



Comparação de métodos para avaliação de beta-hidroxibutirato em ovelhas

[Comparison of methods for evaluation of beta-hydroxybutyrate in ewes]

L.R. Jacondino¹, A.S. Gonçalves¹, B. Riet Correa¹, E.R. Oberst¹, M.K. Silva¹, D.B. Birgel²,
E.H. Birgel Júnior², R.F.S. Raimondo^{1*}

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS

²Universidade de São Paulo - Pirassununga, SP

RESUMO

Atualmente o uso de sensores portáteis para mensuração de corpos cetônicos está padronizado e difundido na rotina clínica, contudo estudos em ovinos são escassos. Assim, a presente pesquisa objetivou avaliar a acurácia dos sensores portáteis de uso humano e de uso veterinário para a determinação de beta-hidroxibutirato (BHB) em ovelhas no final da gestação e no pós-parto recente. Foram utilizadas 37 amostras de sangue provenientes de nove ovelhas mestiças Corriedale. A determinação bioquímica de BHB no soro, considerada como o padrão-ouro, foi realizada utilizando-se metodologia enzimática colorimétrica. A média obtida na bioquímica sérica foi de 0,497mmol/L; no sensor de uso humano, a média foi igual a 0,537mmol/L, enquanto no sensor de uso veterinário foi de 0,751mmol/L. Foi verificada alta correlação entre o dosímetro de uso humano e o padrão-ouro ($r=0,93$, $P<0,001$). A média do aparelho de uso veterinário diferiu das demais (51%; $P<0,05$), superestimando os resultados em ovelhas. As medições obtidas no aparelho veterinário também apresentaram menor precisão e veracidade. Concluiu-se que o sensor portátil de uso humano é mais acurado e mais preciso no diagnóstico precoce de toxemia da gestação em ovelhas.

Palavras-chave: cetose, toxemia da gestação, acurácia, diagnóstico

ABSTRACT

Currently the use of portable sensors for measuring ketone bodies is standardized and diffused in the clinical routine, however, studies in sheep are scarce. Therefore, the present study aimed to evaluate the accuracy of the human portable sensor and the veterinary portable sensor for the determination of beta-hydroxybutyrate (BHB) in sheep at the end of gestation and postpartum. We used 37 samples of blood from nine crossbred Corriedale sheep. Biochemical determination of serum BHB, considered gold standard, was performed using colorimetric enzymatic methodology. The mean serum biochemistry was 0.497mmol/L, in the human sensor the mean was 0.537mmol/L, while in the veterinary sensor it was 0.751mmol/L. A high correlation was verified between the dosimeter for human use and the gold standard ($r= 0.93$, $P< 0.001$). The mean of the veterinary apparatus differed from the others, being 51% ($P< 0,05$), higher than the standard, that is, it was less accurate and had lower veracity, overestimating the results in sheep. It was concluded that the portable sensor for human use is more accurate and accurate in the early diagnosis of toxemia of pregnancy in sheep.

Keywords: ketosis, pregnancy toxemia, accuracy, diagnosis

INTRODUÇÃO

No terço final da gestação de ovinos, ocorre cerca de 80% do crescimento dos fetos que, além de competirem por espaço abdominal na fêmea prenhe, passam a requerer mais nutrientes para

seu desenvolvimento. Essa condição leva ao balanço energético negativo (BEN), resultante do aumento da demanda energética devido ao rápido crescimento fetal e insuficiente ingestão (González e Silva, 2006). A resposta metabólica vem na forma de mobilização lipídica, podendo

Recebido em 24 de agosto de 2017

Aceito em 8 de outubro de 2018

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: raquel.raimondo@ufrgs.br

resultar em hipoglicemia, aumento dos níveis séricos de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e de corpos cetônicos, como: acetona, acetoacetato e beta-hidroxibutirato (BHB) (Harmeyer e Schlumbohm, 2008).

A doença, consequência da desordem no metabolismo energético dos ácidos graxos durante períodos de aumento de sua utilização hepática, é denominada toxemia da gestação. A enfermidade nessa espécie é altamente fatal, com letalidade próxima de 100% (Riet Correa *et al.*, 2007). Concentrações sanguíneas de BHB entre 0,8 e 1,6mmol/L são indicativas de balanço energético negativo (Navarre e Pugh, 2002; Campos *et al.*, 2010).

O monitoramento do perfil metabólico permite detectar alterações ocorridas durante os períodos compreendidos da gestação à lactação (Oliveira, 2016). O BHB sanguíneo pode ser utilizado, durante as seis últimas semanas de gestação, como um indicador da presença de toxemia da gestação em estado inaparente (Radostits *et al.*, 2007). As técnicas mais precisas de mensuração de corpos cetônicos exigem estrutura laboratorial apropriada, o que aumenta os custos e impossibilita a execução a campo. Além disso, a maioria detecta acetoacetato e não BHB e possui limitações na sua utilização (Oetzel, 2004; Kaneko *et al.*, 2008). Atualmente, o uso de sensores portáteis para mensuração da glicemia e da cetose em humanos e para mensuração da cetose em bovinos está padronizado e difundido na rotina clínica. As informações do uso desses sensores para monitorar o perfil energético e diagnosticar toxemia da gestação em ovelhas são escassas. Assim, a presente pesquisa objetivou avaliar a acurácia dos sensores portáteis de uso humano e de uso veterinário para a determinação de BHB em ovelhas no final da gestação e no pós-parto recente.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos envolvendo os animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), com o número do Certificado de Aprovação do Projeto: 30774. Foram utilizadas nove ovelhas mestiças da raça Corriedale, pertencentes à unidade de criação de ovinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS. O sistema

de criação é semi-intensivo, em piquete de 1,6ha, formado por pastagem nativa melhorada, com suplementação de concentrado comercial ofertado no cocho uma vez ao dia, com água e sal mineral à vontade. As ovelhas foram submetidas à monta natural e, 50 dias após, foi realizado exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação. Durante a gestação, foram mantidas no piquete da unidade e seguiram o manejo de rotina. Após o parto, foram separadas em baias individuais para o acompanhamento e os cuidados com o neonato, retornando ao piquete 48 horas após.

Para avaliação do BHB, foram utilizadas 37 amostras de sangue coletadas semanalmente a partir de 52 dias pré-parto, no dia do parto e nos dias três, sete e 10 pós-parto, mediante punção da veia jugular externa, utilizando-se o sistema Vacutainer®, por meio de agulhas 25x10 e de tubos plásticos sem anticoagulante, providos de tampa de borracha, com capacidade para 5mL cada. Imediatamente após a coleta, foram realizadas, diretamente no tubo de coleta, as mensurações de BHB no sensor portátil de uso humano (SPH) Optium Xceed® (Abbott Diabetes Care Ltd., Witney, UK) e no sensor portátil de uso veterinário (SPV) KetoVet® (KetoVet Brasil, TaiDoc technology, Taiwan, China), conforme recomendações de Raimondo *et al.* (2011). A seguir, as amostras foram centrifugadas a 1000g por 15 minutos, sendo o soro separado e conservado em *freezer* (temperatura de -20°C) até a análise. A determinação bioquímica (BP) de BHB no soro foi realizada utilizando-se metodologia enzimática colorimétrica, considerada padrão-ouro, com *kit* comercial (Ranbut D-3-Hydroxybutyrate, Randox Laboratories Ltd, Reino Unido), em analisador bioquímico automático (Labtest modelo Labmax 240, Japão – Tokyo Boeki Medical System Ltda.).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Os valores de BHB obtidos com SPH, SPV e BP foram submetidos ao procedimento General Linear Model (PROC GLM), e as médias foram comparadas usando-se teste de Tukey em nível de 5% de significância. A correlação de Pearson entre os métodos foi avaliada pelo PROC CORR.

A avaliação da acurácia dos métodos foi realizada considerando-se a proximidade entre

seus resultados e os valores de referência aceitos em termos de veracidade e precisão. A veracidade de uma medição indica o grau de concordância entre o valor esperado (sensores portáteis) e o valor de referência (BP), enquanto a precisão indica o grau de concordância interna entre resultados independentes feitos em condições específicas (Statistics..., 1993). Neste estudo, a acurácia dos sensores portáteis foi avaliada seguindo o procedimento de Theil (1966), adaptado por Pomar e Marcoux (2005). Resumidamente, o erro quadrático médio de predição (EQMP) foi calculado somando-se os erros de previsão (diferença entre o valor de BHB no BP e o valor de BHB obtido em cada sensor portátil) ao quadrado e dividindo-os pelo número de observações experimentais. O EQMP foi, então, decomposto em erro na tendência central (ECT), erro devido à regressão (ER) e erro devido às distúrbâncias (ED). Erro na tendência central é a diferença entre o valor médio de BHB obtido na BP e os valores médios correspondentes do SPH e do SPV. Erro devido à regressão é o valor que teria sido obtido se a regressão dos dados de BHB do SPH e do SPV

estivesse em total concordância com os dados de BHB da BP. Quanto maior a soma de ECT e ER, menor é a veracidade do resultado. Erro devido às distúrbâncias é a variação no valor de BHB da BP que não é considerada na regressão de mínimos quadrados para prever o valor de BHB usando SPH e SPV. Quanto maior o valor de ED, menos preciso é o resultado. Assim, a veracidade foi estimada neste artigo pela adição dos valores de ECT e ER, a precisão foi associada ao ED e a acurácia ao EQMP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios (Tab. 1) obtidos na bioquímica sérica, considerada como padrão-ouro no presente artigo, foram de $0,498 \pm 0,214$ mmol/L. No SPH, a média foi igual a $0,538 \pm 0,332$ mmol/L e no SPV foi de $0,751 \pm 0,368$ mmol/L. Foi verificada alta correlação entre o SPH e o BP ($r=0,93$, $P<0,001$). A média do SPV diferiu ($P=0,001$) das demais, sendo 51% maior que o padrão, ou seja, superestimando os resultados em ovelhas.

Tabela 1. Acurácia da avaliação de β -hidroxibutirato sanguíneo de ovelhas durante a fase preparatória do parto até 10 dias pós-parto, por meio de sensores portáteis de uso humano (SPH) Optium Xceed® (Abbott Diabetes Care Ltd., Witney, UK) e de uso veterinário (SPV) KetoVet® (KetoVet Brasil, TaiDoc technology, Taiwan, China)

	Média ¹ , mmol/L	Análise de acurácia ²			
		EQMP	ECT	ER	ED
Bioquímica sérica (padrão-ouro)	0,498 ^a				
SPH	0,538 ^a	0,046	0,002	0,017	0,027
SPV	0,751 ^b	0,172	0,064	0,037	0,070
Probabilidade	0,001				

¹Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem entre si pelo teste de Tukey.

²Erro quadrático médio de predição (EQMP) decomposto em erro na tendência central (ECT), erro devido à regressão (ER) e erro devido às distúrbâncias (ED).

Concentrações sanguíneas de BHB entre 0,8 e 1,6 mmol/L são indicativas de balanço energético negativo. Admite-se que concentrações de BHB no sangue iguais a 0,8 mmol/L indicam adequada ingestão de energia, concentrações entre 0,8 e 1,6 mmol/L indicam inadequada ingestão de energia e concentrações maiores que 1,6 mmol/L apontam para desnutrição grave. Nos casos clínicos de toxemia da gestação, as concentrações de BHB no sangue são superiores a 3,0 mmol/L (Rook, 2000). Quando o SPH foi utilizado para a determinação de BHB em ovinos, foram obtidos resultados semelhantes

($P>0,05$) ao BP, indicando que esse método pode ser utilizado no monitoramento do rebanho. Por outro lado, quando o SPV foi utilizado, valores de BHB foram superestimados. Isso pode levar ao diagnóstico de falsos positivos e comprometer o monitoramento do rebanho, uma vez que, quando o BP retornar a valores próximos ao limite de balanço energético negativo, o SPV poderá retornar a valores que indicam essa desordem.

Os resultados de BHB obtidos nos sensores portáteis foram avaliados quanto à acurácia,

veracidade e precisão em relação ao teste BP. A análise dos erros (Tab. 1) demonstrou que os resultados obtidos com o SPH apresentam melhor acurácia, veracidade e precisão para o uso em ovinos quando comparado aos resultados com o SPV. Isso pode ser constatado uma vez que o SPH retornou valores do EQMP (acurácia), do ECT + ER (veracidade) e do ED, que foram 0,126, 0,082 e 0,043mmol/L menores respectivamente que o SPV, quando estimados os valores de BHB tomados com o BP. O gráfico de regressões facilita a observação desses resultados (Fig. 1). As observações e a regressão do SPH ficam mais próximas da linha identidade (ou linha de igualdade) em comparação ao SPV. Ou seja, se o procedimento analítico apresentar um alto nível de acurácia, isso significa que o valor obtido, em média, é próximo ao valor verdadeiro. Porém, quando o procedimento analítico apresentar um baixo nível de acurácia, ele produz em média valores distantes do verdadeiro (Kaneko *et al.*, 2008). Além disso, a

figura mostra que os dois métodos tendem a superestimar os resultados quanto maiores forem os valores reais de BP, o que indica que futuros estudos devem ser desenvolvidos para melhor calibração do SPH ou do SPV para estimação de BHB em ovinos.

A precisão é uma medida de dispersão entre os valores preditos e observados, que pode ser considerada como a soma dos fatores aleatórios. Representa a variabilidade média da distância entre o valor predito e o observado, ou a variabilidade dos vieses (Kohn *et al.*, 1998), assim o método é mais preciso quanto menor for o valor de ED (Theil, 1966).

O SPH apresentou valor de ED menor que o SPV, demonstrando que esse último método retornou valores com maior variabilidade aleatória. Tal informação é importante, uma vez que esse tipo de erro não é passível de ajuste via calibração do método.

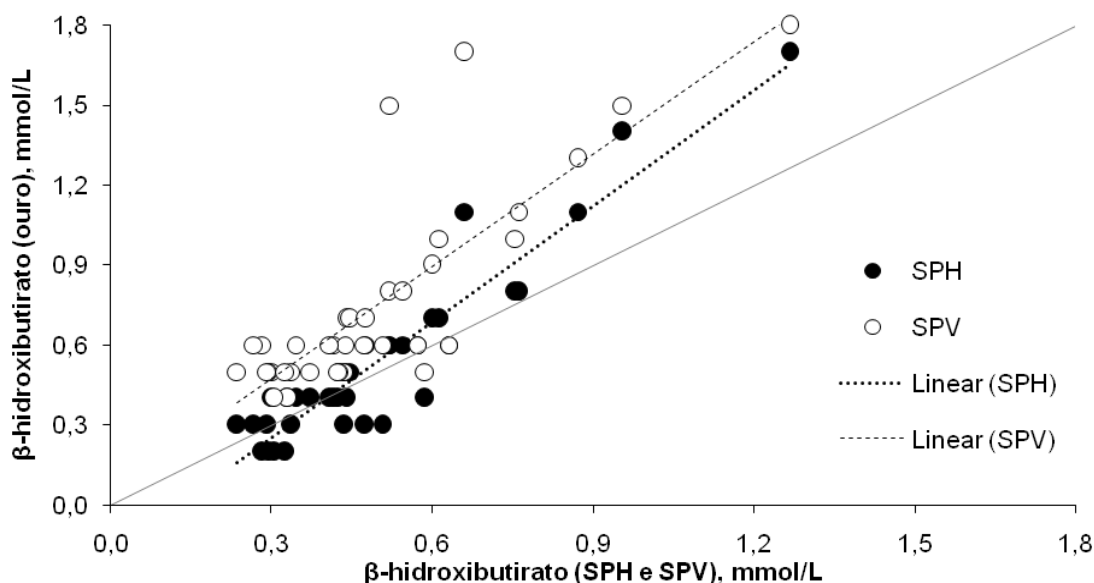


Figura 1. Comparação dos valores sanguíneos de β-hidroxiacetato de ovelhas durante a fase preparatória do parto até 10 dias pós-parto, mensurados pela bioquímica sérica (padrão-ouro) e pelos sensores portáteis de uso humano (SPH) ¹Optium Xceed® (Abbott Diabetes Care Ltd., Witney, UK) e de uso veterinário (SPV) ²KetoVet® (KetoVet Brasil, TaiDoc technology, Taiwan, China).

¹Equação para SPH: $y = -0,184 + 1,445x$; $R^2 = 0,87$.

²Equação para SPV: $y = -0,141 + 1,401x$; $R^2 = 0,67$.

Estudo realizado em bovinos (Souza *et al.*, 2015) obteve uma correlação positiva, com coeficiente de determinação igual a 0,86 entre o SPV e o BP. Os autores concluíram que o SPV foi acurado e preciso, comparado ao método padrão de

mensuração por bioquímica úmida. Na espécie ovina, o sensor ainda não havia sido testado.

A análise dos erros apontou que o SPH, além de ter alta correlação com o valor de BHB obtido na

metodologia padrão, também produz resultados com maior acurácia, veracidade e precisão para o uso em ovinos. Estudos anteriores obtiveram correlação de 0,99 (Panousis *et al.*, 2012) e 0,96 (Pichler *et al.*, 2014) entre o SPH e a bioquímica padrão em ovelhas. O mesmo sensor também foi avaliado como acurado e preciso para o uso em bovinos (Raimondo *et al.*, 2011).

Os sensores portáteis SPH e SPV se diferenciam pelo material utilizado na confecção do eletrodo, que no SPV é de ouro, enquanto no SPH é de carbono, contudo utilizam a mesma metodologia, amperometria enzimática, para a determinação de BHB no sangue capilar ou venoso. Por empregarem a mesma metodologia e por terem sido apontados como acurados e precisos para bovinos, esperava-se o mesmo resultado para a espécie ovina. Não se podem explicar os motivos por que o SPV foi menos acurado.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o sensor portátil de uso humano é uma ferramenta mais acurada, precisa e com maior veracidade quando comparado com o sensor portátil de uso veterinário, para o monitoramento de BHB em ovinos, assim como no diagnóstico precoce de toxemia da gestação. O sensor portátil de uso veterinário superestimou os valores de BHB em comparação com o bioquímico padrão e com o sensor de uso humano e, portanto, não é recomendado para uso em ovinos. Futuros estudos devem ser desenvolvidos em maior escala para melhor calibração dos dois métodos rápidos.

REFERÊNCIAS

- CAMPOS, A.G.; AFONSO, J.A.B.; SANTOS, R.A. *et al.* Estudo clínico-laboratorial da toxemia da prenhez em ovelhas: análise retrospectiva. *Ciênc. Anim. Bras.*, v.11, p.623-628, 2010.
- GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica clínica de glicídios. In: _____. (Eds.). *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006. p.153-207.
- HARMEYER, J.; SCHLUMBOHM, C. Twin-pregnancy increases susceptibility of ewes to hypoglycaemic stress and pregnancy toxemia. *Res. Vet. Sci.*, v.84, p.286-299, 2008.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 8.ed. San Diego: Academic Press, 2008. 916p.
- KOHN, R.A.; KALSCEUR, K.F.; HANIGAN, M. Evaluation of models for balancing the protein requirements of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.3402-3414, 1998.
- NAVARRE, C. B.; PUGH, D. G: Pregnancy toxemia. In: PUGH, D. G. *Sheep and goat medicine*. Philadelphia: Saunders, 2002.
- OETZEL, G.R. Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet. Clin. Food. Anim.*, v.20, p.651-674, 2004.
- OLIVEIRA, R.P.M. Avaliação do perfil metabólico em diferentes fases do parto de ovelhas Santa Inês na Amazônia Ocidental. *Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.*, v.17, p.37-44, 2016.
- PANOUSIS, N.; BROZOS, C.; KARAGIANNIS, I. *et al.* Evaluation of precision Xceed® meter for on-site monitoring of blood β -hydroxybutyric acid and glucose concentrations in dairy sheep. *Res. Vet. Sci.*, v.93, p.435-439, 2012.
- PICHLER, M.; DAMBERGER, A.; SCHWENDENWEIN, I. *et al.* Thresholds of whole-blood β -hydroxybutyrate and glucose concentrations measured with an electronic hand-held device to identify ovine hyperketonemia. *J. Dairy Sci.*, v.97, p.1388-1399, 2014.
- POMAR, C.; MARCOUX, M. The accuracy of measuring backfat and loin muscle thicknesses on pork carcasses by the Hennessy HGP2, Destron PG-100, CGM and ultrasound CVT grading probes. *Can. J. Anim. Sci.* v.85, p.481-492, 2005.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; HINCHCLIFF, K.W. *et al. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10.ed. Philadelphia: Saunders, 2007. 2156p.
- RAIMONDO, R.F.S.; YASUOKA, M.M.; HAGIWARA, M.K. *et al.* Uso de sensor portátil para a mensuração de glicose e β -hidroxibutirato no sangue de bovinos leiteiros. *Vet. Zootec.* v.18, p.389-393, 2011.
- RIET-CORREA, F. *et al. Doenças de ruminantes e equídeos*. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007. v.2, p.281-286.

ROOK, J.S. Pregnancy toxemia of ewes, does and beef cows. *Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract.*, v.16, p.293-317, 2000.

SOUZA, R.C.; SOUZA, R.C.; SOUSA, B.M. *et al.* Uso de aparelho portátil para determinar a concentração de cetose no sangue de bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 52, 2015, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: [s.n.] 2015. p.1-3.

STATISTICS - vocabulary and symbols part 1: probability and general statistical terms. Geneva, Switzerland: ISO, 1993.

THEIL, H. Applied economic forecasting. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1966. 474 p.