

22 **INTERFERENCE OF HAEMATOCRIT IN THE PERFORMANCE OF TWO**
23 **VETERINARY GLUCOMETERS IN DOGS**

24 **SUMMARY**

25 Glucometers (GT) are widely used to monitor the glycemia in dogs but are susceptible to
26 interferences that can compromise their accuracy and lead to erroneous clinical interpretations
27 of the results. Hematocrit (HT) is a hematological parameter that can change blood variants,
28 modifying the enzymatic reactions that constitute the GT test system. This study evaluated the
29 effect of HT on the performance of two veterinary GTs compared to the reference laboratorial
30 test. Both GT showed a good performance on samples with HT less than 37%, only GT1 showed
31 to be adequate for samples with normal HT (between 37% and 55%) and none was adequate
32 for samples with HT greater than 55%. The results presented indicate that both GT results
33 changes according to the hematocrit of the animal. The patient with dysglycemia have
34 clinicopathological disturbance and the use of these specific GT for monitoring may not be
35 adequate, and other glucose measurement procedures should be employed.

36 **KEYWORDS:** Dogs. Glycemia. Monitoring.

37
38 **INTRODUÇÃO**

39 Desequilíbrios no metabolismo energético dos cães podem ser provocados por doenças
40 de etiologia endócrina, infecciosa ou inflamatória (BOUCHER et al., 2014; SHIELDS et al.,
41 2015) Nessas condições, a biodisponibilização da glicose se torna ineficiente, prejudicando a
42 atividade celular e o restabelecimento da saúde. O monitoramento frequente da glicemia
43 permite inferências acerca do estado energético do paciente e adequação das medidas

44 terapêuticas para controlar o desequilíbrio metabólico. Dentre os métodos disponíveis para seu
45 monitoramento, os glicosímetros (GT) se destacam como uma importante ferramenta de
46 monitoramento clínico e domiciliar dos animais pois é uma técnica simples e de fácil execução
47 (WAHL, 2009; HIGBIE et al., 2015; CORREA et al., 2018).

48 Os estudos que avaliam o desempenho de GT são baseados na comparação entre a
49 glicemia mensurada por este aparelho e o método de referência, e demonstram um bom
50 desempenho dos GT para análise dos valores de glicemia (WAHL, 2009; FRECKMANN et
51 al., 2015). Os métodos laboratoriais (MLab) de referência são realizados com controle analítico,
52 sofrendo poucas interferências, e, portanto, suas variações são mais previsíveis (HIGBIE et al.,
53 2015; FRECKMANN et al., 2015). Por sua vez, os métodos de mensuração com GT podem
54 sofrer interferência de algumas variáveis hematológicas, pois estas podem alterar os resultados
55 do teste e, assim, prejudicar a acurácia dos resultados (TONYUSHKINA; NICHOLS, 2009;
56 HERMAYER et al., 2015). O hematócrito (HT) é um dos parâmetros hematológicos cujas
57 variações podem exercer maior interferência nas reações enzimáticas dos GT, especialmente no
58 que se refere à proporção entre as frações celular e plasmática da amostra, pois estas alterações
59 alteram a viscosidade da amostra e a glicose disponível para as reações de quantificação dos
60 GT (PFÜTZNER et al., 2013).

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

66 MATERIAL E MÉTODOS

67 O estudo foi realizado entre os meses de maio e agosto de 2016, no XXXX tendo sido
68 aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (XXXX).

69 Todos os pacientes foram submetidos a exame clínico geral, avaliados durante o
70 atendimento clínico e classificados de acordo critérios de inclusão da pesquisa: espécie canina,
71 idade superior a seis meses e adequada perfusão capilar. Previamente a qualquer procedimento,
72 os responsáveis pelos cães assinavam o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

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

81 Amostras de sangue dos animais selecionados previamente ao acaso foram submetidas a
82 testes de glicemia utilizando STC mensurada por ambos os GT; glicemia venosa mensurada por
83 ambos MLab; e HT. A glicemia capilar foi mensurada por ambos GT a partir de amostra
84 coletada de vaso da face interna do pavilhão auricular dos cães, acessados por lancetas 28 G no
85 dispositivo lancetador AlphaTrak® (Abbott Laboratories Ltd., Maidenhead, Inglaterra). As
86 amostras venosas foram coletadas por venopunção jugular ou cefálica, com auxílio de material
87 de coleta (seringas 5 mL com agulhas 22G, BD Plastipack™, Juiz de Fora, Brasil). A
88 mensuração da glicemia foi realizada em alíquotas de plasma estabilizado em fluoreto de sódio
89 (BD Vacutainer® Fluoreto/EDTA, Juiz de Fora, Brasil) no aparelho semiautomático Cobas-
90 Mira Plus™ (Roche Diagnostics, Indianapolis, Estados Unidos) pelos MLab hexoquinase (Hx)

91 (Labtest, Lagoa Santa, Brasil) e GOx, (Biotécnica, Belo Horizonte, Brasil) no Laboratório de
92 Patologia Clínica do Hospital Veterinário da UFMG. Adicionalmente, procedeu-se a
93 determinação do hematócrito pelo método do micro hematócrito.

94 Cães com no intervalo entre MLab de 20 e 600 mg/dL e HT superior a 20% foram
95 selecionados para estatística, de acordo com recomendação do fabricante. A interferência do
96 HT no desempenho dos GT foi avaliada por estudo das correlações entre os quatro
97 procedimentos de mensuração (GT1 e GT2 em STC e Hx e GOx em plasma) dentro das
98 seguintes faixas: HT inferior a 37%, HT recaindo no intervalo entre 37% e 55% e, por fim, HT
99 maior que 55%. Para tanto, foi estabelecido delineamento experimental inteiramente
100 casualizado em parcelas subdivididas. Para as variáveis de distribuição normal foi utilizada a
101 correlação de Pearson e para aquelas que violaram os princípios de normalidade foi utilizada
102 correlação de Spearman (SAMPAIO, 2010). As análises estatísticas foram realizadas utilizando
103 o software SAS (Statistical Analysis System, versão 9.0) e o aplicativo Excel 2016.

104

RESULTADOS E DISCUSSÃO

105 Noventa e oito animais foram incluídos no estudo e, de acordo com a ordem definida por
106 sorteio para coleta das amostras capilares, 57 amostras foram avaliadas primeiramente pelo
107 GT1 e 41 amostras primeiramente pelo GT2. O HT variou entre 20 e 62%, sendo o valor médio
108 de 47,39%. Amostras de dez pacientes apresentavam $HT < 37\%$, 78 amostras na faixa de
109 referência para a espécie canina ($37\% \leq HT \leq 55\%$) e dez com $HT > 55\%$. A média da glicemia
110 mensurada pelos MLab em amostras plasmáticas foi menor do que as encontradas pelos GT nas
111 amostras capilares. A estatística descritiva de todas as variáveis estudadas está apresentada na
112 tabela 1.

113 As correlações mais elevadas entre os dois GT avaliados e os dois MLab foram
114 observadas na faixa de HT inferior a 37%; sendo o valor do coeficiente de correlação maior que

115 0,8 para as quatro comparações possíveis (tabela 2). Por sua vez, nas amostras cujo HT esteve
116 dentro da faixa de referência para a espécie canina ($37\% \leq HT \leq 55\%$), a elevada correlação foi
117 observada somente na comparação entre GT1 e o MLab Hx ($R = 0,9$), enquanto que o GT2 teve
118 correlação baixa com o MLab GOx ($r=0,39$) (tabela 3). Nas amostras policitêmicas ($HT > 55\%$),
119 os GT apresentaram fraca correlação com os MLab, vista que a única comparação com
120 correlação significativa foi entre GT1 e MLab GOx ($R = 0,55$) (tabela 4).

121 GT1 capilar = glicemia do sangue total capilar pelo GT1; GT2 capilar = glicemia do
122 sangue total capilar pelo GT2; Hx plasma = glicemia plasmática pelo MLab Hx; GOx plasma
123 = glicemia plasmática pelo MLab GOx; N = número de observações; DP = desvio padrão; IC
124 = intervalo de confiança da média de grupos. As variáveis para glicemia estão apresentadas em
125 mg/dL; HT em %.

126 De acordo com as informações fornecidas em ambas as bulas dos glicosímetros avaliados,
127 os GT estariam programados para processarem amostras capilares normocíticas da espécie
128 canina, delimitando as condições das amostras nas quais cada aparelho está programado para
129 processar. Dentro destes supostos limites, possíveis variações na proporção entre as frações
130 líquida (plasma que contém a glicose mensurada por GT e MLab) e celular (eritrócitos) do
131 sangue total não comprometeriam a acurácia do sistema (GERBER; FREEMAN, 2016). Por
132 outro lado, nas amostras que apresentassem desequilíbrio nessa proporção, que estariam
133 marcadas por HT limítrofes, a disponibilização da glicose para reação na tira teste dos GT
134 certamente seria alterada.

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

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

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

160 É necessário ressaltar que os sistemas dos GT avaliados neste estudo diferem-se em
161 relação à enzima que oxida e quantifica a glicose. Deste modo, há de ser considerado que as
162 limitações de funcionamento dos GT podem ser distintas, como observado no trabalho com as
163 faixas de HT avaliados. A GOx que compõe o sistema GT2 tem ação limitada pelo percentual

164 mínimo de água da amostra (WAHL, 2009; HERMAYER et al., 2015), conforme a baixa
165 correlação identificada entre GT2 e os MLab nas amostras com HT elevado.

166 Os resultados das análises afetam sua aplicação clínica. O uso dos GT para
167 monitoramento domiciliar de portadores de *diabetes mellitus* canino é consagrada na medicina
168 veterinária e estes pacientes atendidos frequentemente estão expostos a hiperglicemia,
169 desidratação e hemoconcentração (GERBER; FREEMAN, 2016). Nessas condições, o
170 panorama glicêmico fornecido pelos GT aqui estudados pode estar deturpado pelas
171 interferências analíticas e igualmente prejudicar a adequação do manejo terapêutico e a correção
172 do desequilíbrio metabólico, que pode implicar no agravamento e fatalidade do quadro. Além
173 das interferências do HT, foi observado também baixa acurácia analítica de determinado GT
174 para determinar valores reais de glicemia, resultando em erros nas condutas terapêuticas.

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

181 **CONCLUSÕES**

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

187 **COMITÊ DE ÉTICA**

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

190 AGRADECIMENTOS

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

193 REFERÊNCIAS

194

195 BOUCHER, J.; KLEINRIDDERS, A.; KAHN, C. R. Insulin Receptor Signaling in Normal and
196 insulin-resistance states. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2014, v. 6, p. 1–23, 2014.

197 CORREA, M.L.; PAES LEME, F.O.; COSTA-VAL, A.P. Avaliação da acurácia de dois
198 glicosímetros veterinários para uso em cães. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 39,
199 n. 1, p. 19-28, jan./jun. 2018

200 FRECKMANN, G.; SCHMID, C.; BAUMSTARK, A.; RUTSCHMANN, M.; HAUG, C.;
201 HEINEMANN, L. Analytical performance requirements for systems for self-monitoring of
202 blood glucose with focus on system accuracy: Relevant differences among ISO 15197:2003,
203 ISO 15197:2013, and current FDA recommendations. **Journal of Diabetes Science and**
204 **Technology**, v. 9, n. 4, p. 885–894, 2015.

205 GERBER, K. L.; FREEMAN, K. P. ASVCP guidelines: Quality assurance for portable blood
206 glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 45,
207 n. 1, p. 10–27, 2016.

208 HERMAYER, K. L.; LOFTLEY, A.S.; REDDY, S.; NARLA, S.N.; EPPS, N.A.; ZHU, Y.
209 Challenges of Inpatient Blood Glucose Monitoring: Standards, Methods, and Devices to
210 Measure Blood Glucose. **Current Diabetes Reports**, v. 15, n. 3, 2015.

211 HIGBIE, C.T.; ESHAR, D.; BELLO, N.M. Evaluation of three point-of-care meters and a
212 portable veterinary chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in
213 black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). **American Journal of Veterinary**
214 **Research**, June 2015, Vol. 76, No. 6 , Pages 532-539

215 PFÜTZNER , A.; SCHIPPER , C.; RAMLJAK , S.; FLACKE, F.; SIEBER , J.; FORST , T.;
216 MUSHOLT , P.B. Determination of hematocrit interference in blood samples derived from
217 patients with different blood glucose concentrations. **Journal of Diabetes Science and**
218 **Technology**, v. 7, n. 1, p. 170–178, 2013.

219 RAMLJAK, S.; LOCK, J.P.; SCHIPPER, C.; MUSHOLT, P.B.; FORST, T.; LYON, M.;
220 PFÜTZNER, A. Hematocrit Interference of Blood Glucose Meters for Patient Self-
221 Measurement. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 179–189, 2013.

222 SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte:
223 Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2010.

224 SHIELDS, E. J. *et al.* Extreme beta-cell deficiency in pancreata of dogs with canine diabetes.
225 **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–19, 2015.

226 SHIN, J. PARK, H.; CHO, S.; NAM, H.; LEE.; K.J. A correction method using a support
227 vector machine to minimize hematocrit interference in blood glucose measurements.
228 **Computers in Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 111–118, 2014.

229 TONYUSHKINA, K.; NICHOLS, J. H. Glucose meters: a review of technical challenges to
230 obtaining accurate results. **Journal of diabetes science and technology**, v. 3, n. 4, p. 971–80,
231 2009.

232 WAHL, H. G. How accurately do we measure blood glucose levels in intensive care unit (ICU)
233 patients? **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 23, n. 4, p. 387–400,
234 2009.

235 **Tabela 01** - Valores médios, desvio padrão (DP), concentração máxima e mínima e intervalo
 236 de confiança da glicemia (mg/dL) de cães hígidos, mensurada através de diferentes
 237 metodologias e utilizando-se diferentes amostras

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

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

242

243 **Tabela 02** - Estudos das correlações entre os quatro métodos de mensuração de glicemia para
 244 as amostras incluídas cujos valores de HT foram abaixo do intervalo de referência para a espécie
 245 canina (HT < 37%)

	Hx plasma	GOx plasma	GT1 capilar	GT2 capilar
Hx plasma	1,0			
GOx plasma	0,96	1,0		
GT1 capilar	0,90	0,94	1,0	
GT2 capilar	0,84	0,84	0,82	1,0

246 Os valores apresentados indicam o coeficiente de correlação (R) com significância para $p \leq 0,01$.

247 **Tabela 03** - Estudo das correlações entre os quatro métodos de mensuração de glicemia para as
 248 amostras cujos valores de HT foram dentro do intervalo de referência para a espécie canina
 249 ($37\% \leq HT \leq 55\%$)

	Hx plasma	GOx plasma	GT1 capilar	GT2 capilar
Hx plasma	1,0*			
GOx plasma	0,95*	1,0*		
GT1 capilar	0,90*	0,60*	1,0*	
GT2 capilar	0,31**	0,39*	0,51*	1,0*

250 Os valores apresentados com asteriscos indicam coeficiente de correlação (r) com significância
 251 para $p \leq 0,01^*$ ou $p \leq 0,02^{**}$.

252 GT1 capilar = glicemia do sangue total capilar pelo GT1; GT2 capilar = glicemia do sangue
 253 total capilar pelo GT2; Hx plasma = glicemia plasmática pelo MLab Hx; GOx plasma =
 254 glicemia plasmática pelo MLab GOx; N = número de observações; DP = desvio padrão; IC =
 255 intervalo de confiança da média de grupos. As variáveis para glicemia estão apresentadas em
 256 mg/dL; HT em %.

257

258 **Tabela 04** - Estudo das correlações entre os quatro métodos de mensuração da glicemia para as
 259 amostras cujos valores de HT estiveram além dos limites considerados superiores para a espécie
 260 canina ($HT > 55\%$)

	Hx plasma	GOx plasma	GT1 capilar	GT2 capilar
Hx plasma	1,0*			
GOx plasma	0,67*	1,0*		
GT1 capilar	0,20	0,55*	1,0*	

GT2 capilar	0,02	0,13	0,54*	1,0
--------------------	------	------	-------	-----

261 Os valores apresentados com asterisco (*) indicam coeficiente de correlação (R) com
262 significância para $p \leq 0,01$. GT1 capilar = glicemia do sangue total capilar pelo GT1; GT2 capilar
263 = glicemia do sangue total capilar pelo GT2; Hx plasma = glicemia plasmática pelo MLab Hx;
264 GOx plasma = glicemia plasmática pelo MLab GOx; N = número de observações; DP = desvio
265 padrão; IC = intervalo de confiança da média de grupos. As variáveis para glicemia estão
266 apresentadas em mg/dL; HT em %.