui vârf. Creșterea temperaturii peste acest prag va determina denaturarea proteinei, până la distrugerea totală a acesteia. În cazul stărilor febrile, activitatea metabolică crește datorită sporirii activității enzimatică.

Temperatura optimă pentru majoritatea enzimelor din corpul animalelor este undeva între 37 și 40°C.

Majoritatea enzimelor sunt inactice între 0 și 4°C. Activitatea acestora va începe de la aproximativ 10°C, până la atingerea temperaturii optime.

Scăderea activității enzimatică prezintă un interes sporit pentru medicină (ex.: transplantul de organe) și are un rol major în conservarea alimentelor (refrigerare, congelare).

Experiment:

Demonstrarea efectului temperaturii asupra activității α -amilazei

Pentru realizarea acestui experiment vor fi necesare următoarele materiale: 3 eprubete, α -amilază, soluție amidon, soluție Lügol, pipete, recipient cu gheață, baie de apă pentru fierbere, baie termostat.

În trei eprubete se recoltează o cantitate suficientă de salivă (enzima necesară reacției – α -amilaza salivară) sau de soluție de amilază, peste care se vor adăuga câte 5 mL de soluție de amidon (substrat specific pentru α -amilază). Pentru a pune în evidență prezența amidonului, în toate cele 3 eprubete se vor adăuga câteva picături de soluție Lügol (iodul va da o culoare albastru închis în prezența amilozei) (Figura 3).

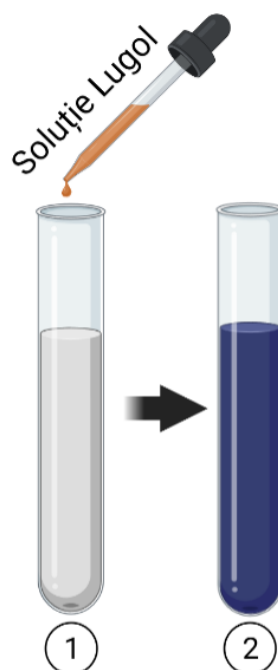


Fig. 03. Peste amestecul de amidon și amilază salivară se adaugă 2-3 picături de soluție Lügol, observându-se virarea culorii în albastru închis.

Prima eprubetă va fi introdusă într-o baie termostat unde va fi menținută la 37°C pentru a asigura o temperatură optimă activității enzimatică. A doua eprubetă va fi introdusă într-o baie de apă pentru fierbere,

iar a treia eprubetă va fi așezată într-un recipient cu gheață.

După 15 – 20 de minute, se va observa dispariția culorii albastre din prima eprubetă și menținerea culorii în celelalte două (Figura 4). Eprubeta ținută la 37°C a avut un mediu optim pentru activitatea enzimatică, astfel amidonul a fost hidrolizat de către α -amilaza până la maltoză. Iodul din soluția Lugol nu colorează maltoza.

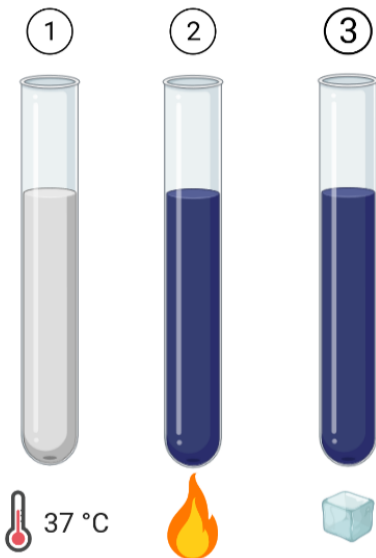


Fig. 04. În eprubeta 1 menținută la 37°C se observă dispariția culorii iar în eprubetele 2 și 3 care au fost fiartă, respectiv răcită, culoarea albastră a persistat.

Hidroliza amidonului poate fi surprinsă în toate etapele prin virarea culorii de la albastru închis spre violet (amilodextrină), roz-roșu (eritrodextrină) și incolor (acrodextrină și maltoză).

Examinarea eprubetei 2 va evidenția menținerea culorii albastre a amestecului. Pentru verificarea activității enzimatice, eprubeta se va introduce la baia termostat,

la 37°C. După 20 – 30 de minute, se examinează din nou și se observă menținerea culorii albastre, deci prezența amidonului în probă. Fierberea inițială a conținutului eprubetei a avut ca rezultat denaturarea enzimei, reacție ireversibilă.

Culoarea albastră se va menține de asemenea în eprubeta 3, menținută în gheață. Pentru evidențierea activității enzimatice, se va introduce timp de 20 – 30 de minute la baia termostat la 37°C. La reexaminarea eprubetei, se va observa dispariția culorii albastre, ceea ce indică reluarea activității enzimatice și hidroliza amidonului. Opierea activității enzimatice prin utilizarea unor temperaturi scăzute este deci o reacție reversibilă.

Există situații în care temperatura optimă pentru activitatea enzimatică poate fi foarte scăzută sau foarte ridicată, precum în cazul bacteriilor extremofile. Studiarea acestor enzime are aplicații practice în industria farmaceutică (ex.: purificarea proteinelor).

pH-ul

Obiective:

1. Stabilirea rolului pH-ului în menținerea activității enzimelor
2. Cunoașterea pH-ului optim pentru activitatea enzimatică
3. Realizarea experimentului și explicarea rezultatelor obținute
4. Realizarea unui grafic pe baza rezultatelor obținute

Dacă restul factorilor sunt menținuți în parametri optimi, viteza reacției enzimatice va crește cu cât pH-ul este mai aproape de valoare optimă și va scădea odată cu îndepărtarea față de pH-ul optim. Expunerea enzimelor la valori extreme de

pH poate duce chiar și la denaturarea acestora.

Modificarea pH-ului va avea ca efect ionizarea atomilor și moleculelor de aminoacizi schimbând astfel forma și structura proteinelor. Aceste modificări structurale vor duce și la afectarea funcției proteinelor. Enzimele sunt la rândul lor proteine, astfel pH-ul le va afecta (în funcție de valoare) în mod reversibil sau ireversibil. Modificarea pH-ului poate afecta în același mod și substratul.

Valoarea pH-ului optim va fi diferită de la o enzimă la alta. De exemplu pepsina și tripsina, enzime proteolitice întâlnite la nivelul sistemului digestiv, vor avea un pH optim diferit. Pepsina este activă în mediul acid al stomacului, la un pH optim de 1,5 – 1,6, pe când tripsina întâlnită la nivelul intestinului subțire are un pH optim de 7,8 - 8,7.

Experiment:

Demonstrarea efectului pH-ului asupra α -amilazei

pH-ul optim pentru α -amilază variază în jurul valorilor de 5,6 – 7. Creșterea sau scăderea pH-ului va scădea viteza de reacție sau va opri activitatea enzimatică.

Pentru realizarea acestui experiment sunt necesare următoarele materiale: α -amilază (salivă sau produs comercial), soluție de amidon fiert (1%), eprubete, soluție Lügol, baie termostat setată la 37°C, soluții tampon (baze și acizi), hârtie de pH.

Se determină pH-ul fiecărei soluții tampon și se notează. Se iau câte 2 mL din fiecare soluție tampon și se distribuie în eprubete separate. În toate eprubetele se adaugă câte 2 mL de soluție de amidon și o cantitate suficientă de enzimă. Se pornește cronometrul. În toate eprubetele se adaugă apoi câte 1 – 2 picături de soluție Lügol.

Eprubetele sunt puse apoi în baia termostat pentru a aduce probele la o temperatură optimă activității enzimatică.

Se urmărește din 30 în 30 de secunde modificarea culorii din eprubetă. Culoarea formată în eprubetă va indica prezența amidonului, a stadiilor intermediare de degradare, sau a maltozei.

Utilizând rezultatele obținute pentru fiecare pH în parte se poate realiza un grafic cu activitatea enzimatică a α -amilazei.

Concentrația substratului și concentrația enzimei

Obiective:

1. Cunoașterea efectului concentrației substratului asupra vitezei de reacție
2. Cunoașterea efectului concentrației enzimei asupra vitezei de reacție
3. Realizarea experimentelor și explicarea rezultatelor obținute

Creșterea concentrației substratului va crește viteza de reacție enzimatică, până la atingerea unui plafon. În momentul în care toată cantitatea de enzimă este legată de substrat, orice creștere a cantității de substrat nu va mai avea efect asupra vitezei de reacție.

În mod asemănător, creșterea concentrației de enzimă va grăbi viteza de reacție, atâta timp cât există substrat disponibil. Dacă toată cantitatea de substrat este antrenată în reacție, o eventuală creștere a cantității de enzimă nu va rezulta și în creșterea vitezei de reacție.

Experiment:

Determinarea efectului concentrației substratului asupra vitezei de reacție

Pentru realizarea experimentului, vor fi necesare următoarele materiale: enzima α -amilază (salivă sau produs comercial), soluție de amidon, eprubete, soluție Lügol, pipete gradate, baie termostat și cronometru.

În 5 eprubete se vor introduce 2 mL din soluțiile de amidon cu concentrații diferite (0,1%, 0,5%, 1%, 3% și 5%). Apoi, în fiecare eprubetă se adaugă câte 0,5 mL soluție de α -amilază și câte 1 - 2 picături de soluție Lügol, moment în care se pornește cronometrul.

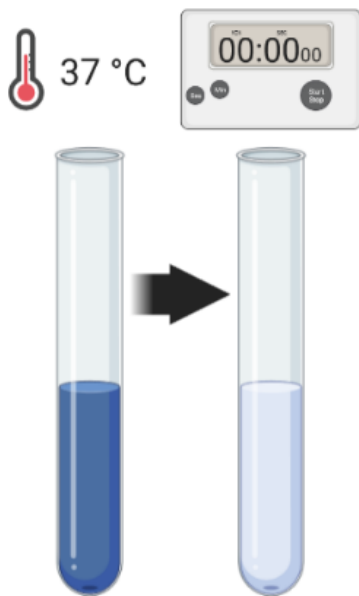


Fig. 05. Eprubetele se mențin la termostat și se determină timpul de hidrolizare a amidonului.

Eprubetele se introduc în baie de apă la temperatura de 37°C și se verifică din 30 în 30 de secunde până la dispariția culorii albastre. Se notează timpul scurs de la introducerea enzimei până la dispariția culorii (indică hidroliza totală a amidonului și prezența maltozei sau a acrodextrinei).

Schema experimentului a fost ilustrată în figura 5.

Pe fișa de lucru se va nota timpul de hidroliză pentru fiecare soluție de amidon și concluziile experimentului. Se vor menționa la ce concentrații s-au obținut timpul minim și timpul maxim de hidroliză. Se va menționa dacă la anumite concentrații timpul obținut este identic și se va oferi o explicație pentru rezultatul obținut. De asemenea, se vor compara rezultatele proprii cu cele ale colegilor. În cazul existenței unor diferențe, va fi necesară explicarea apariției acestora.

Efectul *concentrației enzimei* asupra vitezei de reacție poate fi testat prin utilizarea unei amilaze de uz comercial și stabilirea unui model experimental asemănător cu cel discutat mai sus. Efectul utilizării unei concentrații mai mari de enzimă va fi de creșterea a vitezei de reacție, până la atingerea unui prag limită în care cantitatea maximă disponibilă de enzimă este angajată în descompunerea substratului. Timpul maxim de hidroliză va fi întâlnit la cea mai mică concentrație de amilază, iar timpul minim va fi întâlnit la o concentrație mai mare de enzimă.

Prođuși de reacție, lumină și ioni

Obiective:

1. Cunoașterea efectului produșilor de reacție asupra vitezei de reacție
2. Cunoașterea efectului luminii asupra vitezei de reacție
3. Cunoașterea efectului ionilor asupra vitezei de reacție
4. Realizarea experimentului și explicarea rezultatelor obținute

Prezența produșilor de reacție în exces în mediul de reacție, va avea ca efect scăderea

vitezei de derulare a activității enzimaticе datorită existenței unui mecanism de tip feedback.

Lumina are un efect direct asupra activității enzimaticе. Acest factor are o importanță deosebită în studiul plantelor, datorită afectării procesului de fotosinteză, dar poate fi studiat și în legătură cu diverse microorganisme, precum fungii (ex. *Aspergillus niger*).

Lumina poate afecta și activitatea enzimelor de la nivelul organismului. S-a observat că lumina albastră crește viteza de reacție a amilazei, pe când, lumina ultravioletă îi scade activitatea.

Prezența sau absența unor ioni poate modifica activitatea enzimatică în sensul creșterii sau scăderii vitezei de reacție. De exemplu, pepsinogenul (zimogen) este convertit în pepsină (forma activă a enzimei) în prezența ionilor de H^+ , kinazele sunt active doar în prezența ionilor de Mg^{+2} , iar amilaza salivară este activă în prezența ionilor de Cl^- .¹

Experiment:

Determinarea efectului luminii asupra activității α -amilazei

Pentru realizarea acestui experiment vor fi necesare următoarele materiale: eprubete, α -amilază (salivară sau produs comercial), soluție de amidon, soluție Lügol, baie termostat setată la $37^\circ C$, cronometru, sursă de lumină albastră, sursă de lumină ultravioletă.

În 3 eprubete se vor introduce câte 2 mL de soluție de amidon și 1 – 2 picături de soluție Lügol. Apoi, în fiecare eprubetă se adaugă câte 0,5 mL de soluție de amilază. În acest moment se pornește cronometrul. Schema experimentului a fost ilustrată în figura 6.

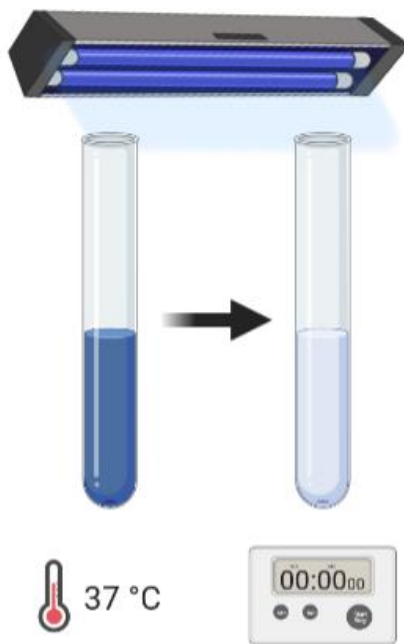


Fig. 06. Se cronometrează timpul de hidroliză al amidonului în prezența unei surse de lumină (ex. lumină UV).

Prima eprubetă se va menține la $37^\circ C$, fără prezența unei surse de lumină (proba martor). A doua eprubetă se va menține la termostat sau într-un recipient cu apă la $37^\circ C$, având în apropiere o sursă de lumină albastră (ex. bec LED). A treia eprubetă se menține la termostat sau într-un vas cu apă la $37^\circ C$, cu o sursă de lumină UV în apropiere (ex. lampă UV).

Se va cronometra pentru fiecare probă tipul scurs de la introducerea enzimei în eprubetă, până la dispariția culorii albastre. Se vor nota timpii obținuți pentru fiecare eprubetă în parte și se vor explica diferențele observate.

Inhibitori enzimatici

Obiective:

1. Cunoașterea modului de inhibare a activității enzimatică
2. Exemplificarea unor factori inhibitori
3. Realizarea experimentului și stabilirea concluziilor

Inhibitorii enzimatici sunt substanțe sau factori ce duc la alterarea activității enzimatică, alții decât pH, temperatură, concentrație etc. Inhibiția poate fi reversibilă sau ireversibilă. Cea reversibilă fiind competitivă (funcție ce stă la baza modului de acțiune al unui număr vast de medicamente) sau non-competitivă (enzime alosterice).

Un exemplu de inhibiție reversibilă de tip competitivă utilizată în activitatea clinică ar fi administrarea etanolului pacienților cu intoxicație cu metanol. În organism, asupra metanolului va acționa enzima alcool dehidrogenaza cu formare de formaldehidă. Etanolul administrat ca antidot în această intoxicație va lega competitiv enzima, în locul metanolului.

Inhibiția enzimatică mai poate avea loc și prin acțiunea unor anti – enzime. Acestea sunt obișnuit substanțe de natură proteică ce acționează asupra majorității enzimelor digestive. De exemplu, unele specii de helminți secretă anti – enzime pentru a supraviețui în sistemul digestiv. Totodată, orezul crud conține proteine cu efect anti – enzimatic.

Experiment:

Determinarea efectului inhibitor al ceaiului negru asupra α -amilazei

Pentru realizarea experimentului vor fi necesare următoarele materiale: eprubete, α -amilază (salivară sau produs comercial),

soluție de amidon, soluție Lügol, ceai negru, baie de apă la 37°C, cronometru.

Polifenolii conținuți de către ceaiul negru au un efect inhibitor asupra enzimelor ce hidrolizează carbohidrați. Efectul inhibitor este cel mai slab în ceaiul verde, mediu pentru ceaiul semi-fermentat Oolong și cel mai puternic la ceaiul fermentat (negru).^{2,3}

În două eprubete se introduc câte 2 mL de soluție de amidon și 1 – 2 picături de soluție Lügol. În prima eprubetă se adaugă 2mL de apă distilată, iar în a doua eprubetă se adaugă 2 mL de decoct de ceai negru. În ambele eprubete se adaugă apoi câte 1 mL de soluție de α -amilază, moment în care se pornește cronometrul. Eprubetele se introduc în baia termostat la 37° C și se verifică din 30 în 30 de secunde pentru urmărirea dispariției culorii. Cronometrul se oprește când nu se mai observă culoarea albastră.

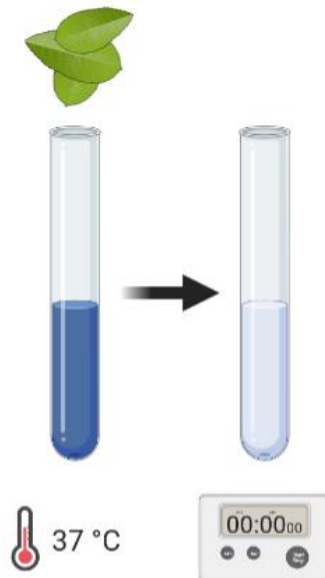


Fig. 07. Se va observa prelungirea timpului de reacție în prezența ceaiului negru datorită activității inhibitorii a polifenolilor.

Bibliografie

1. **Amanullah M**, 2009, Veterinary Biochemistry & Biotechnology, International Book Distribution Company, Lucknow, India.
 2. **Freitas D, Le Feunteun S**, 2019, Inhibitory effect of black tea, lemon juice, and other beverages on salivary and pancreatic amylases: What impact on bread starch digestion? A dynamic in vitro study. Food Chemistry, Elsevier, vol. 297: 124885.
 3. **Striegel L, Kang B, Pilkenton SJ, Rychlik M, Apostolidis E**, 2015, Effect of Black Tea and Black Tea Pomace Polyphenols on α -Glucosidase and α -Amylase Inhibition, Relevant to Type 2 Diabetes Prevention. Front Nutr., vol. 2:3.
- Imagini realizate cu ajutorul aplicațiilor Biorender și Chemix (<https://chemix.org/>)**

Obiective:

1. Cunoașterea modului de organizare sistemului nervos
2. Stabilirea rolurilor sistemului nervos
3. Enumerarea tipurilor de țesut nervos
4. Definirea potențialului de acțiune
5. Cunoașterea modului de comunicare între neuroni

Sistemul nervos (SN) poate fi divizat în două componente majore, respectiv *sistemul nervos central (SNC)* și *sistemul nervos periferic (SNV)*. Sistemul nervos central este reprezentat din punct de vedere anatomic de către encefal și măduva spinării iar sistemul nervos periferic conține restul elementelor ce intră în alcătuirea sistemului nervos.

Funcțiile majore ale SN sunt de a prelua informații din mediu și de a genera un răspuns. Acest răspuns poate fi voluntar (contractii musculare – sistem nervos somatic) sau involuntar (reglarea mediului intern pentru menținerea stării de homeostazie – sistem nervos autonom; sistemul nervos enteric – reglarea digestiei). O altă funcție este cea de integrare, prin care informația preluată din mediu este interpretată la nivel central, unde reacția va fi generată în funcție de experiențele anterioare.

Țesutul nervos este reprezentat de:

- ⇒ neuroni (pseudo-unipolari, bipolari și multipolari) – generarea potențialului de acțiune
- ⇒ celule gliale (astrocite, microglijii, celule ependimale, celule Schwann etc.) – suport, mielinizare, fagocitoză, secreția fluidului cerebro-spinal

Potențialul de acțiune reprezintă o modificare rapidă a sarcinii electrice

celulare. Cuprinde trei perioade: depolarizare, repolarizare și hiperpolarizare.

Neuronii comunică între ei prin intermediul sinapselor. Acestea pot fi chimice sau electrice. Sinapsele chimice implică eliberarea de neurotransmițători iar sinapsele electrice necesită conexiune directă între cele două celule pentru ca ionii să treacă de la o celulă la alta.

Neurotransmițătorii pot fi împărțiți în:

- ⇒ Sistemul colinergic – bazat pe acetilcolină (receptori muscarinici și nicotinici)
- ⇒ Aminoacizi – glutamat (Glu), acidul gama-aminobutiric (GABA) și glicina (Gly)
- ⇒ Amine biogene – serotonină, dopamină, norepinefrină, epinefrină
- ⇒ Neuropeptide – met-enkefalină, beta-endorfină, peptidul intestinal vasoactiv (VIP)

Actul și arcul reflex

Obiective:

1. Definirea arcului reflex
2. Definirea actului reflex
3. Cunoașterea componentelor arcului reflex
4. Demonstrarea rolului componentelor arcului reflex

Actul reflex reprezintă un răspuns al organului efector la o excitație primită prin intermediul unui arc reflex.

Arcul reflex reprezintă substratul anatomic al actului reflex. Acesta are următoarele componente:

- ⇒ Receptor
- ⇒ Cale aferentă (senzitivă)
- ⇒ Centru nervos
- ⇒ Cale eferentă (motorie)
- ⇒ Efector

Arcul reflex și componentele sale a fost schematizat în figura 1.

Se pot deosebi două tipuri de reflexe în funcție de numărul de neuroni implicați:

⇒ Reflexe monosinaptice – un neuron senzitiv și un neuron motor, cu o sinapsă unică între aceștia

⇒ Reflexe polisinpaptice – mai multe sinapse (majoritatea reflexelor)

În funcție de componentele implicate în arcul reflex se pot deosebi reflexe lungi și reflexe scurte. Reflexele somatice sunt întotdeauna reflexe lungi cu implicarea SNC, chiar și în cazul reflexelor monosinaptice. În cazul sistemului nervos autonom, este posibilă apariția unui reflex fără implicarea

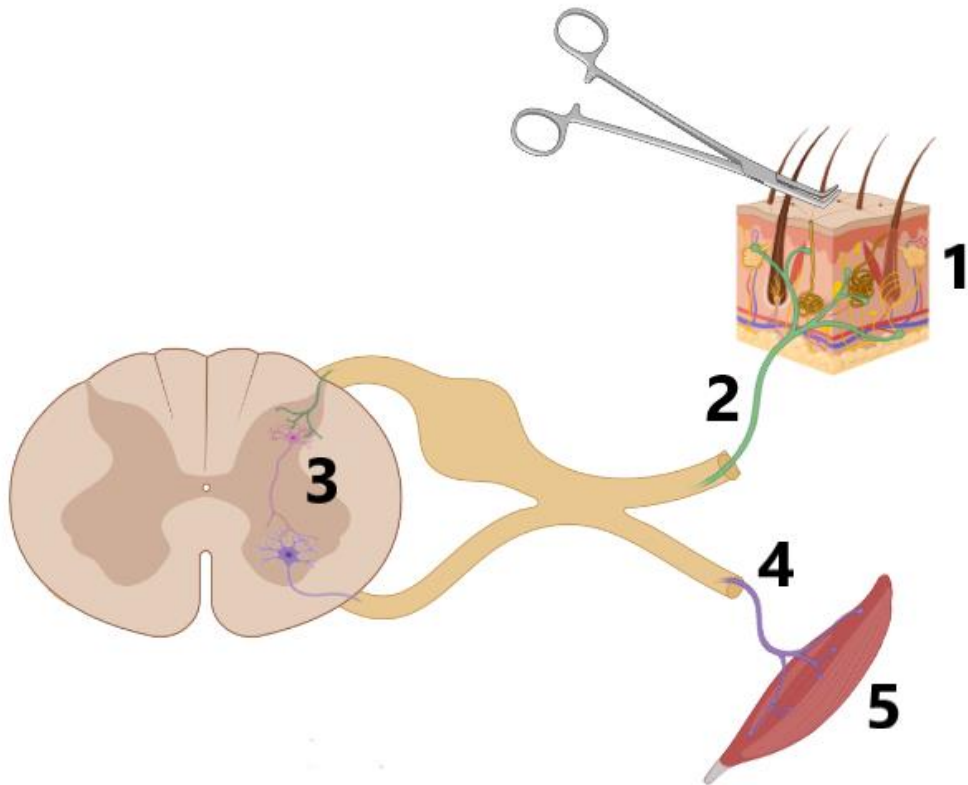


Fig. 1 Arcul reflex și componentele sale. 1. Receptor – piele și stimul dureros reprezentat de ciupirea tegumentului cu ajutorul unei pense; 2. Cale nervoasă aferentă – nerv senzitiv ce transmite potențialul de acțiune la centrul nervos; 3. Centrul nervos spinal – se pot observa două sinapse (reflex polisinpaptic), prima sinapsă fiind între neuronul senzitiv și un neuron intermediar iar a doua sinapsă între neuronul intermediar și neuronul motor; 4. Cale eferentă – neuron motor ce transmite potențialul de acțiune către un efecter; 5. Efecter – reprezentat de un mușchi. Un exemplu de reflex pentru această schemă ar fi retragerea membrului după ciupirea pielii (aplicarea unui stimul dureros) – reflex de apărare.

SNC. În acest caz, neuronul senzitiv activează neuronul ganglionar pentru a transmite mai rapid potențialul de acțiune către efector, evitându-se trecerea pe la nivelul SNC.

Demonstrarea rolului elementelor arcului reflex la broască

Demonstrație experimentală realizată după modelul propus de G.N. Zilov (1954). Acest experiment urmărește observarea reflexului de flexie a membrului posterior și demonstrarea rolului componentelor arcului reflex implicat.

Materiale necesare: broască, mănuși, ac hipodermic și seringă (1 mL), metansulfonat de tricaină soluție 1% (anestezic), lidocaină (anestezic local), suport, trusă de vivisecție, vată hidrofilă, soluție Ringer pentru amfibieni (0,65% NaCl), soluție acid acetic 10% sau pensă (stimul dureros)

Mod de lucru:

1. Realizarea anesteziei: broasca se conționează astfel încât să fie posibilă vizualizarea suprafeței ventrale a corpului. Se injectează 0,5 mL de soluție de metansulfonat de tricaină în cavitatea celomică (injecție intracelomică – IC) și se așteaptă 30 de minute. De menționat faptul că după hotărârea CMVRO nr. 45/26.102013 se acceptă ca metodă de eutanazie pentru amfibieni și decapitarea, fără o sedare prealabilă.
2. Decapitarea broaștei – îndepărtarea encefalului pentru obținerea preparatului de broască spinală.
3. Suspendarea preparatului biologic în suport.
4. Pentru fiecare pas experimental se va determina și timpul reflex, respectiv timpul scurs de la administrarea unui stimul până la producerea reflexului.

A. Demonstrarea rolului receptorului

Se introduce vârful degetelor membrului posterior în soluția de acid acetic 10% sau se ciupește pielea cu ajutorul unei pense. Se observă reflexul de retragere a membrului posterior. Pentru a demonstra rolul receptorului se îndepărtează pielea de la nivelul membrului – incizie în jurul gambei, după care pielea se decolează până la nivelul vârfului degetelor. După îndepărtarea pielii, vârful degetelor este introdus din nou în soluția de acid acetic 10%. Se poate remarca absența reflexului de retragere a membrului ca o consecință a îndepărtării receptorilor cutanați.

B. Demonstrarea rolului căii senzitive

Se verifică integritatea arcului reflex la membrul posterior intact. După obținerea unui reflex de retragere a membrului, pielea se spală cu soluție Ringer. Se izolează nervul sciatic peste care se aplică un tampon de vată cu lidocaină. Se verifică din minut în minut reflexul (cu acid acetic 10% sau prin ciupirea membrului), până la dispariția acestuia.

C. Demonstrarea rolului centrului nervos

Pentru a scoate din funcție SNC, se va dilacera măduva spinării cu ajutorul unui ac spinal. Se ciupește vârful degetelor membrului posterior sau se introduc în soluția de acid acetic 10% pentru a verifica apariția reflexului de retragere a membrului. Se constată dispariția tuturor reflexelor.

Atenție!

Manipularea broaștelor se face numai purtând mănuși confecționate din nitril. Broaștele sunt alergice la latex.¹

Testarea reflexelor spinale la animalele de companie

Obiective:

- 1.Stabilirea informațiilor obținute odată cu examinarea reflexelor spinale
- 2.Cunoașterea modului de apreciere a răspunsului reflex
- 3.Testarea reflexului patelar
- 4.Testarea reflexului gastrocnemian
- 5.Testarea reflexului bicipital
- 6.Testarea reflexului tricipital
- 7.Testarea reflexului de retragere a membrului
- 8.Testarea reflexului perineal
- 9.Testarea reflexului cutanat al trunchiului

Testarea reflexelor spinale reprezintă o etapă importantă a unui examen neurologic, cu importanță deosebită la animalele de companie. Reflexele spinale oferă informații legate de:

⇒ Integritatea căilor senzitive și motorii ale arcului reflex

⇒ Activitatea neuronilor motori superiori și influența acestora asupra arcului reflex.

Reflexele spinale pot fi apreciate în funcție de intensitatea răspunsului efectorului. Astfel, reflexele pot fi:

⇒ Normale

⇒ Slabe

⇒ Exagerate – ex: leziuni ale neuronilor motori superiori, animale agitate etc.

⇒ Absente – ex: afectarea componentelor arcului reflex, leziuni ale articulației implicate în răspunsul reflex etc.

Pacientul este lăsat să se obișnuiască cu mediul din sala de examinare și cu persoanele prezente în cameră. Mediul în care se va realiza examinarea trebuie să fie liniștit, fără zgomot, alte animale, sau factori

stresori. Materialele necesare: plesimetru (instrument pentru testarea reflexelor și pentru practicarea percuției – Figura 2), pensă.



Fig. 2 Plesimetru utilizat ca instrument de diagnostic în examenul neurologic.

Reflexul patelar – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Membrul posterior examinat se menține într-o flexie relaxată
- Cu ajutorul plesimetrului, se va lovi ligamentul patelar (localizat între patelă și tuberozitatea tibială)

Răspunsul normal este reprezentat de o extensie unică, rapidă, a membrului examinat.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații despre integritatea nervului femural și a segmentelor medulare L4-L6.

Reflexul gastrocnemian/Achilian – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Membrul posterior examinat este imobilizat prin prinderea zonei metatarsiene
- Cu ajutorul plesimetrului, se percuțează tendonul calcanean comun (tendonul Achilian) deasupra calcaneului.

Răspunsul normal este reprezentat de contracția porțiunii caudale a musculaturii coapsei. Acest răspuns este mai puțin

evident și este destul de dificil de observat la rasele cu blană deasă și lungă.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații despre integritatea nervului sciatic și a segmentelor medulare L6-S2.

Reflexul bicipital – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Membrul anterior examinat este imobilizat astfel încât să se realizeze extensia cotului (prin orientarea caudală a membrului)
- Se poziționează degetul arătător pe inserția tendinoasă a bicepsului pe radius, apoi cu ajutorul plesimetrului, se va percuta degetul.

Răspunsul normal este reprezentat de contracția mușchiului biceps brahial. La pacienții cu blană lungă se poate urmări flexia cotului la lovirea tendonului. De asemenea, la rasele mari, reflexul este mai evident dacă membrul este menținut într-o poziție paralelă cu masa de examinare.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații cu privire la integritatea nervului musculocutanat și a segmentelor medulare C6 – C8.

Reflexul tricipital – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Membrul anterior examinat este imobilizat și se realizează flexia totului și rotirea medială umărului (spre înăuntru)
- Cu ajutorul plesimetrului se percutează tendonul tricepsului pe suprafața medială, deasupra olecranului.

Răspunsul normal este reprezentat de contracția mușchiului triceps. Acest reflex este uneori slab observat și dificil de obținut chiar și la rasele cu blană scurtă.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații legate de integritatea nervului radial și a segmentelor medulare C7 – T2.

Reflexul de retragere a membrului – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Membrul examinat este adus în extensie
- Cu ajutorul degetelor, examinatorul va ciupi pielea interdigitală

Răspunsul normal este reprezentat de retragerea membrului (anterior sau posterior).

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații cu privire la integritatea nervilor (musculocutanat, axilar, median, ulnar și radial pentru membrele anterioare și nervul sciatic pentru membrele posterioare. Totodată, se mai obțin informații legate de integritatea segmentelor medulare C6 – T2 și L6 – S2.

Reflexul perineal – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în decubit lateral
- Se imobilizează coada pentru evidențierea perineului
- Cu ajutorul degetelor, examinatorul ciupește ușor sau atinge perineul – examinare bilaterală.

Răspunsul normal este reprezentat de contracția sfincterului și flexia cozii.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații legate despre integritatea rădăcinilor nervoase perineale și pudende, precum și despre integritatea segmentelor S1 – S3 și porțiunea terminală a coloanei vertebrale.

Reflexul cutanat al trunchiului/Panniculus – mod de lucru:

- Pacientul este menținut în poziție patrupodală sau în decubit ventral
- Cu ajutorul unei pense se ciupește pielea lateral de coloana vertebrală, începând de la zona lombo-sacrală până aproape de zona gâtului
- Examinarea se va realiza bilateral

Răspunsul normal este reprezentat de contracția mușchilor cutanați. Este prezent în zona toraco-lombară și este absent în zona sacrală și zona gâtului.

Din punct de vedere clinic, reflexul oferă informații despre integritatea nervului toracic lateral și a segmentelor medulare C8 – T1.

Laborator virtual de Neurofiziologie²

Obiective:

1. Accesarea platformei online
2. Cunoașterea scopului realizării experimentului
3. Cunoaștere modului de lucru al disecției
4. Utilizarea aplicației pentru realizarea experimentului virtual
5. Identificarea tuturor tipurilor de neuroni
6. Explicarea prezenței sau absenței răspunsului la aplicarea stimulilor
7. Cunoașterea tipurilor de neuroni întâlniți în cadrul experimentului

Experimentul prezentat în cadrul Laboratorului Virtual de Neurofiziologie a fost realizat în cadrul Institutului Medical Howard Hughes din Statele Unite ale Americii și are ca scop investigarea unor particularități ale sistemului nervos al lipitorii. Această specie a fost aleasă pentru realizarea simulării deoarece neuronii au dimensiuni mari și pot fi identificați cu o relativă ușurință.

Experimentul virtual investighează răspunsul individual al neuronilor la acțiunea unor stimuli tactili. Cu ajutorul unor electrozi, activitatea neuronală poate fi înregistrată, evidențiind transmiterea potențialului de acțiune pe cale senzitivă.

Cunoștințe anterioare necesare: neuron, potențial de repaus și potențial de acțiune.

Experimentul este divizat în două secțiuni:

⇒ Disecția Lipitorii – cu explicarea tehnicii de izolare a componentelor sistemului nervos

⇒ Aplicarea sondei și Identificarea neuronilor – explorarea răspunsului neuronilor la aplicarea unor stimuli, precum și aprecierea caracteristicilor anatomice ale neuronilor prin utilizarea unui colorant fluorescent.

Pentru accesarea experimentului, dați click pe butonul de mai jos sau tastați

<https://www.biointeractive.org/classroom-resources/neurophysiology-virtual-lab>

în bara de căutare a browserului.

ÎNCEPE EXPERIMENTUL

Disecția lipitorii

⇒ Pasul 1: Utilizarea unei soluții de etanol 8% pentru anestezierea lipitorii. Etanolul reprezintă un anesteziec eficient pentru speciile ce prezintă respirație cutanată.

⇒ Pasul 2: Lipitoarea anesteziată este fixată pe o placă de disecție în decubit dorsal. Fixarea se face prin introducerea acelor la nivelul ventuzelor anterioară și posterioară.

⇒ Pasul 3: Se realizează o secțiune longitudinală prin piele la nivelul liniei mediane.

⇒ Pasul 4: Se îndepărtează marginile plăgii și se fixează pe placa de disecție.

⇒ Pasul 5: Odată cu deschiderea cavității celomice, se pot observa structuri interne precum organe digestive, excretoare și

reproducătoare. Nu se poate observa însă sistemul nervos care este localizat pe partea ventrală a animalului, sub celelalte organe.

⇒Pasul 6: Se îndepărtează structurile interne și se evidențiază sinusurile vasculare. Acestea captează cordonul nervos ventral.

⇒Pasul 7: Sinusul vascular prezintă numeroase dilatații. Fiecare dilatație conține un ganglion segmentar al sistemului nervos.

⇒Pasul 8: Se secționează sinusul vascular și se îndepărtează pentru expunerea ganglionului. În această structură se pot vizualiza neuronii individuali din zona dorsală a ganglionului. Neuronii care răspund la stimuli tactili sunt localizați în zona ventrală.

⇒Pasul 9: Pentru a accesa zona ventrală a ganglionului, lipitoarea este întoarsă pielea orientată în sus. Se realizează o secțiune circulară în peretele ventral al corpului pentru a expune ganglionul.

⇒Pasul 10: Se izolează o secțiune prin realizarea a două incizii paralele și perpendiculare pe axul antero-posterior al corpului. Inciziile sunt distanțate astfel încât ele cuprind cel puțin un ganglion.

⇒Pasul 11: Secțiunea izolată este întinsă și fixată cu pielea în sus. Ganglionul va fi vizibil prin gaura realizată în secțiune.

Aplicarea sondei și identificarea neuronilor
Prin următorii pași veți explora modul în care sistemul nervos al lipitorii răspunde la diferite tipuri de stimuli:

⇒Inserați un electrod într-un neuron. Monitorizați răspunsul electric pe măsură ce stimulați pielea cu diferite unelte.

⇒Injectați în neuron un colorant fluorescent și observați caracteristicile anatomice ale celulei.

⇒Comparați datele electrice și anatomice cu rezultatele publicate pentru a identifica tipul neuronului.

⇒Repeți pașii anteriori până la identificarea tuturor tipurilor de neuroni.

Mod de lucru

După pornirea experimentului veți observa în partea stângă o imagine mărită a ganglionului. Aceasta cuprinde numeroase cercuri delimitate cu negru ce indică delimitarea neuronilor disponibili pentru explorare. Unii dintre acești neuroni sunt senzitivi, alții nu. Pentru a-i deosebi, este necesară identificarea modului în care aceștia răspund la acțiunea stimulilor.

Dați click pe un neuron și observați afișajul voltmetrului din partea dreaptă. Afișajul se va modifica odată cu inserția electrodului în neuron. Semnalele electrice de la neuron sunt de asemenea trecute printr-un amplificator audio, ce va produce o versiune audio a semnalului afișat.

Pentru testarea răspunsului neuronului, apăsați pe pensulă, sondă sau pensă pentru a stimula pielea lipitorii. Observați dacă neuronul prezintă descărcări electrice spontane, dacă răspunde la stimuli tactili slabi (pensulă), medii (sondă), sau puternici (pensă) prin generarea potențialelor de acțiune ce vor fi observate sub formă de impulsuri pe afișajul voltmetrului. Ulterior, veți compara răspunsul observat cu datele de referință publicate. Când terminați testarea tuturor uneltelor, apăsați butonul „Continuare”.

Pentru utilizarea colorantului și vizualizarea neuronului, veți apăsa butonul „Injectare Colorant”, urmat de butonul „Înterupător UV”, pentru a porni lumina ultravioletă ce va activa colorantul fluorescent. Acest procedeu va permite identificarea caracteristicilor anatomice ale neuronului. Forma fiecărui tip de neuron

este unică, ceea ce poate fi utilizat ca metodă de identificare.

Identificarea neuronilor

Utilizând datele despre activitatea electrică și structura anatomică a neuronului identificat, veți identifica tipul de neuron pe baza datelor de referință publicate.

Identificați toate tipurile de neuroni. Odată ce ați terminat, apăsați butonul „Concluzii”.

Concluzii

Sistemul nervos este alcătuit din multe tipuri de neuroni, fiecare transmițând diferite tipuri de informații. Modelul activității electrice într-un neuron are o însemnătate specifică dependentă de identitatea neuronului. De exemplu, neuronii senzitivi care recepționează informații tactile dintr-o regiune specifică a organismului, transmit informația către creier, formând o cale nervoasă specifică. Acest principiu se aplică chiar și la un animal simplu precum lipitoarea. După cum ați observat, la lipitoare, sa-u identificat trei tipuri de neuroni senzitivi ce răspund la senzația tactilă și transmit informația în restul sistemului nervos.

Tipuri de neuroni identificați

Neuronii senzitivi sunt reprezentați de trei categorii:

⇒ T (touch – atingere) – răspund la stimuli ușori

⇒ P (pressure – presiune) – răspund la stimuli medii

⇒ N (nociceptive – nocireceptori) – răspund la stimuli puternici. Dacă informația ar fi procesată de către animal, aceasta ar fi de durere.

Alte categorii de neuroni:

⇒ R (celule Retzius) – generează potențiale de acțiune spontane, fără a răspunde la stimuli tactili.

⇒ X – neuroni motori ce nu răspund al stimuli senzitivi și nu au activitate electrică spontană.

O altă categorie de neuroni poate fi cea de neuroni motori.

Bibliografie

1. **KOUSTUBHAN P, KAPLAN DL, LEVIN M, 2013, *Humane Anesthesia and Pain Management in Amphibian Limb Surgery of Rana pipiens*, Cold Spring Harb Protoc, 2013(2): 149-155.**
2. Utilizat și tradus cu permisiunea Institutului Medical Howard Hughes, Copyright (2019). All rights reserved. www.BioInteractive.org.

Imagini realizate cu ajutorul aplicației Biorender

Obiective:

1. Definirea hematologiei
2. Definirea componentelor și proprietăților sângelui
3. Enumerarea examenelor hematologice de rutină

Hematologia este știința care se ocupă cu studiul sângelui și a organelor hematoformatoare. În context clinic, hematologia urmărește studiul, diagnosticul, tratarea și prevenția afecțiunilor maligne, infecțioase, nutriționale și degenerative ale sângelui, cu impact major asupra tuturor sistemelor și organelor.

Sângele are o consistență lichidă, este vâscos, ușor alcalin, lipicios la atingere și cu gust sărat-metalic. Volumul total de sânge reprezintă circa 6 - 8% din greutatea organismului și este menținut la valori constante sub acțiunea a diverși hormoni ce reglează excreția apei și cantitatea de substanțe dizolvate. Funcțiile țesutului sanguin sunt de transport (gaze respiratorii, nutrienți etc.), reglare (pH, temperatura etc.) și protecție.

Sângele este format din plasmă (aproximativ 55%) și elemente figurate. Hematiile au ca rol principal transportul oxigenului către țesuturi, plachetele sangvine au rol în hemostază iar leucocitele fac parte din sistemul imunitar al organismului.

Examenle hematologice utilizate în practica medicală sunt foarte numeroase și au un grad variat de complexitate în ceea ce privește realizarea și interpretarea. Dintre acestea se pot aminti hemoleucograma, testele de coagulare, analiza morfologică a sângelui în frotiu, examenul măduvei osoase hematogene, testul Coombs, VSH etc.

Acest capitol va descrie câteva experimente ce pot fi utilizate pentru determinarea parametrilor hematologici în practica medicală (hematocrit, numărul de hematii, parametri eritrocitari derivați, formula leucocitară etc.). Însușirea acestor noțiuni fiind esențială pentru o bună înțelegere a caracteristicilor fiziologice ale țesutului sangvin cât și pentru evidențierea unor particularități de specie.

Parametrii uzuali hematologici pot fi determinați manual sau cu ajutorul analizatoarelor hematologice. Aparatele utilizate pot fi de uz veterinar sau de uz uman, adaptate cu softuri pentru majoritatea speciilor domestice. Cu ajutorul acestor analizoare se pot obține diverși parametri precum numărul de reticulocite, lărgimea distribuției eritrocitare sau volumul trombocitar mediu. Metodele de obținere a valorilor variază în funcție de modelul aparatului și pot include spectrofotometria, realizarea histogramelor și citometrie în flux.

Una dintre limitările analizatoarelor de hematologie este lipsa softurilor pentru diferențierea elementelor figurate ale speciilor cu hematii nucleate (păsări, reptile, amfibieni, pești), la care obținerea unor parametri de rutină se face prin metode manuale, precum cele descrise în acest capitol.

Printre avantajele utilizării unor astfel de aparate pentru obținerea parametrilor hematologici se pot distinge viteza de realizare a testelor, gradul redus al erorii (în condițiile unei calibrări corespunzătoare și a mentenanței permanente) și volumul redus al probei. Odată cu introducerea probei în aparat, toate operațiunile de diluare sau de adăugare a agenților hemolizanți sunt realizate în mod automat.

Recoltarea probelor de sânge

Obiective:

- 1.Descrierea scopului colectării unei probe se sânge
- 2.Definirea termenului de asepsie și stabilirea rolului acesteia în colectarea probelor de sânge
- 3.Descrierea metodelor de recoltare și a materialelor necesare
- 4.Enumerarea locurilor de elecție pentru recoltarea probelor de sânge
- 5.Cunoașterea principalelor tipuri de anticoagulanți
- 6.Calcularea volumului de sânge pentru recoltare

Sângele utilizat pentru determinări hematologice de rutină poate fi recoltat de la nivelul unei vene superficiale (prin puncționarea vasului cu ajutorul unui ac hipodermic) sau de la nivelul capilarelor pielii (cu ajutorul unei lancete). Sângele arterial este necesar pentru realizarea unor investigații particulare.

Probele de sânge pot fi utilizate pentru investigații hematologice (hemoleucogramă, VSH), biochimice (creatinină, colesterol, fosfatază alcalină etc.), morfologice, serologice (dozare anticorpi), imunologice, genetice (teste de paternitate, depistare boli genetice), toxicologice (dozare mercur, cadmiu, methemoglobină) etc.

Materialele necesare pentru obținerea probelor de sânge variază în funcție de metoda și locul recoltării. Indiferent de tipul de sânge recoltat (capilar sau venos), prima etapă este reprezentată de asigurarea asepsiei locale.

Asepsia reprezintă o măsură profilactică și cuprinde un ansamblu de măsuri ce nu permit contaminarea unei plăgi cu agenți

patogeni (bacterii, virusuri etc.). Pentru prevenirea contaminării sunt necesare următoarele măsuri:

1.Utilizarea instrumentarului steril (lancete, ace, seringi, flacoane de recoltare), fiind recomandată utilizarea instrumentelor de unică folosință.

2.Zona din care se face recoltare se va tunde (recomandat dar opțional), după care se folosesc tampoane cu vată hidrofilă și alcool sanitar 70% (2 – 3 tampoane) pentru dezinfecția locală. Dacă este nevoie, zona de elecție se poate spăla inițial cu apă și săpun, însă aplicarea alcoolului trebuie făcută pe pielea uscată.

Atenție!

Recoltarea probelor se face după ce alcoolul de pe piele s-a evaporat, deoarece acțiunea sa este eficientă doar după uscarea completă iar alcoolul poate interfera cu unele determinări (sânge capilar pentru dozarea hemoglobinei sau a glicemiei prin metode rapide).

3.Prevenirea contaminării – odată cu uscarea alcoolului pe zona de elecție, se evită contaminarea locală, fie cu mâna examinatorului, fie cu instrumentarul nesteril. Aceste precauții se mențin până când plaga creată s-a închis.

Locul de recoltare variază în funcție de specie și se poate adapta în funcție de cantitatea de sânge necesară.

Sângele capilar se poate recolta după puncționarea pielii cu ajutorul unei lancete sterile de unică folosință. Puncționarea pielii se poate face la nivelul urechii (câine, pisică), crestei și bărbușelor (găină), vârful cozii (taurine, șoarece), mucoasa bucală (câine) sau vulvă (vacă).

Sângele venos poate fi recoltat prin puncționarea unui vas superficial cu ajutorul acelor hipodermice.

⇒ Câine, pisică și rumegător mic: vena cefalică, vena safenă și vena jugulară.

⇒ Cabaline: vena jugulară, vena cefalică, vena safenă și vena facială.

⇒ Taurine: vena coccigiană și vena jugulară.

⇒ Iepure: vena auriculară laterală (cea mai accesibilă), vena jugulară, vena safenă, vena cefalică și puncție intracardiacă (ca intervenție terminală, sub anestezie profundă).

⇒ Păsări: vena jugulară, vena axilară, vena metatarsiană medială.

⇒ Cobai: vena safenă, vena jugulară (sub anestezie), vena cavă cranială (sub anestezie profundă), puncție intracardiacă (sub anestezie profundă, ca intervenție terminală).

⇒ Șoarece și șobolan – vena submandibulară, vena safenă, vena caudală, vena podală dorsală, vena jugulară, sinusul retro-orbital (sub anestezie profundă, ca intervenție terminală), puncție intracardiacă (sub anestezie profundă, ca intervenție terminală).

Sângele venos se poate recolta prin două metode, respectiv cu ajutorul unei seringi sau prin sistem tip vacutainer.

1. Pentru recoltarea sângelui cu vacutainer, materialele necesare sunt reprezentate de vacutainere, ac și holder

compatibil, garou (opțional). Această metodă este recomandată doar pentru animalele de talie mare și medie și nu este indicată pentru animalele deshidratate sau hipotensive.

2. În medicina veterinară, cel mai frecvent este utilizată recoltarea cu ajutorul unei seringi. Materialele necesare sunt reprezentate de ac hipodermic, seringă, tub recoltare și garou (opțional). Acele și tuburile pentru recoltare sunt clasificate după un cod de culori recunoscut pe plan internațional.

Notă!

În cazul recoltării prin sistem vacutainer, trecerea forțată a sângelui printr-un ac cu diametru mic poate produce hemoliză. Se recomandă utilizarea unui ac de 19 -21G.

Acele utilizate pentru recoltare se vor adapta în funcție de talia animalului. Diametru acestora este exprimat în „gauge”, cu prescurtarea „G” (ex. 16G), dimensiunea fiind corespunzătoare unei culori a amboului. În tabelul 1 au fost exemplificate câteva valori și corespondentul de culoare.

Tuburile de recoltare se aleg în funcție de examenul realizat și de cantitatea de sânge recoltată. Acestea pot fi tuburi de dimensiuni mari cu capacitate de 2 – 5 mL sau microtainere cu volum de 0,5 mL, iar materialul este plastic sau sticlă. Pentru recoltarea unui volum redus de sânge se recomandă utilizarea microtainerelor,

Tabel 1. Exemple de valori ale dimensiunilor acelor hipodermice și corespondentul acestora pentru culoarea amboului

<i>Dimensiunea exterioară a canulei</i>	<i>Valoarea în gauge</i>	<i>Culoarea amboului</i>
0,4 mm	27 G	gri
0,5 mm	25 G	portocaliu
0,7 mm	25 G	Negru
0,8 mm	21 G	Verde
1,1 mm	19 G	Roz
1,6 mm	16 G	alb

deoarece depășirea cantității recomandate de anticoagulant poate modifica aspectul elementelor figurate ale sângelui (aspect important în analiza morfologică a sângelui periferic). Totodată, recipientele de dimensiuni mici prezintă riscuri proprii, deoarece tensiunea superficială și diametrul redus al tubului duc la o amestecare anevoioasă a probei cu anticoagulant.

Pentru analizele de hematologie se pot folosi tuburile cu capac mov și verde. Recipientul cu capac mov poate fi cu sau fără gel separator. Acesta se pretează foarte bine pentru toate speciile de animale domestice, fiind recomandat pentru realizarea hemoleucogramei și pentru analiza morfologică, deoarece nu modifică aspectul hematiilor. Mai poate fi folosit pentru unele teste biochimice, teste genetice și teste moleculare.

Anticoagulantul conținut de aceste tuburi este reprezentat de **EDTA** (acidul etilendiaminotetraacetic), în formă anhidră, dispersată fin pe pereții tubului. Acest anticoagulant are ca mecanism de acțiune, îndepărtarea calciului ionic prin fenomenul de chelatare. EDTA-ul nu este recomandat pentru specii precum struț, emu^{1, 2} sau reptile³, amfibieni⁴ și pești⁵, la care produce hemoliză și modificarea aspectului morfologic al leucocitelor. De asemenea, poate produce psudotrombocitopenie prin inducerea apariției microtrombilor în proba recoltată⁶.

Atenție!

Excesul de EDTA în probă va modifica aspectul tuturor celulelor sangvine – va micșora volumul hematiilor, ceea ce va duce la obținerea unui hematocrit scăzut, iar leucocitele vor prezenta modificări degenerative.

Tubul de recoltare cu capac verde (uneori capac portocaliu pentru microtainere) conține **heparină**. Heparina este o moleculă

care se găsește în mod natural în organism, fiind secretată de către bazofile și mastocite.

Modul de acțiune este dependent de legarea de antitrombina III, complexul format având capacitatea de a inactiva foarte rapid factorii procoagulanti activați precum factorul IX, X, XI și XII. În clinică este utilizat ca tratament pentru prevenirea coagulării intravasculare a sângelui.

Tuburile cu heparină poate fi folosit pentru realizarea hemoleucogramei, însă nu sunt recomandate deoarece pot produce agregarea leucocitară. În ceea ce privește morfologia sangvină, heparina poate duce la apariția unei culori albastrii a hematiilor în frotiu, precum și modificarea aspectului leucocitelor.

Folosirea acestui anticoagulant este recomandat pentru majoritatea testelor biochimice (cu excepția unor parametri precum electroliți sau proteine plasmatic), în special atunci când se dorește obținerea rapidă a rezultatelor (nu se mai așteaptă coagularea sângelui și obținerea serului).

Notă!

Pentru speciile a căror sânge coagulează foarte rapid (șoarece, găină), se recomandă adăugarea unei soluții de anticoagulant în seringă pentru a facilita recoltarea.

Recipientele cu capac albastru sunt utilizate pentru testele de coagulare și conțin **citrat de sodiu** în proporție de 1:9 cu cantitatea de sânge recoltată.

Mecanismul de acțiune se bazează pe precipitarea ionilor de calciu. Citratul este utilizat de asemenea și pentru stocarea sângelui pentru transfuzii.

Citratul de sodiu mai este folosit și pentru recipientele cu capac negru utilizate pentru testul de sedimentare a hematiilor (VSH), dar cu un raport modificat de 1:3 anticoagulant față de proba de sânge recoltată.

Sângele recoltat în recipiente cu citrat de sodiu nu este recomandat pentru realizarea hemoleucogramei deoarece cantitatea mare de anticoagulant va modifica raportul elementelor figurate față de partea lichidă a sângelui, ceea ce duce la obținerea unor valori modificate.

Tubul de recoltare cu capac gri conține **fluorură de sodiu** ca substanță activă, în combinație cu un anticoagulant (EDTA). Fluorura de sodiu inhibă enzimele din reacția glicolică, oprind metabolizarea glucozei de către eritrocite. Acest recipient, deși nu este utilizat foarte frecvent, este recomandat pentru determinarea cantității de glucoză din sânge.

Pentru realizarea examenelor biochimice, serologice și imunologice se folosește ser obținut după centrifugarea unei probe de sânge coagulat (sânge recoltat fără anticoagulant). În acest scop, se pot folosi recipiente cu sau fără factor activator de coagulare și gel de separare. Tipurile principale de tuburi de recoltare, conținutul și utilitatea lor, au fost schematizate în tabelul 2.

Nu sunt admise pentru teste hematologice probele ce conțin coaguli

(chiar și microtrombi) sau probele cu hemoliză. Hemoliza poate fi rezultatul manipulării anevoioase a probei sau a recoltării necorespunzătoare.

În general, este admisă recoltarea unei probe unice de 10% din volumul estimat de sânge. Pentru o valoare peste 10%, este recomandată administrarea unor fluide izotonice pentru rehidratare (3-4 ori volumul recoltat).

Pentru stabilirea volumului estimat de sânge se pot folosi valori tabelare pentru fiecare specie a cantității de sânge per kg, sau se poate calcula știind ca sângele reprezintă 6 – 8% din greutatea corporală.

Ca exemplu, un șoarece cu o greutate corporală de 20g are sânge în proporție de 58,5 mL/kg, adică un volum total estimat de 1,17 mL. Totodată, la un șoarece de 20g, 6% din greutatea corporală este reprezentată de 1,2 mL de sânge. Cantitatea maximă de sânge ce poate fi recoltată fără a produce efecte negative și fără a necesita rehidratare este de 1,2 mL x 0,1 (10% din volumul total estimat de sânge) = 0,12 mL.

Tabel 2. Tipuri de recipiente: conținut și utilizare

Culoare capac	Conținut	Gel de separare	Utilizare
Mov	EDTA	Nu/Da	Teste hematologice, biochimie (limitat), teste genetice, teste moleculare
Verde	Heparină	Nu	Biochimie, teste hematologice (limitat)
Albastru	Citrat de sodiu 1:9	Nu	Teste de coagulare
Negru	Citrat de sodiu 1:3	Nu	Test de sedimentare (VSH)
Gri	Fluorură de sodiu + EDTA	Nu	Dozare glucoză
Galben	Activator de coagulare	Da	Biochimie
Portocaliu	Activator de coagulare	Nu	Serologie
Roșu	-	Nu	Imunologie

Hemoleucograma

Hemoleucograma cuprinde o paletă diversificată de determinări, axate pe descrierea hematiilor, a leucocitelor și a trombocitelor. Determinările pot fi efectuate prin metode manuale sau cu ajutorul analizatoarelor hematologice.

Determinarea numărului de hematii

Obiective:

1. Cunoașterea principiului pe care se bazează determinările de hemocitometrie.
2. Cunoașterea materialelor utilizate și a modului de lucru.
3. Cunoașterea surselor de erori.
4. Explicarea diferențelor pentru tehnica folosită la mamifer și cea de la pasăre.
5. Interpretarea valorilor de referință și cunoașterea scopului acestei determinări.

Determinarea numărului de hematii cu ajutorul analizatoarelor hematologice utilizează tehnologie de măsurare a impedanței prin metoda volumetrică. Practic, aparatul înregistrează schimbarea voltajului odată cu trecerea celulelor printr-un electrod.

Hemocitometria reprezintă o metodă de determinare a numărului de celule dintr-o probă de sânge, astfel, hematiile, leucocitele și plachetele sangvine vor fi numărate separat.

Principiu:

Deoarece numărul de hematii este foarte mare (de ordinul a milioane pe milimetru cub de sânge), numărarea acestora chiar și cu ajutorul unui microscop este foarte dificilă. Pentru a compensa acest obstacol, proba de sânge poate fi diluată cu un volum cunoscut de soluție pentru a

permite identificarea clară a elementelor figurate și pentru a permite stabilirea numărului.

Proba de sânge este diluată cu ajutorul unei pipete speciale, amestecul rezultat fiind apoi distribuit într-un spațiu cu volum cunoscut, aflat între o lamelă și camera de numărare.

Unitate de măsură:

Rezultatul obținut se măsoară în milioane de hematii pe milimetru cub de sânge (mm^3 , μL). În sistemul internațional, exprimarea numărului de hematii se face raportat la litru, dar pot fi întâlnite diverse tipuri de exprimări în funcție de aparatul utilizat pentru realizarea determinării sau sursa de literatură consultată.

Astfel, pentru un câine cu 8,2 milioane de hematii pe milimetru cub de sânge, exprimarea poate fi: $8,2 \times 10^6/\text{mm}^3$; $8,2 \times 10^{12}/\text{L}$; $8,2 \times 10^6/\mu\text{L}$; $8,2 \text{ M}/\mu\text{L}$; $8,2 \times 10^6/\text{mmc}$, $8,2 \times 10^6/\text{mcl}$.

Materiale necesare:

Setul de hemocitometrie este format din:

1. Pipeta de diluție (Potain)
2. Camera de numărare
3. Lamele
4. Lichid de diluție
5. Materiale auxiliare: sticlă de ceas, vată hidrofilă, alcool sanitar, lancetă pentru recoltarea sângelui sau sânge recoltat anterior (cu un anticoagulant ce nu modifică volumul probei – ex. EDTA).

Pipeta de diluție

Este o pipetă fabricată din sticlă, cu un capilar subțire și o dilatație ce conține o bilă din sticlă de culoare roșie. Pipeta Potain și componentele sale au fost schematizate în figura 1.

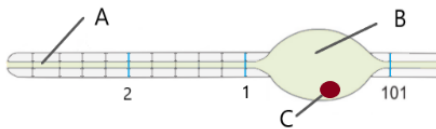


Fig. 1 Pipetă Potain pentru numărarea hematiilor. A: tub capilar, B: dilatație, C: bilă de sticlă de culoare roșie.

Pipeta Potain este alcătuită dintr-un tub capilar, cu vârf conic în partea terminală. Capilarul pipetei prezintă diviziuni marcate, cu diferențe în funcție de pipetă, putând fi întâlnite doar două diviziuni (0,5 și 1) sau mai multe diviziuni (5, 4, 3, 2, 1). Bulbul sau dilatația pipetei acționează ca un rezervor de stocare și amestecare a probei de sânge cu lichidul de diluție. Bila de sticlă din interiorul dilatației ajută la amestecare soluției dar și la identificarea pipetei (culoare roșie pentru hematii și albă pentru leucocite).

Al treilea component al pipetei este tubul de cauciuc și piesa bucală. După dilatație, este prezentă o ală porțiune îngustă (unde se observă o nouă demarcație – 101), de care se atașează tubul de cauciuc, care se recomandă a fi de o lungime de aproximativ 20 cm pentru a permite umplerea pipetei prin aspirație ușoară și totodată observarea gradațiilor. Piesa bucală este obișnuit de culoare roșie pentru hematii și albă pentru leucocite.

Atenție!

Înainte și după utilizarea pipetei se va dezinfecta piesa bucală cu alcool sanitar.

Lichidul de diluție va fi diferit în funcție de specia examinată. Pentru mamifere se folosește lichidul Marcano, care menține integritatea structurală a hematiilor și produce liza celulelor nucleate și a trombocitelor. La pasăre, lichidul de diluție folosit este reprezentat de soluția Natt – Herrick, care păstrează integritatea

structurală a tuturor elementelor figurate, prin urmare poate fi utilizat atât pentru numărarea hematiilor cât și a leucocitelor.

Camera de numărat

Este confecționată dintr-o bucată unică de sticlă, cu șanțuri gravate în profunzime ce delimitează o zonă centrală denumită „platou”. Această platformă centrală este mai joasă cu 0,1 mm față de pilonii laterali. Platoul este la rândul său străbătut transversal de un șanț ce îl împarte în două zone egale pe care se poate observa câte o rețea, după cum este ilustrat în figura 2 .

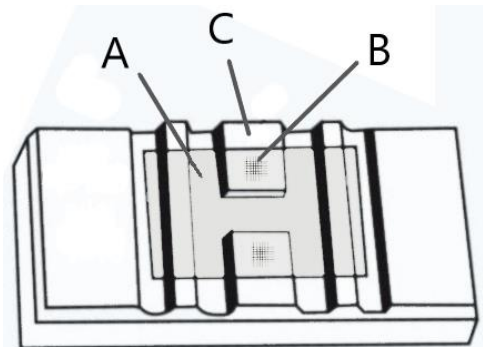


Fig. 2 Cameră de numărat: A. lamelă, B. Rețea, C. Locul unde se depune picătura de sânge diluat.

Pilonii laterali au rolul de a susține lamela care odată dispusă la suprafața camerei de numărat, va acoperi rețeaua și va crea un spațiu cu înălțimea de 0,1 mm în care va difuza sângele diluat, după cum este ilustrat în figura 3 .

Rețeaua hemocitometrului

Rețeaua este divizată în 9 pătrate mari, fiecare cu suprafața de 1 mm², după cum se poate observa în figura 4. Dintre aceste 9 pătrate mari, cele 4 corespunzătoare colțurilor sunt divizate fiecare în câte 16 pătrate medii cu o suprafață de 1/16 mm²

(latură de $\frac{1}{4}$ mm). Aceste 4 pătrate din colțuri sunt utilizate pentru numărarea leucocitelor.

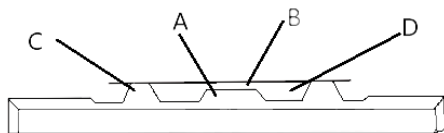


Fig. 3 Camera de numărat: A. Platforma centrală ce conține rețeaua, B. Spațiul dintre platforma centrală și lamelă cu înălțimea de 0,1 mm, C. Pilon lateral pe care se sprijină lamela, D. Șanț în care se scurge excesul de lichid.

Pentru numărarea hematiilor este utilizat pătratul mare central. Acesta este prevăzut cu numeroase diviziuni ce îl delimitează în 25 sau 16 pătrate medii (în funcție de tipul camerei de numărat) separate unul de celălalt prin două sau trei linii paralele. Aceste pătrate medii sunt la rândul lor divizate în câte 16 pătrate mici, fiecare cu o suprafață de $1/400$ mm².

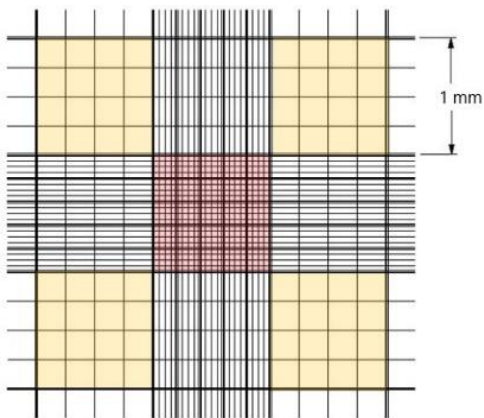


Fig. 4 Rețeaua unui hemocitometru, cu 9 pătrate mari cu latura de 1 mm. În pătratele galbene se vor număra leucocitele iar în pătratul roșu se numără hematiile.

Mod de lucru:

Pregătirea setului pentru hemocitometrie reprezintă primul pas, astfel încât, tot instrumentarul trebuie să fie la îndemâna utilizatorului. Se toarnă lichid de diluție în sticla de ceas apoi se pregătește proba de sânge, care poate fi recoltat pe anticoagulant sau poate fi proaspăt, recoltat prin puncție capilară.

Se fixează piesa bucală și se orientează pipeta astfel încât gradațiile pot fi vizualizate cu ușurință. Vârful pipetei se pune în contact cu sângele (o picătură mare dispusă pe o lamă sau în contact direct cu sângele din plagă) și se orientează la un unghi de aproximativ 40 de grade. Se aspiră sângele până la diviziunea 2 sau 0,5 în funcție de modelul pipetei.

Atenție!

Dimensiunea picăturii trebuie să fie suficient de mare, dacă vârful pipetei nu se menține în contact permanent, se poate aspira aer, ceea ce reprezintă o eroare de tehnică și necesită evacuarea sângelui și reluarea determinării.

După aspirarea sângelui, vârful pipetei se curăță cu ajutorul unui tampon de pânză, fără a atinge deschiderea de la vârful pipetei. Pentru ajustarea cantității de sânge din pipetă, se poate șterge de câteva ori vârful pipetei de suprafața palmei sau de o bucată de hârtie până când coloana de sânge coboară la diviziunea 2 sau 0,5 în funcție de modelul pipetei.

Apoi, pipeta se menține în poziție aproape verticală și se aspiră lichidul de diluție până la diviziunea 101 aflată deasupra dilatației. Diluarea sângelui nu trebuie realizată rapid pentru a împiedica coagularea acestuia în tubul capilar.

După aspirare, pipeta se menține în poziție orizontală, se prinde de la ambele capete între degetul mare și degetul arătător și se înclină ușor timp de 2-3 minute

pentru a facilita amestecarea cu lichidul de diluție. Pipeta se menține în poziție orizontală pe masa de lucru și se prinde imaginea rețelei.

Rețeaua se examinează cu un obiectiv mic (10x) pentru alegerea zonei pentru examinare (fixarea pătratului central), apoi se poate utiliza un obiectiv mai mare (20x). Dacă zona de lucru nu prezintă artefacte (ex. praf), se poate aplica lamela pe suprafața camerei de numărare (sprijinită pe cei doi piloni laterali și acoperind rețelele din zona centrală).

Pipeta se mai înclină de câteva ori pentru a asigura omogenizarea elementelor figurate din diluție, apoi vor fi evacuate pe un tampon de tifon primele 2-3 picături ce conțin doar lichid de diluție.

Notă!

Pipetele de diluție pentru hematii pot fi folosite pentru determinarea numărului de leucocite (atunci când acestea sunt foarte numeroase – ex. leucemie), trombocite și spermatozoizi.

Menținând pipeta la un unghi de 45 de grade, se poziționează vârful pipetei pe suprafața platformei centrale, foarte aproape de marginea lamelei. După exprimarea picăturii, aceasta va difuza sub lamelă prin fenomenul de capilaritate și va acoperi suprafața rețelei. Dacă picătura este prea mare, excesul de lichid se va scurge în șanțurile laterale. Dacă picătura a fost prea mică și nu a fost acoperită suprafața rețelei, este necesară curățarea camerei de numărat și adăugarea unei noi picături. Uneori pot apărea bule de aer dacă pe suprafața rețelei sau a lamelei sunt prezente molecule de grăsime (de exemplu după atingerea acestora cu degetul).

După aplicarea lichidului de diluție se așteaptă 2-3 minute pentru liniștirea curenților din fluid, apoi poate fi realizată numărarea.

Pentru stabilirea numărului de hematii se vor alege aleatoriu 5 pătrate medii cu câte 16 pătrate mici, numărându-se în final hematii în 80 de pătrate cu suprafața de $1/400 \text{ mm}^2$. Modul de numărare este ilustrat în figura 5.

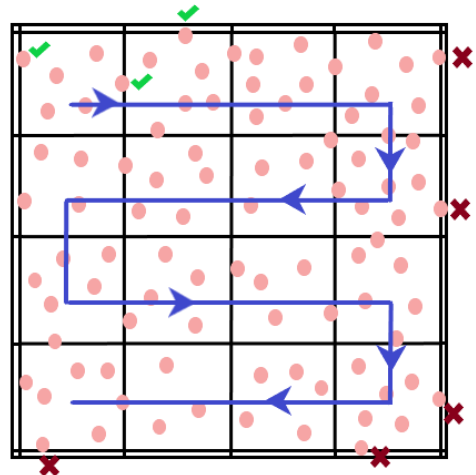


Fig. 5 Pătrat mediu cu 16 pătrate cu suprafața de $1/400 \text{ mm}^2$. Săgețile mov indică direcția de numărare.

Se numără fără pauză hematiile din câte un pătrat mediu, precum cel ilustrat în figura de mai sus. Se începe cu pătratul mic din colțul din stânga sus și se numără hematiile din interiorul pătratului, cele de pe latura stângă și cele de pe latura superioară, apoi se trece la pătratul următor. La final, nu vor fi numărate hematiile dispuse pe latura dreaptă și pe latura inferioară a pătratului mediu, însă numărul acestora este considerat a fi neglijabil (nu modifică rezultatul final).

După finalizarea numărării, camera de numărat se spală, se usucă cu un material hidrofili (de preferat bumbac fin – să nu lase resturi de fibre pe camera de numărat și să nu zgârie sticla), apoi se degresează cu alcool și se așază în suportul de plastic. Se evacuează conținutul pipetei, apoi se spală cu apă distilată, apoi cu alcool și acetonă.

Metoda de calcul

Pentru obținerea numărului de hematii se utilizează următoarea formulă:

$$\text{Nr. hematii} = \frac{X}{80} : S : \hat{I} : D, \text{ unde}$$

⇒ X reprezintă numărul de hematii numărate în cele 5 pătrate medii a câte 16 pătrate mici.

⇒ S reprezintă suprafața unui pătrat mic, respectiv $1/400 \text{ mm}^2$.

⇒ \hat{I} reprezintă înălțimea coloanei de lichid (distanța dintre camera de numărat și lamelă), respectiv 0,1 mm.

⇒ D reprezintă diluția utilizată (pentru aspirarea sângelui la diviziunea 2 sau 0,5, diluția este de 1/200, pentru aspirarea sângelui la diviziunea 1, diluția este de 1/100).

$$\text{Nr. hematii} = \frac{X}{80} \times 400 \times 10 \times 200$$

$$\text{Nr. hematii} = X \times 10000$$

Determinarea numărului de hematii la pasăre

Pentru păsări, determinarea numărului de hematii se realizează utilizând tehnica

Tabel 3. Valori de referință pentru numărul de hematii și dimensiunea hematiilor pentru speciile de animale domestice și de laborator

Specia	Numărul de hematii ($\times 10^6/\text{mm}^3$ de sânge)	Dimensiunea medie a hematiilor (μm)
<i>Câine</i>	5,5 – 8,5	7
<i>Pisică</i>	5 – 11	5,5 – 6,3
<i>Cal</i>	6 – 13	5 – 6
<i>Ponei</i>	4,7 – 9,4	-
<i>Măgar</i>	4,7 – 9	-
<i>Vacă</i>	4,9 – 7,5	5 – 6
<i>Oaie</i>	9 – 15	4,5
<i>Capră</i>	8 – 18	2,5 – 3,9
<i>Porc</i>	5 – 8	6
<i>Găină</i>	2,5 – 3,5	12 x 6
<i>Șobolan</i>	7 – 10	5,7 – 7
<i>Șoarece</i>	9 – 10,6	5 - 7

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷

descrișă pentru mamifere. Deosebiriile sunt legate de lichidul de diluție (Natt Herrick) și faptul că pe rețea se observă atât hematii cât și leucocite și trombocite, fiind necesară diferențierea pentru o numărare corespunzătoare. Se păstrează formula de calcul.

Surse de erori

Erorile posibile sunt numeroase și pot fi legate de umplerea necorespunzătoare a pipetei (modificarea diluției), umplerea necorespunzătoare a camerei de numărat (modificarea volumului de lichid dintre cameră și lamelă) și erori de numărare.

Erorile pot produce o variație a numărului de hematii de până la 10 – 15%, chiar mai mult pentru un examinator fără experiență.

Interval de referință

Numărul de hematii variază destul de mult la speciile domestice, diferențele observate putând fi corelate pozitiv cu dimensiunile hematiilor, observându-se astfel un număr mai mare de hematii la speciile cu dimensiuni celulare reduse și un număr de hematii mai mic la speciile cu hematii de

dimensiuni mari. Intervalele de referință au fost înscrise în tabelul 3.

Determinarea numărului de hematii are o relevanță clinică deosebită pentru aprecierea stării de sănătate a animalelor. Numărul de hematii scade în anemii și crește în policitemie sau poate avea valori fals crescute în deshidratare.

Determinarea cantității de hemoglobină

Obiective:

1. Stabilirea relevanței acestei determinări
2. Realizarea estimării valorii hemoglobinei prin metoda Gowers – Sahli și cunoașterea principiului determinării
3. Explicarea surselor de erori
4. Cunoașterea metodelor exacte pentru determinarea cantității de hemoglobină

Hemoglobina este o cromoproteină întâlnită în interiorul hematiilor, cu rol în transportul gazelor respiratorii. Determinarea valorii hemoglobinei face parte din hemoleucograma de bază și este un parametru ce suferă modificări în numeroase afecțiuni precum anemii, boli nutriționale și inflamații cronice.

Valoarea hemoglobinei dintr-o probă de sânge poate fi estimată prin metode colorimetrice. Cele mai cunoscute fiind metoda Haldane (bazată pe abilitatea hemoglobinei de a lega monoxid de carbon), Tallqvist (necesită o picătură de sânge pe hârtie de filtru și compararea culorii cu o scală standardizată de culori), metoda Lovibond – Drabkin și variațiile sale (măsoară cantitatea de cianmethemoglobină și compară culoarea cu un etalon) și Sahli.

Principiu:

Metoda Sahli se folosește pentru estimarea cantității de hemoglobină dintr-un volum cunoscut de sânge, prin diluarea cu acid clorhidric și compararea cu un etalon de culoare. Exprimarea cantității de hemoglobină se face în g%, dar unitatea de măsură folosită în mod curent este g/dL.

Materiale necesare:

1. *Stativ cu etalon* – Suport din material plastic pentru eprubeta hemoglobinometrului și două bare din sticlă colorată pentru compararea culorii din eprubetă. Stativul este schematizat în figura 6.

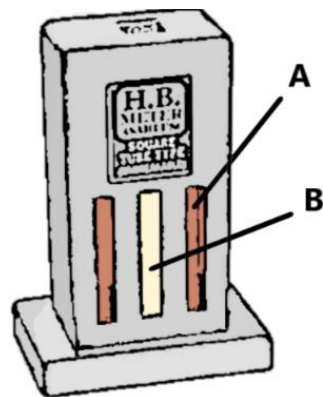


Fig. 6 Suportul hemoglobinometrului Sahli: A. Bară etalon din sticlă colorată; B. Spațiu pentru examinarea conținutului eprubetei.

2. *Eprubetă gradată* – cu gradații în g% (2 - 24 g%) în culoare galbenă și în % (20 – 160%) în culoare roșie.
3. *Pipetă pentru hemoglobină* – este formată dintr-un tub capilar fără dilatații, cu o gradație unică la 0,02 mL. Pipeta de sticlă este prevăzută cu un tub flexibil de cauciuc și o piesă bucală. Pipeta este schematizată în figura 7.

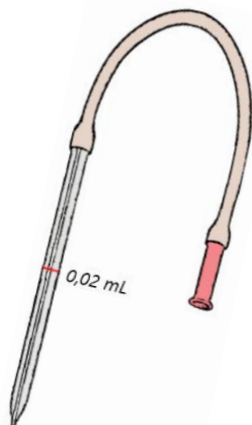


Fig. 7 Pipetă pentru hemoglobinometru Sahli.

4. *Baghetă de sticlă* – utilizată pentru omogenizarea conținutului eprubetei.
5. *Pipete Pasteur* – pentru acidul clorhidric și apă distilată.
6. *Apă distilată*
7. *Acid clorhidric* – soluție N/10 (0,1 N)
8. *Probă de sânge* – poate fi utilizată sânge proaspăt, recoltat prin puncție capilară sau poate fi utilizat sânge recoltat pe anticoagulant (care nu modifică volumul probei – ex. heparină sau EDTA).
9. *Alte materiale* – vată hidrofiliă, alcool sanitar, material din pânză sau bumbac, lancetă (pentru recoltarea sângelui prin puncție capilară).

Mod de lucru

Utilizând o pipetă Pasteur, se introduce HCl în eprubeta hemoglobinometrului până la gradația galbenă de 3 g%, sau gradația roșie de 20% (aproximativ 10 picături de HCl).

Se dezinfectează piesa bucală a pipetei hemoglobinometrului cu alcool sanitar și se aspiră sânge până la gradația indicată pe capilar (0,02 mL). Se vor îndepărta urmele de sânge de la exteriorul pipetei prin ștergerea acesteia cu un material textil –

fără a atinge vârful pipetei (poate modifica cantitatea de sânge din capilar).

Atenție!

Sângele rămas pe exteriorul pipetei va modifica semnificativ cantitatea probei (pentru această determinare este necesar un volum fix de sânge – 0,02 mL)

Se imersează vârful pipetei în soluția de acid din eprubetă și se evacuează sângele. Se aspiră și se evacuează conținutul de 3 – 4 ori pentru a goli complet conținutul eprubetei. Pipeta se retrage prin menținerea în contact cu peretele eprubetei pentru a nu permite îndepărtarea unei cantități semnificative de soluție (fenomenul de adeziune).

Conținutul eprubetei se omogenizează cu ajutorul baghetei din sticlă prin mișcări de rotație și retragere.

Eprubeta se așază în stativul etalon și se lasă 6 – 8 minute în repaus, timp în care acidul clorhidric produce hemoliză și convertește hemoglobina în hematină acidă de culoare brună aurie.

Se scoate eprubeta din stativ și se adaugă apă distilată picătură cu picătură, omogenizând constant cu bagheta de sticlă. După fiecare cantitate de apă distilată adăugată, eprubeta se așază din nou în stativ pentru compararea cu barele etalon.

Notă!

Pentru examinarea culorii, se îndepărtează bagheta din eprubetă deoarece prezența acesteia poate face ca soluția de hemoglobină să pară mai deschisă la culoare.

Stativul etalon se menține la nivelul ochilor în dreptul unei surse de lumină (de obicei, stativul prezintă o placă albă semitransparentă în partea din spate pentru a permite filtrarea omogenă a sursei de lumină).

Dacă culoarea din interiorul eprubetei este aceeași cu cea a etalonului, eprubeta se scoate din stativ și se citește nivelul lichidului (la meniscul inferior) pe scala gradată galbenă, cu exprimare în g%.

Surse de erori

Majoritatea erorilor sunt de natură tehnică, fie o cantitate necorespunzătoare de sânge (nu s-au aspirat fix 0,02 mL, nu s-a curățat exteriorul pipetei, nu s-a evacuat toată cantitatea de sânge din pipetă), nerespectarea timpilor (sub 6 minute, nu se formează o cantitate suficientă de hematină acidă și peste 10 minute, culoarea poate să scadă în intensitate), modificarea în timp a culorii barelor etalon.

O altă sursă de eroare poate fi de natură personală, mai exact de modul în care fiecare examinator percepe culoarea probei în raport cu etalonul.

Erorile de determinare pot modifica valoarea hemoglobinei cu 10 -15 %. Aceste erori pot fi reduse la 5% prin aplicarea unei corecții. Se va face media a trei citiri pe aceeași probă, după cum urmează:

- ⇒ Când culoarea este ușor mai închisă decât cea a etalonului (dar foarte apropiată)
- ⇒ Când culoarea este identică cu cea a etalonului
- ⇒ Când culoarea este ușor mai deschisă decât cea a etalonului.

Metode moderne

Determinarea valorii hemoglobinei se determină obișnuit ca parte integrată a hemoleucogramei.

Proprietatea hemoglobinei de a refracta anumite lungimi de undă de lumină face posibilă dozarea acesteia prin metode de spectrofotometrie. Multe modele de analizoare hematologice au ca tehnică producerea folosirea unor compuși precum fericianura de potasiu pentru a converti toate tipurile de hemoglobină întâlnite în mod normal în sânge (oxihemoglobină,

hemoglobină redusă, carboxihemoglobină și methemoglobină) într-un compus stabil (cianmethemoglobină) ce poate fi determinat prin analiză spectrofotometrică. Prin comparație, metoda Sahli oferă o estimare doar a oxihemoglobinei și a hemoglobinei reduse (carboxihemoglobină și methemoglobina nu sunt estimate).

Datorită deșeurilor toxice, aparatele de hematologie de generații noi, nu mai utilizează cianuri pentru identificare, ci folosesc compuși pe bază de sulf pentru a produce derivați stabili de hemoglobină ce pot fi analizați prin metoda colorimetrică (spectrofotometrie).

Interval de referință

Cantitatea de hemoglobină are valori apropiate pentru majoritatea speciilor de animale domestice. Valorile au fost înscrise în tabelul 4. Cantitatea de hemoglobină crește în condiții de hipoxie și policitemie și va fi scăzută în anemii, inflamații cronice, carențe etc.

Tabel 4. Interval de referință pentru valoarea hemoglobinei

Specia	Interval de referință (g/dL)
<i>Câine</i>	12 - 18
<i>Pisică</i>	8 - 15
<i>Cal</i>	11 - 19
<i>Măgar</i>	9,5 - 16,5
<i>Vacă</i>	8,4 - 12
<i>Oaie</i>	9 - 15
<i>Capră</i>	8 - 12
<i>Porc</i>	10 - 16
<i>Găină</i>	7 - 13
<i>Șobolan</i>	13,7 - 17,6
<i>Șoarece</i>	13,3 - 15,4
<i>Elefant</i>	9,6 - 15,3

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷

Determinarea Hematocritului

Obiective:

1. Definierea hematocritului și stabilirea importanței clinice
2. Stabilirea metodelor de determinare
3. Identificarea unor situații fiziologice și patologice de modificare a acestui parametru

Hematocritul reprezintă exprimarea procentuală a cantității de hematii dintr-un volum de sânge. Modificarea numărului de hematii sau a cantității de plasmă (uneori chiar și a numărului de leucocite) va avea un efect direct asupra acestui parametru.

Hematocritul este exprimat procentual (%) și poate fi întâlnit în literatură sau în hemoleucogramă cu prescurtările: Ht, Hct sau PCV (packed cell volume – volumul de celule aglomerate).

Atenție!

Determinarea hematocritului se realizează numai cu probe de sânge recoltate pe anticoagulant (EDTA sau heparină pentru că nu modifică volumul probei).

Metode de determinare

1. *Analizator hematologic* – obținerea unei valori pentru hematocrit ca parte a hemoleucogramei cu parametri de bază.
2. *Metoda centrifugării în tuburi de microhematocrit* – presupune folosirea unor tuburi cu capilar îngust (tuburi de microhematocrit). Tuburile pot fi cu sau fără anticoagulant. Tubul se pune în contact cu picătura de sânge iar umplerea acestuia se va face prin capilaritate odată cu inclinarea tubului. Folosind un material pliabil precum plastilina, se vor obtura capetele tubului, după care acesta este introdus într-o centrifugă pentru tuburi de microhematocrit.

Proba se centrifughează la 2500 rpm (rotații pe minut) timp de 10 minute. După centrifugare se va observa depunerea celulelor în partea inferioară a tubului, ce va avea o culoare roșie și separarea plasmei în partea superioară a tubului, care va avea o culoare galben pal.

Pentru aprecierea hematocritului, tubul este comparat cu o scală etalon, după cum este indicat în figura 8. Coloana de sânge (alcătuită din elemente figurate și plasmă) este așezată astfel încât să cuprindă în totalitate scala (capătul inferior la 0 și capătul superior la 100). Linia corespunzătoare limitei dintre plasmă și elemente figurate este considerată ca fiind valoarea hematocritului.

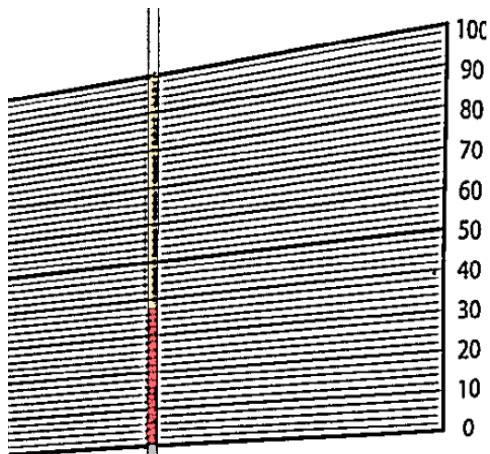


Fig. 8. Schema de citire a hematocritului în tuburi de microhematocrit (în imagine, valoarea citită este de 38%)

3. *Metoda centrifugării în eprubete pentru hematocrit* – se pretează pentru cantități mai mari de sânge și are avantajul citirii rezultatului direct pe scala gradată a eprubetei.

Sângele recoltat pe anticoagulant este aspirat într-o seringă cu ac lung și introdusă în eprubeta pentru hematocrit. Vârful acului trebuie să atingă fundul eprubetei. Se apasă

ușor pistonul seringii, iar acul se retrage pe măsura umplerii eprubetei. Sângele trebuie să ajungă la diviziunea 100 a eprubetei iar proba nu trebuie să conțină goluri de aer.

Eprubeta se centrifughează la 3000 rpm 10 minut, după care se examinează prin citirea scalei gradate.

În situația în care eprubetele nu sunt gradate, hematocritul poate fi calculat folosind o riglă. Se măsoară înălțimea coloanei de sânge (plasmă +elemente figurate) și înălțimea coloanei de elemente figurate și se aplică următoarea formulă:

$$\frac{\text{Înălțime elemente figurate}}{\text{Înălțime coloană de sânge}} \times 100$$

4. *Metode rapide* – hemoglobinometrul folosește strip-uri de unică folosință și oferă valori pentru hemoglobină și hematocrit.

Modificarea hematocritului

Elementele figurate ale sângelui sunt reprezentate de hematii, trombocite și leucocite. Cele mai numeroase sunt hematiile, astfel că din coloana de sediment obținut prin centrifugare, trombocitele și leucocitele se pot observa ca o linie de delimitare între hematii și plasmă, după cum este ilustrat în figura 9.

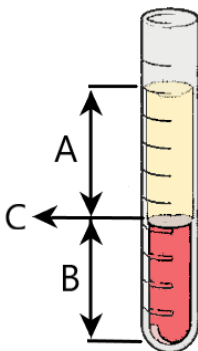


Fig. 9. Probă de sânge centrifugată: A. plasmă, B. Hematii, C. trombocite și leucocite.

Prin centrifugare, nu se poate exprima toată plasma aflată între hematii, aceasta însumând aproximativ 2% din valoarea coloanei de elemente figurate. Hematocritul real se poate calcula prin înmulțirea valorii citite cu 0,98.

Sângele venos are un hematocrit mai mare decât cel al sângelui arterial. Modificarea pH-ului de la 7,41 în sângele arterial la 7,37 în sângele venos face ca hematiile să crească ușor în volum prin absorbția apei.

Intervalele de valori pentru speciile de animale domestice și de laborator au fost înscrise în tabelul 5.

Tabel 5. Valori ale intervalelor de referință pentru hematocrit

Specie	Interval de referință (%)
<i>Câine</i>	37 – 55
<i>Pisică</i>	24 – 46
<i>Cal</i>	32 – 53
<i>Măgar</i>	28 – 47
<i>Vacă</i>	21 – 30
<i>Oaie</i>	27 – 45
<i>Capră</i>	22 – 38
<i>Porc</i>	32 – 50
<i>Găină</i>	22 – 35
<i>Șobolan</i>	38 – 52
<i>Șoarece</i>	46 - 55

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷

Creșterea hematocritului poate fi legată de creșterea numărului de celule – policitemie (nou-născuți, animale crescute la altitudini mari), hipoxie etc. O altă cauză este legată de scăderea cantității de apă din plasmă – deshidratare, arsuri etc.

Scăderea hematocritului este întâlnită în stările de hiperhidratare, gestație (hemodiluție) precum și toate tipurile de anemii.

Un alt motiv pentru modificarea hematocritului este legat de anticoagulantul

utilizat. Citratul de sodiu este un anticoagulant sub formă lichidă, iar utilizarea sa va crește cantitatea de lichid a probei, ceea ce va duce la scăderea falsă a valorii hemoglobinei. Totodată, utilizarea unui cantități prea mari de EDTA (prin nerespectarea limitei de umplere a tubului de recoltare, de exemplu) va duce la micșorarea hematiilor și scăderea hematocritului.

Calcularea parametrilor eritrocitari derivați

Obiective:

1. Definirea parametrilor eritrocitari derivați
2. Cunoașterea formulelor de calcul
3. Stabilirea importanței indicilor în descrierea tipurilor de anemii

Valorile hematocritului, a cantității de hemoglobină sau a numărului de hematii nu oferă examinatorului informații legate de aspectul individual al hematiilor. Pentru a caracteriza în mod corespunzător un tip de anemie, sunt necesare informații legate de volumul hematiilor, cantitatea de hemoglobină din interiorul acestora, precum și procentul de saturație cu hemoglobină a hematiilor, valori obținute prin calcularea parametrilor eritrocitari derivați sau a indicilor eritrocitari.

Volumul eritrocitar mediu (VEM)

Întâlnit în practică și în literatură sub prescurtarea din limba engleză – MCV (mean cell volume), reprezintă dimensiunea medie a unei hematii.

Acest parametru este calculat pe baza valorii hematocritului și a numărului de hematii, prin următoarea formulă:

$$VEM = \frac{Ht \times 10}{Nr. hematii}$$

Unde:

⇒ Ht reprezintă valoarea hematocritului,
 ⇒ Nr. hematii reprezintă numărul de hematii/mm³ de sânge, folosindu-se doar cifra milioanei.

Ex.

Pentru un hematocrit de 45% și un număr de hematii de 7,8 M/μL:

$$VEM = \frac{45 \times 10}{7,8} = 57,69$$

Volumul eritrocitar mediu are ca unitate de măsură μm³, prin urmare, în exemplul anterior, VEM are o valoare de 57,69 μm³. O altă exprimare posibilă a acestei valori este în femtolitri, astfel valoarea VEM va fi de 57,69 fL.

Acest parametru este foarte util în caracterizarea anemiilor. Se pot deosebi astfel anemii normocitare (anemia posthemoragică acută), când volumul hematiilor nu este afectat, anemii microcitare (ex: anemia feriprivă, anemia hemolitică mediată imun) cu un volum redus al hematiilor și anemii macrocitare (anemia megaloblastică) cu o creștere a volumului mediu al hematiilor.

Hemoglobina eritocitară medie (HEM)

Poate fi întâlnit și cu prescurtarea din limba engleză MCH (mean corpuscular hemoglobin sau mean cell hemoglobin) și reprezintă conținutul mediu în hemoglobină a unei hematii.

Se poate calcula pe baza cantității de hemoglobină și a numărului de hematii prin următoarea formulă:

$$HEM = \frac{Hb \times 10}{Nr. hematii}$$

Unde:

⇒ Hb reprezintă valoarea hemoglobinei (g/dL),

⇒ Nr. hematii reprezintă numărul de hematii/mm³ de sânge, folosind doar cifra milioanei pentru calcul.

Ex.

Pentru o valoare a hemoglobinei de 12,7 g/dL și un număr de hematii de 7,8 M/μL:

$$HEM = \frac{12,7 \times 10}{7,8} = 16,28$$

Cantitatea de hemoglobină eritocitară medie se exprimă în picograme, astfel, în exemplul anterior, valoarea HEM este de 16,28 pg.

Modificarea hemoglobinei eritocitare medii indică o perturbare a încărcării hematiei cu hemoglobină, practic o creștere sau scădere a cantității de hemoglobină din interiorul hematiilor. Această valoare poate fi crescută (anemia megaloblastică) sau poate fi scăzută (anemia feriprivă). Acest parametru se corelează pentru interpretare cu concentrația de hemoglobină eritocitară medie.

Concentrația de hemoglobină eritocitară medie (CHEM)

Întâlnit în practică și în literaturi cu prescurtarea din limba engleză – MCHC (mean corpuscular hemoglobin concentration sau mean cell hemoglobin concentration), reprezintă corelația dintre volumul hematiilor și gradul sau procentul de încărcare cu hemoglobină a acestora, altfel spus, cât la sută dintr-o hematie este reprezentat de hemoglobină.

Acest indice se poate calcula pe baza valorii hemoglobinei și a hematocritului, cu următoarea formulă:

$$CHEM = \frac{Hb}{Ht} \times 100$$

Unde:

⇒ Hb reprezintă valoarea hemoglobinei (g/dL),

⇒ Ht reprezintă valoarea hematocritului (%).

Ex.

Pentru o valoare a hemoglobinei de 12,7 g/dL și o valoare a hematocritului de 45%:

Tabel 6. Valori de referință pentru volumul eritocitar mediu, hemoglobina eritocitară medie și concentrația de hemoglobină eritocitară medie.

Specia	VEM (μm ³ , fL)	HEM (pg)	CHEM (% , g/dL)
Câine	60 – 77	21 – 32	32 – 36
Pisică	37 – 55	13,5 – 23	26 – 36
Cal	37 – 59	12 – 20	31 - 40
Măgar	46 – 67	16 – 23	32 – 36
Vacă	36 – 50	14 – 19	38 – 43
Oaie	28 – 40	8 – 12	31 – 34
Capră	16 – 25	5 – 8	30 – 36
Porc	50 – 68	17 – 21	30 – 34
Găină	90 – 140	33 – 47	26 – 35
Șobolan	48 – 58	17 – 20	28 – 33
Șoarece	48 - 59	13 - 16	27 – 31

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷.

$$CHEM = \frac{12,7}{45} \times 100 = 28,2 \%$$

Concentrația se exprimă obișnuit în procente (%), dar valoarea CHEM mai poate fi exprimată în g/dL, astfel, în exemplul anterior, valoarea CHEM este de 28,2 g/dL.

Concentrația de hemoglobină eritrocitară medie este utilă pentru caracterizarea tipurilor de anemii. Se pot întâlni anemii normocrome, cu o concentrație normală de hemoglobină, hipocrome precum anemia feriprivă, când nu există cantități suficiente de hemoglobină în hematie (terminația - crom sugerează o modificare a culorii hematiilor deoarece intensitatea culorii este direct proporțională cu gradul de încărcare cu hemoglobină) și anemii hipercome când valoarea concentrației de hemoglobină este crescută (asociată obișnuit cu prezența hemolizei în probă – hemoglobină liberă în plasmă – secundară anemiilor hemolitice).

Valorile de referință pentru speciile de animale domestice și de laborator au fost înscrise în tabelul 6.

Determinarea acestor indici are o importanță majoră pentru caracterizarea tipurilor de anemie însă orice modificare ar trebui verificată și prin examinarea frotiului din sânge periferic pentru o confirmare a prezenței hematiilor cu modificări de culoare sau de volum.

Erorile apărute în determinarea valorilor pentru numărul de hematii, hematocrit și hemoglobină (precum cele întâlnite la metodele manuale de determinare) vor modifica în mod fals și valorile indicilor eritrocitari derivați.

Determinarea numărului de reticulocite și a lărgimii de distribuție eritrocitară

Obiective:

1. Definirea termenilor de reticulocite și lărgimea distribuției eritrocitare
2. Stabilirea metodelor de determinare
3. Cunoașterea importanței clinice a modificării acestor parametri

Reticulocitele sunt hematii imature ce au în citoplasmă cantități semnificative de ARN (acid ribonucleic) ribozomal și mitocondrial. Acest parametru nu face parte din hemoleucograma de bază dar oferă informații asupra modului de funcționare al măduvei hematogene (regenerare după pierderea masei sangvine).

La unele specii, prezența reticulocitelor în sângele periferic este fiziologică. Circa 1% din hematii fiind reticulocite la câine și porc și 0,5% la pisică. Șoarecele are un procent de reticulocite de aproximativ 4% ca o consecință a duratei reduse de viață a hematiilor și regenerării rapide a acestora.

În frotiurile colorate cu soluții de tip Romanowsky, reticulocitele au un aspect specific, fiind obișnuit mai mari decât hematiile mature și cu o colorație ușor bazofilică, după cum se poate observa în figura 10.

Numărul de hematii poate fi determinat prin metode automate sau manuale, iar exprimarea numărului poate fi în procente (%) sau ca număr absolut ($\times 10^9/L$ sau $\times 10^3/\mu L$).

Aparatele de hematologie folosesc metode de citometrie în flux cu coloranți fluorescenți ce se leagă de ARN-ul ribozomal.

Pentru realizarea metodei manuale de numărare a reticulocitelor este nevoie de următoarele materiale: robă de sânge (sânge capilar sau sânge venos recoltat pe

EDTA), colorant (albastru de cresil brillant sau albastru de metilen N), pipete, recipient gol, lame de microscop, microscop optic cu obiectiv de imersie.

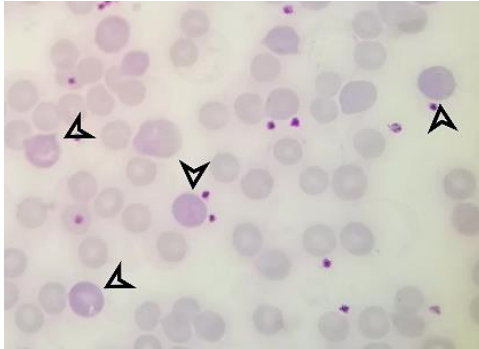


Fig. 10. Reticulocite indicate prin vârfulurile săgeților. Celulele au dimensiuni mai mari decât hematiile și au o culoare mai închisă.

Mod de lucru

Se introduc 3-4 picături de colorant în tubul gol, peste care se adaugă același număr de picături de sânge și se omogenizează.

Proba se lasă 10 minute în repaus pentru fixarea colorantului, după care se omogenizează prin înclinare repetată și se realizează un frotiu.

Atenție!

Colorantul se poate atera pe suprafața hematiilor mature dacă se depășește timpul de colorare.

După uscarea frotiului, acesta se examinează la microscop fără a fi necesară fixarea sau o colorare suplimentară.

Se vor număra 1000 de hematii, notându-se câte dintre acestea sunt reticulocite. Reticulocitele pot fi recunoscute datorită prezenței granulațiilor de culoare albastră în interiorul citoplasmei.

Procentul de reticulocite se calculează cu următoarea formulă:

$$\frac{\text{Nr. retic. din 1000 de hematii}}{1000} \times 100$$

Ex.

Pentru un număr de reticulocite de 10 la 1000 de hematii:

$$\% \text{ Reticulocite} = \frac{10}{1000} \times 100 = 1\%$$

Numărul absolut de reticulocite se calculează prin următoarea formulă:

$$\text{Nr. hematii (x } 10^6/\text{mm}^3) \times \% \text{reticulocite}$$

Ex.

Pentru un număr de hematii de $7 \times 10^6/\text{mm}^3$ și un procent de reticulocite de 1%:

$$\text{Nr. reticulocite} = 7 (\times 10^6/\text{mm}^3) \times 1\% = 0,07 (\times 10^6/\text{mm}^3) \text{ sau } 70 (\times 10^3/\text{mm}^3)$$

Dacă hematocritul are o valoare scăzută, procentul de reticulocite poate să fie fals crescut deoarece proba de sânge conține puține hematii. Se va folosi următoarea formulă de corecție cu valoarea media a hematocritului fiziologic pentru specia studiată pentru a obține procentul de reticulocite corectat:

$$\frac{\text{Hematocrit proba} \times \% \text{reticulocite}}{\text{Hematocrit valoare referință}}$$

Ex.

Pentru un hematocrit de 25, un % de reticulocite de 15% și o valoare fiziologică de 42% pentru hematocrit, procentul de reticulocite corectat va fi:

$$\% \text{ corectat} = \frac{25 \times 15}{42} = 8,9\%$$

Surse de erori

Erorile apărute în realizarea acestei determinări sunt legate fie de tehnică (nerespectarea cantității de colorant,

depășirea timpului de colorare) sau erori de numărare.

Sursele principale de erori sunt incluziile eritrocitare care se colorează cu albastru de metilen N sau albastru de cresil briliant (corpui Pappenheimer, corpui Howell – Jolly) sau prezența corpilor refractari.

Interpretare

Creșterea numărului de reticulocite din sângele periferic indică prezența unui proces regenerativ și indică spre o bună funcționare a măduvei osoase hematogene. Valorile de referință pentru speciile de animale domestice și de laborator au fost înscrise în tabelul 7.

Trebuie menționat faptul că la cabaline, numărul reticulocitelor nu va fi crescut deoarece hematiile se maturizează complet în măduva osoasă hematogenă.

Lărgimea de distribuție eritrocitară

Acest parametru a fost studiat în profunzime în medicina umană ca o metodă de apreciere cantitativă a anizocitozei eritrocitare și a heterogenității eritrocitelor aflate în circulație. Lărgimea distribuției eritrocitare este obținută pe baza valorii

medii și a deviației standard a volumului celular, din care se alcătuiește o histogramă.

Gradul de variație a volumului hematiilor poate fi descris numeric prin acest parametru și poate fi observat în frotiul de sânge periferic odată cu analiza morfologică a sângelui, unde se poate face o apreciere subiectivă a gradului de anizocitoză (prezența hematiilor cu dimensiuni variate). În figura 11. poate fi observată anizocitoza, ce în hemoleucograma s-ar traduce prin modificarea lărgimii de distribuție eritrocitară.

Lărgimea distribuției eritrocitare este prescurtată RDW, după denumirea din limba engleză (red blood cell distribution width) sau LDE în limba română și face parte din hemoleucograma obținută cu ajutorul analizatoarelor hematologice.

Acest parametru este apreciat în comparație cu Volumul Eritrocitar Mediu și cu numărul și procentul de reticulocite pentru caracterizarea anemiilor. Modificarea acestuia este mai eficientă pentru detectarea prezenței răspunsului regenerativ decât aprecierea altor indici eritrocitari sau analiza morfologică a frotiului⁹.

Tabel 7. Valori ale intervalelor de referință pentru reticulocite (procent și număr absolut) și pentru lărgimea de distribuție eritrocitară.

Specie	Procentul de reticulocite (%)	Numărul de reticulocite ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	Lărgimea distribuției eritrocitare (%)
Câine	0 – 1,5	11 – 92	10,6 – 14,3
Pisică	0 – 0,4	9 - 61	13,2 – 17,5
Cal	0	0	17 - 20
Vacă	0 – 0,1	0 – 6,8	16 - 20
Oaie	-	-	16 - 22
Capră	-	-	17,8 – 24,4
Porc	0 - 1	-	12,7 - 32
Găină	0 – 0,6	-	-
Șobolan	-	-	11 - 15
Șoarece	0 – 11,3	177 - 306	12 - 18

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷; www.vet.cornell.edu; www.vetmed.ucdavis.edu; Herman și col., 2019⁸;

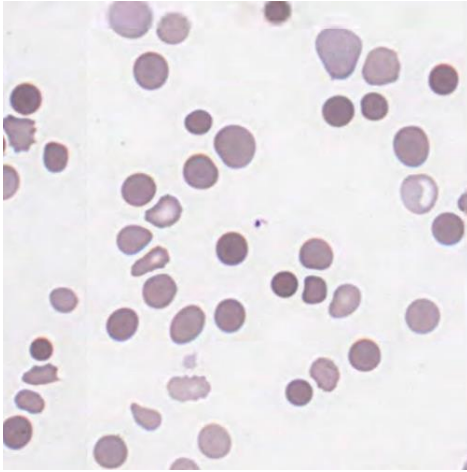


Fig. 11. Sânge periferic – se observă variația volumului hematiilor (anizocitoză) dar și variația formei hematiilor (poikilocitoză).

Determinarea numărului de leucocite

Obiective:

1. Cunoașterea materialelor și a modului de lucru
2. Cunoașterea modului de lucru și a diferențelor de realizare la mamifer și pasăre
3. Stabilirea surselor de erori
4. Interpretarea intervalelor de referință și stabilirea importanței acestei determinări

Leucocitele sau celulele albe ale sângelui reprezintă modul de apărare a organismului împotriva unor agenți externi precum bacterii, fungi, paraziți, virusuri, substanțe toxice etc. În cazul contactului cu un agent patogen, numărul acestor celule poate să crească sau să scadă, iar acest aspect va ajuta clinicianul în stabilirea unui diagnostic.

Numărul de leucocite poate fi obținut prin metoda manuală (hemocitometrie) sau metoda automată (analizator de hematologie).

Determinarea prin metoda automată

Analizatoarele de hematologie folosesc tehnica de citometrie în flux pentru stabilirea numărului de leucocite (diferențiere față de eritrocite prin prezența nucleului) dar și pentru stabilirea numărului fiecărei categorii de leucocit în parte. Acest lucru este posibil datorită capacității aparatului de a diferența forma nucleului și de a aprecia prezența și aspectul granulațiilor.

Limitarea acestor aparate intervine atunci când sunt prezente metarubricite în sângele periferic. Acestea vor fi numărate în mod obișnuit ca leucocite sau vor fi marcate ca celule neidentificate. Prezența acestor hematii tinere este confirmată prin examinarea frotiului și este urmată de realizarea formulei leucocitare și corectarea numărului total de leucocite.

O altă limitare a analizatoarelor de hematologie constă în recunoașterea bazofilelor. În general, o hemoleucogramă cu bazofilie (creșterea numărului de bazofile peste limita superioară a intervalului de referință) necesită confirmare prin examinarea hemoleucogramei.

În cadrul hemoleucogramei, numărul de leucocite este exprimat în mii/mm^3 , K/mm^3 , $\times 10^3/\text{mm}^3$, $\times 10^3/\mu\text{L}$ sau $\times 10^9/\text{L}$ și este foarte des prescurtat WBC (white blood cells) după denumirea din limba engleză.

Determinarea prin metoda manuală

Principiul acestei determinări este identic cu cel pentru determinarea numărului de hematii.

Materiale necesare:

⇒ Sânge recoltat pe anticoagulant (heparină sau EDTA pentru că nu modifică volumul de sânge) sau sânge capilar.

⇒ Cameră de numărat – se poate folosi același tip de cameră ca la elementele figurate roșii.

- ⇒ Lamelă
- ⇒ Lichid de diluție (Türk – produce hemoliză și colorează nucleul leucocitelor pentru a facilita numărarea).
- ⇒ Sticlă de ceas
- ⇒ Pipetă pentru leucocite – ilustrată în figura 12. Se deosebește de pipeta pentru numărarea hematiilor prin grosimea tubului capilar, diametrul dilatației (în care încape de 10 ori mai puțin lichid de diluție – astfel dacă pentru numărarea hematiilor, sângele a fost diluat de 100 de ori, pentru numărarea leucocitelor, sângele va fi diluat de 10 ori) și culoarea bilei de sticlă (albă pentru leucocite și roșie pentru hematii). În mod obișnuit, și piesa bucală a tubului de cauciuc este tot albă pentru a permite o identificare rapidă.
- ⇒ Microscop
- ⇒ Materiale auxiliare – vată hidrofiliă, cârpă din material textil, alcool sanitar.

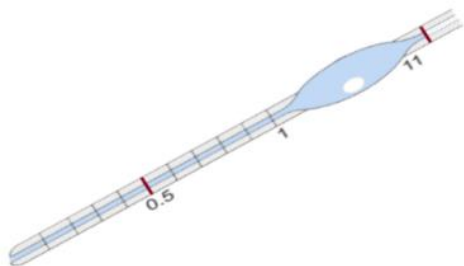


Fig. 12. Pipetă Potain pentru numărarea leucocitelor.

Mod de lucru

Se introduc 2-3 mL de lichid de diluție Türk în sticla de ceas și se dezinfectează piesa bucală a pipetei cu vată și alcool sanitar.

Se pregătește proba de sânge prin omogenizare (înclinarea repetată a flaconului) sau se recoltează o probă proaspătă de sânge prin puncție capilară și se aspiră în pipetă până la diviziunea 0,5 pentru o diluție de 1:20 sau până la diviziunea 1 pentru o diluție de 1:10. Se îndepărtează excesul de sânge de pe

exteriorul pipetei și se aspiră lichid de diluție până la diviziunea 11. Umplerea pipetei se face fără goluri de aer (modifică semnificativ cantitatea de sânge și cea de soluție diluantă).

Conținutul pipetei se omogenizează prin prinderea capetelor piesei de sticlă între două degete și înclinarea repetată, apoi se lasă în repaus timp de 5 minute în poziție orizontală pe masa de lucru.

În acest timp se așază camera de numărat la microscop, se prinde imaginea rețelei și se plică lamela.

La fel ca la tehnica de numărare a hematiilor, conținutul pipetei se omogenizează din nou înainte de folosire, apoi se aruncă primele 2-3 picături (acestea conțin doar lichid de diluție) și se plică o picătură pe platoul central al camerei, în apropierea lamei. Picătura va difuza prin fenomenul de capilaritate, sub lamelă și va acoperi rețeaua. După 2-3 minute, odată cu liniștirea curenților din lichid și stabilizarea imaginii, leucocitele se vor număra în cele patru pătrate din colțuri, fiecare cu latura de 1mm. Acestea au fost ilustrate cu galben în figura 12.

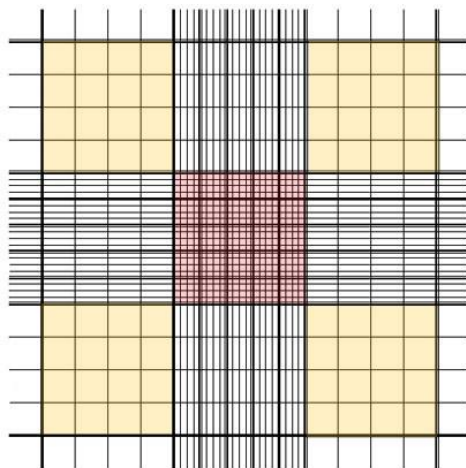


Fig. 13. Rețeaua hemocitometrului – pătratele galbene pentru numărarea leucocitelor.

Leucocitele se pot identifica după forma rotundă și nucleul închis la culoare (colorat de violetul de gențiană din compoziția lichidului de diluție). Acestea sunt refractarea, astfel că apar sticloase atunci când se ajustează imaginea prin microvizare (în acest mod se pot deosebi de eventuale particule de praf). La o examinare cu un obiectiv mai mare, pot fi observate și celulele fantomă, citoplasma hematiilor lipsită de conținut.

Formula de calcul pentru numărul de leucocite este următoarea:

$$\text{Nr. leucocite} = M : I : D$$

Unde:

⇒ M reprezintă media numărului de leucocite pe un milimetru pătrat (numărul total de leucocite numărate pe cele patru pătrate, împărțit la 4),

⇒ I reprezintă înălțimea coloanei de lichid de la camera de numărat la lamelă = 0,1 mm

⇒ D reprezintă diluția utilizată – 1/10 sau 1/20

Determinarea numărului de leucocite la pasăre

Păsările, reptilele, amfibienii și peștii au hematii nucleate, astfel, metoda aplicată pentru mamifer nu poate fi folosită. Numărul de leucocite este apreciat odată cu cel de hematii (metoda și materialele au fost prezentate anterior), utilizând aceeași pipetă și același lichid de diluție. Formula de calcul este cea de la mamifer (M:I:D).

Surse de erori

Sunt asemănătoare ca cele întâlnite la hematii, cuprinzând erori legate de modul de umplere al pipetei, de umplere a camerei de numărat, de numărare sau de calcul.

Gradul de eroare este însă mult mai redus decât ce întâlnit la hematii, în principal datorită diluției (10 – 20 în comparație cu 100 – 200 la hematii). Procentul de eroare este în medie de 5 – 10% și poate să fie mai

redus dacă numărătoarea se face pe ambele rețele ale camerei de numărat.

Notă!

În cazul prezenței unui număr foarte mare de leucocite (ex. leucemie), se poate folosi o pipetă pentru hematii ce permite realizarea unei diluții mai mari (1/100 până la 1/200).

Interpretare

Creșterea numărului de leucocite se numește leucocitoză iar scăderea se numește leucopenie. Modificarea numărului total de leucocite sau a unor categorii individuale poate fi fiziologică în situații. Intervalul de valori pentru speciile domestice și de laborator a fost inclus în tabelul 8.

Leucocitoza fiziologică apare ca un răspuns al organismului la situațiile de stres (creșterea cantității de epinefrină sau norepinefrină). Este întâlnită cel mai frecvent la pisică (indiferent de vârstă) și la tineretul ecvin (sub 12 luni), având o frecvență mult mai redusă la animalele tinere din alte specii. Leucocitoza se traduce printr-o creștere ușoară a numărului de neutrofile segmentate (neutrofilie) și a numărului de limfocite (limfocitoză). Această modificare este tranzitorie, numărul leucocitelor revenind în parametri normali după aproximativ 30 de minute. La pisică, aceste schimbări pot fiacompaniate de eozinofilie și bazofilie.

Atenție!

Leucocitoza fiziologică este diferită față de leucograma de stres (datorată creșterii cantității de corticosteroizi – din surse exogene sau endogene)

Numărul de leucocite este de asemenea mai mare la animalele nou-născute și tineret, la care se recomandă utilizarea unor

Tabel. 8. Valori de referință pentru numărul de leucocite

Specia	#Leucocite ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	#Neutrofile /Heterofile ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	#Limfocite ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	#Monocite ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	#Eozinofile ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	#Bazofile ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Câine	6 - 7	3 - 11,5	1 - 4,8	0,15 - 1,35	0,1 - 1,25	rare
Pisică	5,5 - 19,5	2,5 - 12,5	1,5 - 7	0 - 0,85	0 - 1,5	rare
Cal	5,2 - 13,7	2,7 - 9,6	1,1 - 5,6	0,13 - 0,59	0,06 - 0,58	0,01 - 0,16
Vacă	5,1 - 13,3	1,7 - 6	1,8 - 8,1	0,1 - 0,7	0,1 - 1,2	0,0 - 0,2
Oaie	4 - 8	0,7 - 6	2 - 9	0 - 0,75	0 - 1	0 - 0,3
Capră	4 - 13	1 - 7,2	2 - 9	0 - 0,55	0,05 - 0,65	0 - 0,12
Porc	11 - 22	3 - 10,4	4,2 - 13,6	0,2 - 2,2	0,05 - 2,4	rare
Găină	12 - 30	3 - 6	7 - 17,5	0,15 - 2	0 - 1	rare
Șobolan	1,96 - 8,25	0,22 - 1,57	1,41 - 7,1	0,03 - 0,18	0,01 - 0,16	0 - 0,05
Șoarece	1,22 - 4,78	0,1 - 1,66	0,86 - 3,7	0 - 0,05	0 - 0,07	0 - 0,01

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷, Radostis și col, 2000¹⁰

valori de referință specifice vârstei. O creștere a numărului de neutrofile și monocite (monocitoză) poate fi observată și în gestație.

Realizarea frotiului din sânge periferic

Obiective:

1. Cunoașterea modului de realizare a unui frotiu de sânge
2. Cunoașterea metodelor de colorare și a caracteristicilor acestora
3. Stabilirea modului de examinare a frotiului de sânge
4. Cunoașterea importanței examinării frotiului de sânge
5. Enumerarea unor posibile artefacte ce pot îngreuna examinarea

Examinarea frotiului din sânge periferic reprezintă unul dintre examenele hematologice de bază în medicina veterinară. Este util pentru stabilirea unui diagnostic (parazitoze, anemii, intoxicații, neoplazii etc.), stabilirea unui prognostic sau

aprecierea răspunsului organismului la diverse tratamente.

Materiale necesare:

- ⇒ Sânge proaspăt recoltat prin puncție capilară sau sânge venos recoltat pe anticoagulant (recomandat EDTA deoarece nu modifică aspectul morfologic al hematiilor)
- ⇒ Lame de microscop
- ⇒ Pipetă sau tub de microhematocrit
- ⇒ Colorant

Mod de realizare

Se pregătesc două lame de microscop – una pe care se va întinde frotiul și una ce va fi folosită pentru întinderea frotiului. Lamele trebuie să fie curate, fără particule de praf sau amprente (dacă sunt scoase din ambalajul producătorului, de obicei nu necesită curățare) ce pot afecta aspectul final al frotiului. Lamele se pot șterge cu alcool sanitar și apoi cu un material textil ce nu lasă detritus pe suprafața sticlei.

În cazul utilizării sângelui proaspăt, se recomandă întinderea rapidă a frotiului. Prezența coagurilor în frotiu poate afecta

calitatea acestuia și poate crea aspecte artefactuale (de exemplu trombocitopenie - scăderea numărului de trombocite).

Dacă se folosește sânge recoltat pe anticoagulant, este necesară omogenizarea probei prin înclinarea ușoară a recipientului, apoi, cu ajutorul unei pipete sau a unui tub de microhematocrit, se va depune o picătură de sânge pe lamă, în apropierea zonei opace (dacă aceasta există). Cea de-a doua lamă se așază cu marginea îngustă, la un unghi de 45 de grade pe suprafața primei lame, înaintea picăturii de sânge.

Printr-o mișcare de retragere, se pune în contact cu picătura de sânge (menținând contactul cu lama de pe masă) și se observă difuzarea probei pe toată lungimea muchiei lamei trăgător.

Atenție!

Lama trăgător se menține tot timpul în contact cu lama de pe masă, iar frotiul se întinde printr-o mișcare unică, continuă, cu menținerea constantă a unei presiuni ușoare.

Următoarea etapă este împingerea sau retragerea lamei trăgător (în funcție de manualitatea fiecărui examinator) și întinderea efectivă a frotiului. Etapele realizării frotiului au fost schematizate în figurile 14, 15 și 16. În imaginile oferite procesul este de împingere a lamei pentru întinderea frotiului.

Zona mată a lamei este utilă pentru manipularea lamei (astfel încât să nu se atingă frotiul proaspăt întins) și permite înscrierea datelor precum numele pacientului, data și numărul de înregistrare din registrul de consultații sau registrul laboratorului. Pentru scrierea datelor se folosește un creion. Culoarea markerelor se poate șterge în procesul de colorare.

Un frotiu realizat corespunzător va avea suprafața uniformă, margini paralele și se va termina printr-o zonă franjurată. După

uscarea acestuia se poate trece la etapa de colorare.

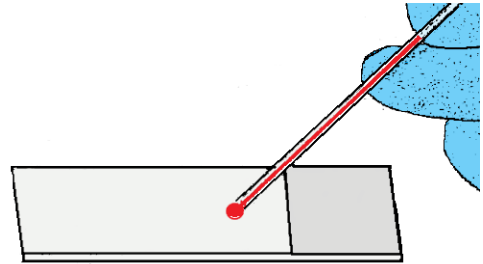


Fig. 14. Picătura de sânge este depusă pe lama de microscop în apropierea zonei mate.

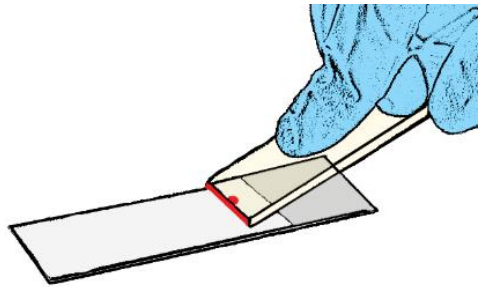


Fig. 15. Lama se pune în contact cu picătura de sânge (se menține la un unghi de aproximativ 45° față de lama de pe masa de lucru) și se observă difuzarea sângelui pe lungimea muchiei.

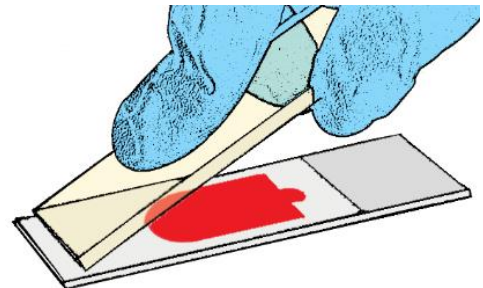


Fig. 16. Printr-o mișcare continuă, sângele este întins pe suprafața lamei.

Colorațiile de tip Romanowsky sunt cele mai frecvent folosite pentru examinarea frotiurilor de sânge. Printre acestea se pot

enumera colorațiile May – Grünwald – Giemsa, Giemsa rapidă și Diff – Quick. Elementele figurate vor fi colorate astfel:

- ⇒ Hematiile vor fi roz – portocalii,
- ⇒ Nucleii vor fi mov de diferite intensități,
- ⇒ Granulațiile se vor colora în funcție de afinitatea tinctorială, de la roz deschis la albastru – închis negricios,
- ⇒ Citoplasma va fi de culoare gri – albastru pal.

Se pot folosi de asemenea colorații speciale precum Albastru de cresil brilliant (pentru identificarea reticulocitelor) sau colorația Pearls (pentru identificarea depozitelor de fier), dar acestea nu sunt incluse în examenele hematologice de rutină.

Colorația May-Grünwald Giemsa (MGG)

Reprezintă colorația de elecție pentru hematologie. Poate fi folosită pentru colorarea frotiurilor din sânge periferic dar și pentru diverse alte frotiuri citologice (măduvă osoasă hematogenă, lichide cavitare, frotiuri citovaginale, punctii etc.).

Trusa de colorare va include cei doi coloranți May – Grünwald și Giemsa, apă distilată, pipete, recipiente gradate și o baie de colorat.

Lamele se așază pe suportul băii de colorat după care se prepară soluția Giemsa. Soluția concentrată se va dilua în proporție de 1:9 (sau după indicațiile producătorului) cu apă distilată într-un cilindru. Soluția Giemsa se prepară în momentul utilizării și se poate păstra doar câteva ore, după care va începe să precipite.

Primul pas va fi acoperirea frotiurilor cu un număr cunoscut de picături de soluție May – Grünwald. Acestea se lasă 3 minute, după care se vor acoperi (fără a vărsa colorantul) cu același număr de picături de apă distilată, așteptând alte 3 minute.

Lichidul de pe suprafața frotiurilor se varsă iar frotiurile vor fi acoperite cu soluție Giemsa diluată. Timpul de așteptare pentru

această etapă va fi de 25 – 30 de minute. Acest timp se poate prelungi pentru frotiurile groase sau pentru probele de citologie (de exemplu, pentru colorarea unui preparat citologic din măduvă osoasă hematogenă, se recomandă dublarea timpului de expunere).

Frotiurile se spală cu apă distilată sau sub jet de apă la robinet, se lasă până la uscarea completă, apoi se examinează la microscop.

Modul de examinare al unui frotiu

Examinarea frotiului începe cu cel mai mic obiectiv al microscopului, cu care se va scana toată suprafața (pot fi observate elemente mari precum diverși paraziți), apoi se trece la un obiectiv mediu (20x) pentru identificarea zonei optime pentru examinare.

Această zonă este localizată în apropierea părții terminale franjurate și este caracterizată prin modul de dispunere al elementelor figurate într-un singur strat. Poziția distanțată a celulelor permite examinatorului să distingă în mod precis și corect caracteristicile fiecărui element în parte și aprecierea diferențelor de culoare, volum, granulații etc. Cele trei zone ale frotiului sunt ilustrate în figurile 17, 18 și 19.

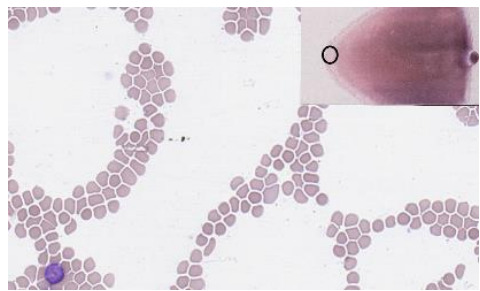


Fig. 17. Zona franjurată terminală a frotiului din sânge periferic unde se observă spații goale vaste între elementele figurate. Acestea au tendința de a rămâne grupate, ceea ce poate îngreuna aprecierea unor caracteristici precum forma sau mărimea.

Pentru realizarea unor investigații precum formula leucocitară, se recomandă examinarea frotiului începând cu marginile laterale, datorită faptului că leucocitele sunt mai dense și pot fi împinse către margini în momentul întinderii frotiului.

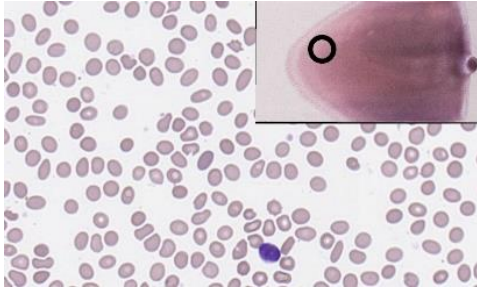


Fig. 18. Zona de celule dispuse într-un singur strat reprezintă aria de interes pentru caracterizarea morfologică a elementelor figurate.

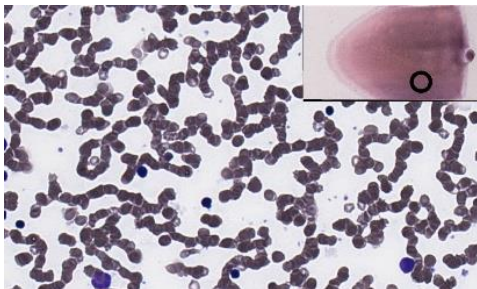


Fig. 19. Corpul frotiului reprezintă zona în care sângele este dispus în strat gros. Elementele figurate sunt suprapuse sau aglutinate, ceea ce face imposibilă aprecierea trăsăturilor morfologice.

Artefacte

Artefactele pot îngreuna examinarea unui frotiu sau pot induce în eroare un examinator lipsit de experiență. Sursele acestor artefacte sunt diverse, începând cu coagularea sângelui înainte de întinderea frotiului, precipitarea colorantului, umiditate crescută în laborator, exces de anticoagulant etc.

Corpii refractari (Fig. 20) reprezintă fragmente cu aspect sticlos, evidențiate cu ușurință la microvizare. Acestea sunt întâlnite în interiorul hematiilor și pot fi confundați cu paraziți intracitoplasmatici. Apar în urma uscării sau fixării necorespunzătoare a frotiului.

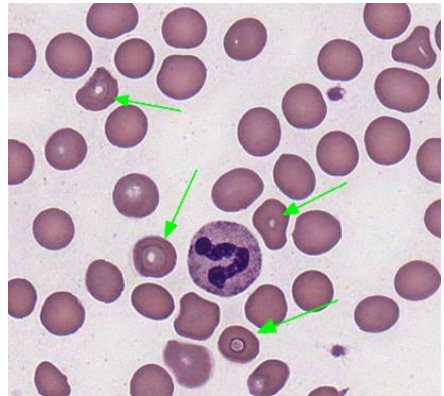


Fig. 20. La vârful săgeților verzi sunt prezenți corpi refractari cu aspect asemănător unor incluzii celulare.

Precipitatul lăsat de colorant poate fi o consecință a utilizării unei soluții vechi (se poate remedia prin filtrare), folosirea unui timp prea lung de colorare sau îndepărtării necorespunzătoare a colorantului în procesul de spălare a frotiului. Figura 21 ilustrează prezența colorantului în frotiu. Particulele închise la culoare pot modifica aspectul leucocitelor și pot fi confundate cu anumite specii de bacterii.

Atenție!

Prezența microcoagurilor (Fig. 22) poate crea un aspect de falsă trombocitopenie. Apar frecvent în contaminarea tisulară în momentul recoltării.

În cazul stocării prelungite a frotiurilor necolorate și nefixate, acestea vor avea o nuanță albastruie a hematiilor, datorită modificării afinității pentru colorant. O modificare asemănătoare poate să apară ca urmare a utilizării unei ape distilate cu pH necorespunzător în colorația May –

Grünwald Giemsa. Acest aspect a fost ilustrat în figura 22. Colorarea diferită a hematiilor poate fi considerată artefact deoarece face dificilă diferențierea policromatofilelor (reticulocitelor).

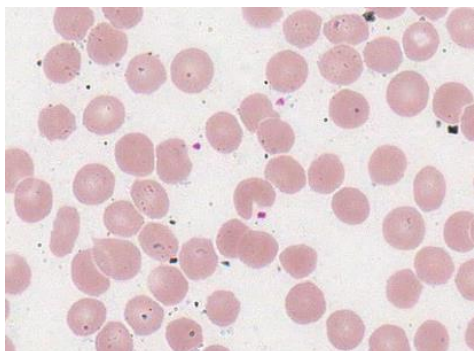


Fig. 21. Precipitat prezent în tot câmpul microscopic. Poate fi confundat cu bacterii sau cu anumite incluzii celulare.

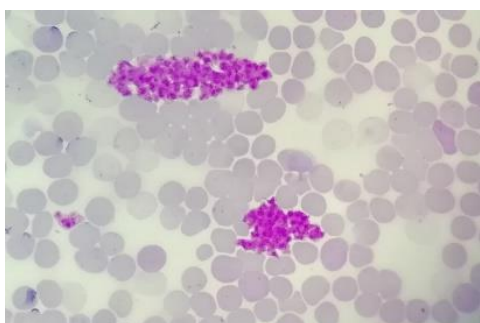


Fig. 22. Frotiu ce a fost ținut peste 24 de ore înainte de fixare și colorare (MGG). Se observă culoarea albastră – gri a hematiilor.

Formula leucocitară

Obiective:

1. Definirea formulei leucocitare și stabilirea importanței acestei determinări
2. Cunoașterea formulei pentru corectarea numărului de leucocite
3. Recunoașterea caracteristicilor fiecărei categorii de celule leucocitare

Formula leucocitară reprezintă procentul fiecărei categorii de celule leucocitare în sângele periferic.

Deși diagnosticul urmărește modificarea numărului absolut, există situații în care formula leucocitară devine utilă. De exemplu, la sângele de pasăre, numărul de leucocite se poate obține prin metoda hemocitometrului, iar cu ajutorul unei formule leucocitare, se poate stabili un număr absolut pentru fiecare categorie leucocitară în parte (înmulțirea procentului pe categorie cu numărul total de leucocite).

O altă situație în care este utilă realizarea formulei leucocitare este prezența unui proces regenerativ intens ce duce la apariția hematiilor nucleate în sânge (metarubricite), precum cele din figura 23.

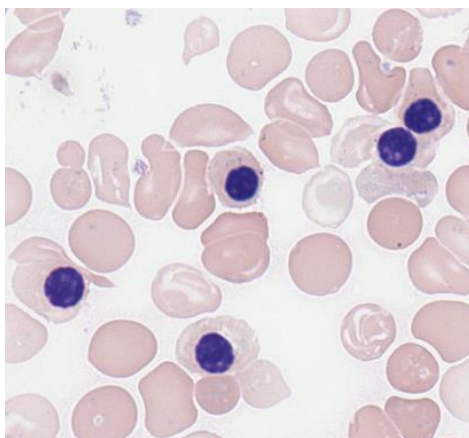


Fig. 23. Hematii nucleate (metarubricite)

Analizatoarele hematologice vor număra obișnuit aceste metarubricite ca fiind leucocite, astfel este necesară numărarea lor în paralel cu întocmirea formulei leucocitare, stabilirea numărului de hematii nucleate la 100 de leucocite numărate, aplicându-se apoi următoarea formulă de corecție:

$$\frac{\text{Nr. leucocite}}{1 + (\text{Hem. nucleate} \div 100)}$$

Ex: Pentru 25 de hematii nucleate la 100 de leucocite numărate și un număr absolut de leucocite de $16 \times 10^3/\text{mm}^3$ de sânge, numărul de leucocite corectat va fi de:

$$\text{Leuc. corectat} = \frac{16000}{1 + (25 \div 100)}$$

Leuc. corectat = 12800 leucocite pe mm^3 de sânge sau $12,8 \times 10^3/\mu\text{L}$ de sânge.

Se poate observa în exemplul de mai sus faptul că diferența dintre cele două valori este foarte mare și poate uneori să facă diferența între fiziologic și patologic.

Cu noua valoare a numărului de leucocite corectate se pot recalcula valorile numărului absolut pentru fiecare categorie de leucocite în parte utilizând procente din formula leucocitară.

Pentru realizarea corectă a unei formule leucocitare este necesară identificarea și clasificarea corespunzătoare a categoriilor de leucocite.

Neutrofilul

Reprezintă prima linie de apărare a organismului și are în principal rol în fagocitoză. În figura 24 este ilustrat un neutrofil înconjurat de hematii și două trombocite.

La câine, neutrofilele reprezintă cea mai numeroasă categorie de leucocite. Celulele mature au nucleul alungit și segmentat (separate prin îngustări ale materialului nuclear). Neutrofilele tinere (în bandă) nu prezintă îngustări ale nucleului, fiind denumite și neutrofile nesegmentate.

Citoplasma este obișnuit incoloră sau ușor oxifilă (roz). Granulațiile nu se disting sau pot fi colorate spre roz.

La pisică, aspectul neutrofilelor este asemănător cu cel întâlnit la câine. La această specie pot fi observați și corpii Bar, segmente de cromatină sexuală, întâlnite la 4 – 11% din neutrofilele femelelor⁷. În

literatură, acest segment al nucleului mai este întâlnit sub denumirea de „drumstick” (datorită asemănării cu un copan de pui).

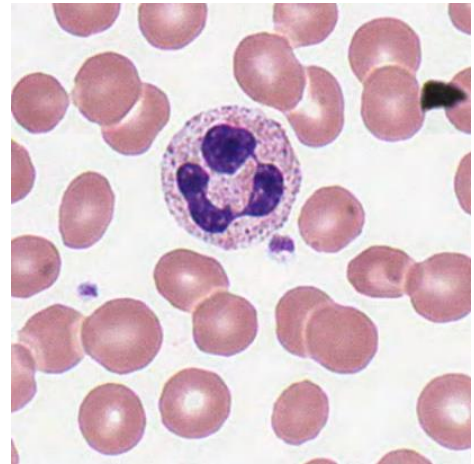


Fig. 24. Neutrofil cu nucleu împărțit în trei segmente și granulații fine vizibile în citoplasmă.

La cal, nucleul neutrofilelor are frecvent membrana cu margini angulare. Sunt prezenți și corpii Bar, identificați ca fiind o formațiune mov, atașată de nucleu printr-un filament subțire de cromatină. Citoplasma este incoloră, cu granulații mai mult sau mai puțin vizibile în funcție de timpul de colorare.

Nota!

Calul are un număr redus de neutrofile în bandă. Numărul acestora nu crește suficient în situații patologice pentru a avea valoare de diagnostic.

Neutrofilele bovinelor au citoplasmă de culoare roz (conțin trei tipuri de granule și nu conțin lizozim) și nucleu polisegmentat. Aceleași caracteristici sunt întâlnite și la rumegătoarele mici.

La suine, neutrofilele au membrană nucleară neregulată și citoplasmă colorată roz pal sau albastru pal.

Atenție!

Frotiurile realizate din probe de sânge păstrate un timp îndelungat (chiar și la 4°C) vor conține neutrofile hipersegmentate.

Păsările nu au neutrofile, fiind însă întâlnite *heterofilele* sau *pseudoeozinofilele*, ce reprezintă cea mai numeroasă categorie de granulocite. Granulațiile intracitoplasmatiche au formă de bastonaș (alungite) sau formă aciculară. Citoplasma este transparentă iar granulațiile pot acoperi parțial nucleul, care va apărea împărțit în 2 – 3 segmente. Heterofilele au funcții asemănătoare cu neutrofilele mamiferelor.

La animalele de laborator (șoarece și șobolan), nucleul neutrofilelor prezintă numeroase inflexiuni ceea ce le poate da un aspect hipersegmentat (diferență a criteriului de apreciere față de alte specii). Citoplasma este aproape incoloră, cu granulații fine. Neutrofilele în bandă pot avea nucleul sub formă circulară (formă de inel).

Eozinofilul

Acest tip celular a fost numit pe baza afinității tinctoriale a granulațiilor intracitoplasmatiche și are roluri multiple în răspunsul imun, cele mai bine cunoscute fiind activitatea antiparazitară și participarea în reacțiile de hipersensibilitate (alergii) alături de bazofil și mastocit.

La canide sunt întâlnite în număr redus în circulație și au dimensiuni mai mari decât neutrofilele. Pot fi recunoscute ușor pe baza prezenței granulelor eozinofile (roz). Citoplasma este ușor bazofilă (albastră) și poate conține un număr redus de vacuole incolore.

Nucleul are un număr mai redus de segmente decât neutrofilul, fiind întâlnite în mod obișnuit 2 sau 3.

Pisicile au eozinofile cu nucleu obișnuit bilobat și un număr mare de granule de culoare roz – portocaliu pal. Aceste granulații sunt abundente în citoplasmă, au dimensiuni reduse și formă alungită.

Eozinofilele cabalinelor au un aspect specific. Acestea conțin granulații de culoare roșu – portocaliu, ce deseori acoperă nucleul și oferă celulelor un aspect de „zmeură”.

Taurinele au eozinofile cu nucleu sub formă de bandă sau bilobat și numeroase granulații roz – roșietice de dimensiuni mici și cu formă rotundă asemănător cu figura 25. Citoplasma este bazofilă. Aspecte asemănătoare sunt întâlnite la ovine și caprine.

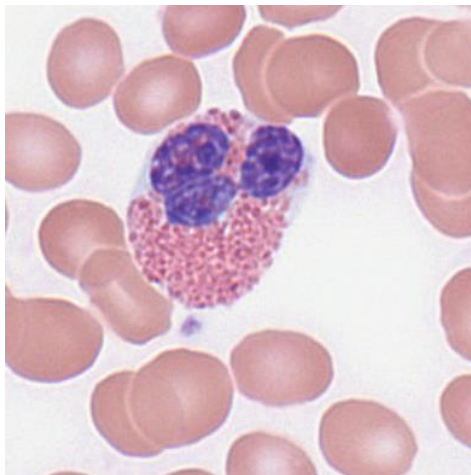


Fig. 25. Eozinofil cu nucleu segmentat și granulații de culoare roz – roșietice.

Eozinofilele suinelor au deseori aspect de celule în bandă (slab segmentat). Granulațiile citoplasmatiche sunt rotunde și ovalare, de culoare roz – oranj deschis și pot acoperi nucleul.

La păsări, eozinofilele au formă rotundă sau neregulată și nucleu segmentat. Citoplasma este de culoare albastru deschis iar granulațiile sunt oxifile, de formă rotundă sau ușor ovalară.

La animalele de laborator, eozinofilele au deseori nucleul în bandă sau cu formă inelară și este acoperit de granulații abundente. Granulațiile sunt de dimensiuni relativ mari, sunt uniforme ca dimensiuni și au culoare roșie sau portocalie.

Bazofilul

Reprezintă o categorie mai puțin numeroasă de celule albe, având o proporție de aproximativ 0,5% din totalul leucocitelor. Odată ajunse în sângele periferic, acestea vor rămâne în circulație aproximativ 6 ore, după care vor migra în țesuturi. Au rol în medierea reacțiilor alergice. În figura 26 este reprezentat un bazofil cu granulații închise la culoare în citoplasmă.

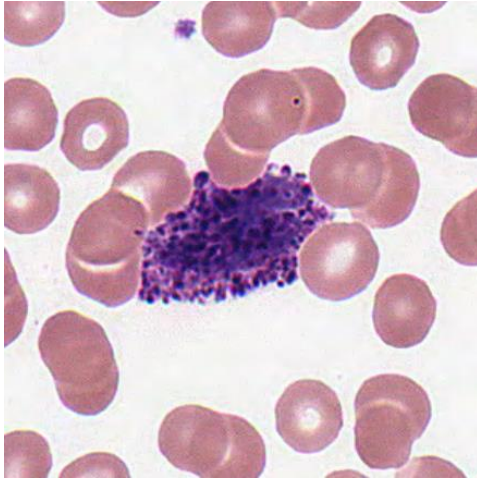


Fig. 26 Bazofil cu granulații de culoare închisă ce nu permit observarea nucleului.

La câine, bazofilele au dimensiuni mai mari decât neutrofilele și un nucleu segmentat. Granulațiile sunt rare și au culoare mov sau mov – roz. Citoplasma este albastră spre gri sau cu tentă ușor mov.

La feline, dimensiunea bazofilelor este asemănătoare cu eozinofilele. Nucleul acestora este segmentat iar granulațiile din citoplasmă au dimensiuni mici, asemănătoare în dimensiuni, formă rotundă

și culoare mov deschis sau mov – roz. Ocazional pot fi observate și granulații mov închis, dar într-un număr mai mic.

Bazofilele întâlnite la ecvine variază din punctul de vedere al numărului de granulații din citoplasmă. Acestea pot fi rare sau abundente, de culoare mov și cu dimensiuni variabile. Dacă numărul acestora este foarte mare, pot să mascheze nucleul. Citoplasma variază de la incolor la albastru deschis.

La taurine, bazofilele conțin numeroase granulații de culoare albastru – închis. Acestea sunt mici și pot masca nucleul. Aspecte asemănătoare sunt întâlnite la caprine și ovine.

La suine, bazofilele conțin numeroase granulații cu formă ușor alungită, colorate mov deschis până la mov închis. Nucleul va apărea mov – pal.

La galinacee, neutrofilul este o celulă cu granulații colorate albastru – închis și nucleu de formă rotundă, plasat central. Are un aspect asemănător cu mastocitul de la mamifere. Totodată, numărul acestora este mai mare la pasăre decât la mamifere.

Șoarecii și șobolanii au bazofile cu aspect specific. Acestea prezintă un nucleu lobat, citoplasmă cu granulații mari, de culoare mov și număr variabil.

Limfocitul

Reprezintă un tip celular cu rol important în răspunsul imun, precum producerea de anticorpi și inițierea efectelor imune mediate celular, precum citotoxicitatea sau reacțiile de hipersensibilitate întârziată. În figura 27 este ilustrat un limfocit cu aspect tipic.

La câine, limfocitele din sângele periferic vor avea dimensiuni variate (mici, medii și mari), cele mici fiind cele mai numeroase. Aspectul acestora este tipic, cu raportul nucleu – citoplasmă în favoarea nucleului, cu o cantitate mică de citoplasmă cu aspect de „halou” sau „semilună” în jurul nucleului. Limfocitele medii au dimensiuni asemănătoare cu neutrofilele. Ocazional,

acestea pot conține în citoplasmă un număr foarte mic de granulații roz – mov. Citoplasma este mai abundentă și se poate observa în jurul nucleului.

La feline, limfocitele au dimensiuni mai reduse decât neutrofilele. Nucleul acestora este rotund și poate prezenta o adâncitură vizibilă pe margine. Unele limfocite pot avea câteva granulații oxifile în citoplasmă.

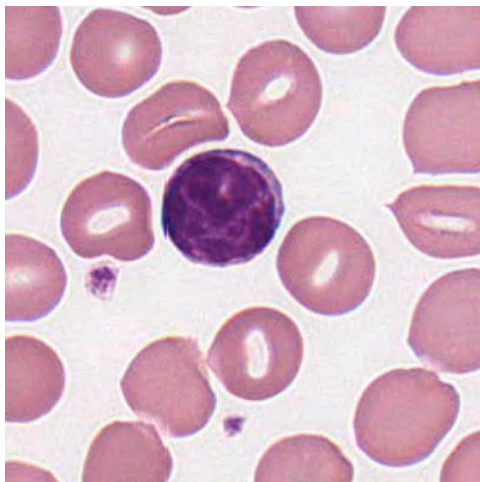


Fig. 27. Limfocit de dimensiuni mici, cu nucleu mare și rotund ce ocupă aproape toată celula.

Limfocitele cabalinelor au dimensiuni mai reduse decât granulocitele. Pot fi întâlnite și limfocite mari, cu citoplasmă abundentă de culoare albastru deschis.

Limfocitele taurinelor reprezintă categoria predominantă de leucocite (la animalele adulte). Limfocitele mari pot fi confundate cu monocitele datorită prezenței unei cantități mari de citoplasmă (este posibil să conțină și vacuole intracitoplasmatic). Majoritatea celulelor conțin granulații de culoare mov, ce ajută la deosebirea față de monocit.

La caprine și ovine, limfocitele sunt de dimensiuni mici și medii. În mod frecvent pot fi identificate și un număr mic de granulații roz în citoplasmă. La fel ca la

taurine, această categorie celulară este predominantă la animalele adulte.

La suine, limfocitele din sângele periferic sunt mici, medii și mari. Cele mari pot conține granulații roz în citoplasmă. Acestea au formă rotundă sau ușor alungită și sunt dispuse grupat.

La galinacee, limfocitele reprezintă categoria predominantă de leucocite. SE întâlnesc limfocite mici și medii, cu aspect tipic de nucleu rotund și mare, cu citoplasmă bazofilă. Ocazional, citoplasma limfocitelor mici poate prezenta proiecții citoplasmatică iar limfocitele medii pot adera la celulele din jur, ceea ce le poate da un aspect angular.

La șoarece și șobolan, limfocitele predomină ca linie limfocitară, chiar și la animalele tinere. Limfocitele din sângele periferic pot fi mici sau mari, cele mari având citoplasmă mai abundentă și uneori granulații roz dispuse grupat în citoplasmă.

Monocitul

Reprezintă un tip celular cu rol major în fagocitoză. Acesta migrează din sânge în țesuturi unde se diferențiază în macrofag și celula dendritică. În figura 28 este reprezentat un monocit cu vacuole citoplasmatică și nucleu lobat.

La câine, monocitele au dimensiuni mai mari decât neutrofilele. Nucleul poate avea forme variate – rotund, lobat, în formă de potcoavă, în forma literei „S”, cu aspect de „fluture” sau reniform. Cele cu nucleu în bandă pot fi deosebite de neutrofilele în bandă prin lățimea mai mare a nucleului și aspectul capetelor nucleului care vor fi rotunjite. Citoplasma este colorată albastru – gri, până la albastru închis și poate conține un număr variabil de vacuole. Ocazional, se pot distinge și granulații foarte fine dispersate în citoplasmă.

La feline, monocitele au dimensiuni mai mari decât neutrofilele și nucleu cu forme variate. Acesta poate fi rotund, lobat, reniform sau neregulat. Citoplasma este

abundentă, de culoare albastru – deschis până la gri, cu un număr mic de vacuole citoplasmatic.



Fig. 28. Monocit cu nucleu bilobat. Se pot distinge vacuole citoplasmatic și granulații fine de culoare roz.

La ecvine, monocitele au dimensiuni mari și nucleu cu formă variată: oval, lobat, formă de potcoavă sau neregulat. Citoplasma are culoare gri – albastru, cu un număr mic de vacuole și granulații fine de culoare roz.

La taurine, monocitele au dimensiuni mari, nucleu în formă aproape rotundă, bilobat sau cu aspect ameboid. Prezintă numeroase vacuole citoplasmatic. Aspecte similare pot fi observate la ovine și caprine.

Monocitele suinelor au un nucleu cu formă neregulată, cromatină cu aspect dantelat și citoplasmă abundentă de culoare gri – albastru. Pot fi întâlnite vacuole și granulații fine.

La galinacee, monocitele sunt celule mari, care pot fi confundate cu limfocitele mari. Monocitele au un nucleu aproape rotund, cu o zonă laterală deformată (aspect spintecat) și citoplasmă abundentă cu vacuole și granulații foarte fine.

La șoarece și șobolan, monocitele sunt cele mai mari leucocite din sângele periferic.

Nucleul acestor celule poate avea formă rotundă, lobată, sau neregulată. Deseori conține vacuole citoplasmatic și uneori se pot distinge granulații oxifile fine.

Pentru realizarea formulei leucocitare se vor număra 200 de leucocite. Examinarea frotiului se va face începând cu marginile laterale, în zona în care celulele sunt dispuse într-un singur strat, mutând obiectivul în zig – zag sau în orice altă manieră astfel încât să nu existe posibilitatea de a vizualiza de două ori aceeași parte a frotiului (Figura 29).

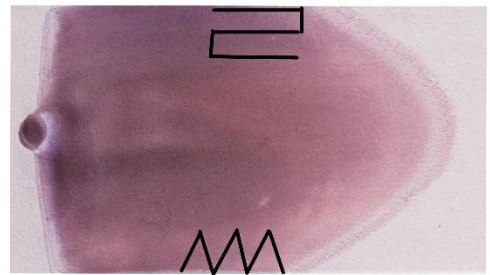


Fig. 29. Metoda examinării frotiului pentru realizarea formulei leucocitare.

Se va folosi un obiectiv mic (20x) pentru prinderea imaginii și stabilirea locului optim pentru începerea examinării, apoi se va trece la un obiectiv mai mare (40x) pentru distingerea categoriilor de leucocite. Pentru observarea detaliilor, se va utiliza obiectivul de imersie (100x), după aplicarea pe suprafața frotiului a unei picături de ulei de imersie.

Atenție!

După finalizarea determinării, frotiurile se așază cu partea uleioasă pe un material absorbant (hârtie de filtru sau șervețel din hârtie) ce nu lasă detritus. Acestea nu se șterg – se poate zgâria suprafața frotiului, iar în timp se estompează detaliile.

Pe măsura găsirii leucocitelor în frotiu, se vor nota în tabel cu ajutorul unor linii sau marcaje în dreptul categoriei respective. Tabelul este împărțit în 10 coloane a câte 20 de elemente, pentru a ușura calculul final și pentru a urmări mai simplu numărul de celule. După identificarea a 200 de leucocite, se vor aduna pe orizontal numărul de celule pentru fiecare categorie în parte. Pentru verificarea corectitudinii, se poate aduna pe verticală coloana de total, care ar trebui să însumeze 200 de celule. Pentru obținerea procentelor, numărul total pentru fiecare categorie se împarte la 2, astfel, pentru 60 de limfocite găsite în frotiu, procentul de limfocite va fi de 30%. În tabelul 9 a fost prezentat modul de completare a unei formule leucocitare la mamifer.

Pentru pasăre, modul de completare este identic, fiind întâlnite diferențe numai în ceea ce privește categoriile de leucocite. Astfel, în locul neutrofilelor segmentate și în bandă, va fi înscrisă categoria de pseudoeozinofile sau heterofile. Modelul pentru speciile cu hematii nucleate poate fi vizualizat în tabelul 10.

Tabel 9. Tabel formulă leucocitară mamifer și exemplu completare

Categorie leucocite	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Total	%
Neutrofile nesegmentate	II		...								17	8,5
Neutrofile segmentate	III II III	II	...								112	56
Eozinofile	I		...								3	1,5
Bazofile		I	...								1	0,5
Limfocite	III I III		...								56	28
Monocite	II	I	...								11	5,5
Total	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	200	100

În cazul speciilor cu hematii nucleate, obținerea unui număr absolut pentru fiecare categorie de leucocit în parte se va face pe baza formulei leucocitare obținute prin examinarea frotiului și înmulțirea procentului cu numărul de leucocite obținut prin metoda hemocitometrică.

Ex: Pentru un număr de leucocite de $12 \times 10^3 / \text{mm}^3$ de sânge și o formulă leucocitară cu 56% heterofile, numărul absolut de heterofile va fi:

$12000 \times 0,56 = 6720$ de heterofile pe mm^3 de sânge sau $6,72 \times 10^3 / \text{mm}^3$ de sânge.

În mod asemănător, pentru corectarea numărului leucocite în cazul prezenței hematiilor nucleate, se folosește formula leucocitară obținută prin examinarea frotiului.

Ex. Pentru un număr corectat de leucocite de $12,8 \times 10^3 / \text{mm}^3$ de sânge și un procent de neutrofile de 64,5%, numărul corectat de neutrofile va fi $8,25 \times 10^3 / \text{mm}^3$ de sânge.

Tabel 10. Tabel formulă leucocitară pasăre

Categorie leucocite	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	Total	%
Pseudoeozinofile/ Heterofile												
Eozinofile												
Bazofile												
Limfocite												
Monocite												
Total	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	200	100

Estimarea numărului de plachete sanguine

Obiective:

1. Cunoașterea metodelor pentru obținerea numărului de plachete sanguine
2. Stabilirea importanței estimării numărului de plachete sanguine
3. Cunoașterea metodei de lucru și a formulei de calcul pentru estimarea numărului de plachete sanguine
4. Interpretarea intervalului de referință

Plachetele sanguine reprezintă ce de-a doua categorie de elemente figurate ca număr, după hematii. Acestea sunt fragmente celulare provenite din megacariocitele întâlnite în măduva osoasă hematogenă.

Rolul acestor fragmente celulare este de realizare a coagulării, menținerea integrității vasculare și controlul hemostazei.

Echivalentul plachetelor sanguine la speciile cu hematii nucleate sunt trombocitele. Acestea sunt celule nucleate, de dimensiuni mici, cu formă rotundă sau ovală. La păsări, trombocitele au și rol imun datorită capacității fagocitare.

Pentru obținerea numărului absolut de plachete sanguine se poate folosi metoda manuală de numărare, folosind hemocitometrul, pipeta Potain și o soluție diluantă ce produce hemoliză. Această metodă, precum cea de determinare a numărului de hematii și leucocite este mai puțin exactă decât metoda automată. Pentru păsări, metoda manuală de stabilire a numărului de trombocite rămâne ca metodă etalon.

Metoda automată de obținere a numărului de plachete sanguine utilizează tehnologia de citometrie în flux, bazată pe dispersia luminii, identificând plachetele pe baza dimensiunilor acestora și a indicilor de refracție.

În completarea determinării automate a numărului de plachete este recomandată și evaluarea morfologică a frotiului din sânge periferic. Se caută identificarea prezenței agregatelor de plachete (microtrombi) ce pot duce la scăderea falsă a numărului de plachete, atât în metoda manuală, cât și în cea automată. În cazul prezenței acestor agregate în număr mare (în număr mare în zona franjurată, terminală a frotiului), nu se va lua în calcul valoarea obținută pentru numărul de plachete și se va recurge la estimarea numărului de plachete în frotiu.

Prezența microcoagurilor este foarte des întâlnită la șoarece datorită numărului mare

de trombocite și a activării plachetare rapide, dar și la pisică, unde este greu de obținut o valoare reală a numărului de plachete.

Estimarea numărului de plachete

Estimarea numărului de plachete dintr-un frotiu realizat din sânge periferic se va realiza utilizând un microscop cu obiectiv de imersie (100x). Este analizată zona în care celulele sunt dispuse într-un singur strat (în apropierea zonei franjurată a frotiului), unde se numără plachetele din 10 câmpuri microscopice alese aleatoriu. Numărul de plachete sangvine se estimează prin următoarea formulă:

$$\text{Plachete estimate /}\mu\text{L} = \text{Media din 10 câmpuri} \times 15000$$

Ex:

Dacă s-au numărat în total 56 de plachete, media va fi de 5,6 plachete sangvine pe câmp microscopic, astfel:

$$\text{Numărul estimat de plachete /}\mu\text{L} = 5,6 \times 15000 = 84000 \text{ plachete/}\mu\text{L sau } 8,4 \times 10^4/\mu\text{L}$$

Pentru realizarea acestui examen microscopic, este importantă identificarea corectă plachetelor sangvine.

Acestea sunt în general mici, de formă rotundă sau ovală. Citoplasma poate fi incoloră, până la gri – deschis, cu numeroase granulații roz, chiar și mov în citoplasmă. Plachetele activate pot avea membrana cu aspect de pseudopode (prelungiri fine). Uneori pot fi observate și plachete foarte mari, ce depășesc dimensiunea unei hematii. Aspectul plachetelor este ilustrat în figura 30.

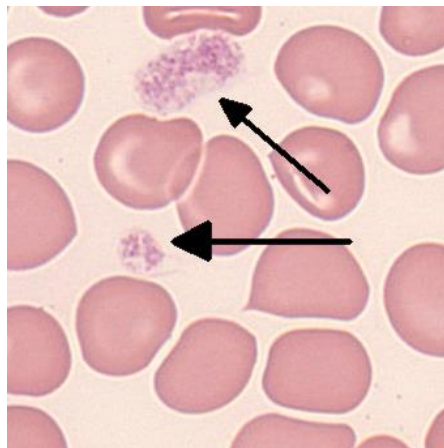


Fig. 30. Două trombocite la vârful săgeților negre. Se poate observa citoplasma incoloră și prezența vacuolelor de culoare roz -mov.

Interpretare

Numărul de plachete sangvine este mai mare la tineret, în special la bovine și ecvine (aspect fiziologic).

Numărul poate fi scăzut în cazul consumului crescut, al pierderii unei cantități de sânge (hemoragii) sau fals scăzut, când sunt prezenți microcoaguli. Intervalul de referință este prezentat în tabelul 11.

Tabel 11. Valori ale intervalelor de referință pentru plachetele sangvine

Specie	Interval ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Câine	200 - 500
Pisică	200 - 800
Cal	100 - 350
Măgar	160 - 580
Vacă	160 - 650
Oaie	800 - 1100
Capră	300 - 600
Porc	200 - 500
Găină	20 - 30
Șobolan	630 - 1170
Șoarece	320 - 1866

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷

Determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH)

Obiective:

1. Definirea vitezei de sedimentare și stabilirea importanței acestei determinări
2. Cunoașterea modului de lucru
3. Interpretarea rezultatelor și cunoașterea particularităților de specie

Viteza de sedimentare a hematiilor reprezintă distanța parcursă de hematii pe o unitate de timp, până la depunerea pe fundul unui recipient. Pentru realizarea acestei determinări se folosește sânge recoltat pe anticoagulant. În acest sens poate fi folosit orice tip de anticoagulant care nu modifică hematocritul, sau pot fi folosite recipientele dedicate pentru VSH (capac negru și conținut de citrat de sodiu 1:4).

Metoda Westergren

Este una dintre cele mai frecvent folosite metode pentru estimarea vitezei de sedimentare a hematiilor. O alternativă pentru aceasta ar fi metoda Wintrobe care folosește tuburi de dimensiuni mai mici.

Materialele necesare sunt reprezentate de probă de sânge venos, pipete (tuburi) Westergren și stativ pentru pipete (figura 31).

Pipeta este un tub lung cu marcații ce reprezintă înălțimea tubului în milimetri sau fără marcații, atunci când acestea sunt trasate pe stativ. Partea superioară se termină la marcația 0. Aceste tuburi pot fi fabricate din sticlă și sunt reutilizabile, sau pot fi de unică folosință, fabricate dintr-un material plastic.

Pipeta este umplută până la diviziunea 0 și se așază în stativ, în poziție verticală la temperatura camerei. Citirea se face la o oră la nivelul diviziunii din dreptul liniei de

contact dintre sediment (elemente figurate – culoare roșie) și partea lichidă superioară (plasmă – culoare alb – gălbuie), după cum este indicat în figura 32.

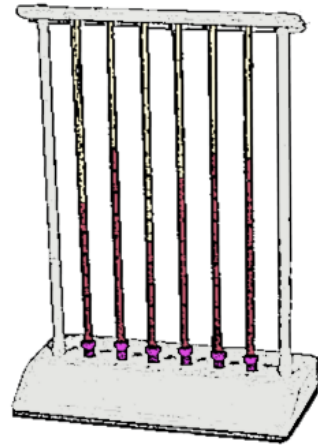


Fig. 31. Stativ clasic pentru VSH cu 6 pipete pentru examinare.

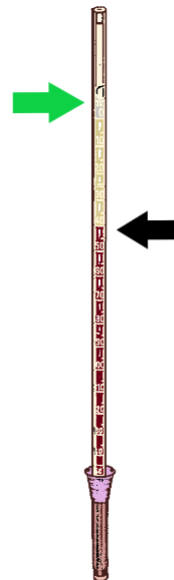


Fig. 32. Pipetă VSH – la vârful săgeții verzi se va face citirea inițială (la diviziunea 0), iar citirea finală se va face la o oră, la vârful săgeții negre.

Rezultatul este exprimat în număr de mm/h (milimetri pe oră) iar valoarea intervalului de referință diferă foarte mult în funcție de specie.

Pe parcursul procesului de sedimentare, pot fi observate trei stadii:

⇒ 1. Perioada de agregare, în care se formează fișcurile (rulourile) – tradus prin schimbarea modului de aranjare a hematiilor. În această fază, viteza de sedimentare este redusă.

⇒ 2. Perioada de sedimentare rapidă în care alunecarea hematiilor are loc la o viteză constantă.

⇒ 3. Perioada finală în care majoritatea hematiilor s-au aglomerat la baza tubului, iar viteza de sedimentare este din nou lentă.

Hematiile au sarcini negative la suprafața membranei. Precum un magnet, sarcinile identice se resping, ceea ce va încetini procesul de alunecare spre fundul recipientului. Prezența unor proteine (precum cele apărute în inflamații) ce se lipesc de suprafața hematiilor, le poate schimba sarcina electrică, iar hematiile vor avea tendința să formeze agregate (fișcure), ceea ce va grăbi procesul de alunecare spre fundul recipientului.

Interpretare

Viteza de sedimentare a hematiilor nu face parte din seria investigațiilor hematologice de bază. Aceasta este o investigație nespecifică ce semnalează obișnuit prezența unor procese inflamatoare în organism. Este folosită cu succes în medicina umană pentru monitorizarea unor procese inflamatoare cronice ale articulațiilor. O investigație cu valoare de diagnostic mai mare este dozarea proteinei C reactive.

În medicina veterinară, se pot observa diferențe majore ale valorilor de referință, cu o viteză foarte mare pentru sângele de ecvine, datorită cantității crescute de proteine plasmatică la această specie. Această particularitate are consecințe

vizibile și în sângele periferic, unde hematiile se dispun una în spatele celeilalte, sub formă de rulouri sau fișcure.

Valori de referință pentru animalele domestice au fost înscrise în tabelul 12.

Tabel 12. Valori de referință pentru viteza de sedimentare

Specie	Valori (mm/h)
Câine	0 – 10
Cal	51 - 63
Oaie	0 – 1
Vacă	0 - 2
Porc	1 - 14
Găină	1 - 4

Interval de referință după Militello și col, 2020¹¹, Osbaldistion, 1971¹², Reece, 1997¹³

Valoarea vitezei de sedimentare poate fi influențată de numeroși factori precum numărul de hematii, forma hematiilor, cantitatea de proteine plasmatică, medicamente, cantitatea de colesterol etc.

Testul de fragilitate osmotică a hematiilor

Obiective:

1. Definirea fragilității osmotice
2. Cunoașterea principiului determinării fragilității osmotice
3. Cunoașterea modului de lucru
4. Interpretarea rezultatelor

Rezistența osmotică a hematiilor reprezintă proprietatea acestora de a-și menține integritatea membranelor atunci când sunt imersate în soluții hipotone (hipoosmotice) de concentrații diferite.

Osmolaritatea plasmei este menținută în limitele a 270 – 310 mosmoli. Substanțele cu rol major în stabilirea acestei valori sunt reprezentate de cationi, precum sodiul (136 – 145 mM) și potasiul (3,6 – 5,4 mM), și anioni precum clorul. Concentrația molară a altor substanțe active osmotice (uree,

glucoză, proteine plasmatic) este mică, fiind responsabile pentru 8 – 12 mosmoli de presiune oncotică coloidală.¹⁴

Astfel, gradul de rezistență a hematiilor la hemoliză este testat pe baza scăderii concentrației de clorură de sodiu din plasmă și conține o curbă de hemoliză cu o valoare pentru rezistența maximă a hematiilor și rezistența minimă a hematiilor.

Fragilitatea osmotică este testată prin suspendarea hematiilor în soluții de concentrații descrescătoare de soluții hipotone și menținerea lor pentru o perioadă de 30 de minute la o temperatură de 37°C. Probele vor fi apoi centrifugate, iar supernatantul se va analiza prin metoda spectrofotometrică (540 nm) pentru determinarea procentului de hemoliză. O alternativă pentru metoda spectrofotometrică ar fi metoda manuală de determinare.

Pentru realizarea metodei manuale sunt necesare: eprubete, pipete gradate, apă distilată, soluție clorură de sodiu 1%, centrifugă și sânge venos recoltat pe anticoagulant.

Mod de lucru

Utilizând apa distilată și soluția de clorură de sodiu 1%, se vor umple 9 eprubetele numerotate de la 1 la 9 cu câte 1 mL de soluție cu concentrații descrescătoare, pornind de la 0,9%, până la 0,1% (ex: în eprubeta 1, se adaugă 0,9 mL soluție NaCl și 0,1 mL apă distilată, pentru o concentrație de 0,9%; în eprubeta 2 se adaugă 0,8 mL soluție de clorură de sodiu și 0,2 mL apă distilată pentru a obține o concentrație de 0,8% NaCl etc.)

După realizarea concentrațiilor descrescătoare de clorură de sodiu, se adaugă câte o picătură de sânge în fiecare eprubetă și se omogenizează prin înclinare.

Eprubetele se centrifughează 5 minute la 2000 rpm pentru a produce rapid sedimentarea elementelor figurate, după care se așază într-un stativ în ordinea numerică. Hemoliza va fi evidentă prin colorarea soluției de clorură de sodiu în roz, datorită punerii în libertate a hemoglobinei care difuzează în soluție. Hematiile întegre vor putea fi observate ca un sediment pe fundul eprubetei. Prima eprubetă în care apare hemoliza reprezintă rezistența minimă și evidențiază concentrația la care primele hematii își vor pierde integritatea

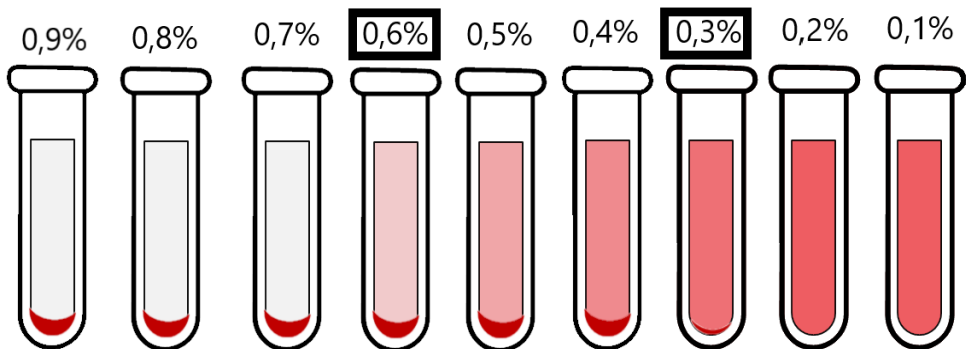


Fig. 33. Rezistența osmotică minimă în eprubeta 4 (0,6% NaCl), unde a apărut pentru prima dată hemoliza și rezistența maximă în eprubeta 7 (0,3% NaCl), ultima eprubetă în care se găsește sediment de hematii.

structurală. Se observă sedimentul pe fundul eprubetei dar și apariția culorii în soluție. Ultima eprubetă în care este întâlnit sedimentul de hematii reprezintă rezistența osmotică maximă, respectiv concentrația minimă la care hematiile își păstrează integritatea structurală, după exemplul ilustrat în figura 33.

Pentru stabilirea unor date exacte, se pot face diluții mai mici, începând cu concentrația precedentă rezistenței minime și terminând cu concentrația următoare rezistenței maxime. De exemplu, în eprubeta 1 se vor introduce 0,7 mL soluție clorură de sodiu și 0,3 mL apă distilată (concentrație de 0,7%), în eprubeta 2 se vor introduce 0,68 mL soluție clorură de sodiu și 0,32 mL apă distilată (concentrație de 0,68%) etc. până la concentrația 0,3, după care se repetă toți pașii și se examinează pentru stabilirea exactă a valorilor fragilității osmotice eritrocitare.

Interpretare

Hematiile introduse în soluții hipotone răspund prin trecerea în spațiul intracelular a apei pentru reglarea diferenței de concentrație. Rezistența hematiilor la hemoliză este un rezultat direct al formei biconcave a acestora, ceea ce le permite o creștere a volumului cu până la 70% fără distrugerea membranei celulare. Depășirea acestei limite duce la lizarea celulei.

Prin urmare, orice modificare a raportului suprafață – volum, va avea consecințe și asupra fragilității osmotice a hematiilor.

Acest test poate fi folosit ca metodă de diagnostic pentru unele afecțiuni hematologice, dar și în cercetare pentru stabilirea efectelor unor factori (temperatură, pH) și substanțe precum medicamente etc. asupra proprietăților hematiilor.

În condiții fiziologice, hematiile tinere au rezistența cea mai mare, comparativ cu hematiile bătrâne care își pierd plasticitatea

și au rezistența cea mai mică. În categoria de hematii tinere sunt incluse și reticulocitele care au un raport suprafață – volum mai mare decât hematiile mature.

Pentru un animal clinic sănătos, mutarea intervalului rezistență minimă – rezistență maximă spre o concentrație mai mare va indica prezența unei populații de hematii îmbătrânite. Același interval mutat spre concentrațiile mici, va indica prezența unor hematii rezistente, tinere. Diferența mare dintre cele două concentrații (corespunzătoare rezistenței maxime și rezistenței minime) indică prezența unei populații eterogene de hematii în sângele periferic.

În tabelul 13 au fost înscrise câteva valori de referință pentru animalele domestice. Ca apreciere generală, se consideră că hematiile au o fragilitate osmotică crescută atunci când rezistența minimă este sub concentrația de 0,5% NaCl.

Tabel 13. Interval de referință pentru fragilitatea osmotică a hematiilor (rezistența minimă – rezistența maximă, în concentrații de NaCl)

<i>Specia</i>	<i>% NaCl</i>
<i>Iepure</i>	0,5 – 0,3
<i>Vacă</i>	0,55 - 0,35
<i>Oaie</i>	0,65 - 0,45
<i>Capră</i>	0,75 – 0,55
<i>Câine</i>	0,55 – 0,38
<i>Pisică</i>	0,57 – 0,45

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷, Thrall și col, 2012¹⁵, Barascud și col., 1998¹⁶, Tritschler și col, 2016¹⁷, Igbokwe, 2018¹⁸

Hemostaza

Hemostaza este un termen corespunzător unor procese fiziologice complexe ce au ca rezultat final oprirea unei hemoragii, respectiv, menținerea echilibrului fluido – coagulant al sângelui.

Procesul hemostatic se derulează în trei etape: faza vasculo – plachetară, corespunzătoare hemostazei primare, faza activării cascadei de coagulare, finalizată cu formarea cheagului și corespunzătoare hemostazei secundare, și faza de activare a mecanismelor de control ce limitează activarea cascadei de coagulare la nivelul regiunii vasculare lezate.

Timul de sângerare

Obiective:

1. Definirea timpului de sângerare și stabilirea importanței acestei determinări
2. Cunoașterea metodei de lucru
3. Interpretarea intervalelor de referință

Timul de sângerare reprezintă durata de timp scursă de la producerea unei plăgi standard până la oprirea sângerării.

Această determinare este utilă în context clinic pentru evaluarea hemostazei primare. Pentru animalele de talie mică se folosește timul de sângerare a mucoasei bucale, pentru animalele de talie mare se folosește timul de sângerare al buzei, iar pentru rozătoare, se poate utiliza timul de sângerare al cozii.

Mod de lucru

Pentru realizarea inciziilor, sunt necesare lancete speciale ce perforază mucoasa la o adâncime suficientă pentru a determina activarea plachetară, dar nu și formarea fibrinei.

Pentru obținerea timpului de sângerare la nivelul mucoasei bucale, buza superioară va fi răsfrânsă către exterior, evidențiind mucoasa bucală, și prinsă cu ajutorul unei benzi de tifon de maxilar sau de maxilar și mandibulă.

Incizia va fi realizată deasupra premolarilor, evitându-se zonele cu vase foarte bine evidențiate. În momentul realizării inciziei, se va porni cronometrul. Sângele exprimat se va îndepărta prin aplicarea unei hârtii de filtru în imediata vecinătate a inciziei, fără a atinge incizia și fără a aplica presiune locală. Cronometrul se va opri în momentul în care nu se mai observă sânge pe suprafața hârtiei de filtru.

Faza vasculo – plachetară a hemostazei debutează prin vasoconstricție locală (îngustarea lumenului vasului de sânge pentru apropierea marginilor plăgii și limitarea volumului de sânge circulant), urmată de aderarea plachetelor sangvine la endoteliul lezat și agregarea acestora (aderă între ele), formând un veritabil dop plachetar.

Acest test este recomandat pentru pacienții cu hemoragii vizibile la nivelul mucoaselor și poate scoate în evidență o afecțiune a plachetelor sangvine.

Interpretare

Intervalul de referință depinde în principal de dimensiunea plăgii realizate, mai exact de tipul lancetei folosite. Ca o regulă generală, timul de sângerare ar trebui să fie sub 4 minute pentru câine și sub 2 minute pentru pisică pentru a fi considerat fiziologic. Valoare de diagnostic prezintă doar prelungirea timpului de sângerare.

Ca surse de erori pentru acest test, pot fi enumerate adâncimea inciziei (dacă se aplică mai multă presiune pe lancetă, incizia va fi mai profundă), presiunea exercitată de către banda de tifon (poate produce stază

vasculară ce poate prelungi în mod fals timpul de sângerare) și hârtia de filtru aplicată incorect (atunci când se plică presiune locală sau când hârtia atinge plaga).

Acest test poate fi înlocuit cu metode exacte pentru aprecierea factorilor implicați în hemostaza primară, precum teste ce evaluează funcția plachetară, obținerea numărului de plachete sangvine sau dozarea factorului Von Willebrand.

Timul de coagulare

Obiective:

1. Definierea timpului de coagulare
2. Enumerarea metodelor de determinare și cunoașterea modului de lucru
3. Stabilirea importanței acestei determinări
4. Interpretarea valorilor de referință

Timul de coagulare este reprezentat de durata de timp scurs de la recoltarea unei probe de sânge până la coagularea acesteia.

Coagularea în tub capilar

Pentru această determinare este nevoie de o probă de sânge capilar și un tub de microhematocrit fără anticoagulant.

Se recoltează sânge în tubul capilar prin înclinarea acestuia și punerea capătului în contact cu picătura de sânge, umplerea făcându-se prin capilaritate. Se pornește cronometrul, iar tubul se menține între palme pentru a păstra o temperatură cât mai apropiată de 37°C.

Din 30 în 30 de secunde, se rupe câte un fragment de tub și se îndepărtează cele două margini pentru a verifica prezența coagulului. Dacă între cele două margini ale tubului se exprimă un fir subțire de fibrină (figura 34), proba este considerată a fi coagulată și se oprește cronometrul.

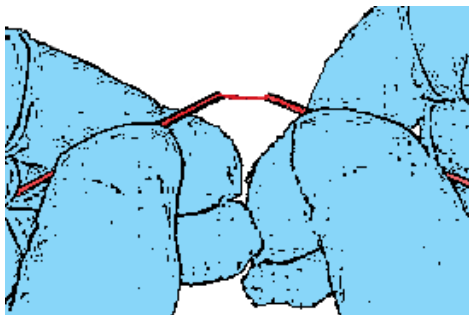


Fig. 34. Filament vizibil de fibrină între cele două margini ale tubului capilar.

Coagularea pe lamă

Materiale necesare: lamă de microscop, cutie Petri, hârtie de filtru, probă de sânge.

Se recoltează o picătură de sânge capilar care se așază pe o lamă de microscop. În momentul recoltării, se va porni cronometrul. Lama apoi este introdusă în cutia Petri, pe fundul căreia a fost dispusă hârtie de filtru umezită.

Cutia se înclină din 30 în 30 de secunde până când nu se mai observă deformarea picăturii, moment în care se va opri cronometrul.

Atenție!

Picătura de sânge recoltată pentru coagularea pe lamă trebuie să fie suficient de mare astfel încât să permită vizualizarea deformării sau a prezenței rețelei de fibrină.

Totodată, coagularea mai poate fi verificată prin introducerea unui ac, sau chiar a lancetei utilizate pentru recoltare în picătură (din 30 în 30 de secunde). Dacă pe vârful acului se ancorează un filament de fibrină (figura 35), se confirmă prezența coagulării și se oprește cronometrul.

Alte metode

⇒ Activatori ai căii extrinsece – utilizează tromboplastină tisulară sau factor tisular uman recombinat

⇒ Activatori ai căii intrinsece – utilizează substanțe ce activează factorul XII. Ex: bile de sticlă, pământ silicios (diatomit), caolin etc.

⇒ Activatori ai căii comune – trombină sau venin de viperă.

Toate aceste metode pot fi confirmate vizual (prin înclinarea tubului în care a fost introdusă proba) sau prin metode automate (mecanice, foto-optice - spectrofotometrie, vâscoelastice – tromboelastrometrie)

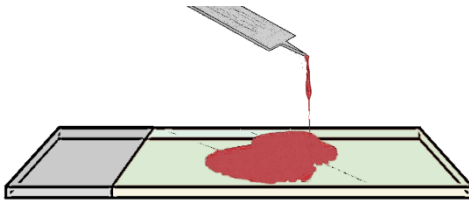


Fig. 35. Test de coagulare pe lamă, cu formarea rețelei de fibrină și prinderea acesteia pe vârful lancetei.

Valorile de referință sunt ilustrate în tabelul 14. Trebuie menționat faptul că fiecare metodă de determinare prezintă intervale diferite ca referință pentru interpretare. Respectiv, fiecare laborator utilizează în mod obișnuit un set propriu de valori de referință pentru speciile studiate. Datele prezentate în tabel pentru timpul de coagulare sunt obținute prin testul de

activare a căii intrinsece, respectiv, timpul de coagulare activată (ACT – activated coagulation time).

Timpul de protrombină (PT)

Timpul de protrombină sau timpul Quick, măsoară timpul scurs de la activarea factorului VII la producerea fibrinei. Reprezintă un test pentru calea extrinsecă și calea comună.

Pentru realizarea acestei investigații este nevoie de sânge venos recoltat pe anticoagulant (citrat de sodiu 3,8%, 1:9 – recipient cu capac albastru).

Timpul de tromboplastină activată parțial (aPTT)

Timpul de tromboplastină activată parțial măsoară timpul necesar producerii fibrinei de la inițierea căii intrinsece. Modul de recoltare a probei de sânge este identic cu cel descris pentru timpul de protrombină.

Timpul de trombină (TT)

Timpul de trombină măsoară timpul necesar transformării fibrinogenului în fibrină în prezența trombinei. Acest test măsoară astfel integritatea acestei reacții și indică o scădere a disponibilității fibrinogenului sau prezența unui factor inhibitor a activării acestuia.

Tabel 14. Valori medii și interval de valori pentru timpul de sângerare, timpul de coagulare, timpul de protrombină (PT) și timpul de tromboplastină activată parțial aPTT) la diferite specii.

Specia	Timp de sângerare (minute)	Timp de coagulare (minute)	PT (secunde)	aPTT (secunde)
Iepure	1,4 – 5,4	4	7,5	15,7 – 42,7
Dihor	2		10,3 – 15,7	18,4
Cobai	3,5 - 4	3	17,6 - 26	13 – 22,9
Hamster	1,8	1 – 3	9 – 14	22,2 – 24,4
Găină			9 - 11	
Câine	<4	0,9 – 1,3	11 – 16	10 – 17
Pisică	<2	0,9 – 1,4	15 – 20	15 – 19
Cal	<5	2,1 – 3,3	16 - 20	45 - 66

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷; www.vet.cornell.edu

Grupele de sânge

Obiective:

1. Cunoașterea grupelor de sânge la animalele domestice
2. Cunoașterea utilității determinării grupei de sânge
3. Stabilirea metodelor de testare a compatibilității sângelui dintre un donator și un primitor
4. Cunoașterea modului de recoltare, procesare și stocare a sângelui pentru transfuzii

La om, grupele de sânge au fost descoperite în anul 1900, de către Karl Landsteiner și au fost încadrate în sistemul ABC, devenit mai apoi ABO (O sau 0, după cuvântul german „ohne”). Atât la om, cât și la animale, grupele de sânge sunt determinate de antigene specifice, dobândite genetic și localizate pe suprafața hematiilor.

În afara antigenelor de suprafață, mai prezintă importanță și anticorpii plasmatici care pot fi produși în mod natural de către organism sau pot apărea secundar unei sensibilizări (contact cu antigenul specific de pe suprafața hematiilor). În mod fiziologic, nu vor exista anticorpi pentru antigenele prezente pe propriile hematii.

Câine

Au fost identificate 7 sisteme de grupă și 9 grupe distincte. Încadrarea acestora se face pe baza unui sistem de litere (A, B, C, D, F și Tr) și pe baza sistemului DEA (dog erythrocyte antigen). Serurile pentru tipizare sunt disponibile doar pentru grupele DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5 și 7.

Sistemul DEA 1.1, 1.2, 1.3 (Sistemul A)

Sistemul A prezintă cea mai mare relevanță din punct de vedere clinic. Incidența cea mai mare este întâlnită la subgrupa 1.1, urmată

de 1.2. Subgrupa 1.3 a fost identificată în Australia.

Nu există anticorpi naturali pentru antigenele DEA 1.1 și 1.2. Anticorpii vor fi întâlniți în urma unei sensibilizări (transfuzii), având drept consecință reacții acute soldate cu hemoliză și pierderea masei de sânge transfuzate după 12 ore. Această grupă este asociată și cu izoeritroliză neonatală (asemănătoare cu incompatibilitatea de Rh la om).

Sistemul DEA 3 (Sistemul B)

Au fost descoperiți anticorpi naturali anti – DEA 3 la aproape 20% dintre câinii DEA 3 – negativi⁷. Este o grupă rar întâlnită, dar care pare a avea o incidență mai mare la rasele de ogar¹⁹.

Sistemul DEA 4 (Sistemul C)

Nu au fost întâlniți anticorpi naturali pentru acest sistem de grupă. Câinii DEA 4 negativi expuși la antigenul DEA 4, vor produce anticorpi specifici, aceștia având însă imunogenitate foarte redusă. Se pot observa reacții transfuzionale doar după administrarea repetată de sânge DEA 4 la indivizi sensibilizați.

Sistemul DEA 5 (Sistemul D)

Au fost identificați anticorpi naturali anti – DEA 5 la aproximativ 10% din populația de câini DEA 5 – negativă⁷. Incidența acestei grupe este scăzută, dar are o prevalență mai mare la rasele de ogar¹⁹.

Sistemul DEA 6 (Sistemul F)

Nu au fost întâlniți anticorpi naturali pentru antigenele DEA 6. Transfuziile la indivizii sensibilizați pot induce reacții transfuzionale soldate cu pierderea masei sangvine transfuzate. Serul pentru tipizarea DEA 6 nu se mai produce.

Sistemul DEA 7 (Sistemul Tr)

Au fost identificați anticorpi naturali anti – Tr la aproximativ 40 – 45% din câini⁷, aceștia fiind însă slab imunogeni, nehemolitici și cu titru scăzut.

Sistemul DEA 8

Antigenul acestui sistem a fost denumit inițial He și poate fi întâlnit la 40 – 45% din populația canină. Serul pentru tipizare nu se mai produce.

Alte sisteme de grupe

Sistemul D, a fost identificat în Japonia și cuprinde 2 antigene: D1 și D2, cu trei fenotipuri: D1, D2 și D1D2. Grupa D2 a fost descrisă numai în Japonia, dar grupele D1 și DEA 3, care este asemănătoare antigenic au o incidență crescută la rasele cu origine Japoneză, cum ar fi Akita, Shiba, Kishu și Shikoku.

Antigenul Dal a fost identificat la dalmațieni.

Pisică

La feline a fost identificat sistemul de grupă AB, cu 3 fenotipuri distincte: A, B și AB. Asemănător cu omul, pisica prezintă anticorpi naturali anti – A și anti – B. Grupa A este cea mai frecvent întâlnită. Grupa B este rară și asociată mai mult cu rasele pure, iar grupa AB are o reprezentare foarte redusă, fiind întâlnită doar la rasele la care a fost identificată și grupa B.

Prezența anticorpilor naturali în plasmă va face posibilă observarea reacțiilor transfuzionale chiar și la prima transfuzie, la indivizi nesensibilizați. Indivizii cu grupa A prezintă un titru scăzut de anticorpi anti – B, iar cei cu grupa B prezintă un titru crescut de anticorpi anti – A.

La această specie a fost identificată și izoeritroliza neonatală la pisoii cu grupa A sau AB proveniți de la mame cu grupa B. Anticorpilor anti – A sunt întâlniți în concentrație foarte mare în colostru.

Antigenul eritrocitar Mik

Acest antigen a fost descoperit pe fondul unor reacții transfuzionale la indivizi cu grupe compatibile. A fost descrisă prezența anticorpilor naturali anti – Mik. Datorită faptului că nu există seruri pentru tipizarea, este necesară realizarea testelor de compatibilitate pentru prevenirea reacțiilor adverse post-transfuzionale apărute în cazul incompatibilității.

Taurine

La această specie au fost identificate peste 70 de factori de grupă, cu diferite subtipuri ce alcătuiesc fenogrupe. Factorii de grupă au fost identificați prin litere (Ex. EAA, EAB, EAC, unde EA reprezintă termenul de antigen eritrocitar – erythrocyte antigen). Singurii anticorpi regăsiți în mod natural în plasmă sunt anticorpilor anti – J, asociați antigenului eritrocitar J care nu este o componentă intrinsecă a membranei eritrocitare. Grupele ce prezintă interes clinic sunt B și J.

Cabaline

Calul prezintă 34 de factori de grupă distribuiți în 7 sisteme de grupă notate cu litere (EAA, EAC, EAD etc.). Incompatibilitățile de grupă au importanță clinică la această. Anticorpilor pentru antigenele grupelor de sânge pot fi întâlniți în mod natural în plasmă sau pot fi dobândiți în urma gestației. La cal a fost identificată izoeritroliza neonatală. Grupele ce prezintă interes clinic sunt A, C și Q.

Ovine și caprine

La oaie au fost descrise 8 sisteme de grupă (EAA, EAB, EAC, EAD, EAM, EAR și EAF30) și 22 de factori de grupă. Grupele ce prezintă interes clinic sunt B și R. La capră au fost identificate 6 sisteme genetice (EAA, EAB, EAC, EAE, EAF și EAR).

Suine

Au fost identificate 16 sisteme de grupă, cu un număr variabil de factori. Sistemele de grupă au fost notate cu litere (de la EAA, până la EAP). Sistemul A (EAA – erythrocyte antigen A) este înrudit cu sistemul EAJ de la taurine, sistemul EAR de la ovine și grupa A de la om.

Importanța determinării grupei de sânge

La animalele de rentă, stabilirea grupei de sânge nu are relevanță practică datorită variației mari a grupelor. În cazul în care este necesară realizarea unei transfuzii, aceasta se poate face în general fără cunoaștere grupei, fiind suficiente testele de compatibilitate (valabil pentru o transfuzie unică).

Transfuzia poate fi utilă și pentru înlocuirea proteinelor plasmatiche, uneori nefiind necesară prezența elementelor figurate. Plasma poate fi recoltată și administrată proaspătă sau poate fi congelată pentru păstrare și folosire ulterioară.

O altă utilizare posibilă pentru determinarea grupelor de sânge este în domeniul de ameliorare, unde este necesară stabilirea unui pedigreu exact și estimarea eritabilității pentru selecția exemplarelor de montă. Variația foarte mare a grupelor permite stabilirea paternității sau maternității cu un grad de exactitate de până la 98% pentru majoritatea speciilor de rentă. Utilizarea grupelor de sânge a fost înlocuită de tipizările ADN în domeniul de ameliorare a speciilor.

Teste de compatibilitate

Stabilirea grupelor de sânge la animalele de companie se face cu ajutorul unor teste rapide, cu obținerea rezultatelor în 2 – 5 minute. Chiar și în cazurile în care sunt testați atât primitorul cât și donatorul și există compatibilitate de grupă, se

recomandă realizarea testelor de compatibilitate.

Testul de compatibilitate majoră directă este util pentru detectarea anticorpilor anti – eritrocitari din sângele primitorului. Pentru realizarea acestui test se amestecă pe o lamă plasmă de la primitor cu hematiile de la donator. Lama se înclină pentru a facilita amestecarea celor două părți, apoi se evaluează macroscopic și microscopic pentru prezența aglutinării.

Testul de compatibilitate minori directă este utilizat pentru detectarea anticorpilor anti-eritrocitari din sângele donatorului. Pentru realizare se amestecă pe o lamă de microscop plasmă de la donator cu hematiile de la primitor. Lama se înclină pentru facilitarea amestecării celor două părți apoi se examinează macroscopic și microscopic pentru prezența aglutinării.

Testul autoaglutinării pe lamă este util pentru excluderea autoaglutinării în contextul verificării compatibilității dintre donator și primitor. În anumite situații patologice (anemia hemolitică autoimună, inflamații), hematiile au tendința să formeze agregate. Aceste situații trebuie excluse pentru o apreciere corectă a testelor de compatibilitate.

Pentru realizarea acestui test, pe o lamă de microscop se vor depune câteva picături de soluție salină (2 picături pentru câine și 3 – 4 picături pentru pisică, deoarece la această specie, hematiile au tendința naturală de a forma fișicuri), peste care se adaugă o picătură de sânge recoltat pe EDTA de la primitor. Lama se înclină pentru facilitarea omogenizării, apoi se examinează microscopic și macroscopic.

La microscop se va face și diferența între aglutinare, atunci când hematiile sunt dispuse sub forma unui ciorchine (anemia autoimună), și dispunerea sub formă rulouri sau fișicuri (în inflamații).

Transfuzii

Transfuziile de sânge au devenit posibile la o scară largă în medicina veterinară datorită apariției băncilor de sânge și a colaborării proprietarilor de animale. Pentru realizarea unei transfuzii este necesară respectarea unor parametri stricți pentru recoltarea probelor și pentru stocarea și procesarea acestora.

Cantitatea de sânge recoltată de la donator variază în funcție de specie și se calculează în funcție de volumul estimat de sânge (85 mL/kg pentru câine și 40 – 60 mL/kg pentru pisică). Se recomandă recoltarea unui volum de 15 – 22% din volumul estimat de sânge, adică un volum maxim de 19 mL/kg la câine și 11 – 19 mL/kg la pisică.

Înainte recoltare, donatorul este evaluat clinic și se realizează examene de laborator precum hemoleucogramă, profil biochimic și profil de dozare a anticorpilor pentru boli infecțioase. Ca o regulă generală, valoarea hematocritului ar trebui să aibă o valoare de minim 40% pentru câine și 30% pentru pisică, iar valoarea hemoglobinei să fie de minim 13 g/dL la câine și 10 g/dL la pisică.

Sângele este colectat în pungi speciale de uz uman. Acestea reprezintă un sistem închis ce împiedică contaminarea probei. Sângele mai poate fi colectat și printr-un sistem deschis, precum seringi sau flacoane cu anticoagulant. În cazul sistemului deschis, este recomandată utilizarea produsului sanguin în 24 de ore (cu stocare la 1 - 6°C).

Pungile pentru recoltare au dimensiuni variate și conțin anticoagulant, preservant și aditivi nutritivi. Anticoagulantul de elecție este reprezentat de citrat.

Aditivii nutritivi au scopul de a prelungi perioada de păstrare a sângelui până la aproape o lună și sunt reprezentați de soluție salină, adenină, dextroză, manitol și acid citrat – citric. Umplerea pungilor de sânge se va face cu respectare volumului ±

10% pentru păstrarea raportului dintre sânge și anticoagulant.



Fig. 37. Pungi pentru recoltarea sângelui pentru transfuzii.*

Vasul recomandat pentru recoltarea sângelui pentru transfuzii este reprezentat de vena jugulară. La pisică este obișnuit nevoie de sedare sau anestezie pentru recoltare.

Opțional, după recoltarea sângelui pot fi administrate suplimente de fier și se poate face rehidratare intravenoasă sau subcutanată cu un volum de 2 – 3 ori mai mare decât cel al sângelui recoltat.

Sângele recoltat poate fi împărțit în diferite tipuri de produse, în funcție de necesitate, deosebindu-se: plasma (proaspătă sau congelată), crioprecipitat și criosupernatant (obținut din plasmă congelată în primele 8 ore de la recoltare) și concentrat plachetar.

Sângele integral poate fi stocat până la o lună de zile la o temperatură de 1 – 6°C iar plasma proaspătă congelată (congelată în primele 8 ore de la recoltare) poate fi stocată 1 an la -18°C sau 7 ani la -65°C. Plasma congelată după 8 ore poate fi păstrată timp de 5 ani la -18°C.

Măduva osoasă hematogenă

Obiective:

1. Cunoaștere noțiunilor de hematopoieză și hematopoieză extramedulară
2. Stabilirea importanței evaluării măduvei osoase hematogene
3. Cunoașterea modului de recoltare a măduvei osoase hematogene
4. Cunoașterea modului de realizare a frotiului din măduvă osoasă hematogenă
4. Recunoașterea tipurilor de celule întâlnite la nivelul măduvei osoase hematogene

Evaluarea citologică a măduvei osoase hematogene este utilă pentru investigarea afecțiunilor hematologice ce nu pot fi diagnosticate prin evaluarea sângelui. La cabaline, măduva osoasă hematogenă este evaluată pentru depistarea răspunsului regenerativ în anemii, deoarece la această specie, reticulocitele nu sunt eliberate în sângele periferic.

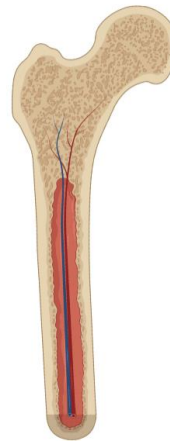
Hematopoieza reprezintă procesul prin care organismul produce elemente figurate sangvine noi. Centrul principal de hematopoieză este la nivelul măduvei osoase hematogene, iar hematopoieza extramedulară reprezintă procesul de producere a celulelor sanguine noi în afara măduvei hematogene. Există specii precum șoarecele, la care splina rămâne un centru hematopoietic pe toată durata vieții. Alte localizări ale hematopoiezei extramedulare: ficat, limfonoduri, rinichi, cord, țesut adipos, sinusuri para-nazale, uter etc.

La câine și pisică, măduva osoasă poate fi recoltată de la nivelul capătului proximal al femurului (fig. 38), prin fosa trocanterică; de la nivelul crestei iliace și capătului proximal al humerusului.

La animalele de talie mare se pretează recoltarea de la nivelul iliumului, coastelor sau sternului.

La șoarece, măduva osoasă poate fi recoltată de la nivelul femurului, tibiei și humerusului.

Se poate folosi sedare sau anestezie generală, dar pentru unele specii este suficientă anestezia locală. Totodată, măduva hematogenă poate fi recoltată ca parte a examenului necropsic.



*Fig. 38. Capătul proximal al humerusului, cu măduva hematogenă colorată în roșu și o schemă a vascularizației.**

Materiale necesare: ac de biopsie (acele hipodermice se pot înfunda cu fragmente osoase), seringă, lame de microscop, colorant pentru hematologie, microscop.

Mod de lucru

Se pregătește zona de inserție a acului prin tundere, radere, spălare și aseptizare. Dacă animalul are pielea groasă, aceasta se poate secționa pentru a facilita pătrunderea acului. Se introduce acul prin apăsare ușoară și rotire. Se îndepărtează stiletul și se atașează seringă și se aplică presiune

negativă până la exprimarea vizibilă a măduvei în seringă.

După colectarea probei, frotiurile se realizează rapid pentru a preveni coagularea. Ca metodă de precauție, se pot adăuga 2 – 3 picături de EDTA, soluție 10% în seringă înainte de recoltare.

Se pune o picătură de măduvă pe o lamă de microscop, apoi a doua lamă de microscop se așază peste prima, fără a exercita presiune. Se așteaptă întinderea picăturii, apoi se îndepărtează lama superioară prin alunecarea pe suprafața primei lame (figura 39).

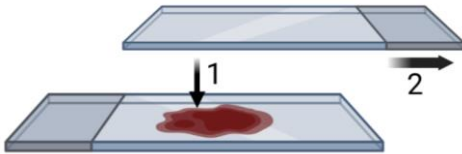


Fig. 39. Realizarea unui frotiu din măduvă hematogenă. Etapa 1 – suprapunerea celor două lame și întinderea picăturii de măduvă hematogenă. Etapa 2 – separarea celor două lame prin alunecare în direcția indicată de săgeată.*

După uscarea completă, frotiurile se vor colora utilizând colorații de tip Romanowsky (Ex. Diff – Quick, May – Grünwald Giemsa). Datorită celularității bogate, se recomandă prelungirea timpilor de expunere a coloranților.

Celulele seriei eritroide

Precursorii eritrocitari au nuclei rotunzi, cromatină condensată și citoplasmă de culoare albastru închis, ce virează spre roz odată cu creșterea cantității de hemoglobină la celulele mai bine diferențiate.

Stadiile de dezvoltare a unei hematii sunt reprezentate de: rubriblaste, prorubricite, rubricite, metarubricite, eritrocite policromatofile și eritrocite mature.

Celulele liniei mieloide (granulocitare)

Precursorii granulocitari au forme neregulate și deseori nucleul poziționat excentric, cromatină fină sau granulară și citoplasmă de culoare mov deschis. Stadiile mai târzii conțin și granulații azurofile, iar nucleul devine alungit, sub formă de potcoavă, inelar, sau chiar segmentat.

Stadiile de dezvoltare ale granulocitelor sunt: mieloblast, promielocit, mielocit, metamielocit, granulocit în bandă și granulocit segmentat.

Celulele liniei monocitare

Precursorii monocitari sunt întâlniți într-o proporție foarte redusă și obișnuit sunt dificil de deosebit față de precursorii liniei mieloide. Ca element distinctiv ar putea fi menționată forma neregulată a nucleului.

Celulele liniei megacariocitare

Fragmentele citoplasmatiche ale megacariocitelor vor deveni plachete sangvine. Aceste celule au dimensiuni foarte mari și pot avea până la 16 nuclei, ce pot fi observați într-o grupare în centrul celulei. Stadiile de dezvoltare ale acestei linii celulare sunt: megacarioblast, promegacariocit și megacariocit.

Alte tipuri celulare

La examinarea microscopică a frotiului din măduvă osoasă pot fi observate limfocite mici, cu aspect asemănător celor din sângele periferic, plasmocite, limfoblaste (foarte rare la animalele sănătoase), macrofage, osteoblaste, osteoclaste, mastocite, fibrocite și fibroblaste.

Interpretare

Evaluarea și interpretarea măduvei osoase hematogene trebuie realizată în paralel cu hemoleucograma și cu frotiul din sângele periferic.

Examinarea frotiului se va realiza inițial cu un obiectiv mic (x10 sau x20), apoi cu

obiectiv cu imersie pentru observarea detaliilor. Se pot observa aspecte legate de abundența celulelor, numărul acestora poate fi crescut (proliferare) sau poate fi scăzut (hipoplazie sau aplazie).

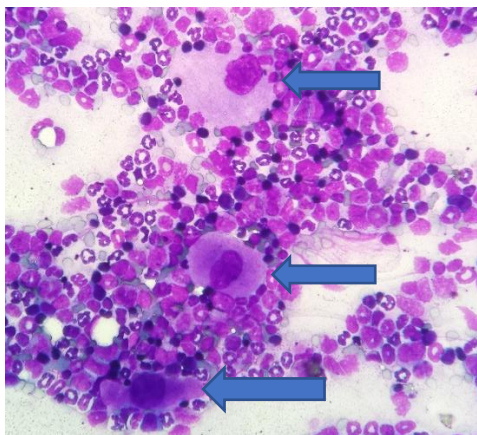


Fig. 40. Măduvă osoasă hematogenă (x40) provenită de la șoarece. Se pot observa 3 megacariocite indicate prin săgețile albastre.

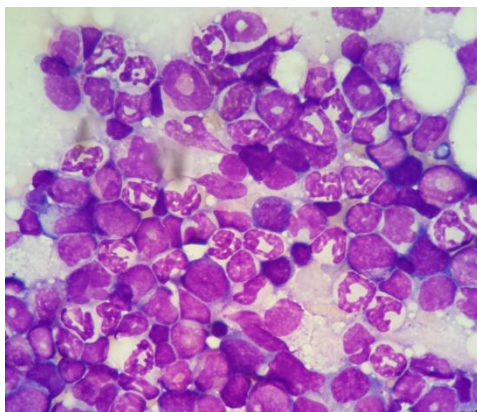


Fig. 41. Măduvă osoasă hematogenă (x100) provenită de la șoarece. Aspect fiziologic cu predominarea liniei granulocitare și maturare ordonată.

Un alt aspect ce poate fi evaluat este numărul megacariocitelor, care poate fi crescut, scăzut sau adecvat. Ca regulă generală, într-un frotiu ar trebui să se

observe cel puțin 5 – 10 megacariocite, iar pentru o creștere a numărului, acesta ar trebui să fie peste 50.

Raportul mieloid – eritroid (M:E) are o importanță deosebită în evaluarea măduvei osoase, oferind informații legate de creșterea sau scăderea proporțiilor acestor două categorii celulare. Pentru realizarea raportului, se identifică o zonă în care elementele celulare sunt bine individualizate și pot fi recunoscute cu ușurință după caracteristicile morfologice și se numără 300 – 500 de elemente figurate nucleate care se împart în cele două categorii de celule.

Ordinea maturării celulelor ar trebui luată de asemenea în considerare. În mod fiziologic, majoritatea celulelor (aproximativ 80%) ar trebui să fie forme mature (începând cu metamielocite pentru linia granulocitară și rubricite pentru linia eritrocitară).

Restul categoriilor de celule ar trebui evaluate pentru stabilirea unui procent. Macrofagele constituie aproximativ 1% din totalul celulelor iar limfocitele aproximativ 5%, la unele specii precum șoarece și șobolan putând reprezenta chiar și o treime din numărul total de celule de la nivel medular.

Tabel 15. Raportul mieloid - eritroid la speciile de animale domestice și de laborator

Specia	Raport M:E
Câine	1,0:1 – 2,9:1
Pisică	1,2:1 – 2:1
Cal	0,5:1 – 2,4:1
Vacă	0,36:1 – 0,6:1
Oaie	0,5:1 – 0,6:1
Capră	1:1
Porc	1,77:1 – 2:1
Șoarece	0,8:1 – 2,79:1

Interval de referință după Weiss și Wardrop, 2010⁷

Bibliografie

1. **Fudge AM, 1996**, Clinical hematology and chemistry of rartites. In: Tully TN, Shane SM, eds. *Ratite Management Medicine, and Surgery*. Malaba: Kreiger.
2. **Hassim HA, Yusoff R, Abdullah R, et al., 2006**, A preliminary study on hematology and serum biochemistry values of captive ostrich (*Struthio camelus*) in Malaysia. *Proc Asian Zoo Wildlife Pathol (Bangkok)*; 59.
3. **Arikan H, ÇİÇEK K, 2014**, Hematology of amphibians and reptiles: a review, *North-Western Journal of Zoology*, vol. 10(1):190-209.
4. **Papp Z, Smith JEG, 2007**, Validation and novel applications of the whole-blood chemiluminescence assay of innate immune function in wild vertebrates and domestic chickens, *Journal of Wildlife Diseases*, vol. 43(4):623-634.
5. **Witeska M, Wargoeka W, 2011**, Disodium EDTA used as anticoagulant causes hemolysis in common carp blood, *Turk J Vet Anim Sci*, vol. 35(2):99-104.
6. **Wills TB, Wardrop JK, 2008**, Pseudothrombocytopenia secondary to the effects of EDTA in a dog, *J Am Anim Hosp Assoc*, vol. 44(2):95-97.
7. **Weiss DJ, Wardrop JK, 2010**, *Schalm's Veterinary Hematology, Sixth Edition*. Wiley-Blackwell, USA, Iowa.
8. **Herman N, Trumel C, Geffré A, Braun JP, Thibault M, Schelcher F, Bourgès-Abella N, 2018**, Hematology reference intervals for adult cows in France using the Sysmex XT-2000iV analyzer, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, vol. 30(5): 678-687.
9. **Martinez C, Mooney CT, Shiel RE, Tang PK, Mooney L, O'Neill EJ, 2019**, Evaluation of red cell distribution width in dogs with various illnesses, *The Canadian Veterinary Journal*, vol. 60(9): 964-971.
10. **Radostis OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW, 2000**, *Veterinary Medicine*, 9th edition, WB Saunders, MB, Londra.
11. **Militello C, Pasquini A, Valentin AAM, Simčić P, De Feo G, Lubas G, 2020**, The canine erythrocyte sedimentation rate (ESR): Evaluation of a point-of-care testing device (MINIPET DIESSE). *Hindawi, Veterinary Medical International*, volume 2020, ID 3146845.
12. **Osbaldiston GW, 1971**, Erythrocyte sedimentation rate studies in sheep, dog, and horse. *Cornell Vet.*, vol. 61(3): 386-399.
13. **Reece WO, 1997**, *Physiology of domestic animals*, 2nd edition, illustrated. Williams & Wilkins, USA, Iowa.
14. **Walski T, Chludzińska L, Komorowska M, Witkiewicz W, 2014**, Individual Osmotic fragility distribution: a new parameter for determination of the osmotic properties of human red blood cells. *Biomed research international*, vol. 2014: 162102.
15. **Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW, 2012**, *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Second Edition*. Wiley-Blackwell, Iowa, SUA.
16. **Barascud Y, Guelfi JF, Concordet D, Dossin O, Braun JP, 1998**, Erythrocyte osmotic fragility test in dogs: preanalytical and analytical validation, frequent values, variations with diseases, *Revue de médecine vétérinaire*, vol. 149(8-9): 867-874.
17. **Tritschler C, Mizukami K, Giger U, 2016**, Increased erythrocytic osmotic fragility in anemic domestic shorthair and purebred cats, *Journal of feline med. surg.*, vol. 18(6): 462-470.
18. **Igbokwe NA, 2018**, A review of the factors that influence erythrocyte osmotic fragility. *Sokoto J. of Vet. Sci.*, vol. 16(4): 1 – 23.
19. **Hale AS, 1995**, Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion *Medicine. Vet Clin N Am Small Anim Pract*, vol. 25: 1323 – 1332.

***imagini realizate cu ajutorul aplicației Biorender**

Studiul salivei

Obiective:

- 1.Recoltarea probelor de salivă
- 2.Proprietăți organoleptice ale salivei
- 3.Cunoașterea compoziției chimice a salivei
- 4.Enumerarea rolurilor secreției salivare
- 5.Identificarea unor ioni și săruri anorganice din compoziția salivei
- 6.Identificarea unor substanțe organice din salivă
- 7.Realizarea examenului microscopic al salivei
- 8.Determinarea pH-ului salivei

Saliva reprezintă produsul de secreție al glandelor salivare. Saliva din cavitatea bucală este un amestec al produselor de secreție provenite de la glandele salivare majore și minore: parotidă, mandibulară, sublinguală, zigomatică, și glandele bucale, labiale, linguale, tonsilare, palatine, și molare.

Recoltarea probelor de salivă la animale este deseori dificilă. Probele pot fi aspirate de la nivelul cavității bucale, sau pot fi recoltate direct într-un recipient la speciile care prezintă hipersalivație fiziologică. Pentru o recoltare relativ sterilă sau pentru recoltarea specifică a secreției unei glande se poate interveni chirurgical pentru realizarea unei fistule.

Secreția salivară poate fi mucoasă, seroasă sau mixtă. Celulele seroase produc o secreție apoasă, bogată în enzime și ioni, și săracă în mucină. Celulele mucoase produc o secreție vâscoasă și filantă.

Saliva este conține apă în proporție de 97 – 99% și este hipoosmotică (cu excepția rumegătoarelor, la care saliva este izoosmotică). Este un lichid incolor și inodor, cu un pH ușor acid (6,75 – 7) la majoritatea

speciilor, cu excepția rumegătoarelor la care pH-ul este alcalin (8,2 – 8,4).

Electrolizii din compoziția salivei sunt reprezentați de: sodiu, potasiu, clor, bicarbonat și fosfați. Saliva conține și substanțe organice precum: mucina, creatinină, aminoacizi, acid uric, uree, globuline, lizozim, α -amilază, maltază și lipază (la animalele sugare).

Carbonatul și fosfatul de calciu pot precipita, formând calculi salivari, sau în combinație cu substanțe organice, se pot depune sub formă de tartru.

O vacă adultă poate produce între 100 și 200 L de salivă pe zi.

Funcțiile secreției salivare sunt reprezentate de:

⇒ Solubilizarea hranei – dizolvarea alimentelor permite distribuirea particulelor pe suprafața limbii și perceperea corespunzătoare a senzației gustative, precum și favorizarea reacțiilor de tip digestiv

⇒ Neutralizarea mediului acid – prezența bicarbonatului și a fosfatului neutralizează aciditatea alimentelor

⇒ Excreție – metale grele (Pb, Bi, Hg), I, As, sulfocianat de potasiu, antibiotice, alcool etilic, uree, acid uric, glucoză (patologic), virusuri (rabie)

⇒ Formarea bolului alimentar

⇒ Protecția locală a cavității bucale și a esofagului (lubrefiant)

⇒ Inițierea digestiei amidonului

⇒ Neutralizarea mediului acid din rumen la rumegătoare

⇒ Asigurarea igienei locale – prin activitatea bacteriostatică a lizozimul (enzimă), IgA locale se atașează de peretele microbial și împiedică traversarea epitelului bucal

⇒ Termoreglare – scăderea temperaturii corpului prin evaporare (funcție importantă pentru carnivore și păsări)

⇒ Fonație

Identificarea calciului

Materiale necesare: probă de salivă, eprubete, stativ, pipetă Pasteur, oxalat de amoniu 5%.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează 2 mL de salivă, apoi se adaugă câteva picături de oxalat de amoniu (reacție calitativă). Prezența calciului se va observa prin apariția unui precipitat alb, insolubil de oxalat de calciu.

Identificarea clorurilor

Materiale necesare: probă de salivă, eprubete, stativ, pipetă Pasteur, azotat de argint soluție 20%.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează 2 mL de salivă, apoi se adaugă câteva picături de azotat de argint 20% (reacție calitativă). Prezența clorurilor se va observa prin formarea unui precipitat alb de clorură de argint.

Identificarea mucinei

Materiale necesare: probă de salivă, eprubete, stativ, pipetă Pasteur, soluție de acid acetic glacial 20%.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează 2 mL de salivă, apoi se adaugă câteva picături de acid acetic 20% (reacție calitativă). Prezența mucinei poate fi observată prin formarea unei pelicule gelatinoase ce plutește la suprafața lichidului.

Identificarea globulinelor

Materiale necesare: probă de salivă, eprubete, stativ, pipete Pasteur, soluție de hidroxid de sodiu 10% și soluție de sulfat de cupru 1%.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează 2 mL de salivă, peste care se adaugă câteva picături de hidroxid de sodiu și câteva picături de sulfat de cupru (reacție calitativă). Prezența globulinelor poate fi observată prin apariția unei culori roz-violet.

Examenul microscopic al salivei

Materiale necesare: probă de salivă, eprubetă, stativ, pipete Pasteur, lamă de microscop, lamelă, albastru de metilen 1%, microscop.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează o probă de salivă, apoi cu ajutorul unei pipete se depune o picătură de salivă pe lama de microscop. Apoi, se adaugă o picătură de albastru de metilen. Proba colorată se acoperă cu o lamelă și se examinează la microscopul optic, inițial cu obiectiv mic, apoi cu obiectiv mare pentru observarea detaliilor.

În mod fiziologic, se pot observa celule epiteliale descuamate, leucocite, bacterii, filamente de mucină și resturi alimentare.

Determinarea pH-ului salivar

Materiale necesare: probă de salivă, eprubete, stativ, hârtie indicatoare de pH, pensă.

Mod de lucru: într-o eprubetă se recoltează o probă de salivă (în cantitate suficientă pentru umezirea hârtiei de pH), apoi cu ajutorul unei pense, se introduce o fâșie din hârtia de pH în proba de salivă. Culoarea obținută se compară cu scala de culori a hârtiei indicatoare. La om, pH-ul salivei va fi între 6 și 7 (aduți)

Sucul gastric

Obiective:

- 1.Recoltarea probelor de suc gastric
- 2.Cunoașterea caracteristicilor fizice și chimice ale sucului gastric
- 3.Dozarea acidului clorhidric din sucul gastric
- 4.Evidențierea activității proteolitice a pepsinei

Sucul gastric reprezintă produsul de secreție al glandelor gastrice. Recoltarea sucului gastric se poate face prin sondaj buco-esofago-gastric sau nazo-esofago-gastric. Această metodă va permite obținerea unui amestec de suc gastric cu conținut gastric (mucus, salivă, alimente, conținut intestinal refulat). Pentru recoltarea unui suc gastric pur, se poate folosi metoda „prânzului fictiv” (Ivan Petrovich Pavlov, 1897) ce presupune realizarea a două fistule. Prima fistulă este esofagiană și permite evacuarea conținutului deglutit, iar a doua fistulă este gastrică și permite recoltarea sucului gastric lipsit de conținut alimentar.

Sucul gastric este un lichid limpede, incolor, alcătuit din: apă, electroliți, bicarbonat, acid clorhidric, mucină, factor intrinsec și enzime (pepsinogen). Secreția gastrică este stimulată inițial de perceperea gustului (actul de a manca) - faza cefalică; apoi este stimulată de ajungerea mâncării în stomac – faza gastrică; și în ultimul rând este influențată de ajungerea hranei în lumenul intestinal – faza intestinală.

La nivelul stomacului se realizează o parte a digestiei (carbohidrați și proteine), dar nu se realizează și absorbție – cu excepția unor substanțe liposolubile.

pH-ul sucului gastric este foarte acid, cu o valoare ce variază de la 0,8 la carnivore, la 4 – 5 la rumegătoare (stomacul glandular).

pH-ul poate fi determinat utilizând un pH metru electronic sau cu ajutorul unei hârtii indicatoare de pH.

Dozarea acidului clorhidric din sucul gastric

Dozarea acidului clorhidric din sucul gastric poate fi realizată cu ajutorul metodei de titrare. Pentru rememorare sau exersarea pașilor de lucru înaintea începerii experimentului în laborator, se poate accesa platforma virtuală ChemCollective¹.

Pentru accesarea experimentului, dați click pe butonul de mai jos sau tastați

<http://chemcollective.org/activities/autograded/128>

în bara de căutare a browserului.

ÎNCEPE EXPERIMENTUL

Materiale necesare: probă de suc gastric (filtrată, lipsită de conținut alimentar), soluție NaOH N/10 cu titru cunoscut, fenolftaleină 1%, sticlărie laborator, pâlnie de sticlă, biuretă, pipetă gradată.

Mod de lucru: se pun 10 mL de suc gastric într-un pahar Berzelius, peste care se adaugă 2-3 picături de soluție indicator (fenolftaleină 1%) (Figura 1).

Într-o biuretă se adaugă o cantitate suficientă de soluție NaOH N/10 cu titru cunoscut apoi se citește și se notează valoarea inițială a volumului de NaOH (Figura 2).

Se titrează aciditatea probei de suc gastric – se adaugă NaOH picătură cu picătură, omogenizând constant, până la

neutralizarea mediului acid și apariția unei culori roz deschis ce se menține 30 de secunde (Figura 3).

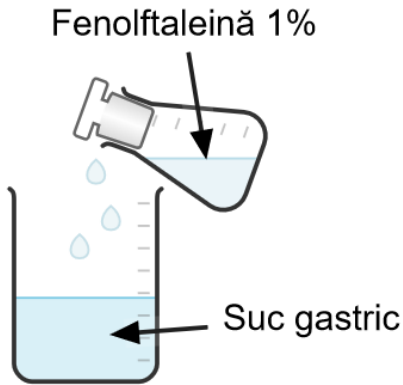


Fig. 01. Peste proba de 10 mL suc gastric cu concentrație necunoscută de HCl se adaugă 2-3 picături de fenolftaleină 1%.

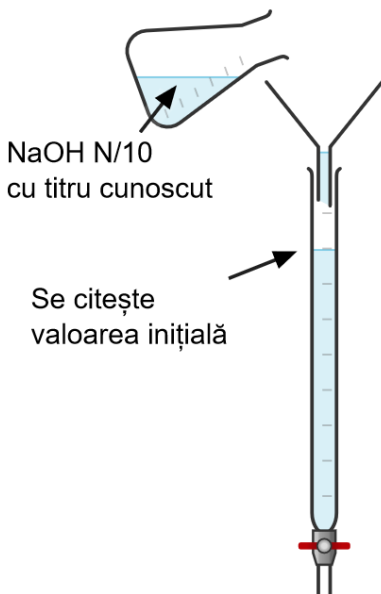


Fig. 02. În biuretă se adaugă o cantitate de NaOH N/10 cu titru cunoscut, după care se citește valoarea pe scala gradată a biuretei.

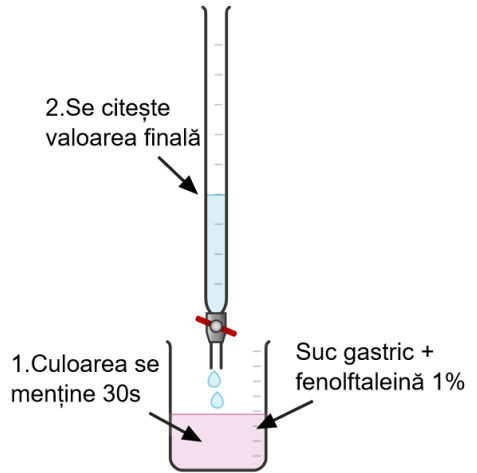


Fig. 03. Se adaugă NaOH picătură cu picătură peste proba de suc gastric, până când se obține o culoare roz deschis ce se menține 30 de secunde. Pe scala gradată a biuretei se citește și se notează valoarea finală a NaOH N/10.

Se calculează volumul de NaOH utilizat pentru neutralizarea a 10 mL suc gastric: valoarea inițială citită pe scala biuretei – valoarea finală citită pe scala biuretei. (Ex. 6,2 mL)

Pentru un titru al soluției NaOH de 0,00407, valoarea în grame a cantității de NaOH va fi de $6,2 \times 0,00407 = 0,02523$ g NaOH.

Știind faptul că 40g NaOH neutralizează 36,5 g HCl (sunt echivalente), atunci 0,02523g NaOH vor neutraliza X g HCl. Astfel calculul va fi:

$$X = \frac{0,02523 \times 36,5}{40} = 0,02302$$

0,2302 g HCl în 10 mL suc gastric, respectiv 2,302 g/L HCl

Evidențierea activității proteolitice a pepsinei

Pepsina este o enzimă proteolitică secretată la nivelul stomacului. Experimentul presupune urmărirea hidrolizei unui substrat (cazeină) de către pepsina din suc gastric, într-un interval de timp și la o temperatură standard.

Materiale necesare: probă de suc gastric (probă filtrată fără conținut alimentar), soluție Ringer, soluție acidă de cazeină 1‰ (la 37°C), eprubete, stativ, baie termostat, soluție acetat de sodiu 20%.

Mod de lucru: în două eprubete se introduc câte 10 mL de soluție acidă de cazeină 1‰ (Figura 4). În prima eprubetă se adaugă 1 mL de soluție Ringer, iar în a doua eprubetă se adaugă 1 mL de suc gastric (Figura 5.) Prima eprubetă va reprezenta proba martor, iar a doua eprubetă va fi proba experimentală.

10 mL soluție Cazeină

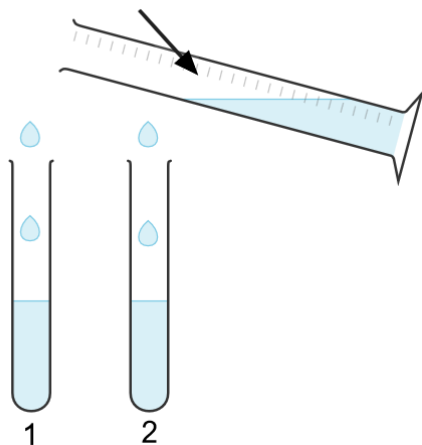


Fig. 04. În două eprubete se adaugă câte 10 mL soluție acidă de cazeină 1‰.

Ambele eprubete se introduc apoi la termostat la 37°C pentru 15 minute (Figura 6).

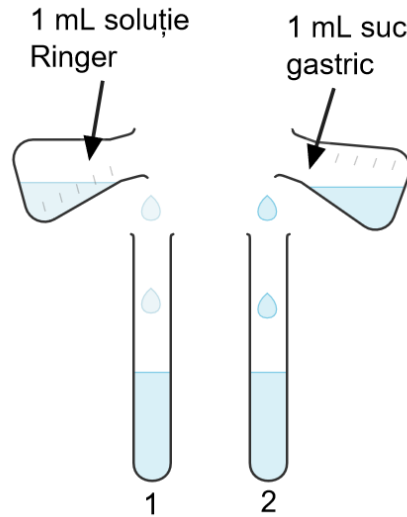


Fig. 05. În prima eprubetă se adaugă 1 mL de soluție Ringer, iar în eprubeta 2 se adaugă 1 mL suc gastric.

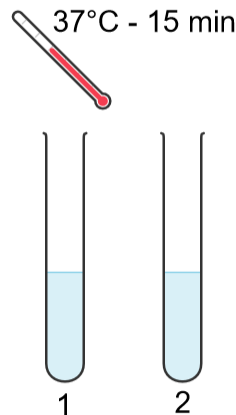


Fig. 06. Ambele eprubete se introduc în baie termostat pentru 15 minute – pentru a accelera acțiunea enzimei asupra substratului (Vezi capitol Enzime).

După 15 minute, în ambele eprubete se adaugă câte 1mL de soluție de acetat de sodiu 20% (Figura 7) pentru a determina precipitarea cazeinei.

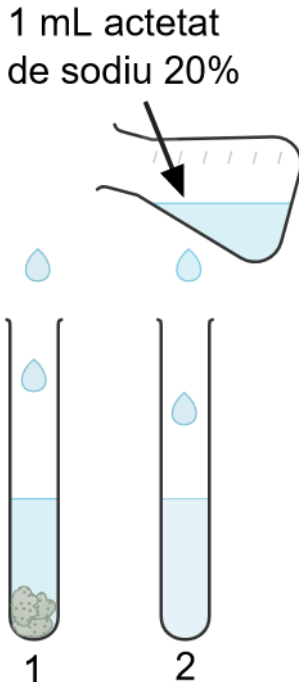


Fig. 07. În ambele eprubete se adaugă câte 1 mL de soluție acidă de acetat de sodiu 20%. În eprubeta 1 se observă formarea unui precipitat iar în eprubeta 2 soluția rămâne clară.

Rezultate (Figura 7): în eprubeta 1 se observă apariția precipitatului (eprubeta martor) – în lipsa enzimei (pepsină din suc gastric), cazeina nu a fost hidrolizată, astfel încât în prezența acetatului de sodiu aceasta a precipitat. În eprubeta 2, soluția este clară deoarece s-au pus în contact o enzimă cu un substrat corespunzător – pepsina din suc gastric a hidrolizat cazeina. În lipsa cazeinei, în eprubeta 2, nu se observă formarea precipitatului după adăugarea acetatului de sodiu.

Secreția biliară

Obiective:

- 1.Recoltarea secreției biliare
- 2.Cunoașterea compoziției chimice a bilei
- 3.Cunoașterea rolului secreției biliare
- 4.Enumerarea factorilor care influențează secreția biliară
- 5.Identificarea unor componenți biliari
- 6.Demonstrarea acțiunii emulsionante a bilei
- 7.Cunoașterea rolului determinării parametrilor biochimic hepatici

Bila reprezintă produsul de secreție continuă a ficatului, produsă la nivelul celulelor parenchimotoase hepatice. Secreția biliară are rol în digestie și absorbție. Bila este drenată depozitată în vezica biliară, apoi se varsă în duoden în perioadele digestive.

Recoltarea probelor de bilă se poate realiza în mod experimental prin introducerea unei canule pe traiectul canalului coledoc, prin realizarea unei fistule colecistice sau prin sondaj.

Culoarea secreției biliare variază de la galben-auriu, la brun închis, până la verde (în funcție de particularitățile de specie), tulbure (celule epiteliale descumate, săruri de calciu) sau limpede (bila hepatică ce nu a staționat la nivelul vezicii biliare), filantă (conține mucus), cu pH ce variază de la ușor acid la alcalin (în funcție de alimentație și specie).

Se pot deosebi două tipuri de bilă – bilă hepatică și bilă veziculară. Bila veziculară este de aproape 10 ori mai concentrată decât bila hepatică, având mai multă substanță uscată.

Secreția biliară conține: apă, glicocolat și taurocolat de sodiu și potasiu (săruri ale

acizilor glicocolic și taurocolic), pigmenți biliari (biliverdină, bilirubină), colesterol, acizi grași, fosfolipide, uree, mucină, ioni (sodiu, potasiu, calciu, magneziu, fier etc.).

Sărurile biliare reprezintă aproximativ $\frac{2}{3}$ din substanța uscată a bilei. Aproape întreaga cantitate de săruri biliare este resorbită la nivel intestinal (circuit hepato-entero-hepatic).

Atenție!

Secreția biliară are rol digestiv dar nu conține enzime.

Rolul digestiv al bilei este reprezentat de activitatea de emulsionare a lipidelor (trigliceride) – permite digestia și absorbția lipidelor, precum și absorbția vitaminelor liposolubile.

Notă:

Lipsa sărurilor biliare duce la pierderea pe cale digestivă a $\frac{2}{3}$ din lipidele și vitaminelor liposolubile (A, K, D și E) ingerate. Lipsa bilei poate duce astfel la instalarea unor hipovitaminoze complexe.

În afară de rolul său în procesele de digestie și absorbție, bila reprezintă și o cale de eliminare a anumitor produși endogeni (pigmenți rezultați din catabolismul hemoglobinei, lecitine, colesterol etc), exogeni (săruri ale metalelor grele, medicamente etc.).

Bila are rol laxativ și antiputrid (în lipsa sărurilor biliare, grăsimile nedigerate acoperă proteinele și împiedică acțiunea enzimelor proteolitice). Bila reprezintă totodată și cel mai eficient coleretic natural (sărurile biliare stimulează secreția biliară).

Factorii care influențează cantitatea de bilă produsă și eliminată la nivel intestinal:

⇒ Factori nervoși – sistemul nervos vegetativ: parasimpaticul crește secreția biliară.

⇒ Factori umorali – secretina și colecistokina cresc secreția și eliberarea de bilă.

Identificarea sărurilor biliare – reacția Pettenkofer

Această reacție urmărește punerea în evidență a unui compus de culoare roșie, format în prezența sărurilor biliare.

Materiale necesare: bilă, soluție zaharoză 10%, H₂SO₄ concentrat, eprubete, stativ, apă rece.

Mod de lucru: într-o eprubetă se introduc 3 mL de bilă, peste care se adaugă 0,5 mL soluție de zaharoză 10%. Se omogenizează, apoi cu ajutorul unei pipete se adaugă 2 mL de acid sulfuric concentrat, astfel încât cele două medii lichide să nu se amestece. Eprubeta se va menține sub jet de apă rece pentru a preveni încălzirea lichidului.

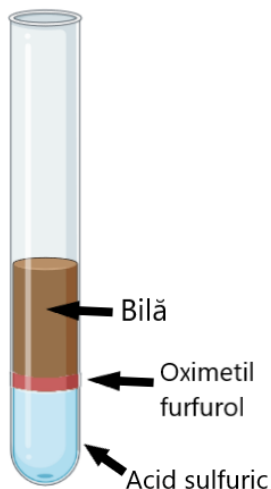


Fig. 08. Reacția calitativă de identificare a sărurilor biliare cu ajutorul acidului sulfuric concentrat. Reacție pozitivă cu formarea unui inel roșu.

La suprafața de contact dintre cele două lichide (bilă și acid sulfuric) se va observa formarea unui inel de culoare roșie-violacee (Figura 8). Sub acțiunea acidului sulfuric, zaharoza se descompune în levuloză și glucoză și împreună cu sărurile biliare formează compusul oximetil – furfurul de culoare roșie-violacee.

Evidențierea pigmentilor biliari – reacția Trousseau – Rosin

O parte din pigmentii biliari sunt eliminați fie prin segmentul digestiv, în fecale, fie pe calea sistemului excretor, în urină. Pigmenții biliari din urină pot fi puși în evidență cu ajutorul tincturii de iod. Astfel, urina cu bilirubină se va colora în verde în prezența iodului din tinctura de iod.

Materiale necesare: urină icterică (cu bilă) sau probă de bilă diluată cu ser fiziologic, tinctură de iod, pipete, eprubete, stativ.

Mod de lucru: într-o eprubetă se introduc 6 mL de bilă diluată sau urină icterică, peste care se adaugă 2-3 mL tinctură de iod. Soluția de iod se adaugă cu ajutorul unei pipete pe fundul eprubetei, astfel încât cele două lichide să rămână separate.

La suprafața de contact dintre cele două medii lichide (bilă și tinctură de iod) se va observa formarea unui inel de culoare verde, (Figura 9) ceea ce confirmă prezența pigmentilor biliari, respectiv a bilirubinei.

Evidențierea pigmentilor biliari – reacția Franke

Bilirubina se colorează în verde intens în prezența albastrului de metilen. Aceasta este o metodă calitativă pentru determinarea prezenței bilirubinei în urină.

Materiale necesare: probă de bilă diluată sau urină icterică (ce conține bilirubină), soluție de albastru de metilen 2‰, pipete, eprubete și stativ.

Mod de lucru: într-o eprubetă se introduc 4 mL de probă de cercetat (bilă diluată sau urină icterică), apoi se adaugă albastru de metilen picătură cu picătură, omogenizând constant.

Proba se va colora în verde intens, ceea ce va indica prezența bilirubinei. Prin oxidare (albastru de metilen este un compus cu proprietăți oxidative), bilirubina este transformată în biliverdină. O probă negativă, ce nu conține bilirubină, va avea culoare albastră.

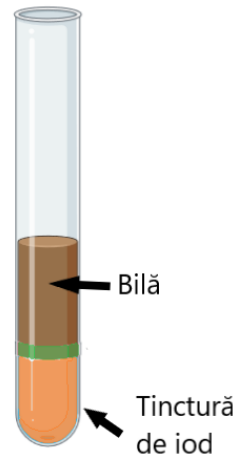


Fig. 09. Reacția Trousseau – Rosin – probă calitativă pentru identificarea bilirubinei în urină. O reacție pozitivă este reprezentată de formarea unui inel verde la suprafața de contact dintre cele două medii.

Demonstrarea acțiunii emulsionante a bilei

Secreția biliară are un rol activ în digestie prin procesul de emulsionare a lipidelor. Sărurile biliare scad tensiunea superficială a lipidelor, ceea ce va permite apariția miceliilor și va favoriza acțiunea enzimelor lipolitice pancreatice.

Materiale necesare: soluție de săruri biliare sau bilă proaspătă, ulei vegetal, apă distilată, pipete, eprubete și stativ.

Mod de lucru: în prima eprubetă se vor adăuga 4 mL de apă distilată și 1 mL de ulei vegetal. În a doua eprubetă se vor introduce 4 mL de soluție de săruri biliare sau 4 mL de bilă, peste care se va adăuga 1 mL de ulei vegetal. Ambele eprubete se vor omogeniza prin agitarea conținutului.

În prima eprubetă (martor) se vor observa două straturi separate – nemiscibile. Apa distilată și uleiul formează un amestec temporar, care la scurt timp se separă, formând o emulsie instabilă.

În a doua eprubetă, se va observa formarea unei emulsii stabile. Uleiul este dispersat în toată masa lichidului, sub formă de particule mici.

Parametri biochimici hepatici – scurtă clasificare

Testele biochimice asociate ficatului pot fi încadrate în trei categorii: parametri ce apreciază prezența unor leziuni hepatocelulare, parametri ce indică existența colestazei, și parametri asociați diminuării funcției hepatice.

Alaninaminotransferaza – ALT/GPT

Face parte dintr-un profil biochimic de bază (la carnivore). La câine și pisică, cantitatea cea mai mare a acestei enzime este întâlnită la nivelul hepatocitelor (în citoplasmă). Acest parametru mai poate fi alterat și în cadrul unor afecțiuni musculare.

La cabaline și rumegătoare, ALT-ul nu este găsit în cantități semnificative în hepatocite, astfel încât, acest parametru nu ar trebui inclus într-un profil biochimic de bază.

La câine și pisică, creșterea nivelului ALT-ului poate fi asociată cu modificări hepatice

precum: hipoxie, acumulare lipidică cu alterări metabolice, toxine bacteriene, inflamație, neoplazii, medicamente și toxice. La câine, valoarea ALT mai poate fi crescută în asociere cu administrarea de corticosteroizi și medicamente anticonvulsivante.²

Aspartataminotransferaza – AST/GOT

Această enzimă este prezentă în concentrații mari, la toate speciile, în hepatocite și celulele musculare (scheletice și striate), astfel, această enzimă nu are specificitate hepatică. O creștere a AST-ului seric poate fi întâlnită atât în cadrul unor leziuni hepatice, cât și în cadrul leziunilor musculare.

La fel ca și în cazul ALT-ului, pentru deosebirea originii leziunii, se vor investiga și parametrii specifici pentru celulele musculare (ex. CK – creatinkinaza).

În cazul cabalinelor și rumegătoarelor, AST reprezintă parametrul specific pentru țesutul hepatic (ALT-ul nu este produs în cantități mari la nivel hepatic) și ar trebui inclus în cadrul unui profil biochimic de bază. Pentru deosebirea originii leziunii, se va asocia cu alți parametri (ex. CK).

Fosfatasa alcalină – ALP

Această enzimă este produsă în numeroase țesuturi: ficat, os, rinichi, intestine, pancreas și placentă. Este asociată cu membrana celulară.

Majoritatea cantității de ALP serică este asociată cu originea hepatică și este asociată cu afecțiuni hepato-biliare precum colestaza, creșterea activității osteoblastice și diverse afecțiuni cronice. La câine, nivelul de ALP poate fi crescut ca o consecință a administrării de medicamente precum corticosteroizi și anticonvulsivante.

Gama-glutamyltransferaza – GGT

Această enzimă este produsă în majoritatea țesuturilor și este asociată cu membrana celulară. Nivelul seric de GGT crește foarte rapid în cadrul unor leziuni hepatice acute, probabil datorită eliberării de fragmente membranare în timpul distrugerii celulelor.

Cea mai mare concentrație a enzimei este întâlnită în pancreas și rinichi dar nivelul de GGT seric asociat cu originea hepatică. Creșterea acestuia este atribuită frecvent unor afecțiuni precum coleastă și hiperplazie biliară.³ La câine, o creștere este întâlnită și în cazul administrării unor medicamente precum corticosteroizi sau anticonvulsivante.

Parametri pentru aprecierea funcției hepatice

Bilirubina

Produs de degradare al hemoglobinei și a altor hemoproteine. Creșterea nivelului seric de bilirubină este asociată cu bolile hepatice obstructive și hemoliză.

Acizi biliari

Măsurarea concentrației de acizi biliari serici reprezintă un test util pentru aprecierea funcției hepatice, diagnosticul colestazei, și aprecierea evoluției unor anomalii circulatorii portale.

Acizii biliari sunt sintetizați din colesterol la nivel hepatic, apoi sunt conjugați și stocați în vezica biliară.

Pentru un diagnostic corespunzător, se vor doza și acizii biliari urinari și acizii biliari serici înainte și după masă (la aproximativ 2 ore).

Amoniacul plasmatic

Amoniacul este produs în cea mai mare parte de bacteriile intestinale în timpul digestiei, după care este absorbit în sânge. Amoniacul ajunge apoi la nivel hepatic unde

este utilizat pentru sinteza de uree și proteine. Alterarea vascularizației hepatice locale sau lezarea țesutului hepatic va face permite persistarea amoniacului în torentul circulator.

Creșterea nivelului de amoniac seric este asociată cu pierderea funcțională a aproape 60% din țesutul hepatic.

Amoniacul este instabil, astfel încât dozarea acestuia nu face parte din analizele de rutină. Recoltarea se face după un repaus alimentar de cel puțin 8 ore, în recipiente cu EDTA, sau heparină fără amoniac, care apoi sunt centrifugate (imediat, în primele 10 minute). Proba se va refrigera și apoi se va lucra rapid, în maxim 30-60 de minute de la recoltare, dacă nu este posibil, atunci proba se congelează.

Albumina serică

Albuminele sunt proteine sintetizate la nivel hepatic. Scăderea cantității de albumină este asociată cu pierderea funcțională a 60 – 80% din țesutul hepatic.

Globuline

Globulinele sunt sintetizate în cea mai mare parte în ficat (cu excepția imunoglobulinelor care sunt sintetizate în țesutul limfoid).

Nivelul globulinelor poate să scadă, datorită pierderii funcționale a țesutului hepatic, sau poate să crească odată cu producerea unor cantități mari de proteine de fază acută.

Glucoza

Hepatocitele reprezintă locul de stocare al glucozei, sub formă de glicogen, ceea ce va ajuta la reglarea nivelului plasmatic. Totodată, ficatul poate produce glucoză prin procesul de gluconeogeneză.

În afecțiunile hepatice, nivelul de glucoză serică poate să fie astfel crescut sau scăzut.

Uree

Ureea este sintetizată la nivel hepatic din amoniac. În cazul leziunilor hepatice, nivelul seric de amoniac va fi crescut iar nivelul ureei serice (BUN – blood urea nitrogen) va fi scăzut.

Colesterol

Creșterea nivelului de colesterol seric poate fi asociată cu afecțiuni precum colestaza, dar în anumite boli hepatice, nivelul colesterolului seric poate fi scăzut (colesterolul este sintetizat la nivel hepatic) atunci când există pierderi funcționale.

Factori de coagulare

Factorii de coagulare sunt în cea mai mare parte sintetizați la nivel hepatic, o distrugere a țesutului hepatic va avea astfel ca și consecințe scăderea cantității de factori de coagulare.

Totodată, ficatul mai este și sediu de sinteză pentru diverși factori anticoagulanți precum: antitrombină, proteina C, proteina S etc.

În cazul afecțiunilor de tipul colestazei este blocată activitatea de absorbție a vitaminei K.⁴

Sucul pancreatic

Obiective:

- 1.Recoltarea sucului pancreatic
- 2.Cunoașterea compoziției chimice a caracteristicilor fizice și ale sucului pancreatic
- 3.Cunoașterea rolului sucului pancreatic
- 4.Enumerarea factorilor care influențează secreția sucului pancreatic și diferențierea tipurilor de secreție pancreatică
- 5.Observarea și dozarea activității amilazei pancreatice din ser sau urină
- 6.Cunoașterea parametrilor biochimici asociați pancreasului exocrin

Sucul pancreatic reprezintă produsul de secreție al pancreasului exocrin și poate fi recoltat prin intermediul unei fistule la nivelul canalului Wirsung, sau prin sondaj duodenal (se recoltează suc duodenal – amestec de suc gastric, pancreatic, intestinal și bilă).

Sucul pancreatic este un lichid limpede, inodor, cu vâscozitate redusă, ușor hipertonic față de plasmă. Secreția acestuia este discontinuă. Valoarea pH-ului poate ajunge și până la valoarea 9, în funcție de concentrația de bicarbonat de sodiu. Sucul pancreatic este cel mai alcalin produs de excreție din organism.

Compoziția chimică a sucului pancreatic este variabilă în funcție de alimentele consumate sau de excitantul care a determinat secreția: apă în proporție de aproximativ 98%, bicarbonat de sodiu, cloruri, fosfați, potasiu, sodiu, magneziu, calciu, sulf, cupru, zinc, enzime.

Enzimele sucului pancreatic pot fi împărțite în trei categorii:

- *Enzime proteolitice:* tripsina, chimotripsină, elastază, colagenază, carboxipeptidaze, ribonucleaze, dezoxiribonucleaze
- *Enzime lipolitice:* lipază, fosfolipaze, colesterolsterază
- *Enzime glicolitice:* amilaza pancreatică

Enzimele proteolitice sunt sintetizate sub formă de proenzime care sunt activate în lumenul duodenal. Tripsinogenul este activat de către enterokinaza secretată de mucoasa duodenală. Tripsina acționează autocatalitic și activează restul proenzimelor proteolitice.

Sucul pancreatic, prin compoziția enzimatică, îndeplinește un rol foarte important în digestia alimentelor. Contribuie totodată la neutralizarea

acidității chimului gastric și creează condiții favorabile pentru activarea enzimelor digestive.

În mod asemănător cu secreția gastrică, suc pancreatic este reglat prin mecanisme neurale și hormonale. Secreția este stimulată în timpul fazei cefalice și gastrice ale digestiei gastrice pe cale vagală (parasimpatic).

O altă cale de stimulare este ajungerea alimentelor cu conținut lipidic și proteic în lumenul duodenal. Acestea vor determina secreția de colecistokinină (CCK) de către celulele neuroendocrine ale peretelui duodenal. CCK are rol de stimulare a secreției sucului pancreatic.

Scăderea pH-ului în lumenul duodenal va stimula secreția de secretină de către celulele neuroendocrine de la nivelul peretelui duodenal. Secretina are rol de stimulare a secreției de bicarbonat.

În funcție de mecanismele de stimulare, secreția pancreatică poate fi de două tipuri:
-Secreție hidreletică – bogată în apă și bicarbonat de sodiu, cu enzime în cantitate redusă (dependentă de secretină)
-Secreție ecboică – redusă cantitativ dar bogată în enzime (CCK, serotonină, stimulare vagală).

Observarea și dozarea activității amilazei pancreatice – metoda Wohlgemuth

Activitatea amilolitică a amilazei pancreatice se poate aprecia prin capacitatea de hidrolizare a amidonului în produși intermediari, evidențiați cu ajutorul soluției Lügol.

Materiale necesare: ser sanguin (sau urină), soluție ser fiziologic (NaCl 0,9%), soluție amidon 0,1%, soluție Lügol, stativ cu 10 eprubete numerotate, pipete, termostat.

Mod de lucru:

În cele 10 eprubete numerotate se vor realiza diluții crescânde de ser (sau urină) astfel: în prima eprubetă se introduc 3 mL de ser (sau urină), iar în celelalte 9 eprubete se introduc câte 1 mL de ser fiziologic. Apoi din prima eprubetă se ia 1 mL de ser (sau urină) și se adaugă peste serul fiziologic din a doua eprubetă. După omogenizarea conținutului, din a doua eprubetă se ia 1 mL și se introduce peste serul fiziologic din a treia eprubetă, apoi se omogenizează. Se repetă tehnica până la eprubeta 10. Se vor obține următoarele diluții: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, $\frac{1}{16}$, $\frac{1}{32}$, $\frac{1}{64}$, $\frac{1}{128}$, $\frac{1}{256}$ și $\frac{1}{512}$.

În toate cele 10 eprubete se adaugă câte 2 mL de soluție de amidon 0,1% (ce conține 2 mg de amidon). Se omogenizează conținutul eprubetelor, apoi probele se introduc la termostat, la 37°C timp de 30 de minute.

După 30 de minute, eprubetele se răcesc sub jet de apă și se adaugă în fiecare eprubetă câte 1-2 picături de soluție Lügol.

În prezența amilazei, amidonul este hidrolizat complet până la nivel de maltoză, sau hidrolizat parțial până la nivel de amilo- sau eritrodextrine. În prezența soluției Lügol, amidonul se colorează în albastru. Eprubetele ce conțin amidon complet hidrolizat vor rămâne incolore, iar cele care conțin amidon parțial hidrolizat vor avea culoare roșie sau violet.

Se va nota numărul eprubetei aflate înaintea celei cu conținut albastru. În această eprubetă, conținutul de amilază este suficient pentru hidrolizarea a 2 mg de amidon.

Teste biochimice și imunologice

Aceste teste sunt utile în practica medicală pentru diagnosticul unor afecțiuni pancreatice asociate cu distrugerea țesutului pancreatic sau cu insuficiența

funcțională pancreatică (scăderea cantității de suc pancreatic secretat).

Imunoreactivitatea tripsin-like la câine și pisică (cTLI și FTLI)

Acest test determină nivelul de tripsinogen și tripsină din ser cu ajutorul anticorpilor. În condiții fiziologice, aceste două forme enzimatică sunt eliberate în cantități foarte mici în circulația sangvină. În cazul unor leziuni ale țesutului hepatic, enzimele nu mai sunt produse în cantități suficiente iar cantitatea din ser va fi scăzută.

Aceste metode sunt mai specifice decât dozarea enzimelor pancreatice din sânge. Unele enzime precum lipaza pot avea și alte origini în afara pancreasului, ceea ce le face să fie nespecifice pentru diagnostic.

Elastaza

La câine, elastaza nu este degradată complet în lumenul intestinal, astfel poate fi identificată în fecale prin metoda ELISA. În cazul unei insuficiențe funcționale, nivelul elastazei va fi scăzut.

Lipaza

Se poate doza cantitativ lipaza serică însă nu se poate deosebi și originea acesteia. Lipaza este secretată și în alte organe în afară de pancreas. Nu este indicată utilizarea acestui parametru pentru diagnosticarea pancreatitelor la pisică.⁵

Nivelul lipazei poate fi modificat în afecțiuni renale, administrarea de corticosteroizi, neoplazii, boli hepatice, boli ale intestinului.

Amilaza serică

Amilaza serică are și alte origini în afară de pancreas, astfel, acest parametru nu este specific pentru diagnosticarea afecțiunilor pancreatice. Creșterea nivelului de amilază

serică poate fi asociată și cu afecțiuni renale sau intestinale.

Glucoza

Deși nivelul glicemiei este asociat în cea mai mare parte cu afecțiuni ale pancreasului endocrin și diabet, o afectare generală a țesutului pancreatic poate duce la instalarea hiperglicemiei (creșterea nivelului de glucoză serică).

Bibliografie

1. ChemCollective – National Science Digital Library (NSDL) – Carnegie Mellon – Online Resources for Teaching and Learning Chemistry – www.chemcollective.org
 2. Bunch SE (1993) Hepatotoxicity associated with pharmacologic agents in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23: 659–70.
 3. Center SA (2007) Interpretation of liver enzymes. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 37: 297–333.
 4. Badylak SF (1988) Coagulation disorders and liver disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 18: 87–93.
 5. Thrall MA, Weiser G, Allison RW, Campbell TW (2012) *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Second Edition*. Wiley-Blackwell, Iowa, SUA.
- Imagini realizate cu ajutorul aplicațiilor Biorender și Chemix (<https://chemix.org/>)**

Cordul

Cordul reprezintă un organ muscular cu localizare la nivelul cutiei toracice, iar speciile de animale domestice au un cord tetracameral: 2 atrii și 2 ventricule.

Mușchii cardiaci sunt alcătuiți din două tipuri de celule:

- Celule ce generează și conduc potențialul de acțiune
- Celule contractile, care de asemenea conduc potențialul de acțiune

Proprietățile cordului sunt reprezentate de:

- ⇒ Automatism
- ⇒ Batmotropism - excitabilitatea
- ⇒ Cronotropism - ritmicitatea
- ⇒ Dromotropism - contractilitatea
- ⇒ Inotropism - conductibilitatea

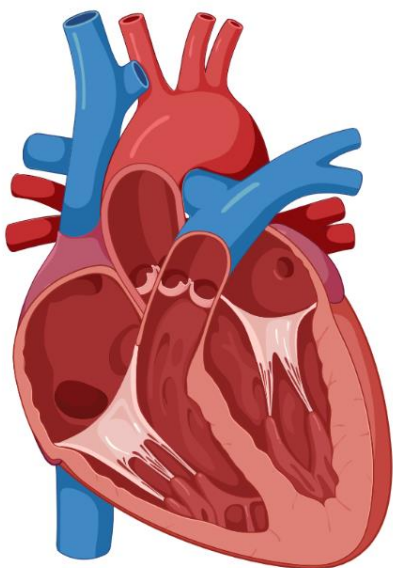


Fig. 1 Schema unei secțiuni longitudinale prin cord.*

Exercițiu:

Urmărind imaginea ilustrată în Figura 1, realizați o schemă pe caietul de lucru și numiți structurile identificate.

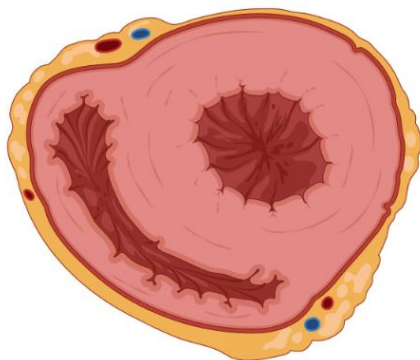


Fig. 2 Schema unei secțiuni transversale prin treimea inferioară a cordului. Observați diferența semnificativă dintre musculatura ventriculelor.*

Exercițiu:

Explicați diferența observată între musculatura ventriculului drept și cea a ventriculului stâng.

Termeni utili:

- ⇒ Frecvență cardiacă = numărul de cicluri cardiace (sistolă și diastolă) ce se succed într-o perioadă de timp (un minut). Se folosește exprimarea bpm (bătăi pe minut).
- ⇒ Debit cardiac = volumul de sânge ejectat din cord într-o perioadă de timp (un minut). Variaza în funcție de frecvența cardiacă și Volumul Bătaie.
- ⇒ Volumul bătaie = volumul de sânge ejectat din cord la sfârșitul unei sistole.

Demonstrarea prezenței țesutului excitoconducător - Ligaturile lui Stannius

Obiective:

1. Cunoașterea particularităților anatomice ale cordului de broască
2. Cunoașterea particularităților sistemului excitoconducător la broască
3. Cunoașterea modului de lucru și realizarea ligaturilor
4. Interpretarea rezultatelor obținute

Cordul de amfiban și reptile (cu excepția crocodilienilor) este tricameral. Cordul de broască este format din două atrii și un ventricul, după cum este ilustrat în figura 3.

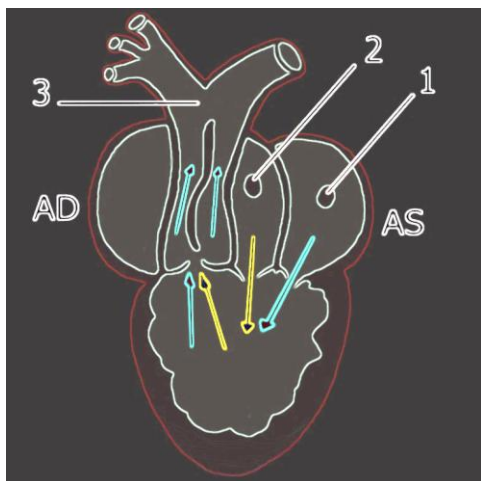


Fig. 03 Schemă a structurii cordului de broască. AS (atriu stâng), AD (atriu drept), 1 – vena pulmonară, 2 – Sinusul venos, 3 – Trunchi vascular care se ramifică în artere sistemice, artera carotidă și arterele pulmono-cutanate.

Principii metodei:

Evidențierea structurilor răspunzătoare de automatism în cordul de broască, și stabilirea proprietăților acestora.

Materiale:

Broască, placă din plută, ace, trusă de disecție, ață și cronometru.

Mod de lucru:

Pentru realizarea acestui experiment se vor utiliza broaște spinalizate. Broasca se va fixa în decubit dorsal pe planșa de lucru, cu ajutorul acelor cu gămălie.

➤ Se realizează o incizie la nivelul pielii, de-a lungul linei mediene, ce pornește de la mandibulă și ajunge până la bazin.

➤ Se secționează pielea din dreptul membrilor: câte o incizie perpendiculară pe linia mediană.

➤ Lambourile cutanate se îndepărtează prin tracționare și dilacerare.

➤ Se prinde vârful sternului cu ajutorul unei pense. Cu o foarfecă se realizează o butonieră în imediata vecinătate a structurii prinse în pensă.

➤ Se secționează musculatura de-a lungul marginilor plastronului sternal.

➤ Se îndepărtează plastronul sternal pentru a evidenția cordul.

➤ Se secționează pericardul și ligamentul frenulum.

➤ Cu ajutorul unui cronometru se va determina frecvența cardiacă (bătăi pe minut). Se notează rezultatul în fișa de lucru.

➤ **Ligatura I:** se aplică la limita dintre sinusul venos și atrii, după cum este ilustrat în figura 4. Se observă modificările apărute la nivelul structurilor cordului. Se notează frecvența cardiacă și se compară cu rezultatul obținut înainte de aplicarea ligaturii.

➤ **Ligatura II:** se aplică o altă ligatură la limita dintre atrii și ventricul, după cum este ilustrat în figura 5. Se notează frecvența cardiacă și modificările observate. Se compară rezultatele.

➤ **Ligatura III:** se îndepărtează prima ligatură efectuată între sinusul venos și atrii, după cum este ilustrat în figura 6. Dacă este

nevoie, se va face o ligatură nouă între atriul și ventriculul la o a doua broască. Se notează frecvența cardiacă și modificările observate. Se compară rezultatele.

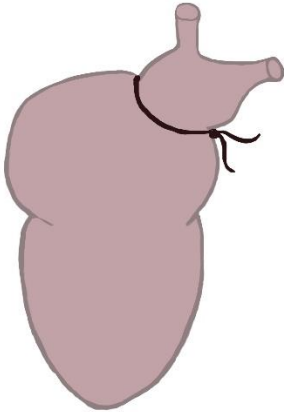


Fig. 4 Ligatura I – între sinusul venos și atriul.

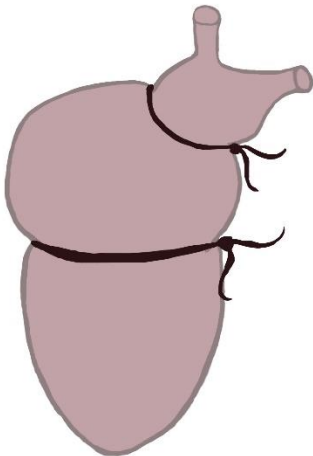


Fig. 5 Ligatura II – între atriul și ventriculul. Se păstrează ligatura I.

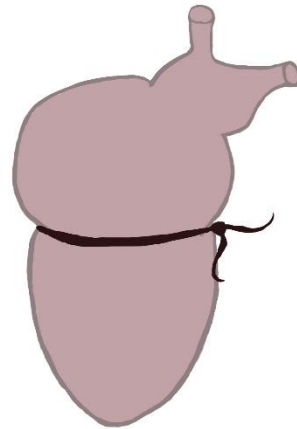


Fig. 6 Ligatura III – între atriul și ventriculul.

Rezultate:

Cordul de broască are trei structuri distincte cu rol în producerea și conducerea potențialului de acțiune în cord. Structurile au fost schematizate în figura 7.

➤ După aplicarea primei ligaturi, se va observa oprirea cordului. Sinusul venos va continua însă să se contracte cu o frecvență egală cu cea a cordului înainte de aplicarea ligaturii.

➤ După aplicarea celei de-a doua ligaturi, se va observa reluarea activității contractile a ventriculului, dar cu o frecvență modificată față de cea a sinusului venos (aproximativ jumătate). Se observă și faptul că atriile nu au activitate contractilă.

➤ După cea de-a treia ligatură (îndepărtarea primei ligaturi), se va observa reluarea activității contractile a atriilor, care va fi identică cu cea a sinusului venos. Ventriculul va continua să se contracte cu o frecvență mai redusă.

În concluzie, ganglionul Remak are funcție de pace-maker și stabilește ritmul de contracție a cordului. Ganglionul Ludwig are funcție inhibitorie, iar ganglionul Bidder are activitate contractilă, dar stabilește un ritm

mai redus față de ganglionul Remak. Cei trei ganglioni au activitate ierarhică, iar ganglionul Remak este structura care stabilește frecvența de contracție normală a cordului.

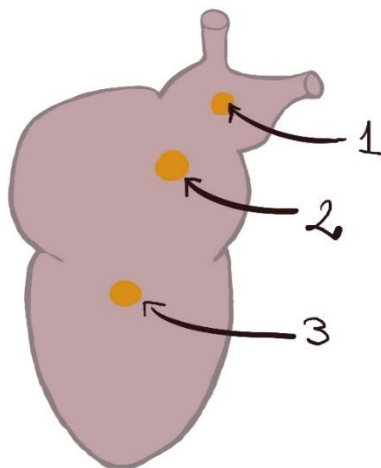


Fig. 7 Schemă a structurilor ce alcătuiesc sistemul de automatism la broască. 1 – Ganglionul Remak, 2 – Ganglionul Ludwig, 3 – Ganglionul Bidder.

Înregistrarea activității electrice a cordului

Obiective:

1. Cunoașterea principiului de funcționare a electrocardiografului
2. Cunoașterea particularităților structurilor sistemului excitoconducător la mamifere
3. Cunoașterea derivațiilor utilizate pentru realizarea unei electrocardiografii
4. Interpretarea unei cardiograme cu aspect fiziologic

Electrocardiografia reprezintă înregistrarea activității electrice a cordului și presupune

captarea potențialului electric generat la suprafața corpului.

Această metodă de investigație clinică permite înregistrarea direcției de propagare a biocurenților cardiaci de-a lungul sistemului excitoconducător, precum și vizualizarea grafică a amplitudinii undei generate. Înregistrarea potențialelor de acțiune este realizată prin amplasarea unor electrozi amplasați în direcții specifice – derivații.

Pentru realizarea acestui examen, pacientul va fi așezat în decubit lateral drept (oferă o calitate superioară a înregistrării prin diminuarea artefactelor produse de contracții musculare), realizându-se o imobilizare ușoară. Felinele tolerează mai bine o contenție în decubit ventral. Nu se recomandă sedarea pacienților deoarece orice tip de medicație utilizată va afecta activitatea normală a cordului.

Electrozii se atașează la nivelul membrelor, ușor proximal față de articulația cotului la membrele anterioare și la membrele posterioare cranial și proximal față de articulația tibio-femuro-patelară. Trebuie să se asigure un contact electric bun între electrozi și piele prin aplicarea unui gel de cuplare sau a alcoolului sanitar. Pacientul trebuie să fie așezat pe o suprafață ce oferă izolare electrică și trebuie ținut la distanță față de alte echipamente electrice.

Sunt utilizate trei derivații bipolare standard pentru înregistrarea biocurenților cardiaci. Asocierea acestora este numită triunghiul lui Einthoven (figura 8).

⇒ Derivația I – electrozi amplasați pe membrele anterioare

- ⇒ Derivația II – electrozi amplasați pe membrul superior drept și membrul inferior stâng
- ⇒ Derivația III – electrozi amplasați pe membrul superior stâng și membrul inferior stâng

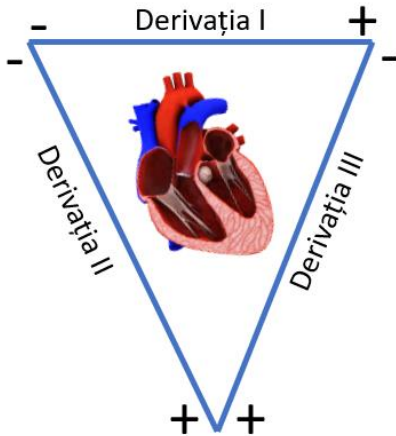


Fig. 8 Triunghiul lui Einthoven descris prin amplasarea electrozilor în derivațiile bipolare.

Aceeași electrozi oferă și înregistrarea a trei derivații unipolare. Fiecare electrod este pozitiv. Amplitudinea undelor este mai mică decât ce înregistrată în derivațiile bipolare, astfel, undele sunt amplificate în mod automat (augmented volt – right, left, foot):

- ⇒ aVR – membrul anterior drept – electrodul roșu
- ⇒ aVL – membrul anterior stâng – electrodul galben
- ⇒ aVF – membrul posterior stâng – electrodul albastru

Mod de lucru:

Pacientul se așază pe masa de examinare, se conționează în decubit lateral drept sau în decubit ventral (piscă) și se atașează

electrozii după umectarea pielii cu alcool sanitar sau cu gel conductor (utilizat pentru electrocardiogramă, electroencefalogramă, electromiogramă etc.). Se pornește electrocardiograful și se pornește înregistrarea.

Se va observa o înregistrare grafică (pe hârtie milimetrică) a parcursului potențialului de acțiune prin sistemul excitoconducător al cordului. Un ciclu cardiac corespunde unui complex de unde PQRST ilustrat în figura 9.

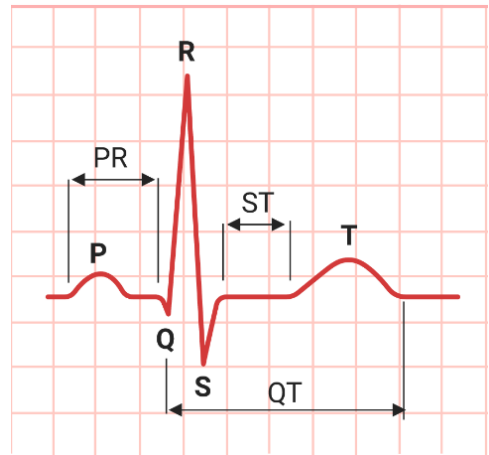


Fig. 9 Înregistrarea grafică a activității electrice a cordului în timpul unui ciclu cardiac.*

- ⇒ Unda P – depolarizarea atriilor.
- ⇒ Intervalul PR – depolarizarea atriilor și trecerea potențialului de acțiune prin nodul atrio-ventricular (AV). Oferă informații legate de eficiența conducerii potențialului de la atriile la ventricule.
- ⇒ Segmentul PR – de la sfârșitul undei P la începutul complexului QRS – conducerea potențialului de acțiune prin nodul AV și reprezintă linia izoelectrică sau linia de

referință cu care este comparată amplitudinea tuturor undelor.

⇒ Complexul QRS – depolarizarea ventriculelor.

⇒ Segmentul ST – faza de platou a potențialului de acțiune, întâlnește între depolarizarea și repolarizarea ventriculelor.

⇒ Punctul J – locul în care începe intervalul ST. Pentru evaluarea poziției intervalului ST, se compară diferența (în mm) dintre poziția punctului J și cea a segmentului PR.

⇒ Unda T – repolarizarea ventriculelor.

⇒ Unda U – observată ocazional, este pozitivă și întâlnește după unda U, cu o amplitudine de aproximativ $\frac{1}{4}$ din unda U. Originea acestei unde este încă necunoscută. O undă U inversată sau cu amplitudine mare este considerată eveniment patologic.

⇒ Intervalul QT – depolarizarea și repolarizarea ventriculelor.

1 mm pe o linie verticală este echivalent cu o tensiune electrică de 0,1 mV sau 1 mV pentru 1 cm. La o viteză de deplasare a înregistrării grafice de 25 mm/s, 1 mm pe o linie orizontală reprezintă 0,04 s. Undele localizate deasupra liniei izoelectrice sunt considerate pozitive, iar liniile localizate sub linia izoelectrică sunt considerate negative. O undă poate fi pozitivă în o derivație și negativă în altă derivație.

Calcularea frecvenței cardiace (FC)

Se măsoară distanța în mm dintre două unde RR (interval RR). Pentru o viteză de 25 mm/s: $FC = 1500/X$ mm. Pentru o viteză de 50 mm/s: $FC = 3000/X$ mm. Unde X reprezintă distanța dintre două unde R măsurată în mm.

Observarea ritmicității activității cardiace

Se măsoară distanțele dintre fiecare interval RR. O aritmie ușoară poate fi observată în mod fiziologic la câine (figura 10).

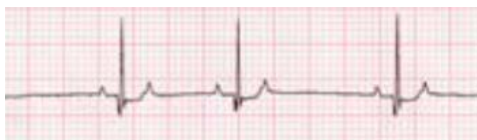


Fig. 10 Aritmie fiziologică la câine. Se observă lungimile diferite ale intervalelor RR (aritmie sinusală fiziologică).

Interpretarea ECG se face prin măsurarea tuturor intervalelor și undelor observate (amplitudine în mV și durată în s). Se mai poate urmări prezența sau absența undelor, dacă există câte o undă P corespunzătoare pentru fiecare complex QRS, dacă undele au tot timpul aceeași amplitudine și durată etc.

Bibliografie

*Imagini realizate cu ajutorul aplicației Biorender

Funcția principală a sistemului excretor este de a produce urina, mediu lichid prin care sunt eliminate din organism subproduse nefolositoare rezultate din procesele metabolice ale organismului, precum și alte substanțe precum toxice sau medicamente. Alte funcții ale sistemului excretor sunt legate de producerea eritropoietinei, reglarea pH-ului, reglarea presiunii sanguine, reglarea concentrației de solviți din plasmă și sinteza vitaminei D.

Examinarea sistemului urinar poate fi realizată prin numeroase metode: determinarea unor parametri biochimici din plasmă, examinarea organoleptică a urinei, dozarea unor parametri din urină, determinarea proprietăților fizico-chimice ale urinei, realizarea examenului microbiologic al urinei și realizarea examenului citologic al sedimentului urinar.

Rata de filtrare glomerulară (RFG)

Obiective:

1. Definierea ratei de filtrare glomerulară
2. Cunoașterea modului de determinare a ratei de filtrare glomerulară
3. Cunoașterea modului de estimare a ratei de filtrare glomerulară
4. Stabilirea importanței clinice a estimării ratei de filtrare glomerulară

Rata de filtrare glomerulară reprezintă cea mai eficientă metodă de predicție a funcției renale, fiind condiționată de numărul nefronilor funcționali. Poate fi definită ca volumul de plasmă filtrată de la nivelul capilarelor glomerulare în spațiul Bowman pe unitate de timp.

Rata de filtrare glomerulară normală este de 3 – 6 mL/min/kg la câine și 2 – 4 mL/min/kg la pisică. Aceste valori variază în funcție de cantitatea de sânge ce ajunge la nivelul rinichiului, presiunea arterială,

presiunea interstițială și presiunea intratubulară.

Determinarea directă a ratei de filtrare glomerulară este foarte costisitoare și dificil de aplicat într-un context clinic. Aceasta poate fi realizată utilizând substanțe care sunt filtrate liber de către glomerul și care nu sunt secretate sau reabsorbite: inulină, iohexol, manitol, EDTA sau creatinină exogenă.

O metodă alternativă pentru evaluarea funcției renale este estimarea ratei de filtrare glomerulară prin studierea clearance-ului creatininei endogene. Producția creatininei este relativ constantă în organism iar excreția este aproape totală pe cale renală.

În context clinic, calcularea clearance-ului creatininei poate fi utilă atunci când se suspectează o afecțiune renală, iar nivelul creatininei și ureei serice sunt normale. Poate fi calculat pe baza creatininei serice, creatininei urinare, volumului de urină produsă pe unitate de timp și greutatea pacientului. Este astfel necesară golirea completă a vezicii urinare la începutul experimentului și măsurarea volumului de urină produsă pe durata studiului. Se va folosi următoarea formulă de calcul:¹

$$C_{Ct} = \frac{C_{t u} \times vol. urină / timp / kg}{C_{t s}}$$

Unde:

- ⇒ C_{Ct} = clearance creatinină
- ⇒ C_{t u} = creatinină urinară
- ⇒ C_{t s} = creatinină serică

Rata de filtrare glomerulară indică modul de funcționare al rinichilor și poate fi utilizată ca o metodă de screening a pacienților sau pentru monitorizarea răspunsului la tratament.²

Parametrii serici asociați sistemului urinar

Obiective:

1. Cunoașterea modului de producere și excreție a creatininei
2. Cunoașterea modului de producere și excreție a ureei serice
3. Cunoașterea rolului ureei și creatininei în organism
4. Stabilirea rolului determinării parametrilor biochimici creatinină și uree în caracterizarea funcției renale
5. Cunoașterea unor factori ce determină variația fiziologică a valorilor creatininei și ureei
6. Stabilirea importanței raportului uree:creatinină
7. Interpretarea valorilor de referință pentru speciile de animale domestice

Una dintre funcțiile sistemului urinar este de a excreta diverse molecule. Printre acestea se regăsesc ureea și creatinina. Creșterea valorilor acestor parametri este regăsită în literatură sub termenul de azotemie.

Creatinina este un subprodus rezultat din degradarea creatinei și fosfocreatinei la nivel muscular. Creatina este sintetizată în cea mai mare parte în ficat și este apoi transportată la nivelul mușchilor striai scheletici. La acest nivel, este convertită în fosfocreatină (rol energetic) cu ajutorul enzimei creatinkinază. Producția musculară de creatinină este relativ constantă și este proporțională cu masa musculară.

Deși un aport alimentar de creatină (prin consum de carne) poate crește valoarea creatininei serice prin absorbție intestinală, acest lucru ne se realizează datorită creșterii reflexe a ratei de filtrare glomerulară.

O creștere a valorii creatininei poate fi întâlnită în mod fiziologic la caii cu

musculatură foarte bine dezvoltată și la câinii din rasa Greyhound.³ Valori scăzute pot fi întâlnite în timpul gestației sau la câinii de talie mică.⁴

Ureea este produsă la nivel hepatic din amoniu și bicarbonat și reprezintă modul principal de excreție a azotului. În literatură sau în cadrul buletinelor de analize, ureea serică mai poate fi întâlnită sub denumirea carbamidă și cu prescurtarea BUN (blood urea nitrogen) SUN (serum urea nitrogen) sau UN (urea nitrogen).

Ureea serică este filtrată la nivel glomerular, dar aproximativ 50% este reabsorbită. Cantitatea reabsorbită este invers proporțională cu viteza de curgere a sângelui. O anumită cantitate de uree este excretată prin salivă, transformată în amoniu la nivel intestinal de către bacterii. Amoniul este absorbit prin intestin iar la nivel hepatic este reconvertit în uree. Astfel, pentru majoritatea speciilor, ureea nu este secretată pe cale intestinală. O excepție importantă este întâlnită la rumegătoare unde microorganismele de la nivelul rumenului transformă ureea în aminoacizi.

O dietă cu aport proteic ridicat poate să crească pentru o perioadă valoarea ureei serice. Proteina descompusă la nivel intestinal eliberează amoniu care este absorbit și transformat în uree la nivel hepatic.

Valori crescute ale ureei serice pot fi întâlnite în mod fiziologic în cazul unei creșteri a catabolismului proteic (de ex. exerciții fizice suprasolicitante) și în cazul administrării unei diete hiperproteice. Valorile vor fi scăzute în cazul administrării unei diete cu conținut proteic redus și la animalele tinere.

Valorile ureei și creatininei vor fi crescute în momentul în care aproximativ 75% din nefroni devin inactivi. Deși nu pot indica

evoluția unei disfuncții renale timpurii, există foarte puține alte cauze ce duc la modificarea valorilor. Astfel, acești parametri biochimici sunt asociați cu sistemul excretor.

Raportul uree:creatinină poate oferi informații legate de sursa azotemiei (renală sau în afara rinichiului – ex: deshidratare). La animalele mici, raportul normal este de aproximativ 20:1 iar la animalele mari de 10:1.¹

Ureea serică poate fi estimată cu ajutorul unor teste rapide de tip „strip”, dar utilitatea acestei metode ar trebui limitată doar la indicarea unei creșteri a valorii peste limita fiziologică. Pentru obținerea unor valori exacte se recomandă dozarea cantitativă prin metode biochimice (spectrofotometrie).

Valorile fiziologice pentru creatinină și uree serică au fost înscrise în tabelul 1. Au fost înscrise valorile exprimate în sistem internațional (μmol/L pentru creatinină și mmol uree/L pentru uree serică) și în unitatea de măsură utilizată în mod frecvent în aprecierea clinică (mg/dL).

Recoltarea probei de urină

Obiective:

- 1.Cunoașterea modurilor de recoltare a urinei
- 2.Stabilirea avantajelor și dezavantajelor fiecărei metode de recoltare
- 3.Cunoașterea materialelor necesare recoltării probelor de urină
- 4.Enumerarea principalelor tipuri de investigații realizate din proba de urină

Recoltarea urinei este un pas foarte important în realizarea sumarului de urină și a uroculturii. Metoda de recoltare și recipientul folosit pot influența rezultatele obținute. Pentru o interpretare corectă, se recomandă recoltarea probelor înainte de administrarea unui tratament sau a fluidoterapiei deoarece medicamentele pot afecta rezultatele iar diluarea urinei afectează semnificativ aspectul sedimentului și greutatea specifică.

Urina poate fi recoltată prin diverse metode. Printre acestea se pot enumera: compresia manuală a vezicii urinare, introducerea unui cateter transuretral, cistocenteză și stimularea micțiunii.

Tabel 1. Interval de referință pentru creatinină și uree serică

Specia	Creatinină		Uree serică	
	mg/dL	μmol/L	mg/dL	mmol uree/L
Câine	0,5 – 1,7	44 – 150	8 – 28	2,9 – 10
Pisică	0,9 – 2,2	80 – 194	19 – 34	6,8 – 12,1
Cal	0,4 – 2,2	35 – 194	11 – 27	3,9 – 9,6
Vacă	0,5 – 2,2	44 – 194	10 – 25	3,6 – 8,9
Porc	1 – 2,7	141 – 239	10 – 30	3,6 – 10,7
Oaie	1,2 – 1,9	106 – 168	8 – 20	2,8 – 7,1
Capră	1 – 1,8	88 – 159	10 – 20	3,6 – 7,1
Iepure	0,5 – 2,5	44 – 221	20 – 45	7,1 – 16,1

Valori de referință după MDS Veterinary Manual

Alegerea metodei de recoltare trebuie să fie adaptată la specia examinată, tipul investigațiilor realizate și să urmărească minimizarea traumatismelor de natură iatrogenă ce pot duce la instalarea unor infecții urinare.

Recoltarea liberă a probei de urină este mai facilă pentru specii precum câinele și se recomandă o probă din mijlocul procesului de micțiune. Urina inițială poate să conțină bacterii localizate la nivelul porțiunilor terminale ale aparatului excretor. Se recomandă de asemenea recoltarea probei de dimineață, când urina este mai concentrată. În urina foarte diluată, celulele precum hematii și leucocite vor fi lizate și nu vor putea fi identificate în examinarea sedimentului urinar. Această metodă nu prezintă riscuri pentru animal și limitează stresul asociat recoltării.

Compresia vezicii urinare prin peretele abdominal poate fi folosită ca metodă de recoltare pentru câine și pisică (figura 1). Riscul producerii unor infecții sau traumatisme este minim, probele putând fi recoltate de la indivizi cu vezica urinară destinsă (plină de conținut). Este necesară limitarea forței aplicate peretelui vezicii urinare pentru a împiedica traumatismele. Proba poate fi contaminată cu celule sau bacterii de la nivelul aparatului genital sau pielii, ceea ce nu permite utilizarea acesteia pentru realizarea uroculturii. Compresia vezicii nu este întotdeauna asociată și cu relaxarea sfincterului uretral, astfel este posibilă refularea urinei în uretere, rinichi sau glanda prostată. Pacientul poate fi menținut în poziție patrupodală sau poate fi așezat în decubit lateral. Se aplică o presiune moderată la nivelul pereților vezicii urinare și se așteaptă relaxarea sfincterelor uretrale.

Manopera poate dura câteva minute. În cazul în care pacientul nu micționează, se poate încerca mutarea acestuia în cușca de transport (dacă aceasta este prevăzută cu litieră) sau se poate scoate la plimbare (câine) și se va urmări recoltarea liberă.

Atenție!

Nu se va utiliza manopera de compresie a vezicii urinare la pacienții suspectți de obstrucții uretrale (parțiale sau totale).

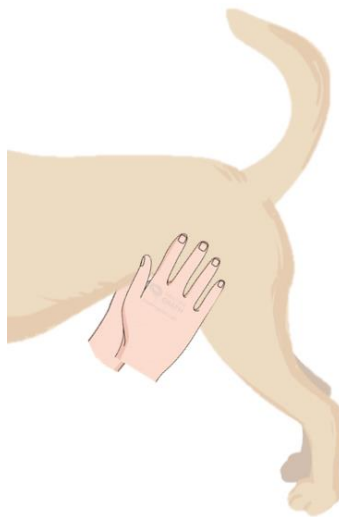


Fig. 01. Compresia vezicii urinare la câine ca metodă de recoltare a probei de urină.

Cateterizarea transuretrală reprezintă o metodă de recoltare frecvent întâlnită în practica medicală veterinară. Dacă nu este realizată corespunzător poate duce la înseminarea bacteriană a vezicii urinare sau producerea leziunilor traumatiche. Această manoperă poate avea un scop diagnostic sau terapeutic. Este justificabilă cateterizarea transuretrală pentru recoltarea probelor de urină destinate unui set complet de analize (inclusiv urocultură),

recoltarea probelor la un anumit interval de timp, măsurarea cantității de urină produsă de către pacient, introducerea unei substanțe de contrast etc. Cateterizarea în scop terapeutic este necesară pentru situațiile precum retenție urinară sau administrarea locală de medicamente.

Este importantă alegerea dimensiunii cateterului, a materialului din care este fabricat, tipul acestuia, precum și adaptarea lungimii la talia animalului. Se recomandă utilizarea cateterelor sterile, flexibile, cu suprafață netedă.

Riscul apariției unor complicații precum traumatisme sau infecții ca urmare a sondajului uretral sunt legate de individ (temperament, sex) sau de specie (manoperele sunt mai dificilă la pisică, dar câinele este mai sensibil la dezvoltarea unei infecții urinare).

Se recomandă realizarea unei retenții corespunzătoare (într-o poziție comodă și suficient de fermă astfel încât să prevină mișcările bruște) sau sedarea animalului (mai frecvent la feline). Cateterul se menține steril, având grijă să nu atingă masa, blana sau pielea pacientului, iar examinatorul va folosi mănuși sterile. Pentru a preveni disconfortul, se poate utiliza și un anestezic local de tipul lidocainei. Vârful cateterului și zona adiacentă vor fi acoperite cu lubrifianți medicali sterili. Cateterul este inserat în lumenul uretrei prin mișcări treptate, fără a forța inserția. Dacă se observă apariția unei rezistențe, cateterul se retrage ușor, apoi se inseră cu mișcări ușoare de rotație. Dacă persistă dificultatea, se va alege un cateter cu diametrul mai mic. Se poate percepe o rezistență normală atunci când cateterul ajunge la nivelul sfincterului uretral. Avansarea tubului este oprită în momentul în care se observă exprimarea urinei (Figura 2).

La femele, ghidarea cateterului se poate face cu ajutorul degetului (tehnica digitală - fără vizualizare, poate fi folosită pentru cățea), sau se poate vizualiza prin folosirea unui speculum sau a unui endoscop. Pentru recoltarea probei de urină se poate folosi și o seringă atașată la capătul extern al cateterului.

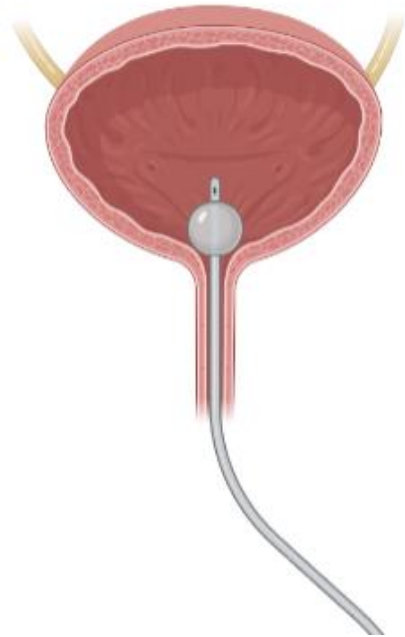


Fig. 02. Cateter cu balon ce oprește retragerea sondei.

Cistocenteza reprezintă manoperele de puncționare a vezicii urinare cu ajutorul unui ac, cu scopul recoltării unei probe de urină. Această manoperă este asociată cu mai puține complicații decât cateterizarea transuretrală și este în general mai bine tolerată de către pacienți (în special felinele). Această intervenție poate fi realizată și cu scop terapeutic, atunci când se identifică o obstrucție la nivelul uretrei. O complicație posibilă este reprezentată de producerea unei hemoragii locale, tradusă

prin hematurie tranzitorie și prezența hematiilor în sedimentul urinar).

Pentru recoltare se folosesc seringi adaptate la talia animalului (2 – 60 mL), cu ac hipodermic sau ac spinal. Pentru câine și pisică se pot folosi ace 22G.⁵

Manopera se realizează doar atunci când vezica urinară este destinsă de conținut. Organul se poate identifica prin palpație sau cu ajutorul unei sonde ecografice (puncție ghidată ecografic – figura 3). Acul se introduce la un unghi de 45° (pentru a facilita menținerea elasticității naturale a peretelui muscular al vezicii), în porțiunea ventrală sau ventro-laterală a vezicii (pentru a evita punționarea ureterelor sau a unor vase abdominale mari).

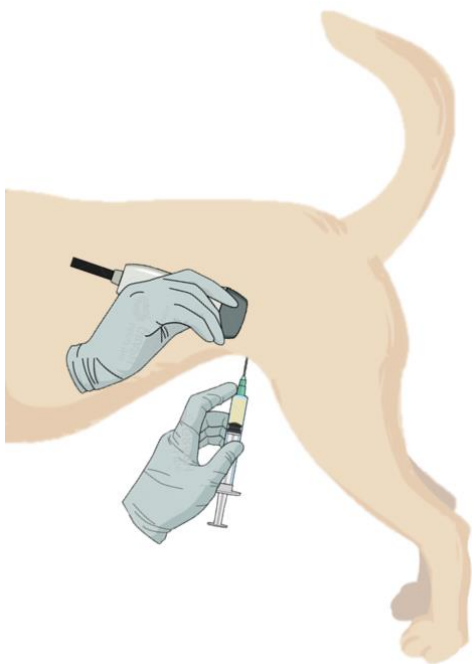


Fig. 03. Cistocenteză ghidată ecografic. La câine, această manoperă poate fi realizată și în poziție patrupodală.

Urina recoltată va fi depozitată în recipiente sterile, ce obișnuit au o zonă mată (Figura 4) destinată înscrierii unor informații precum numele pacientului, numele proprietarului, numărul din registrul de consultații, momentul recoltării, metoda utilizată pentru recoltare etc.



Fig. 04. Recipient utilizat pentru recoltarea probelor de urină.

Proba poate fi distribuită în diverse recipiente în funcție de utilitatea acestora:
⇒ Tuburi conice ce facilitează centrifugarea
⇒ Recipiente cu substanțe preservante (ex. acid boric)

În funcție de metoda de recoltare, timpul scurs de la recoltare și recipientul utilizat, se pot realiza investigații pentru identificarea unor compuși din urină, determinarea proprietăților fizice ale urinei, teste toxicologice, examinarea sedimentului urinar și observarea proprietăților organoleptice.

Determinarea proprietăților organoleptice ale urinei

Obiective:

1. Cunoașterea importanței culorii în aprecierea probei de urină
2. Cunoașterea importanței mirosului în caracterizarea probei de urină
3. Cunoașterea importanței turbidității în caracterizarea probei de urină
4. Cunoașterea importanței volumului probei de urină
5. Stabilirea importanței proprietăților organoleptice pentru analiza unei probe de urină

Proprietățile organoleptice ale urinei sunt printre primele aspecte observate de către examinator și oferă deseori informații rapide cu privire la starea de sănătate a aparatului excretor. Aprecierea acestor proprietăți se realizează în momentul recoltării probei și au avantajul de a nu necesita instrumentar specializat sau materiale consumabile. Caracterizarea probei de urină se face din punct de vedere calitativ.

Culoarea urinei trebuie să fie interpretată în paralel cu greutatea specifică, deoarece intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația. Astfel, o probă de urină diluată va avea o culoare galben-pal, până la aproape incolor (în funcție de cantitatea de urină recoltată). O probă concentrată de urină va avea o culoare galbenă, până la galben – chihlimbar.

Culoare se va analiza cu un fundal alb în spatele probei și la o lumină adecvată. Culoarea galbenă specifică este dată de prezența urobilinei și se poate modifica atunci când sunt prezenți alți pigmenți de natură exogenă sau endogenă. Câteva

exemple pentru modificarea fiziologică și patologică a unei probe de urină au fost exemplificate în figura 5.



Fig. 05. Recipientele reprezintă probe de urină cu variații ale culorii. Recipientul 1 reprezintă o probă de urină diluată, cu culoare galben deschis, recipientul 2 reprezintă o probă de urină cu culoare galbenă normală, recipientul 3 indică o probă concentrată de urină de culoare galben – chihlimbar, recipientul 4 conține o probă de urină colorată în roșu ce indică obișnuit prezența hematiilor sau a hemoglobinei în urină, recipientul 5 conține o probă de urină de culoare verde – albastruie, asociată obișnuit cu administrarea albastrului de metilen, prezența unei infecții cu *Pseudomonas aeruginosa* sau prezența biliverdinei, recipientul 6 conține o probă de culoare maro sau galben – maro întâlnită obișnuit în prezența pigmentilor biliari, a methemoglobinei sau a mioglobinei. Primele 3 probe reprezintă aspecte fiziologice, iar ultimele 3 reprezintă aspecte patologice.

Mirosul urinei este specific și are o intensitate direct proporțională cu gradul de

concentrație al probei și cu cantitatea de urină recoltată. Mirosul poate fi descris ca fiind aliaceu sau amoniacal și la un animal cu status de hidratare normal, ar trebui să fie insesizabil.

Mirosul urinei este mai puternic la unele specii precum feline și poate varia în funcție de statusul hormonal al animalelor. Mirosul poate fi modificat în cazul prezenței unei infecții urinare, administrării unor medicamente sau în cadrul patologiei unor afecțiuni precum diabetul zaharat (miros dulceag).

Turbiditatea sau claritatea urinei poate fi apreciată prin vizualizarea unui fundal cu scris (revistă, ziar etc.) prin proba recoltată într-un recipient transparent, după cum este schematizat în figura 6.

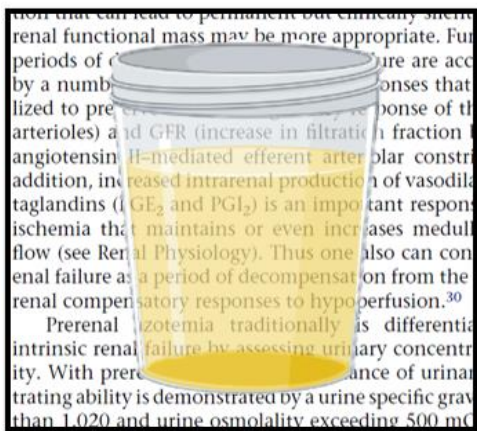


Fig. 06. Aprecierea turbidității unei probe de urină prin examinarea unui fundal cu scris.

Pentru majoritatea speciilor de animale, urina trebuie să fie limpede, fără prezența turbidității. Excepțiile sunt întâlnite la specii precum cabaline, cobai sau iepure, unde este considerată fiziologică prezența unor anumite tipuri de cristale ce afectează turbiditatea. La cabaline, prezența

fiziologică a mucusului în urină va afecta în mod direct turbiditatea probei, crescând totodată și vâscozitatea (urină cu aspect filant).

Volumul urinei variază în funcție de momentul recoltării, gradul de hidratare al animalului, metoda de recoltare etc. Este de asemenea invers proporțional cu greutatea specifică.

Volumul de urină produs de un animal sănătos este de 20 – 40 mL/kg/zi la canide și 10 – 20 mL/kg/zi la feline.¹

Creșterea volumului de urină se numește poliurie, scăderea volumului de urină se numește oligurie, iar absența urinei se numește anurie.

Determinarea proprietăților fizico - chimice ale urinei

Obiective:

1. Cunoașterea importanței pH-ului în caracterizarea probei de urină
2. Cunoașterea modului de determinare al pH-ului unei probe de urină
3. Cunoașterea importanței greutății specifice în caracterizarea probei de urină
4. Cunoașterea modului de determinare a greutății specifice a probei de urină

pH-ul urinei variază în funcție de specie, fiind neutru spre acid la carnivore (5 – 7) și neutru spre alcalin la ierbivore (7 – 8). pH-ul se menține în general între limitele 5 și 9 și reflectă în principal statusul echilibrului acido – bazic în organism.¹

Creșterea pH-ului unei probe de urină este asociată cu prezența unei infecții urinare, anumite medicamente (ex. bicarbonat de sodiu) sau stocarea prelungită la temperatura camerei sau contaminarea cu

detergenți. La un pH de peste 8, pot fi întâlnite modificări ale sedimentului urinar, precum liza hematiilor, a leucocitelor și distrugerea cilindrilor. Scăderea pH-ului unei probe este asociată cu creșterea consumului de carne și unele medicamente (ex. furosemid).

pH-ul poate fi determinat cu ajutorul stripurilor urinare. Această metodă este rapidă și utilă mai ales în cadrul examinării probelor în fermă. Limitarea utilității stripurilor urinare este dată de imposibilitatea aprecierii probelor cu modificare de culoare (roșu, verde etc.). Pentru o determinare exactă se recomandă utilizarea unui pH-metru (figura 7).



Fig. 07. Utilizarea unui pH-metru pentru determinarea unei valori exacte pentru proba de urină.

Greutatea specifică a unei probe de urină oferă informații vitale cu privire la sănătatea rinichiului, mai exact capacitatea renală de a concentra sau de a dilua urina. Aprecierea densității urinare se face în comparație cu densitatea apei distilate (1,000).

Determinarea greutateii specifice poate fi realizată cu ajutorul stripurilor urinare sau cu ajutorul unui refractometru (figura 8)



Fig. 08. Refractometru utilizat pentru determinarea greutateii specifice a unei probe de urină. (CEphoto, Uwe Aranas – Wikimedia Commons)

Refractometrul oferă rezultate mai exacte decât cele obținute cu ajutorul stripurilor urinare. Totodată, majoritatea stripurilor detectează concentrații ale probei cu o valoare de până la 1,030, ceea ce nu cuprinde limita superioară a valorilor întâlnite la animalele de companie.

Valoarea greutateii specifice variază între 1,020 – 1,045 la câine, 1,020 – 1,050 la pisică, 1,020 – 1,045 la cabaline și 1,020 – 1,045 la cabaline.¹

Creșterea valorii greutateii specifice peste limita fiziologică descrie fenomenul de hiperstenurie, iar scăderea valorii greutateii specifice sub limita fiziologică descrie fenomenul de hipostenurie. În izostenurie, urina va avea o greutate specifică constantă și o presiune osmotică aproximativ egală cu cea a serului.

Determinarea compoziție chimice a urinei

Obiective:

1. Cunoașterea compoziției normale a urinei
2. Stabilirea unor compuși cu importanță în diagnostic
3. Cunoașterea utilității stripurilor urinare pentru dozarea unor compuși din urină
4. Realizarea aplicațiilor practice și interpretarea rezultatelor obținute

Urina este formată în cea mai mare parte din apă, în proporție de peste 95%. Substanța uscată este împărțită în substanțe organice și substanțe anorganice. Substanțele organice sunt reprezentate de uree, acid uric și creatinină, precum și pigmenți (urobilină și urobilinogen). Componentele anorganice sunt reprezentate de clor, sodiu, potasiu, magneziu, calciu, sulfat, amoniu etc.

Examinarea chimică a urinei are ca scop stabilirea sau orientarea unui diagnostic și în general, aprecierea stării de sănătate a sistemului excretor. Aprecierea prezenței sau absenței compușilor cu importanță clinică poate fi realizată cu ajutorul stripurilor urinare (figura 9), sau pot fi dozate cu ajutorul unui spectrofotometru. Printre substanțele de interes se pot enumera: glucoza, corpii cetonici, proteinele, bilirubina, nitriții și acidul ascorbic.

Stripurile urinare se pot folosi pentru aprecierea prezenței glucozei, a proteinelor, corpiilor cetonici, bilirubinei și a sângelui. Pentru utilizarea acestei metode, este necesară aducerea probei de urină la temperatura camerei și centrifugarea probelor cu turbiditate crescută. Testul ar

trebui realizat în primele 2 ore de la recoltare, iar imersarea stripurilor se face rapid (1 – 2 secunde). Prezența diferitelor substanțe în urină va modifica culoarea hârtiei indicatoare. Modificarea culorii poate fi apreciată prin compararea probei cu o scală oferită obișnuit pe recipientul de depozitare a stripurilor, sau poate fi apreciată cu ajutorul unor aparate dedicate (metodă automată de apreciere).



Fig. 09. Strip urinar cu flacon de depozitare ce are prezentă scala culorilor pentru comparație.

Prezența **glucozei** în proba de urină (glicozurie) poate fi apreciată cu ajutorul stripurilor (de reținut faptul că nivelul glucozei scade odată cu stocarea prelungită a probei), sau poate fi dozată cu ajutorul metodei spectrofotometrice. Glucoza mai poate fi pusă în evidență cu ajutorul reacției Fehling.

Experiment:

Materiale necesare: probe de urină (normală și patologică), eprubete, reactivi Fehling, baie de apă pentru fierberea probelor.

Mod de lucru: în două eprubete se introduc câte 3 – 4 mL de urină din cele două flacoane disponibile. Prima probă va fi martorul (urină provenită de la un individ sănătos), iar cea de-a doua va fi proba experimentală (urină provenită de la un pacient diabetic – excreție de glucoză prin urină). În ambele eprubete se introduc câte 0,5 mL din fiecare reactiv, apoi probele se omogenizează prin agitare. Cele două eprubete vor fi depuse apoi în recipientul cu apă pentru fierbere (reacția Fehling descrisă în detaliu în cadrul capitolului Enzime). Apariția unui precipitat portocaliu – cărămiziu indică prezența glucozei în proba de urină.

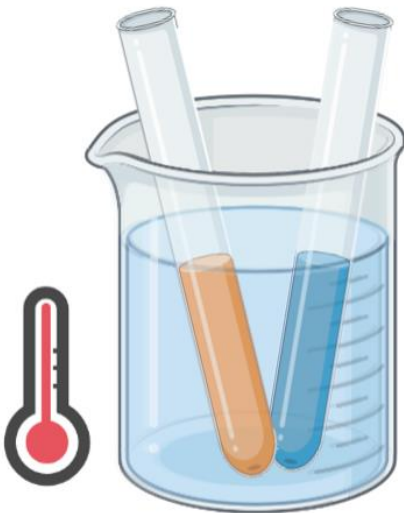


Fig. 09. Reacția Fehling utilizată pentru depistarea prezenței glucozei în probele de urină. Proba pozitivă – eprubeta cu conținut de culoare portocaliu – cărămiziu.

Determinarea prezenței **proteinelor** poate fi realizată printr-o multitudine de metode, majoritatea fiind foarte sensibile

față de prezența albuminelor, datorită structurii acestora și a sarcinii negative. De exemplu, stripurile urinare sunt de 50 de ori mai sensibile pentru albumină față de globuline.

Prezența unei reacții pozitive pentru proteine poate indica fie proteinurie, fie prezența sângelui, hemoglobinei, mioglobinei sau a unei inflamații locale. Pentru o interpretare corespunzătoare, valoarea obținută pentru acest parametru trebuie interpretată în contextul altor modificări (sediment urinar, parametri biochimici și hematologie).

La câine, o valoare de 0,1 g/dL poate fi considerată normală (dacă urina este concentrată).¹

Stripurile urinare pot da reacții fals pozitive dacă se prelungește contactul cu proba de urină, în administrarea unor tipuri de antibiotice, contaminarea cu dezinfectanți și la un pH foarte mare al urinei.

În context clinic, se pot realiza și proba turbidității cu acid sulfosalicilic, electroforeză sau spectrofotometrie.

Experiment:

Materiale necesare: eprubete, probe de urină (martor și origine patologică), pipete, acid sulfosalicilic 3%.

Mod de lucru: în două eprubete se introduc câte 3 mL de urină (martor și urină de studiat), peste care se vor adăuga câte 3 mL de acid sulfosalicilic 3%. Apariția turbidității denotă prezența proteinelor.

Dacă urina de studiat este tulbure, aceasta se va centrifuga înaintea realizării reacției. Gradul de turbiditate se apreciază în mod asemănător cu aprecierea organoleptică (explicația mai sus). Proba se așază în fața unui text (revistă, ziar etc.) și se apreciază transparența, acordând-se un scor de la 0 (transparent, limpede), la +4 (opac, nu se

poate distinge scrisul), după cum este indicat în figura 10.

Reacțiile fals pozitive se pot întâlni în cazul administrării unor medicamente precum penicilina și sulfonamide).

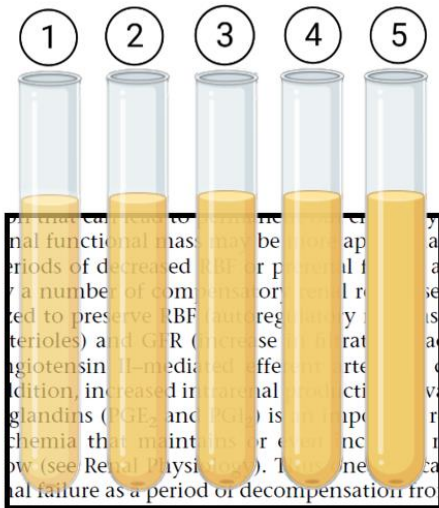


Fig. 10. Aprecierea cantității de proteine din urină în reacția cu acid sulfosalicilic. Eprubeta 1 primește scorul 0 deoarece textul din spate se citește foarte clar. Eprubeta 2 primește scorul +1 deoarece se observă opacitate dar textul este încă lizibil. Eprubeta 3 primește scorul +2 deoarece turbiditatea este moderată și pot distinge doar părți din text. Eprubeta 4 primește scorul +3 deoarece textul nu se poate citi dar se pot distinge marcații și puncte. Eprubeta 5 primește scorul +4 deoarece nu se poate distinge nimic în spațele lichidului.

Corpii cetonici nu ar trebui să fie identificați în urina animalelor sănătoase. Stripurile urinare detectează în principal prezența acidului acetoacetic, mai puțin acetona. Corpii cetonici pot fi identificați cu ajutorul stripurilor urinare, sau cu ajutorul

unor stripuri dedicate (Ketostix™) ce au sensibilitate mai mare.

Bilirubina poate fi identificată în condiții patologice în urină. Stripurile urinare nu pot identifica prezența biliverdinei (bilirubina hidrolizează în biliverdină atunci când urina este expusă la lumină), astfel încât este necesară testarea rapidă a probei. La câine, detectarea unei concentrații de +1 în urină este considerată fiziologică (urină concentrată), mai ales la masculi.

Unele stripuri urinare prezintă și indicatori pentru urobilinogen, nitrați, leucocite și greutate specifică, însă rezultatele nu sunt exacte și ar trebui ignorate pentru interpretare în practica veterinară.

Sedimentul urinar

Obiective:

1. Cunoașterea modului de lucru pentru obținerea unei probe de sediment urinar
2. Stabilirea componentelor fiziologice ale sedimentului urinar
3. Cunoașterea unor particularități de specie și rasă în descrierea unui sediment urinar cu aspect fiziologic
4. Enumerarea unor compuși patologici din sedimentul urinar
4. Enumerarea unor posibili contaminați ce ar putea interfera cu interpretarea aspectului sedimentului urinar

Înainte sau după realizarea investigațiilor calitative și cantitative, proba de urină se va centrifuga (obișnuit la 1500 – 2500 rpm pentru 5 minute, în funcție de caracteristicile centrifugii din dotare).

După centrifugare, supernatantul se aspiră cu ajutorul unei pipete (și se păstrează pentru alte investigații), păstrând

în recipient aproximativ 0,5 mL de urină, în care se resuspendă sedimentul prin agitarea conținutului.

Cu ajutorul unei pipete se recoltează o picătură care se depune pe o lamă de microscopie curată și degresată, peste care se așază o lamelă. Proba se examinează la microscopul optic (fără colorare) cu un obiectiv mic inițial (10x) pentru depistarea aspectului general al probei și identificarea localizării cristalelor sau a cilindrilor în probă, precum și prezența celulelor sau plajelor celulare (aspect patologic). Pentru deosebirea detaliilor și pentru diferențierea tipurilor de celule și identificarea bacteriilor, va fi necesară utilizarea unui obiectiv mare (100x).

Atenție!

Dacă proba observată la microscop pare foarte turbure, sau densitatea cristalelor sau celulelor este prea mare, se recomandă diluarea probei cu supernatantul recoltat după centrifugare sau cu soluție salină. Dacă numărul hematiilor este prea mare și face imposibilă examinarea, se recomandă lizarea acestora cu acid acetic 2%.

Pe parcursul examinării, va fi necesară microvizarea pentru o vizualizare corespunzătoare a elementelor. Nu toate celulele sau cristalele vor fi localizate în același plan.

Dacă se observă prezența unor aspecte patologice, precum celule cu caractere nespecifice epiteliului urinar, sau celule dispuse sub formă grupată, se poate realiza și un frotiu citologic. Acesta va fi colorat cu o colorație uzuală de hematologie (ex. MGG sau Diff-Quick).

Elementele mai dense, cum sunt cilindrii, vor fi împinse către marginea lamei. Este

astfel necesară examinarea în întregime a preparatului.

În condiții fiziologice, sedimentul urinar ar trebui să conțină elemente precum leucocite (în număr restrâns), celule epiteliale descumate, cristale (la unele specii și rase) și bacterii (dacă nu s-a realizat o recoltare sterilă (ex. cistocenteză)).

Hematii

Prezența hematiilor în proba de urină poate avea origine iatrogenă – ca urmare a metodei de recoltare (cistocenteză sau cateterizarea uretrei).

Dacă greutatea specifică a urinei este mică (sub 1,008), sau dacă pH-ul urinei este alcalin, hematiile vor fi lizate și nu vor putea fi identificate în sediment. La o greutate specifică crescută (peste 1,025), acestea vor avea aspect ratatinat (Figura 11).

Într-o probă de urină cu greutate specifică moderată, hematiile își vor menține forma specifică de disc biconcav, cu contur clar și zonă de paloare centrală uneori ușor de identificat.

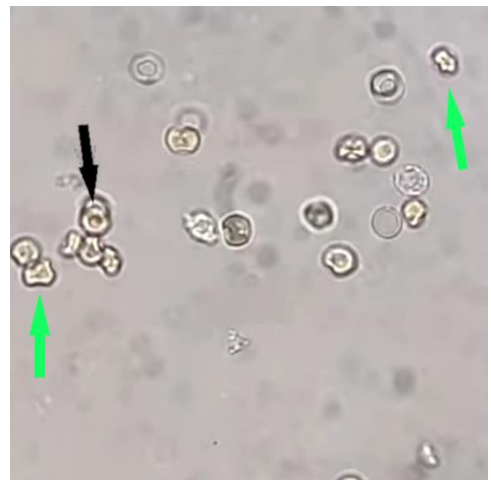


Fig. 11. Hematii prezente în sedimentul urinar. La vârful săgeții negre se poate observa o hematie cu contur normal. La

vârful săgeților verzi se pot identifica hematiile cu aspect ratatinat.

Dacă se suspicionează producerea unei hemoragii minore în timpul recoltării, numărul de hematii ar trebui să fie sub 5 celule pe câmp microscopic (cu obiectiv mare – 100x).

Leucocite

Leucocitele pot fi întâlnite în număr redus în sedimentul urinar. Limita fiziologică este de maxim 5 celule pe câmp microscopic examinat cu obiectiv mare (100x). La fel ca hematiile, leucocitele vor fi lizate în urina hipotonă și la un pH alcalin.

Leucocitele au contur regulat și dimensiuni mai mari decât hematiile. Forma lor este rotundă, cu aspect granular (Figura 12). Uneori se poate identifica prezența nucleului. Majoritatea leucocitelor observate în sedimentul urinar vor fi neutrofile.



Fig. 12. Sediment urinar în care se poate distinge prezența unui număr mare de hematii și o celulă leucocitară indicată prin săgeata neagră. Se poate observa aspectul granular și mărimea celulei (de 1,5 – 2 ori mai mare decât o hematie).

Celule epiteliale

Celulele epiteliale descumate sunt prezente în mod fiziologic într-o probă de urină. Ca regulă generală, la un animal sănătos, numărul acestora nu trebuie să depășească 5 celule pe câmp microscopic (obiectiv mare 100x). Aspectul acestor celule va fi diferit în funcție de originea lor.

Se pot întâlni:

⇒ Celule scuamoase de la nivelul uretrei, aparatului genital sau pielii. Acestea sunt rare și se pot distinge prin aspectul angular al conturului. Nucleul este rareori vizibil.

⇒ Celule tranziționale de la nivelul vezicii urinare. Au o morfologie variată, cu contur rotund sau poligonal, nucleu vizibil și aproape duble ca dimensiune față de leucocite.

⇒ Celulele epiteliale tubulare renale sunt foarte rar întâlnite. Seamănă ca mărime și caracteristici cu leucocitele și au un nucleu rotund dispus central.

Bacterii

Urina recoltată direct din vezica urinară este în mod normal sterilă și va fi lipsită de bacterii. În momentul în care urina ajunge la nivelul uretrei distale, aceasta va fi contaminată cu bacterii din flora locală a organismului.

Acestea pot fi vizualizate la microscop dacă se folosește luminozitate scăzută și obiectiv mare (100x). Sunt frecvent confundate cu resturi de particule în mișcare Browniană. Sunt mai ușor de identificat dacă numărul acestora este foarte mare (Figura 13). Pentru confirmare și stabilirea tipului de bacterii, va fi necesară realizarea uroculturii.

Cultura bacteriană cantitativă va indica numărul de unități formatoare de colonii (UFC) pe mililitru de urină. Se recomandă utilizarea exclusivă a probelor recoltate prin cistocenteză sau cateterizare uretrală.

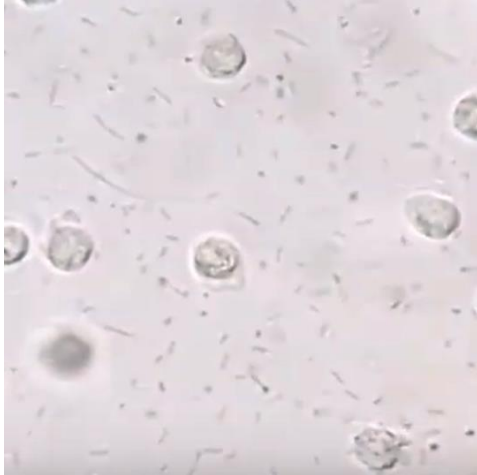


Fig. 13. Sediment urinar în care se poate observa prezența leucocitelor și a unui număr mare de bacterii dispuse aleatoriu în fundal (bacili și coci).

Cilindri

Aceste formațiuni sunt compuse în principal din mucoproteine secretate de celulele epiteliale tubulare și au forma lumenului tubular.

În compoziția lor pot fi întâlnite elemente precum celule, lipide, cristale sau detritus. Într-o probă de urină provenită de la un animal sănătos, ar trebui să lipsească sau să fie identificați în număr foarte mic (maxim 2 cilindri hialini sau granulari pe câmp microscopic examinat cu obiectiv 10x).

Tipurile de cilindri sunt:

- ⇒ Hialini – au tendința de a se dizolva în urină alcalină și conțin mucoproteină și albumină.
- ⇒ Granulari – conțin celule și mucoproteină; culoarea variază de la transparent la maro.
- ⇒ Ceroși – transparenți cu margini bine definite și terminații drepte
- ⇒ Celulari – conțin celule epiteliale, hematii sau leucocite.

⇒ Lipidici – întâlniți la pisică; conțin picături lipidice.

⇒ Hemoglobinici și mioglobinici – culoarea variază de la galben la roz și maro; rar întâlniți.

Lipide

Picăturile de lipide se întâlnesc frecvent la pisică. Acestea sunt produse în mod fiziologic la nivelul epitelului tubular.

Aspectul microscopic este de particule rotunde, transparente, refractare, cu dimensiuni variate.

Fungi

Pot fi întâlniți în cazuri patologice sau prin contaminarea probei în timpul recoltării. Frecvent întâlnite în probele vechi.

Sunt formațiuni transparente, cu formă alungită (hife) sau ovalară și rotundă (levuri).

Paraziți

Rar întâlniți în urină, cu aspect caracteristic speciei parazitare.

Contaminanți externi

Sunt întâlniți frecvent atunci când proba de urină este recoltată în recipiente nesterile, când proba este recoltată din litieră, sau dacă s-a practicat recoltarea liberă. Cel mai frecvent se întâlnesc elemente precum fibre de păr, fibre textile, polen, cristale de talc provenite de pe mănuși și fragmente de sticlă de pe lama de microscop.

Se mai pot întâlni și spermatozoizi dacă proba a fost recoltată imediat după montă la femele sau după ejaculare la mascul.

Cristale

Cristalele pot fi întâlnite în mod fiziologic în sedimentul urinar, dar pot fi asociate și cu diverse stări patologice.

Cristalele ar trebui examinate numai în probele proaspete de urină. Examinarea probei după 6 – 30 de ore, poate induce formarea de cristale, cu o prevalență mai mare la probele refrigerate. Modificarea pH-ului poate duce la formarea de cristale noi sau la dizolvarea celor deja existente.

⇒ Biurat de amoniu – sferice, cu aspect țepos, culoare maro – gălbuie, uneori cu tentă verzuie. Se întâlnesc în mod fiziologic la Dalmațian și Bulldog Englez.

⇒ Carbonat de calciu – culoare variată de la incolor la maro, sferice sau cu formă de „ganteră”. Uneori pot avea striaii cu dispunere radială. Întâlnite în mod fiziologic la cal, iepure și cobai.

⇒ Oxalat de calciu dihidrat – incolor, cu formă pătrată sau rectangulară. Aspect specific de „plic” sau „cruce Malteză” (Figura 14). Identificarea lor în urina de vacă sau cal este asociată obișnuit cu consumul de plante bogate în oxalați. Pot fi întâlnite în mod fiziologic și la carnivore.

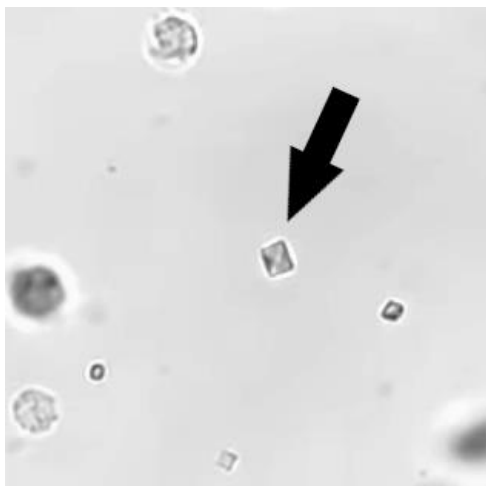


Fig. 14. Sediment urinar în care se pot identifica leucocite și cristale. La vârful

săgeții - cristal de oxalat de calciu dihidrat cu desen specific de „cruce Malteză”.

⇒ Oxalat de calciu monohidrat – incolor, formă variată, frecvent cu aspect alungit și ascuțit la ambele capete (Figura 15 – la vârfurile săgeților negre), aspect de „ganteră”, „fus” etc. Pot fi întâlnite în mod fiziologic la ierbivore, câine și pisică.

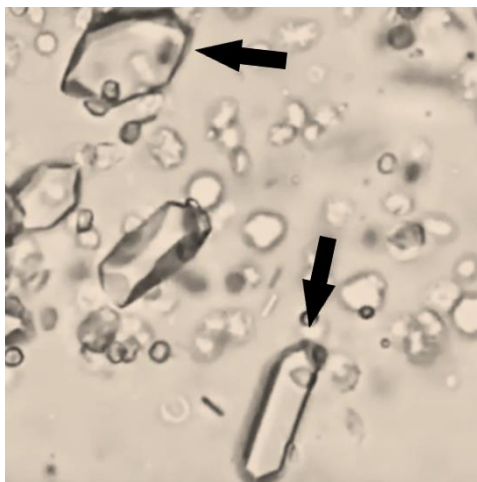


Fig. 15. Sediment amorf în fundal și patru cristale mari de oxalat de calciu monohidrat. La vârful săgeților negre se pot observa două cristale de oxalat de calciu monohidrat cu aspect specific ascuțit la ambele capete.

⇒ Struviți (fosfați amoniaco-magnezieni) – incolor, cu aspect prismatic, terminații oblice, cu formă de „sicriu” (Figura 16). Întâlniți frecvent la carnivore în urina alcalină.

⇒ Cistină – incolor, cu formă hexagonală. Au tendința de a se suprapune (Figura 17).

⇒ Colesterol – incolor, transparente, cu formă rectangulară cu o creștătură în unul dintre colțuri. Întâlnite în mod fiziologic la câine.



Fig. 15. Sediment urinar cu struviți.

⇒ Fosfat de calciu – incolor sau cu tentă gălbuie, întâlnite sub formă de agregate amorfe, formă aciculară ce formează agregate sau rozete. Pot fi întâlnite în mod fiziologic la câine.

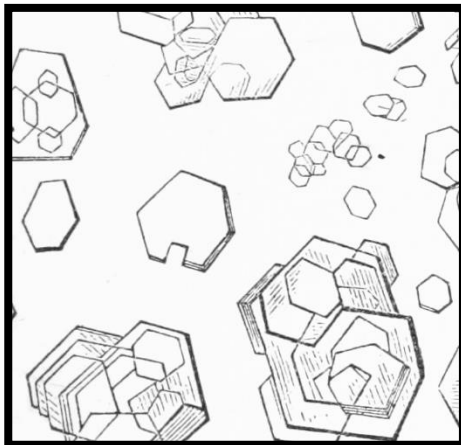


Fig. 16. Imagine schematică a cristalelor de Cistină. Se observă forma hexagonală și aranjarea suprapusă.

⇒ Bilirubină – culoare care variază de la galben, galben roșiatic, până la roșu. Cristalele au formă granulară sau de spiculi.

Se întâlnesc în mod fiziologic la câine (Figura 18).

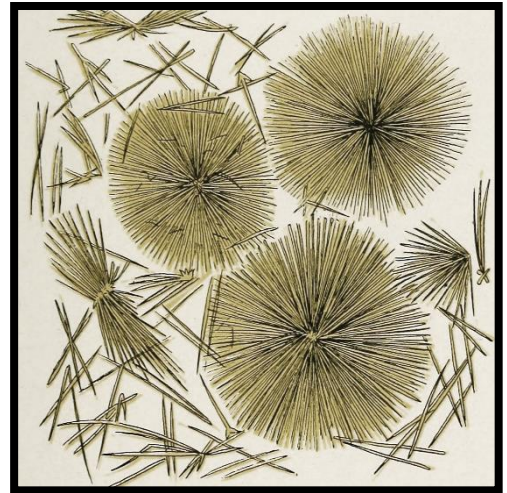


Fig. 17. Schemă a dispunerii cristalelor de bilirubină. Se observă forma aciculară și culoarea galben-maronie.

Bibliografie

1. **THRALL MA, WEISER G, ALLISON RW, CAMPBELL TW, 2012.** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry, Second Edition, Wiley-Blackwell, Iowa, SUA.
2. **RULE AD, LARSON TS, BERGSTRALH EJ, ET AL., 2004.** Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Int Med.* Vol. 141(12): 929-37.
3. **LIFFMAN R, JOHNSTONE T, TENNENT-BROWN B, HEPWORTH G, COURTMAN N, 2018.** Establishment of reference intervals for serum symmetric dimethylarginine in adult nonracing Greyhounds. *Vet Clin Pathol.* Vol. 47(3):458-463.
4. **MISBACH C, CHETBOUL V, CONCORDET D, MÉDAILLE C, GRUET P, SPERANZA C, HOFFMANN AC, ROCHA A, BALOUKA D, PETIT AM, TREHIOU-SECHI E, POUCHOLON JL, LEFEBVRE HP, 2014.** Basal plasma concentrations of routine variables and packed cell volume in clinically healthy adult small-sized dogs: effect of breed, body weight, age, and gender, and establishment of reference intervals. *Vet Clin Pathol.* Vol. 43(3):371-80.

5. **BARTGES J, POLZIN DJ, 2011.** Nephrology and Urology of small animals, Wiley – Blackwell, Iowa, USA.

Imagini realizate cu ajutorul aplicațiilor Biorender și MindtheGraph.

Obiective:

1. Definirea conceptelor de metabolism, anabolism și catabolism
2. Stabilirea importanței cunoașterii ratei metabolice bazale
3. Rata metabolică și factorii de influență
4. Cunoașterea modului de calculare a ratei metabolice

Metabolismul reprezintă suma tuturor reacțiilor chimice cu rol în menținerea activității celulare. Metabolismul are două componente cu rol specific:

⇒ *Catabolismul* – descompunerea substanțelor pentru producerea energiei

⇒ *Anabolismul* – sinteza produșilor pentru stocarea surselor de energie.

Sursa principală de energie utilizată de către organism este ATP-ul (adenozin trifosfat). ATP-ul reprezintă o modalitate eficientă pentru păstrarea și transferul de energie în celule, atât în regnul animal, cât și în cel vegetal.

Sursele nutriționale de ATP sunt reprezentate de: proteine (AA), lipide (acizi grași) și carbohidrați (glucoză, piruvat).

Majoritatea reacțiilor din organism se derulează cu consum de energie. Procesul de utilizare și producere a energiei este un sistem imperfect. Doar o parte din moleculele consumate sunt transformate în energie utilizabilă. De exemplu, energia rezultată din descompunerea glucozei este stocată sub formă de ATP în proporție de 40%, restul de 60% este eliberată sub formă de căldură. Unele specii de animale (specii endoterme) precum păsări și mamifere, utilizează căldura produsă în cadrul reacțiilor din organism pentru procesul de termoreglare.

Rata metabolică bazală reprezintă cantitatea de energie consumată de un

animal într-o perioadă de timp pentru menținerea funcțiilor vitale. Aceasta poate fi exprimată cantitativ în J, cal, sau kcal pe unitate de timp. Se poate calcula în funcție de căldura produsă sau consumul de oxigen. Pentru realizarea unui calcul exact, rata metabolică se va calcula atunci când animalul este într-un mediu neutru din punct de vedere termic, când este calm și organismul nu este implicat activ în procesul de digestie.

La om, rata metabolică bazală este de aproximativ 1600 – 1800 kcal/zi pentru bărbați și 1300 – 1500 kcal/zi pentru femei.

Rata metabolică reprezintă totalul energiei expediate de către un individ pe parcursul unei perioade de timp. Aceasta variază mult în funcție de activitatea fizică, dietă, condiții de mediu, stare fiziologică etc. Pentru om, aceasta va fi de 1,5 ori rata metabolică bazală, iar pentru animale, de 2-4 ori rata metabolică bazală. Pentru o interpretare corespunzătoare, rata metabolică se va calcula pe gram masă corporală.

Exercițiu de gândire:

Dintre un șoarece și un elefant, care animal va avea rata metabolică mai mare și de ce?

Șoarecele, cu o masă corporală de aproximativ 35g, va avea o rata metabolică de $890 \text{ mm}^3 \text{ O}_2 / \text{g masă corporală/oră}$, iar un elefant, ce cântărește 4.500.000g va avea o rată metabolică de $75 \text{ mm}^3 \text{ O}_2 / \text{g masă corporală}$.

Unele specii de animale prezintă variații semnificative ale ratei metabolice. Acestea pot fi:

⇒ Torpoarea – scăderea ratei metabolice și a temperaturii pentru conservarea energiei (unele specii de păsări, șoareci,

lemuri, urși, lilieci). Poate fi sezonieră sau doar într-o perioadă a zilei.

⇒ Hibernare – stare de torpoare prelungită și profundă, ce va rezulta în scăderea ratei metabolice și a temperaturii și poate fi declanșată atât de scăderea consumului de hrană (aceasta nu mai este disponibilă), cât și de modificarea zilei luminoase și scăderea temperaturii ambientale. (unele specii de rozătoare, lilieci – la care numărul de contracții ale cordului poate să scadă de la 400 /minut până la 25 /minut).

⇒ Estivație – fenomen întâlnit mai frecvent la animalele din zonele aride (unele specii de broaște, mamifere marsupiale, rozătoare, melci).¹

Consumul zilnic de energie al unui individ poate fi împărțit în 3 categorii: rata metabolică bazală (energia necesară menținerii funcțiilor vitale), energia consumată în timpul digestiei și energia consumată pentru procesele active (ex. locomoție). Proporțiile acestora au fost identificate grafic în figura 1.

Consumul de energie poate fi modificat în funcție de starea fiziologică a animalului: lactația, gestația, perioada de călduri (exemple de stări fiziologice în care se înregistrează un consum ridicat de energie). Acest lucru are o semnificație deosebită pentru medicina veterinară, deoarece este necesară modificarea rațiilor pentru animalele cu producții mari, sau animalele gestante etc.

Alți factori care modifică consumul de energie în stare de repaus sunt reprezentați de: analgezice, sedative, perioade prelungite de înfometare sau post (scad consumul bazal de energie), iar cafeina, nicotina, catecolaminele, modificarea temperaturii ambientale, stresul și stările patologice vor crește consumul bazal de energie.

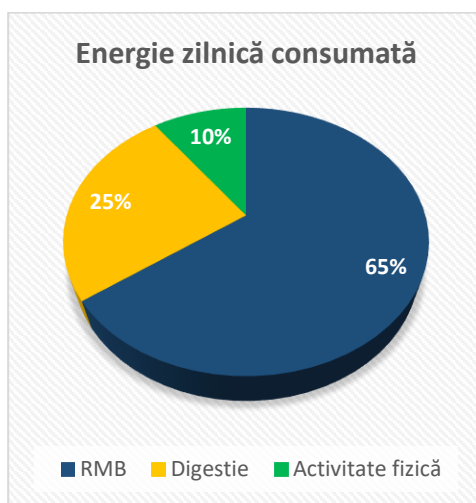


Fig. 01 Proporțiile aproximative ale energiei expediate pentru îndeplinirea activităților fiziologice ale organismului (la om). RMB reprezintă rata metabolică bazală.

Determinarea **valorii ratei metabolice** are o importanță deosebită pentru medicina umană. Un exemplu în acest sens este calcularea necesarului energetic pentru stabilirea unei rații în cazul pacienților aflați în comă.

În medicina veterinară, valoarea ratei metabolice este necesară pentru cercetare și pentru stabilirea unor rații adecvate în vederea susținerii cerințelor nutriționale energetice ale animalelor. Rata metabolică se poate calcula prin calorimetrie directă, sau indirect prin stabilirea consumului de oxigen. Relația dintre cele două metode de calcul a fost ilustrată grafic în figura 2.

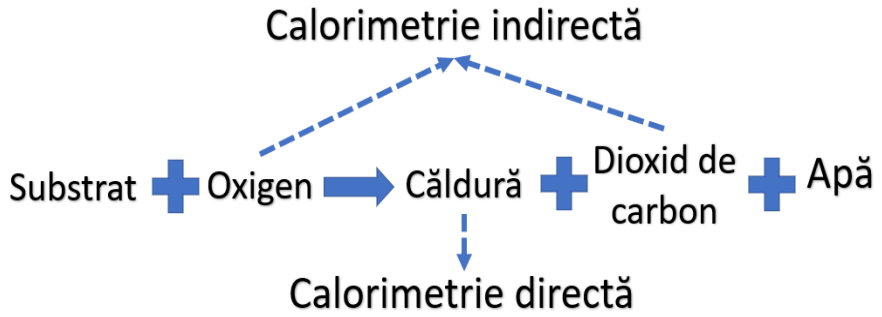


Fig. 02 Schematizarea modului de calculare a ratei metabolice.

Bibliografie

1. Staples JF, 2016. Metabolic Flexibility: Hibernation, Torpor, and Estivation, *Comprehensive Physiology*, vol. 6(2): 737 – 771.