

INTERFERÊNCIA DO HEMATÓCRITO SOBRE O DESEMPENHO DE DOIS GLICOSÍMETROS VETERINÁRIOS EM CÃES

INTERFERENCE OF HAEMATOCRIT IN THE PERFORMANCE OF TWO VETERINARY GLUCOMETERS IN DOGS

F. M. COURA¹, M. C. LOPES², F. O. P. LEME³, A. P. C. VAL⁴

RESUMO

Os glicosímetros (GT) são uma ferramenta muito utilizada no monitoramento da glicemia em cães e o hematócrito (HT) é um dos fatores que pode alterar sua acurácia, possivelmente devido a modificação da viscosidade do sangue, ao impedimento da reação com o plasma na superfície da tira, à alteração da cinética de difusão e/ou da modificação do volume plasmático, resultando em volume insuficiente de plasma para o teste dos GT. Este estudo avaliou o efeito do HT sobre o desempenho de dois GT veterinários para uso em cães em comparação a dois métodos laboratoriais de referência: glicose hexoquinase (Hx) e glicose oxidase (GOx). Ambos os GT apresentaram boa performance em amostras com HT inferior à 37%: GT1 $r=0,90$ com MLab Hx e $r=0,94$ para GOx. Por sua vez, GT2 apresentou $r=0,84$ tanto para Hx quanto para GOx. Entretanto, apenas GT1 demonstrou desempenho adequado em amostras com HT (entre 37% e 55% ($r=0,90$ para Hx) e nenhum GT ofereceu atuação apropriada em amostras com HT superior à 55%. Conclui-se que o resultado apresentado por ambos GT altera de acordo com o hematócrito do animal. Deve-se considerar que pacientes com disglucemias estão frequentemente expostos às alterações clínico-patológicas, e a adoção destes GT específicos como estratégia de monitoramento pode não ser adequada, por isso a importância de outros procedimentos de medição da glicose serem empregados.

PALAVRAS-CHAVE: Cães. Glicemia. Monitoramento.

SUMMARY

Glucometers (GT) are widely used as tools for monitoring blood glucose in dogs and hematocrit (HT) is one of the factors that can change its accuracy, possibly due to the change in blood viscosity, preventing the reaction with plasma on the surface of the strip, alteration of the diffusion kinetics and / or modification of the plasma volume, resulting in insufficient plasma volume for the GT test. This study evaluated the effect of HT on the performance of two veterinary GT for use in dogs compared to two reference laboratory methods (MLab): glucose hexokinase (Hx) and glucose oxidase (GOx). Both GT showed good performance in samples with HT below 37%: GT1 $r = 0.90$ with MLab Hx and $r = 0.94$ for GOx. In turn, GT2 presented $r = 0.84$ for both Hx and GOx. However, only GT1 demonstrated adequate performance in samples with HT between 37% and 55% ($r = 0.90$ for Hx) and no GT offered adequate performance in samples with HT greater than 55%. It can be concluded that the result presented by both GT changes according to the animal's hematocrit. It should be considered that patients with dysglycemias are frequently exposed to clinical-pathological changes, and the adoption of these specific GT as a monitoring strategy may not be adequate, so the importance of other procedures glucose measurement devices are employed

KEY-WORDS: Dogs. Glycemia. Monitoring.

¹ Professor, Instituto Federal Minas Gerais. Faz. Varginha - Rodovia Bambuí/Medeiros - Km 05, Zona Rural, 38900000 - Bambuí, MG - Brasil - Caixa-postal: 05

² Programa de Pós Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. Av. Antônio Carlos, 6627, São Francisco, 31.370-090, Belo Horizonte, Minas Gerais.

³ Professor, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. Av. Antônio Carlos, 6627, São Francisco, 31.370-090, Belo Horizonte, Minas Gerais.

⁴ Professor, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias. Av. Antônio Carlos, 6627, São Francisco, 31.370-090, Belo Horizonte, Minas Gerais. Autor para correspondência: adriane@ufmg.br

INTRODUÇÃO

Desequilíbrios no metabolismo energético dos cães podem ser provocados por doenças de etiologia endócrina, infecciosa ou inflamatória (BOUCHER et al., 2014; SHIELDS et al., 2015). Nessas condições, a biodisponibilidade da glicose se torna ineficiente, prejudicando a atividade celular e o restabelecimento da saúde. O monitoramento frequente da glicemia permite inferências acerca do estado energético do paciente e adequação das medidas terapêuticas para controlar o desequilíbrio metabólico. Dentre os métodos disponíveis para seu monitoramento, os glicosímetros (GT) se destacam como uma importante ferramenta de monitoramento clínico e domiciliar dos animais, pois é uma técnica simples e de fácil execução (WAHL, 2009; HIGBIE et al., 2015; CORREA et al., 2018).

Os estudos que avaliam o desempenho de GT são baseados na comparação entre a glicemia mensurada por este aparelho e o método de referência, e demonstram um bom desempenho dos aparelhos para a análise dos valores de glicemia (WAHL, 2009; FRECKMANN et al., 2015). Os métodos laboratoriais (MLab) de referência são realizados com controle analítico, sofrendo poucas interferências, e, portanto, suas variações são mais previsíveis (HIGBIE et al., 2015; FRECKMANN et al., 2015). Por sua vez, os métodos de mensuração com GT podem sofrer interferência de algumas variáveis hematológicas, pois estas podem alterar os resultados do teste e, assim, prejudicar a acurácia dos resultados (TONYUSHKINA; NICHOLS, 2009; HERMAYER et al., 2015). O hematócrito (HT) é um dos parâmetros hematológicos cujas variações podem exercer maior interferência nas reações enzimáticas dos GT, e os motivos para tal relação são diversos, como alteração da viscosidade do sangue e alteração na cinética de difusão no teste, afetando, assim, a acurácia do GT (PFÜTZNER et al., 2013).

Devido a utilização rotineira do GT e sua importância na prática clínica, o presente estudo propôs avaliar a interferência do hematócrito sobre a glicemia mensurada por meio de dois GT veterinários calibrados para uso em amostras de sangue total capilar (STC) de cães. Além disto, dois MLab foram utilizados para fornecer os valores de referência de glicemia plasmática venosa dos mesmos pacientes e para permitir a comparação entre os testes.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado entre os meses de maio e agosto de 2016, no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), tendo sido aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (CEUA/UFMG nº383/2015).

Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico geral, avaliados durante o atendimento clínico e classificados de acordo com critérios de inclusão da pesquisa: espécie canina, idade superior a seis meses e adequada perfusão capilar. Previamente a qualquer

procedimento, os responsáveis pelos cães assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

O estudo avaliou dois GT veterinários, AlphaTrak 2 - GT1- (Abbott Laboratories, Maidenhead, Inglaterra) e IPet - GT2 - (Ultimed Inc., Saint Paul, Estados Unidos). Cada GT apresenta um sistema enzimático de oxidação da glicose determinado pela enzima presente na tira teste do aparelho: sistema GT1 com glicose desidrogenase (GD), e GT2 com glicose oxidase (GOx). Ambos foram calibrados para fornecerem glicemia em mg/dL. A ordem de leitura da amostra sangue total capilar (STC) foi aleatória e variou de acordo com sorteio para cada novo paciente. O manuseio dos GT e os procedimentos de coleta das amostras capilares foram realizados pelo mesmo pesquisador, seguindo as instruções de uso de cada aparelho.

Amostras de sangue dos animais selecionados previamente ao acaso foram submetidas a testes de glicemia utilizando STC mensurada por ambos os GT; glicemia venosa mensurada por dois MLab de referência; e hematócrito. A glicemia capilar foi mensurada por ambos GT a partir de amostra coletada de vaso da face interna do pavilhão auricular dos cães, acessados por lancetas 28 G no dispositivo lancetador AlphaTrak® (Abbott Laboratories Ltd., Maidenhead, Inglaterra). As amostras venosas foram coletadas por venopunção jugular ou cefálica, com auxílio de material de coleta (seringas 5 mL com agulhas 22G, BD Plastipack™, Juiz de Fora, Brasil). A mensuração da glicemia as amostras armazenadas em tubos contendo fluoreto de sódio foram centrifugadas (Cientec, Belo Horizonte, Brasil) com menos de uma hora da coleta, a 2.000 a 3.000 rpm por 10 minutos, o plasma transferido para microtubo VT0150 de 0,5mL (Vatten/Biometrix, Curitiba, Brasil) com auxílio de pipeta de precisão de 250µL e armazenadas sob refrigeração até seu subsequente processamento. A mensuração da glicemia foi feita no aparelho semiautomático Cobas-Mira Plus™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, Estados Unidos) pelos MLab hexoquinase (Hx) (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) e glicose oxidase (GOx), (Biotécnica, Belo Horizonte, Brasil) no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG. Adicionalmente, procedeu-se a determinação do hematócrito pelo método do micro hematócrito.

Cães com intervalo entre MLab de 20 e 600 mg/dL e HT superior a 20% foram selecionados para estatística, de acordo com recomendação do fabricante. A interferência do HT no desempenho dos GT foi avaliada por estudo das correlações entre os quatro procedimentos de mensuração (GT1 e GT2 em STC e Hx e GOx em plasma) dentro das seguintes faixas: HT inferior a 37%, HT recaindo no intervalo entre 37% e 55% e, por fim, HT maior que 55%. Para tanto, foi estabelecido delineamento experimental inteiramente casualizado em parcelas subdivididas. Para as variáveis de distribuição normal (MLab Hx, MLab GOx e STC GT1) foi utilizada a correlação de Pearson e para STC GT2 que violou o princípio de normalidade, testada pelo teste de Shapiro-Wilk, foi utilizada correlação de

Spearman (SAMPAIO, 2010). Os coeficientes de correlação (r) foram considerados fracos quando $r = 0,1$ até $0,3$; moderado, sendo $r = 0,4$ até $0,6$ e forte quando $r = 0,7$ até 1 (DANSEY and REIDY, 2006)

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS (Statistical Analysis System, versão 9.0) e o aplicativo Excel 2016.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Noventa e oito animais foram incluídos no estudo e, de acordo com a ordem definida por sorteio para coleta das amostras capilares, 57 amostras foram avaliadas primeiramente pelo GT1 e 41 amostras primeiramente pelo GT2. O HT variou entre 20 e 62%, sendo o valor médio de 47,39%. Amostras de dez pacientes apresentavam $HT < 37\%$, 78 amostras na faixa de referência para a espécie canina ($37\% \leq HT \leq 55\%$) e dez com $HT > 55\%$. A média da glicemia

mensurada pelos MLab em amostras plasmáticas foi menor do que as encontradas pelos GT nas amostras capilares. A estatística descritiva de todas as variáveis estudadas está apresentada na Tabela 1.

As correlações mais elevadas entre os dois GT avaliados e os dois MLab foram observadas na faixa de HT inferior a 37%; sendo o valor do coeficiente de correlação maior que 0,8 para as quatro comparações possíveis (Tabela 2). Por sua vez, nas amostras cujo HT esteve dentro da faixa de referência para a espécie canina ($37\% \leq HT \leq 55\%$), a elevada correlação foi observada somente na comparação entre GT1 e o MLab Hx ($r = 0,9$), enquanto que o GT2 teve correlação baixa com o MLab GOx ($r=0,39$) (Tabela 2). Nas amostras policitêmicas ($HT > 55\%$), os GT apresentaram fraca correlação com os MLab, vista que a única comparação com correlação significativa foi entre GT1 e MLab GOx ($r = 0,55$) (Tabela 2).

Tabela 01 - Análise da glicemia (mg/dL) de noventa e oito cães hígidos, mensurada através de diferentes metodologias.

Variáveis	N	Média	DP	Máximo	Mínimo	IC
GT1 capilar	98	106,61	29,87	219	25	100,70 a 112,53
GT2 capilar	98	90,81	38,17	159	29	83,25 a 98,36
Hx plasma	98	81,30	14,90	136,7	41,3	78,35 a 85,25
GOx plasma	98	79,38	13,51	135,29	43,9	76,71 a 82,05
HT	98	47,39	7,83	62	20	45,84 a 48,94

GT1 capilar = glicemia do sangue total capilar pelo GT1; GT2 capilar = glicemia do sangue total capilar pelo GT2; Hx plasma = glicemia plasmática pelo MLab Hx; GOx plasma = glicemia plasmática pelo MLab GOx; N = número de observações; DP = desvio padrão; IC = intervalo de confiança da média de grupos.; HT em %.

Tabela 2 - Estudo das correlações entre os quatro métodos de mensuração da glicemia e as faixas de hematócrito estudadas

Comparação	Faixa de hematócrito	
	Menor que 37%	Entre 37 e 55%
GT1 HOX	$r=0,90$	$r=0,90$
GT1 GDx	$r=0,94$	
GT2 HOX	$r=0,84$	
GT2 GDx	$r=0,84$	

De acordo com as informações fornecidas em ambas as bulas dos glicosímetros avaliados, os GT estariam programados para processarem amostras capilares normocíticas da espécie canina, delimitando as condições das amostras nas quais cada aparelho está programado para processar. Dentro destes supostos

limites, possíveis variações na proporção entre as frações líquida (plasma que contém a glicose mensurada por GT e MLab) e celular (eritrócitos) do sangue total não comprometeriam a acurácia do sistema (GERBER; FREEMAN, 2016). Por outro lado, nas amostras que apresentassem desequilíbrio nessa

proporção, que estariam marcadas por HT limítrofes, a disponibilização da glicose para reação na tira teste dos GT certamente seria alterada.

De fato, o GT1 demonstrou desempenho satisfatório para avaliar amostras com HT dentro da faixa de referência para a espécie canina, considerando como referência os valores de glicemia mensurados pelos MLab. Contudo, no mesmo intervalo, o GT2 não apresentou o presumido padrão, pois só atingiu o valor dos MLab nas amostras com HT inferior a 37%.

As falhas nos sistemas dos GT são devidas, principalmente, a falhas na etapa de difusão da amostra sobre a tira teste e na etapa de oxidação enzimática da glicose amostral. As tiras representam uma superfície de teste *in vitro* e funcionam como membranas porosas através das quais a amostra de sangue total é filtrada e, por fim, disponibilizada para a reação de quantificação, sendo mensurada a fração semelhante ao plasma e que contém a maior parte da glicose amostral (TONYUSHKINA; NICHOLS, 2009; HERMAYER et al., 2015). Quando o sangue capilar está hemoconcentrado, seu conteúdo líquido está reduzido e, quando a amostra é submetida ao teste, há produção de menor volume do filtrado (RAMLJAK et al., 2013), prejudicando a acurácia das mensurações assim como foi observado neste estudo. Este resultado corrobora com um outro estudo no qual o GT tende a subestimar a glicemia de amostras hemoconcentradas durante o monitoramento de pacientes humanos portadores de *diabetes mellitus* (PFÜTZNER et al., 2013).

O processo de disponibilização da fração glicosilada sobre a superfície reagente da tira teste, é também influenciado pela difusão da amostra sobre as membranas, um processo relacionado com a viscosidade da amostra e a sua capacidade de fluir sobre a tira (PFÜTZNER et al., 2013; HERMAYER et al., 2015). Amostras com maior saturação de sólidos (eritrócitos, proteínas plasmáticas, além da própria glicose) tendem a apresentar distribuição atípica entre as frações do sangue total em função do equilíbrio oncótico, prejudicando a fluidez sobre a tira (PFÜTZNER et al., 2013; GERBER; FREEMAN, 2016). Desse modo, o volume real do plasma pode não ter difusão suficiente para alcançar a superfície de reação da tira e a glicemia tende a ser subestimada.

É necessário ressaltar que os sistemas dos GT avaliados neste estudo diferem-se em relação à enzima que oxida e quantifica a glicose. Deste modo, há de ser considerado que as limitações de funcionamento dos GT podem ser distintas, como observado no trabalho com as faixas de HT avaliados. A GOx que compõe o sistema GT2 tem ação limitada pelo percentual mínimo de água da amostra (WAHL, 2009; HERMAYER et al., 2015), conforme a baixa correlação identificada entre GT2 e os MLab nas amostras com HT elevado.

Os resultados das análises afetam sua aplicação clínica. O uso dos GT para monitoramento domiciliar de portadores de *diabetes mellitus* canino é consagrada na Medicina Veterinária e estes pacientes atendidos frequentemente estão expostos a hiperglicemia, desidratação e hemoconcentração (GERBER; FREEMAN, 2016). Nessas condições, o panorama glicêmico fornecido pelos GT aqui estudados pode

estar deturpado pelas interferências analíticas e igualmente prejudicar a adequação do manejo terapêutico e a correção do desequilíbrio metabólico, que pode implicar no agravamento e fatalidade do quadro. Além das interferências do HT, foi observado também baixa acurácia analítica de determinado GT para determinar valores reais de glicemia, resultando em erros nas condutas terapêuticas.

Alguns aparelhos disponíveis no mercado para monitoração de pacientes humanos dispõem de ajustes na tecnologia do sistema que corrigem as distorções de mensuração da glicemia provocadas pelo HT discrepante (SHIN *et al.*, 2014; WAHL, 2009; GERBER; FREEMAN, 2016). No entanto, considerando a variação de desempenho dos GT observados nas diferentes faixas de HT, provavelmente os GT abordados não foram adaptados para garantir tais correções.

CONCLUSÕES

O modelo de avaliação proposto identificou que os sistemas de ambos GT não demonstraram homogeneidade para avaliação das amostras sob diferentes condições de hemoconcentração. Vista que pacientes em disglycemias estão frequentemente expostos às alterações clínico-patológicas, a adoção destes GT especificamente como estratégia de monitoramento parece ser inadequada

COMITÊ DE ÉTICA

A pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em experimentação animal (UFMG) sob registro nº383/2015.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos colegas médicos veterinários e acadêmicos que participaram das coletas e processamento das amostras.

REFERÊNCIAS

- BOUCHER, J. et al. "Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistance States." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014, vol. 6, 2014, pp. 1–23.
- DANSEY, C.; REIDY, J. "Estatística Sem Matemática Para Psicologia." *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 53, no. 9, 2006, doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- FRECKMANN, G. et al. "Analytical Performance Requirements for Systems for Self-Monitoring of Blood Glucose with Focus on System Accuracy: Relevant Differences among ISO 15197:2003, ISO 15197:2013, and Current FDA Recommendations." *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 9, no. 4, 2015, pp. 885–94, doi:10.1177/1932296815580160.

- GERBER, K. L.; KATHLEEN, P. F. "ASVCP Guidelines: Quality Assurance for Portable Blood Glucose Meter (Glucometer) Use in Veterinary Medicine." *Veterinary Clinical Pathology*, vol. 45, no. 1, 2016, pp. 10–27, doi:10.1111/vcp.12310.
- HEINEMANN, L. et al. "Accuracy in Blood Glucose Measurement: What Will a Tightening of Requirements Yield?" *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 6, no. 2, 2012, pp. 435–43, doi:10.1177/193229681200600232.
- HERMAYER, K. L. et al. "Challenges of Inpatient Blood Glucose Monitoring: Standards, Methods, and Devices to Measure Blood Glucose." *Current Diabetes Reports*, vol. 15, no. 3, 2015, p. 10, doi:10.1007/s11892-015-0582-9.
- PFUTZNER et al. "Determination of Hematocrit Interference in Blood Samples Derived from Patients with Different Blood Glucose Concentrations." *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 7, no. 1, 2013, pp. 170–78
- RAMLJAK, S. et al. "Hematocrit Interference of Blood Glucose Meters for Patient Self-Measurement." *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 7, no. 1, 2013, pp. 179–89.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Edited by Ivan Barbosa Machado Sampaio, 3 ed, Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária, 2010.
- SHIELDS, E. J. et al. "Extreme Beta-Cell Deficiency in Pancreata of Dogs with Canine Diabetes." *Plos One*, vol. 10, no. 6, 2015, p. e0129809, doi:10.1371/journal.pone.0129809.
- SHIN, J. et al. "A Correction Method Using a Support Vector Machine to Minimize Hematocrit Interference in Blood Glucose Measurements." *Computers in Biology and Medicine*, vol. 52, Elsevier, 2014, pp. 111–18, doi:10.1016/j.compbiomed.2014.06.005.
- TONYUSHKINA, K.; NICHOLS, J. H. "Glucose Meters: A Review of Technical Challenges to Obtaining Accurate Results." *Journal of Diabetes Science and Technology*, vol. 3, no. 4, 2009, pp. 971–80, doi:10.1177/193229680900300446.
- WAHL, H. G. "How Accurately Do We Measure Blood Glucose Levels in Intensive Care Unit (ICU) Patients?" *Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology*, vol. 23, no. 4, 2009, pp. 387–400, doi:10.1016/j.bpa.2009.09.003.