

SIMPÓS

SUL

II Simpósio de Pós-Graduação do Sul do Brasil

BICENTENÁRIO DA INDEPENDÊNCIA: 200 ANOS DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO NO BRASIL

AVALIAÇÃO DE B-HIDROXIBUTIRATO: UMA COMPARAÇÃO ENTRE MÉTODOS DE TESTAGEM RÁPIDA E ENZIMÁTICO EM NOVILHAS PERIPARTURIENTES

Davi Dayan Assenheimer

Universidade Federal da Fronteira Sul -UFFS
assendavi@gmail.com

Luana Carolina Bachmann Gregolin

Universidade Federal da Fronteira Sul –UFFS
lubgregolin@gmail.com

Higor Henrique Cogo

Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS
cogohigor@gmail.com

Maiara Garcia Blagitz

Universidade Federal da Fronteira Sul –UFFS
maiara.azevedo@uffs.edu.br

Eixo 05: Ciências Agrárias

Resumo: Novilhas leiteiras são fonte de reposição nos rebanhos e diversos distúrbios afetam negativamente essa classe, dentre eles, a cetose. O objetivo do estudo foi avaliar a acurácia dos resultados de dois métodos de avaliação portáteis (FreeStyle® e KetoVet®) de β -hidroxibutirato e correlacionar com o método enzimático padrão ouro. Foram analisadas 150 amostras de sangue e soro em cinco momentos distintos do periparto de 30 novilhas. A análise estatística foi realizada pelo programa SAS 9.3®. Os resultados demonstraram que os testes portáteis não substituem o enzimático e que o FreeStyle® pode ser utilizado a campo, mas é necessário substituir o valor encontrado pelo aparelho na equação de regressão.

Palavras-chave: Diagnóstico; Enfermidades; Período de Transição.

Introdução

De acordo com Abdeli *et al.* (2017), a doença que vem sendo identificada mundialmente em altos índices nos rebanhos leiteiros é a cetose, principalmente na forma subclínica. Esta é mais comum durante o pós-parto imediato e é descrita pelo aumento nas

concentrações de corpos cetônicos na corrente sanguínea do animal, principalmente de β -hidroxibutirato (BHB) (PONCHEKI, 2019).

De acordo com alguns autores, o único método eficiente de detecção da cetose subclínica é a dosagem do BHB no sangue ou soro sanguíneo devido a sua estabilidade e predominância entre os corpos cetônicos circulantes (VANHOLDER *et al.* 2015; RUTHERFORD, OIKONOMOU e SMITH, 2016). É válido ressaltar que quando esse exame é realizado a partir do soro sanguíneo há uma exigência de estrutura laboratorial, cuidados com o manuseio da amostra, demanda logística e tempo para emissão dos resultados (ALVARENGA *et al.* 2015).

Para auxiliar os médicos veterinários a campo que não tem acesso ao exame padrão ouro, e até mesmo facilitar o diagnóstico na fazenda, possibilitando que o mesmo seja realizado de forma econômica, rápida e precisa, vários dispositivos eletrônicos portáteis vêm sendo desenvolvidos e comercializados (JACONDINO *et al.* 2019). Dentre eles, alguns dispositivos com princípio de aferir glicemia na medicina humana são utilizados na veterinária para a determinação da concentração de BHB em rebanhos leiteiros (FIORENTIN *et al.* 2017). Bons resultados são observados tanto para aparelhos adaptados da medicina humana (SOUZA *et al.* 2015) quanto para dispositivos desenvolvidos especificamente para uso veterinário (SCHEIDER *et al.* 2020).

Em vista disso, os objetivos do presente estudo foram (1) comparar a mensuração sanguínea de BHB obtida por meio de dois dispositivos eletrônicos portáteis de testagem rápida e um método enzimático (padrão ouro); além de (2) determinar qual dos testes rápidos pode substituir o teste padrão ouro.

Material e Métodos

O estudo foi realizado de outubro de 2020 a julho de 2021 em duas fazendas leiteiras comerciais localizadas no município de Salto do Lontra (PR), mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS (nº 8290280720, 5403300919 e 6321041021).

Ambas as propriedades adotavam manejo alimentar semelhante. No período entre -60 e -30 dias antes do parto, os animais se alimentavam de silagem de milho, pré-secado de aveia, ração comercial, farelo de soja e sal mineral comercial. Aproximadamente 30 dias antes

do parto (-30), os animais passavam a se alimentar com silagem de milho, feno e ração, preparada na propriedade, composta por farelo de soja, casquinha de soja, mineral pré-parto.

Para o estudo foram selecionadas 30 novilhas híginas e sem histórico recente de enfermidades (Fazenda 1 = 20 novilhas; Fazenda 2 = 10 novilhas). Para avaliação do BHB foram coletadas 5 amostras de sangue de cada uma das 30 novilhas: -15 dias antes do parto (M1), dia do parto (M2), sete dias após o parto (M3), 15 dias após o parto (M4) e trinta dias após o parto (M5).

O sangue foi coletado por punção a veia coccígea usando o sistema Vacutainer® (BD, New Jersey, EUA), em tubos plásticos com EDTA e com capacidade de 5 mL para mensurar BHB por meio dos métodos portáteis eletrônicos. Para dosagem enzimática de BHB foram utilizados tubos plásticos sem anticoagulante com capacidade de 10 mL. Os tubos foram acondicionados em caixas isotérmicas, na temperatura de 4°C e encaminhadas ao Laboratório de Análises Clínicas da Superintendência Unidade Hospitalar Veterinária Universitária (SUHVU) da Universidade Federal da Fronteira Sul, *Campus Realeza*.

Foram realizadas as mensurações dos teores de BHB com auxílio dos dosímetros portáteis FreeStyle Optium β -ketone® (Abbott Diabetes Care) e Ketovet® (TaiDoc Technology Corporation). Para isso, o tubo com EDTA foi homogeneizado e com auxílio de um capilar, uma gota de sangue foi colocada sobre as fitas de cada um dos testes conforme as instruções de cada fabricante. Os resultados foram exibidos na tela após dez segundos no FreeStyle® e cinco segundos no Ketovet®. Os valores de cada momento foram registrados na ficha individual de cada animal.

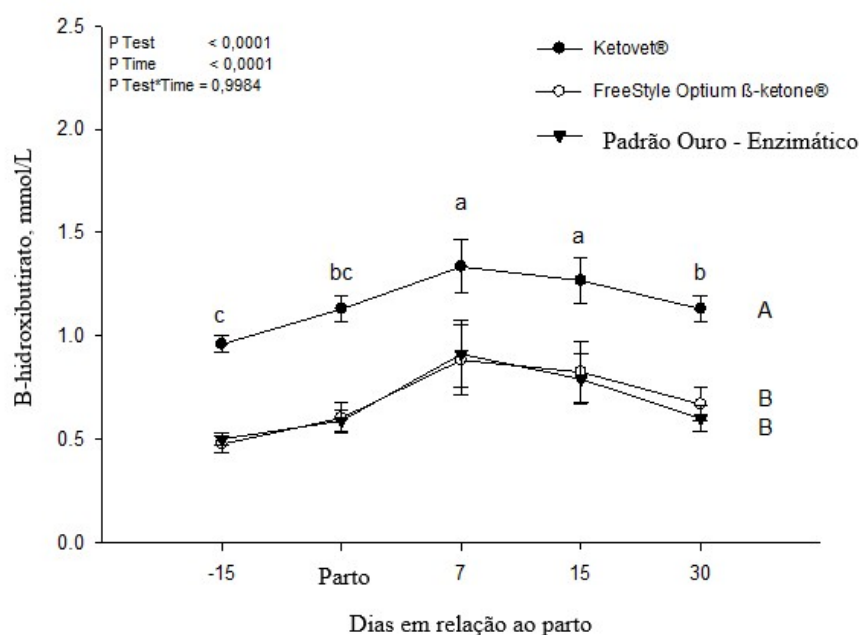
As amostras dos tubos sem anticoagulante foram centrifugadas a 4330 g por dez minutos. O soro obtido foi separado, armazenado em tubos tipo Eppendorf®, identificados e conservados em freezer - 80 °C para posterior dosagem do BHB de forma enzimática. Para avaliação de BHB no soro foi utilizada a metodologia enzimática colorimétrica, considerada Padrão Ouro para esse tipo de análise. O kit comercial utilizado foi o Ranbut D-3-Hydroxybutyrate® (Randox Laboratories Ltda). O exame foi realizado em analisador bioquímico automático Labtest® (Labmax 240, Japão).

Para a comparação entre os diferentes exames de BHB (Ketovet®, FreeStyle® ou Padrão ouro) em relação ao momento de coleta, a estatística descritiva foi representada pela média aritmética e erro padrão da média (EPM). Estes dados foram obtidos por meio do procedimento Means programa SAS 9.3 (SAS/STAT, SAS Institute Inc.). Para a elaboração

das equações e dos gráficos de regressão, bem como a predição dos valores de BHB do Padrão ouro (Analisador automatizado), usando os dois testes rápidos (Ketovet® e FreeStyle®), foi utilizado o programa Sigmaplot 12.0. As análises de regressão foram expressas como curvas de regressão linear simples. A concordância entre os métodos foi verificada usando o gráfico de diferenças de Bland-Altman (BLAND e ALTMAN, 1986) com intuito de verificar qual(is) dos métodos testados poderia(m) substituir o Padrão ouro.

Resultados

A comparação dos níveis de BHB entre os três métodos testados, de acordo com os diferentes momentos de coleta de sangue, pode ser observada na Figura 1. Observa-se semelhante formato na curva de BHB durante o periparto, quando comparados os três testes. No entanto, na média, o Ketovet® apresentou resultados maiores que os outros dois testes, no decorrer de todos os momentos experimentais.



Legenda: * Letras maiúsculas diferentes indicam diferença entre os testes avaliados. Letras minúsculas diferentes, indicam diferença entre os momentos avaliados.

Figura 1. BHB (médias ± EPM) e valores de *P* (Exame, Tempo e Exame*Tempo) obtidos nos cinco momentos de avaliação através do Padrão ouro (teste automático) e aparelhos portáteis (Free Style® e KetoVet®).

No teste de Bland-Altman, não houve diferença entre a média e a média das diferenças para os métodos FreeStyle® e o Padrão ouro. No entanto, quando analisadas a equação de

regressão linear obtida com as diferenças entre os métodos, houve um viés de proporção, onde o FreeStyle® acabou gerando alguns valores maiores que o Padrão Ouro. Nesse caso, o método FreeStyle® não é capaz de substituir integralmente o método enzimático. Apesar disso, esse teste rápido pode ser usado a campo, desde que o valor obtido seja substituído na equação $= 0.473 + 0.989 * (\text{valor obtido no aparelho})$.

Discussão

Fundamentando os resultados apresentados na Figura 1, as variações que ocorrem ao redor do parto nos níveis de BHB foram visualizadas. Além disso, foi possível identificar o aumento da concentração de corpos cetônicos durante o pós-parto imediato. As maiores concentrações de BHB foram vistas no M3 e M4, podendo-se inferir que houve uma tendência dos animais apresentarem cetose, onde as concentrações de BHB se mostraram levemente elevadas.

Ao utilizar o aparelho de uso veterinário, Ketovet®, os valores de BHB foram superestimados em todos os momentos experimentais. Quando isso acontece, resultados falsos positivos são diagnosticados (JACONDINO *et al.* 2019), interferindo na conduta terapêutica e gerando muitas vezes tratamentos desnecessários, gastos com medicamentos, além de influenciar negativamente nas condutas em relação ao manejo pré-parto dos animais e monitoramento de saúde do rebanho (ALVARENGA *et al.* 2015).

Foi realizado o teste de Bland-Altman, considerado um teste de predição, o qual mostra com mais confiabilidade se os valores obtidos pelo método testado podem substituir o padrão ouro (BLAND e ALTMAN, 1986). Voyvoda e Erdogan (2010), em um estudo realizado com vacas leiteiras também utilizaram o gráfico de diferença de Bland-Altman com intuito de comparar o aparelho Optium Xceed® com o padrão ouro e, da mesma forma que na presente pesquisa, puderam verificar um pequeno viés entre os testes, onde o aparelho humano apresentou valores mais altos que o padrão ouro.

Em contrapartida, quando analisados o teste de Bland-Altman entre o método KetoVet® e o Padrão ouro, foi possível observar diferença entre todos os parâmetros. Dessa forma, os resultados de β -hidroxibutirato obtidos por meio do KetoVet® não podem substituir os valores obtidos no método automatizado (Padrão ouro).

Conclusão

Os resultados dessa pesquisa demonstram que o dosímetro portátil FreeStyle[®] utilizado durante o parto de fêmeas Holandês apresenta valores de BHB semelhantes aos obtidos por meio do analisador bioquímico. No entanto, o BHB oriundo do analisador bioquímico (Padrão ouro) não pode ser integralmente substituído pelos valores de BHB obtidos nos dosímetros portáteis FreeStyle[®] ou KetoVet[®].

Referências

ABDELI, A. *et al.* Elevated non-esterified fatty acid and β -hydroxybutyrate in transition dairy cow and their association with reproductive performance and disorders: a meta-analysis. **Theriogenology**, v.93, p.99-104, 2017.

ALVARENGA, E. A. *et al.* Avaliação do perfil metabólico de vacas da raça Holandesa durante o período de transição. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.3, p.281-290, 2015.

BLAND, J. M., ALTMAN, D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. **Lancet**, v. 327, n.8476, p. 307-310, 1986.

FIORENTIN, E. *et al.* Accuracy of two hand-held electronic devices for determination of blood β -hydroxybutyrate in dairy cows. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.18, n.3, p. 439–445, 2017.

JACONDINO, L. R. *et al.* Comparação de métodos para avaliação de beta-hidroxibutirato em ovelhas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, p. 857-862, 2019.

PONCHEK, J. K. Beta-hidroxibutirato e perfil de ácidos graxos do leite bovino no início da lactação: efeitos sobre produção, reprodução e sanidade. 2019. 113 f. **Tese (Doutorado) - Curso de Zootecnia**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2019.

RUTHERFORD, A. J., OIKONOMOU, G e SMITH, R. F. The effect of subclinical ketosis on activity at estrus and reproductive performance in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n.6, p.4808–4815, 2016.

SCHNEIDER, R. F. *et al.* Diagnóstico de cetose em vacas leiteiras, em diferentes sistemas de produção, por Optium Xceed[®] e Ketovet[®]. **PUBVET**, v.14, n.11, a688, p.1-7, 2020.

SOUZA, R. C. *et al.* Uso de aparelho portátil para determinar a concentração de cetose no sangue de bovinos. **Revista V&Z**, v. 26, p.2179-9482, 2015.

VANHOLDER, T. *et al.* Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in The Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v.98, n.2, p.880-888, 2015.

VOYVODA, H; ERDOGAN, H. Use of a hand-held meter for detecting subclinical ketosis in dairy cows. **Research in Veterinary Science**, v. 89, n. 3, p. 344-351, 2010.