

Validación de glucómetros portátiles para la determinación de la glucemia en quelonios (*Trachemys sp*)

Validation of portable glucometers for the determination of glycemia in chelonians (*Trachemys sp*)



Alumna:

Sofía Gillsbro Carrillo

Directores:

Pedro José Ginel Pérez

Rafael Guerra Caro



INDICE

	<u>Página</u>
1. Introducción.....	2
1.1 Papel del Parque Zoológico.....	3
1.2 Especies exóticas invasoras.....	4
1.3 Descripción de <i>Trachemys scripta</i>	5
1.4 Glucemia.....	7
1.5 Extracción de sangre en quelonios.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Material y métodos.....	13
3.1 Animales y hábitats.....	13
3.2 Equipos de medición de la glucemia.....	14
3.3 Muestras de sangre.....	16
3.4 Determinación de la glucemia.....	17
3.5 Determinación del hematocrito.....	19
3.6 Determinación de las proteínas totales.....	19
3.7 Análisis estadístico.....	19
4. Resultados y discusión.....	21
4.1 Estadística descriptiva.....	22
4.2 Precisión.....	24
4.3 Exactitud.....	26
4.4 Influencia del hematocrito.....	32
4.5 Limitaciones del estudio.....	33
5. Conclusiones.....	34
6. Resumen.....	35
7. Summary.....	36
8. Agradecimientos.....	37
9. Bibliografía.....	38

1. INTRODUCCIÓN

Los reptiles están clasificados taxonómicamente en 4 órdenes, y los quelonios componen uno de ellos, el orden *Testudines*, *Testudinata*, o *Chelonia*. Este orden se divide en dos subórdenes, atendiendo al modo en que las tortugas retraen el cuello: el suborden *Cryptodira*, que retraen el cuello y la cabeza hacia el interior del caparazón; y el *Pleurodira*, que tan sólo giran el cuello lateralmente y lo pegan al cuerpo (Boyer y Boyer, 2006).

La mayoría de los quelonios que los veterinarios están más habituados a ver y tratar pertenecen al suborden *Cryptodira*, como los galápagos (Boyer y Boyer, 2006).

Entre las pruebas que los veterinarios necesitan realizar en los animales, está la medición del nivel de glucosa en sangre. En los quelonios, como en otros animales, conocer el valor de la glucemia ayuda al diagnóstico de algunas enfermedades o a saber el estado fisiológico en el que se encuentran (Chitty y Raftery, 2013b). Por lo que su determinación es una tarea que se realiza con frecuencia.

El *gold standard* de la determinación de la glucemia es el analizador bioquímico automatizado de los laboratorios, pero cada vez más en medicina veterinaria se está extendiendo el uso de medidores portátiles de glucosa en sangre (glucómetros) que, realizando unas reacciones enzimáticas con la glucosa existente de una gota de sangre, son capaces de medir la glucemia en pocos segundos (Stein y Greco, 2002; Gerber y Freeman, 2016).

En los quelonios, las muestras sanguíneas normalmente proceden de vasos venosos, porque las que se obtienen de los capilares suelen estar diluidas con líquido linfático debido a la proximidad de los vasos linfáticos y los capilares sanguíneos (Campbell, 2006). Razones como el pequeño tamaño de algunos de estos animales, el complejo manejo por su caparazón y la retracción del cuello, o la difícil visualización de las venas hacen que la extracción sanguínea en estos animales sea difícil en la práctica. Por lo que el uso de los glucómetros en los quelonios sería de gran utilidad para la labor de los veterinarios, motivo por el cual este trabajo pretende comprobar su validez en galápagos.

1.1 PAPEL DEL PARQUE ZOOLÓGICO

Numerosas entidades e instituciones trabajan para conservar el patrimonio natural y la biodiversidad a nivel mundial. Entre ellas se encuentran los parques zoológicos, que albergan una muestra representativa de especies de fauna silvestre y reciben gran cantidad de visitantes, a los que comunican y sensibilizan sobre la importancia de proteger dichas especies y sus hábitats, implicándolos en su cuidado (Rodríguez-Guerra y Guillén-Salazar, 2010).

Estos zoológicos están llevando a cabo un serio trabajo en la conservación de especies y protección del medio ambiente, involucrando y colaborando con organizaciones ambientales, autoridades nacionales y regionales, instituciones científicas, universidades, asociaciones profesionales y ONG (Rodríguez-Guerra y Guillén-Salazar, 2010).

El Parque Zoológico Municipal de Córdoba (en adelante PZMC) trabaja bajo una estrategia global para desempeñar las funciones de investigación científica, conservación de especies, educación y ocio. Además de trabajar en la recuperación de animales.

El PZMC ayuda al medio ambiente en el control de las especies exóticas invasoras actuando como centro receptor de éstas. Un ejemplo de ello, es la entrada de aproximadamente 250 galápagos exóticos de media anualmente, que se mantienen en una instalación expuesta al público de alto contenido educativo y separados de los galápagos autóctonos.

Estos especímenes proceden de particulares o encontrados en medio natural, intentándose en el PZMC concienciar a la sociedad de la responsabilidad que implica tener este tipo de animal de compañía, como los cuidados diarios y sanitarios que requieren, la edad que pueden llegar a alcanzar (40 años), el foco de enfermedades que pueden ser o el peligro de desplazamiento de especies autóctonas. No hay que olvidar que la comercialización de la especie *Trachemys scripta* ya está prohibida en España por ser una especie exótica invasora.

1.2 ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS

La creciente expansión de especies exóticas invasoras (EEI) a nivel mundial y su consecuente destrucción del hábitat son los dos problemas más graves para la conservación de la biodiversidad en el mundo (Capdevilla-Argüelles y cols, 2006).

Una EEI es aquella que se introduce o establece en un ecosistema o hábitat natural o seminatural, y que es un agente de cambio y amenaza para la diversidad biológica nativa, ya sea por su comportamiento invasor, o por el riesgo de contaminación genética (Capdevilla-Argüelles y cols, 2006).

Entre las especies que ya se detectan frecuentemente en el medio natural, los parques y los jardines públicos de Andalucía, se incluyen los galápagos exóticos. La especie más abundante, a la que debemos calificar como especie invasora, es el galápago de orejas rojas o galápago de Florida (*Trachemys scripta elegans*), de la que se ha demostrado la existencia de poblaciones naturalizadas en algunos medios acuáticos andaluces (Hidalgo-Vila y cols, 2009).

El galápago *Trachemys scripta* viene del sudeste de EEUU y se ha extendido como animal de compañía y liberado por el hombre por el mundo, llegando hasta el Sureste Asiático, África, Europa y zonas de EEUU en las que no estaba presente (Chitty y Raftery, 2013a). España no ha sido una excepción, se pueden encontrar en todo tipo de masas de agua dulce como ríos, lagunas o estanques urbanos como resultado de la liberación de estos animales cuando ya no se quieren como mascotas o porque se han escapado de los jardines donde estaban (Hidalgo-Vila y cols, 2009).

El galápago de Florida comparte hábitat con dos especies de galápagos autóctonas: el galápago europeo (*Emys orbicularis*) y el galápago leproso (*Mauremys leprosa*). En áreas del sur de España se detectaron animales de *T.s. elegans* que tenían un escaso período de hibernación y colonizaron más temprano las zonas óptimas para búsqueda de alimento o asoleamiento, cuando los individuos de *M. leprosa* y *E. orbicularis* aún se encontraban inactivos debido a dicha hibernación. Esto le confiere a esta especie exótica una ventaja competitiva frente a las autóctonas. Además, esta convivencia entre galápagos autóctonos y alóctonos posibilita el intercambio de parásitos y microorganismos a los que los galápagos de Europa son más sensibles (Capdevilla-Argüelles y cols, 2006; Martínez-Silvestre y cols, 2015).

1.3 DESCRIPCIÓN DE *TRACHEMYS SCRIPTA*

Los quelonios que utilizaremos en este estudio son galápagos de la especie *Trachemys scripta*, que pertenecen a la familia *emydidae* del suborden *Cryptodira* anteriormente descrito.

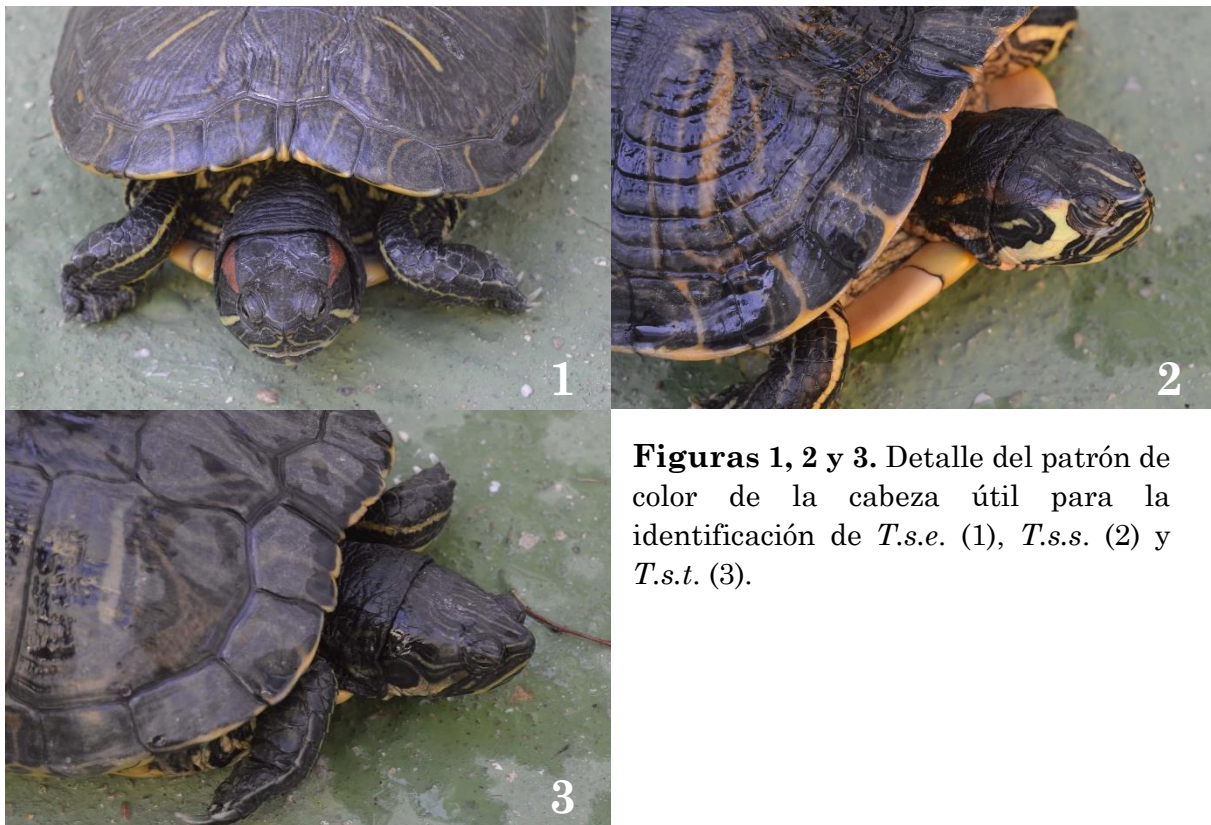
Dentro de esta especie, en el PZMC hemos seleccionado animales de las tres subespecies que la componen, que son *T.s. scripta*, *T.s. elegans* y *T.s. troostii*, además de un híbrido entre *T.s. scripta* y *T.s. elegans*.

Las tortugas de la especie *Trachemys scripta* son galápagos de mediano tamaño, que se caracterizan por la presencia de una mancha prominente a cada lado de la cabeza, cuyo colorido difiere según las subespecies (roja en *T.s. elegans*, y amarilla en *T.s. scripta* y en *T.s. troostii*) (Martínez-Silvestre y cols, 2015). Estos quelonios tienen el caparazón un poco aplastado, la parte superior de las escamas inframarginales presenta manchas redondas negras, y la parte inferior también presenta manchas pero de menor tamaño. El peto es amarillo y en algunos casos con manchas negras (Díaz-Paniagua y cols, 2005).

La longitud del caparazón puede alcanzar 30 cm en hembras y 23 cm en machos, siendo las hembras de mayor tamaño que los machos y presentando los machos uñas más largas que las hembras (Martínez-Silvestre y cols, 2015). El patrón de color de su cabeza y de su espaldar sirve para su identificación:

- *Trachemys scripta elegans*. La cabeza y el cuello son de color verde con diseño de líneas amarillas longitudinales, la presencia de una banda roja o naranja que recorre cada lado de la cabeza a partir del ojo y por encima del tímpano es característica de esta subespecie. Las escamas del espaldar son de color marrón o verdoso y tienen líneas negras y amarillas (Díaz-Paniagua y cols, 2005) (Figura 1).
- *Trachemys scripta scripta*. La cabeza y el cuello son negros con rayas gruesas amarillas. En este caso la cabeza presenta una amplia mancha amarilla que se extiende por detrás del ojo y se prolonga hasta el cuello. El color de las escamas del espaldar es marrón con grandes manchas amarillas (Díaz-Paniagua y cols, 2005) (Figura 2).

- Híbrido entre *T.s. elegans* y *T.s. scripta*. El color de cabeza y el cuello puede variar entre las tonalidades de verde oliva y negro, con una mezcla del patrón de líneas y manchas amarillas propio de las dos subespecies. En la cabeza tiene una pequeña mancha rojiza o anaranjada por encima del tímpano, y una gran línea amarilla detrás de los ojos, a modo de antifaz. En el espaldar las escamas son de color marrón o verdoso oscuro con líneas negras y amarillas (Díaz-Paniagua y cols, 2005).
- *Trachemys scripta troostii*. La cabeza y el cuello son de color verde con varias bandas postorbitales de color amarillo, que discurren de forma paralela desde el ojo hasta la base del cuello. Tiene bandas amarillas en cada escama pleural (Martínez-Silvestre y cols, 2015) (Figura 3).



Figuras 1, 2 y 3. Detalle del patrón de color de la cabeza útil para la identificación de *T.s.e.* (1), *T.s.s.* (2) y *T.s.t.* (3).

1.4 GLUCEMIA

1.4.1 Determinación de la glucemia

Durante décadas, se ha extraído sangre de personas y animales y ha sido analizada para obtener información sobre la fisiología del organismo, la salud y la condición. Para ese análisis, los analizadores químicos automáticos de los laboratorios son los métodos de referencia por excelencia. Con ellos se determinan los valores de los compuestos sanguíneos, entre los que se encuentra la concentración de glucosa en sangre (Stein y Greco, 2002; Stoot y cols, 2014).

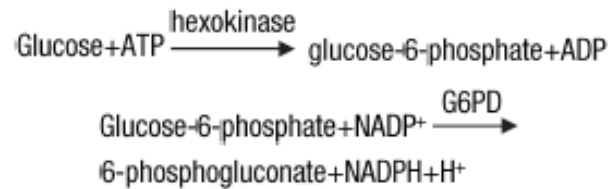
Como complemento a los equipos laboratoriales, en los últimos 20 años se han desarrollado diversos tipos de aparatos de medición portátiles que dan la opción de realizar mediciones de ciertos parámetros *in situ* durante el examen del paciente. Este tipo de dispositivos se denominan genéricamente como *point-of-care tests* (POC), y aunque este término puede traducirse como pruebas en el punto de atención, usaremos las siglas en inglés por ser las más empleadas. Posiblemente, la mayor aplicación de los POC en medicina humana y veterinaria sean los medidores portátiles de glucosa en sangre, los glucómetros, debido a la incidencia de diabetes mellitus en personas y pequeños animales como el perro y el gato (Stoot y cols. 2014; Hwang y cols, 2015).

Los glucómetros son un medio práctico, cómodo, rentable y rápido para evaluar la concentración de glucosa en sangre del paciente (Gerber y Freeman, 2016). Presentan claras ventajas frente a los métodos de referencia porque sólo necesitan una pequeña gota de sangre y en pocos segundos se obtiene el resultado, son fáciles de usar y no necesitan personal de laboratorio cualificado para su uso. Pero también tienen las desventajas de proporcionar mayor tasa de error debido a condiciones ambientales de humedad y temperatura o por influencia del hematocrito (Stein y Greco, 2002; Stoot y cols, 2014).

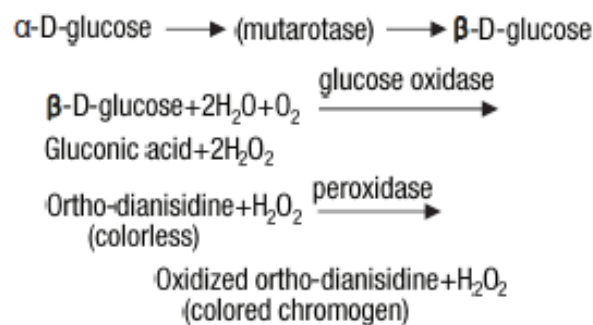
En general, los analizadores químicos automáticos usan los métodos de hexoquinasa o glucosa oxidasa en muestras de plasma con heparina para determinar la concentración de glucosa en sangre venosa de animales (Stein y Greco, 2002). Mientras que en los glucómetros es más habitual el uso de métodos con glucosa deshidrogenasa (Gerber y Freeman, 2016). Estos métodos difieren en

la enzima que interactúa con la glucosa y por tanto en las reacciones enzimáticas que producen (Figura 4) (Hwang y cols, 2015).

1) Hexokinase methods



2) Glucose oxidase methods



3) Modified glucose oxidase methods

4) Glucose dehydrognase methods

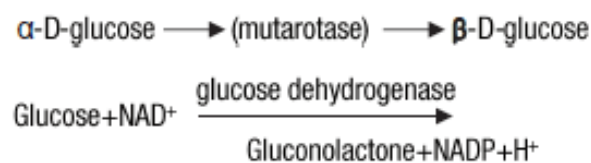


Figura 4. Métodos usados para medir la glucosa en sangre (Hwang y cols, 2015).

1.4.1.1 Método de la hexoquinasa

El principio del método de la hexoquinasa se basa en la capacidad de esta enzima para generar glucosa-6-fosfato a partir de adenosin trifostato (ATP) y glucosa, que se transforma en 6-fosfoglutamato por la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En esta segunda reacción también se transforma la nicotinamida adenin dinucleótido fosfato (NADP⁺) a su forma reducida (NADPH) que es capaz de absorber la luz a una longitud de onda de 340 nm (Hwang y cols, 2015).

Este método mide la glucosa en sangre a través del cambio en la absorbancia, basándose en el incremento del nivel de NADPH (Hwang y cols, 2015).

1.4.1.2 Método de la glucosa oxidasa

En el método de la glucosa oxidasa se produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno a partir de la glucosa por acción de la enzima en cuestión. Después una molécula productora de pigmento (orto-dianisidina) reacciona con el peróxido de hidrógeno en presencia de una peroxidasa y como resultado se oxigena dicha molécula generando color, que a su vez refleja el nivel de glucosa en sangre (Hwang y cols, 2015).

1.4.1.3 Método de la glucosa deshidrogenasa.

En este método la enzima oxida a la glucosa transformándola en gluconolactona y además se producen electrones por el cambio de NAD^+ a NADP (Hwang y cols, 2015).

Los glucómetros que usan este método tienen el reactivo en el electrodo de la tira, de tal manera que cuando la muestra se coloca en la punta de dicha tira se produce la reacción y se generan electrones, produciendo una corriente eléctrica proporcional a la glucosa en sangre, que es medida por el glucómetro y transformada en el valor numérico que nos proporciona en la pantalla (Contour® XT, manual del usuario).

1.4.2 Interés clínico de la glucemia

Conocer el valor de la glucosa en sangre es interesante tanto en situaciones donde dichos valores de glucemia pueden ser fisiológicos como en casos patológicos donde la hiperglucemia o hipoglucemia podrían ayudar a la hora de orientar el diagnóstico (Chitty y Raftery, 2013b).

La concentración de la glucosa en sangre en reptiles varía entre diferentes especies, actividad reproductiva, estado nutricional o por las condiciones ambientales. Por ejemplo, un incremento de la temperatura provocaría una hipoglucemia en tortugas acuáticas pero una hiperglucemia en caimanes (Campbell, 2006); o el estrés inducido por el manejo, que provoca hipoglucemia en cocodrilos pero hiperglucemia en la mayoría del resto de reptiles, incluyendo a las quelonios (Fyre, 1991a).

1.4.2.1 Hiperglucemia en quelonios

Es normal encontrar hiperglucemia en quelonios en los meses después de la hibernación (abril-junio), en hembras en la época de puesta de huevos, o incluso de manera transitoria debido al estrés por manejo, como antes mencionamos (Wilkinson, 2004; Stahl, 2006; Chitty y Raftery, 2013c).

En casos donde repetidos análisis de glucosa en sangre revelen la persistencia de hiperglucemia en ausencia de estrés, se debe de considerar el diagnóstico de diabetes mellitus, teniendo en cuenta que es una enfermedad poco común. Se han reportado dos casos de diabetes mellitus en quelonios marinos y uno en un quelonio terrestre afectado con pancreatitis granulomatosa (Fyre, 1991a).

Las lesiones patológicas características de la diabetes mellitus están relacionadas con la deficiencia de insulina pancreática, donde los islotes de Langerhans podrían atrofiarse o desaparecer, presentando sus células cambios degenerativos hidrópicos, deposiciones amiloides o hialinización celular (Fyre F, 1991b).

1.4.2.2 Hipoglucemia en quelonios

Los quelonios con hipoglucemia suelen presentar signos clínicos no específicos, como son la anorexia, la pérdida de peso, letargia, o una severa depresión. También desarrollan signos clínicos neurológicos como temblores musculares, convulsiones, ataxia, incoordinación y midriasis (McArthur, 2004; Chitty y Raftery, 2013c).

Además, la hipoglucemia es común en casos de inanición (sobre todo en animales de edad avanzada) o malnutrición, enfermedad hepatobiliar severa, septicemia o incluso en tortugas con enfermedades crónicas (Donoghue, 2006; Campbell, 2006; Chitty y Raftery, 2013c).

1.5 EXTRACCIÓN DE SANGRE EN QUELONIOS

Debido a las limitaciones que el caparazón de los quelonios impone durante la exploración física de las tortugas y a que los signos clínicos que presentan a menudo son muy inespecíficos, la extracción de muestra sanguínea está frecuentemente indicada en estos animales (Chitty y Raftery, 2013b).

Para obtener muestras de calidad, se necesita una buena técnica de extracción de sangre y una adecuada elección del lugar de extracción. El objetivo es obtener muestras que nos permitan conseguir resultados fiables en su posterior análisis (Chitty y Raftery, 2013b).

La venopunción en galápagos se puede realizar en las venas yugular externa y coccígea dorsal, en el seno subcaparacial o en el plexo venoso braquial. De estos sitios el más indicado es la vena yugular externa, porque el resto de vasos sanguíneos generalmente van acompañados de vasos linfáticos que pueden alterar los valores sanguíneos por la dilución de la muestra de sangre con linfa (Campbell, 2006; Chitty y Raftery, 2013b) (Figura 5).



Figura 5. Abordaje de la vena yugular externa derecha en *T.s.s.*

Se debe acceder por el lado derecho, ya que la vena yugular derecha es más grande que la izquierda, extender el cuello y la cabeza y hacer presión en el cuello, en la zona de entrada al caparazón, para ingurgitar la vena. Una vez conseguida la cantidad deseada, hay que aplicar presión en el sitio de punción para prevenir la aparición de hematoma (Barrows y cols, 2004; Hernández-Divers, 2006).

2. OBJETIVOS

1. Validar dos glucómetros portátiles, de uso frecuente en medicina veterinaria, para la determinación de glucemia en sangre venosa de galápagos *Trachemys sp* estableciendo su precisión y exactitud respecto a dos métodos de referencia.
2. Establecer cuál de estos glucómetros es el más aconsejable para su uso en quelonios.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES Y HÁBITATS

Las muestras sanguíneas con las que se ha trabajado en este estudio fueron extraídas de 10 galápagos de la especie *Trachemys scripta* procedentes del Parque Zoológico Municipal de Córdoba.

Este estudio se realizó durante los meses de enero y febrero, todos los quelonios eran hembras adultas clínicamente sanas con un rango de pesos desde 1.452g hasta 1.889g, siendo la media de 1.641g (Tabla 1).

GALÁPAGOS	SUBESPECIE	MICROCHIP	PESO (g)
Galápago 1	<i>T. s. scripta</i>	900 176000111178	1.593
Galápago 2	<i>T. s. troostii</i>	938 000000770284	1.688
Galápago 3	<i>T. s. scripta</i>	900 176000111195	1.769
Galápago 4	<i>T. s. elegans</i>	938 000000770190	1.474
Galápago 5	híbrido de <i>T.s.s.</i> y <i>T.s.e.</i>	900 176000111175	1.889
Galápago 6	<i>T. s. scripta</i>	938 000000792644	1.465
Galápago 7	híbrido de <i>T.s.s.</i> y <i>T.s.e.</i>	938 000000789451	1.748
Galápago 8	<i>T. s. elegans</i>	938 000000790099	1.452
Galápago 9	<i>T. s. troostii</i>	938 000000770211	1.520
Galápago 10	<i>T. s. scripta</i>	900 176000082994	1.835

Tabla 1. Relación de individuos empleados.

Su hábitat en el PZMC es un estanque de agua dulce de poca profundidad con vegetación semiacuática, y salientes de tierra y roca dispuestos para su asoleamiento (Figura 6). Los galápagos fueron seleccionados por su tamaño y sexo, llevándose a una instalación temporal (4 piscinas de 50 litros de capacidad cada uno y una amplia zona al sol con césped artificial y piedras). Diariamente se renovó el agua y, dado la estación del año en que se encuentran (letargo invernal), no fueron alimentados (Figura 7).



Figuras 6 y 7. Hábitat natural en el PZMC (5) e instalación temporal (6).

Los quelonios del estudio estuvieron en esta instalación temporal desde 20 días antes de la toma de muestras para aclimatarlas previamente a su manejo y anestesia.

Se identificaron con microchip, leyéndoselo o implantándose al que no lo tuviese, y se pesaron (Tabla 1). La Sociedad Zoológica Veterinaria Británica (The British Veterinary Zoological Society) del Reino Unido recomienda que la implantación del microchip en quelonios sea en el miembro posterior izquierdo, subcutáneo y justo debajo del caparazón (Chitty y Raftery, 2013b).

3.2 EQUIPOS DE MEDICIÓN DE LA GLUCEMIA

3.2.1 Métodos de referencia

En este trabajo hemos empleado y comparado dos analizadores bioquímicos automatizados como métodos de referencia para la determinación de la glucemia y validación de los glucómetros portátiles:

- A15 de BioSystems (Barcelona, España) (Figura 8).
- Catalyst One® de Idexx (Barcelona, España) (Figura 9).

Ambos funcionan con el método de la glucosa oxidasa para la medición de la glucosa en sangre, empleando ambos una muestra de plasma o suero sanguíneo (A15, manual del usuario; Catalyst One®, manual del usuario).



Figuras 8 y 9. Métodos de referencia empleados: A15 (7) y Catalyst One® (8).

3.2.2 Glucómetros portátiles

Los glucómetros a validar, son de medicina humana y ambos han sido validados o empleados en otras especies de animales en estudios previos (Figura 10):

- Accu-Chek® Aviva de Roche (Roche Farma, Madrid, España).
- Contour® XT de Bayer (Bayer Hispania S.L., Barcelona, España).

Estos dos glucómetros necesitan una gota de sangre entera de 0,6 μ l (puede ser venosa, arterial o capilar), y en 5 segundos calculan la cantidad de glucosa en un rango de 10 a 600 mg/ml de sangre usando el método de la glucosa deshidrogenasa (Accu-Chek® Aviva, manual del usuario; Contour® XT, manual del usuario).



Figura 10. Glucómetros portátiles empleados: Accu-Chek® (derecha) y Contour® (izquierda).

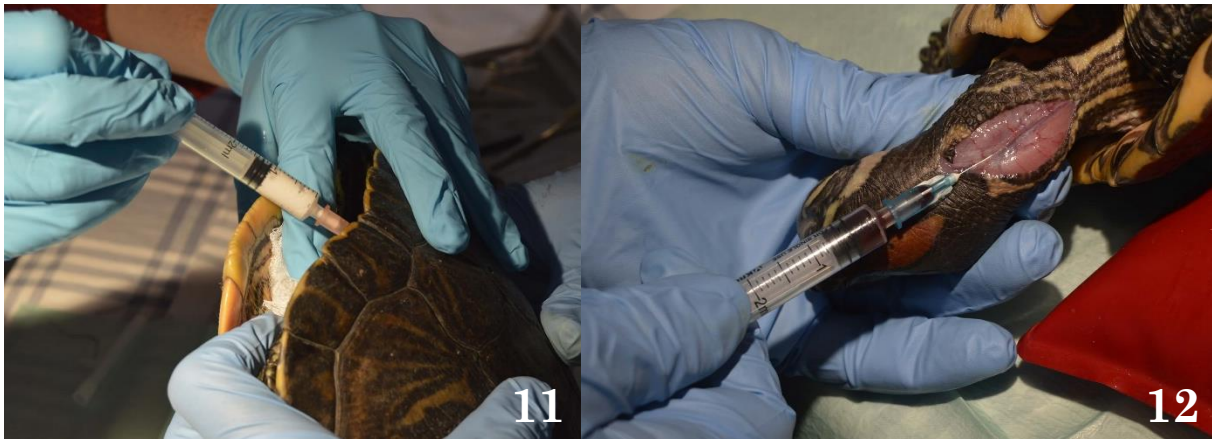
3.3 MUESTRAS DE SANGRE

La sangre con la que trabajamos fue sangre venosa, sacada de la vena yugular externa derecha de los galápagos. A fin de obtener muestras de la máxima calidad posible, sin alteraciones de hemolisis o coagulación que pudieran alterar los resultados, así como minimizar el estrés de los animales, se optó por un manejo y extracción sanguínea bajo anestesia e incisión cutánea para acceder y visualizar de vena yugular derecha.

Previamente, dos horas antes de la manipulación, se llevaron a los individuos objetos del estudio a un cuarto con temperatura ambiente a 25° C. Se siguió el siguiente procedimiento para la obtención de las muestras sanguíneas:

- La anestesia se realizó con propofol (Propovet®), bien en el seno subcaparacial o en la vena coccígea dorsal, utilizando una dosis/efecto de 10-15 mg/kg (Schumacher y Yelen, 2006) y esperando unos minutos hasta observar la ausencia de reflejos en el animal. Algunos individuos requirieron alguna dosis de repetición (Figura 11).
- Posicionamos al animal en decúbito lateral izquierdo, le estiramos el cuello y cabeza, desinfectamos la zona y procedemos a realizar una incisión cutánea de dos centímetros, caudal al tímpano, y a lo largo del cuello. Una vez visualizada la vena yugular se procede a la extracción de la muestra sanguínea en volúmenes adecuado de sangre (Figura 12).
- Obtuvimos 1 ml que se depositó inmediatamente en un tubo con heparina de litio, ya que es un anticoagulante que no afecta a la medición de glucosa. En quelonios sanos se puede sacar hasta 3 ml de sangre (Chitty y Raftery, 2013b).
- Cerramos la herida con puntos simples y dejamos al animal despertar en una zona segura.

De la sangre obtenida de cada galápagos (aproximadamente 1 ml de cada una), se tomaron muestras en dos capilares de microhematocrito con una longitud de 70 mm y un diámetro interno de 1,5 mm. Uno de los capilares se empleó para las mediciones con los glucómetros y el otro para la determinación del hematocrito. El resto de la sangre se usó para medir la glucemia por los métodos de referencia y para calcular las proteínas totales.



Figuras 11 y 12. Detalle de la administración del agente anestésico en el seno subcaparacial (10) y de la extracción de sangre en la vena yugular externa derecha (11).

3.4 DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

3.4.1 Métodos de referencia

En el laboratorio determinamos la glucemia en las 10 muestras plasmáticas, correspondientes a cada uno de los galápagos muestreados, por los métodos de referencia ya mencionados: A15 y Catalyst One®. En uno de los galápagos se obtuvieron dos muestras, la muestra adicional se utilizó para calcular la precisión intraensayo del Catalyst One®. Estas muestras plasmáticas fueron obtenidas por el siguiente procedimiento:

- Centrifugamos cada muestra sanguínea lo antes posible a 2.500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma.
- Pipeteamos el plasma y lo trasladamos a un tubo de Eppendorf de 1,8 ml (Figura 13).
- Refrigeramos inmediatamente el plasma hasta su análisis.
- Transporte al laboratorio y análisis de las muestras con ambos métodos de referencia inmediatamente después de finalizar las mediciones con los glucómetros portátiles.



Figura 13. Pipeteo del plasma después de la centrifugación.

3.4.2 Glucómetros portátiles

Las mediciones de glucosa con ambos glucómetros utilizados (Accu-Chek® Aviva y Contour® XT) se realizaron inmediatamente después de la extracción sanguínea. Para ello establecimos las siguientes pautas:

- Ponemos en contacto la punta del capilar con la hendidura de la tira reactiva introducida en el glucómetro en posición horizontal.
- La muestra se absorbe por capilaridad y en 5 segundos el resultado aparece en la pantalla (Figura 14).
- Vamos alternando el orden del uso de los glucómetros entre la muestra de una tortuga y la siguiente.



Figura 14. Detalle de la absorción por capilaridad de gota de sangre.

En total se usaron 20 tiras reactivas de cada glucómetro, 10 para la medición de glucosa de cada galápago y otras 10 para establecer la precisión intraensayo de cada glucómetro, realizando 10 medidas repetidas en la misma muestra.

3.5 DETERMINACIÓN DEL HEMATOCRITO

Tras la centrifugación de los capilares con las muestras de sangre a 11.000 rpm durante 5 minutos se determinó el porcentaje de hematocrito en las muestras, para ello se utilizó una centrifugadora clínica (Nahita modelo 2824, Beriáin (Navarra), España).

3.6 DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

Las proteínas totales se determinaron por refractometría empleando un refractómetro clínico de mano específico para veterinaria (Schonfeld modelo ZGRC-200, Buenos Aires, Argentina).

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los cálculos estadísticos utilizados en este trabajo y que se especifican a continuación se realizaron mediante el software Prism 5.02 para Windows (GraphPad software, San Diego, California).

Las variables estudiadas fueron la glucemia, el hematocrito y las proteínas totales, para todas ellas se calcularon los estadísticos descriptivos de la muestra. Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov (KS) mediante la cual se puede saber si los valores de las variables tienen una distribución normal (de campana de Gauss o Gaussiana) o no. En función del resultado del test de KS, posteriormente se eligió una prueba estadística paramétrica o no paramétrica para la comparación de medias y para la determinación de la correlación entre los valores de glucemia obtenidos los dos métodos objetos de la comparación.

Como parámetros para la validación de los glucómetros portátiles se determinaron la precisión, entendida como la capacidad del glucómetro usado de realizar mediciones iguales entre sí de una misma muestra, y la exactitud, o capacidad del glucómetro a validar para medir el valor real de glucemia establecido por el método de referencia con el que se compara (Brito-Casillas y cols, 2014).

Para valorar la precisión de los glucómetros se calculó el cociente de variación de 10 medidas repetidas de la misma muestra en el mismo ensayo y efectuadas por el mismo operador (precisión intraensayo). No se determinó la precisión interensayos.

En la determinación de la exactitud primero se realizó un test de Friedman para la comparación del valor medio de glucemia obtenido por cada método, seguido del post-test de Dunn para comparar todas las posibles parejas de columnas entre sí. A continuación, se determinó la correlación (la existencia de una asociación o no, y cómo de significativa) con los métodos de referencia mediante el test de Spearman (si los valores de alguno de los dos métodos en comparación, o los dos, no siguen una distribución normal) o el test de Pearson (si los valores de los dos métodos en comparación siguen una distribución normal).

Finalmente se representaron las diferencias entre los valores de glucemia obtenidos mediante cada glucómetro respecto a las técnicas de referencia mediante gráficos de Bland-Altman. Para la construcción de los gráficos se siguió la norma ISO 15197: 2013 utilizada como estándar internacional en la evaluación de la exactitud y precisión para la determinación de glucómetros portátiles en sangre humana. Esta norma establece como aceptables diferencias en las concentraciones de glucosa inferiores a 15 mg/ml para muestras con una glucemia inferior a 100 mg/ml (Brito-Casillas y cols, 2014).

El sistema Catalyst One® se usó como método de referencia para la validación de los glucómetros pero a su vez también se comparó con el autoanalizador A15 al ser el sistema Catalyst One® un equipo que acaba de comercializarse y de reciente adquisición.

Por último, se determinó también la correlación de los valores de glucemia cada uno de los glucómetros con los valores de las variables del hematocrito y de las proteínas totales para valorar si podía haber influencia de alguno de estas dos variables en la medición de glucemia por parte de los glucómetros.

Para la detección de valores sesgados o fuera de rango (*outliers*) se realizó el test de Grubbs (<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>) sobre los valores de glucemia obtenidos por cada método.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de sangre en la vena yugular de los animales fue realizada con cierta dificultad, debido a su pequeño calibre y la rapidez con la que la vena se colapsaba al realizar el vacío con la jeringa. A causa de la baja frecuencia cardíaca de estos animales era necesario esperar unos segundos para que el vaso volviera a llenarse de sangre. A pesar de ello, en todos los galápagos se tomó una cantidad suficiente de sangre, sin problemas de coagulación ni de hemólisis.

La utilización de capilares de hematocrito permitió aplicar con facilidad una pequeña gota de sangre en el área de lectura de cada glucómetro resultando ser un método más práctico que la aplicación directa empleando la jeringa al ser el área de lectura estrecha, especialmente en el glucómetro Contour® XT.

Todo el proceso de obtención de las muestras se realizó sin incidentes y no hubo que repetir la extracción en ninguno de los galápagos. Los cuales se recuperaron sin ninguna complicación ni efecto secundario, sus heridas cicatrizaron y se retiraron los puntos antes de devolverlas a su estanque.

Las mediciones de glucemia con los glucómetros se realizaron justo después de obtener las muestras, los capilares de hematocrito se sellaron inmediatamente y tanto los capilares como el plasma obtenido por centrifugación se refrigeraron en menos de 15 minutos tras la extracción sanguínea.

Todas las muestras se tomaron el mismo día por la mañana y, una vez que se procesó la muestra del último animal, nos desplazamos al laboratorio del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad de Córdoba, donde se determinaron los valores de glucemia mediante los métodos de referencia en todas las muestras de plasma. También se midieron los valores de hematocrito y proteínas totales. Las muestras de plasma sobrantes fueron posteriormente congeladas.

El test de Grubbs detectó como sesgado o fuera de rango el valor (*outlier*) de glucemia obtenido del galápagos número 8 en el método Catalyst One® y hubo que repetir la determinación a partir del plasma congelado. La segunda determinación obtuvo un resultado similar al otro método de referencia. Este error tuvo que ser de origen pre-analítico por una mal pipeteo de la muestra; el equipo incluye una

pipeta especial que toma una muestra de 300 μ l y es posible que en el primer análisis el volumen pipeteado fuese inferior.

Los resultados obtenidos de las mediciones de glucemia de las 4 pruebas, del hematocrito y de las proteínas totales se encuentran recogidos en la Tabla 2.

Galápagos	A15 (mg/dl)	Catalyst® (mg/dl)	Accu-Chek® (mg/dl)	Contour® (mg/dl)	Hto (%)	PT (g/dl)
1	68	67	40	29	24	6,5
2	72	74	68	54	22	5,4
3	57	51	46	35	20	4,6
4	86	94	68	51	25	5,4
5	51	44	43	36	18	4,2
6	61	61	44	32	19	6,3
7	69	75	59	51	27	4,5
8	119	118	93	75	32	6
9	64	70	54	41	22	6,8
10	118	130	93	79	25	5,6

Tabla 2. Mediciones de glucemia en sangre venosa obtenidas por los 4 métodos ensayados, del hematocrito (Hto) y las proteínas totales (PT).

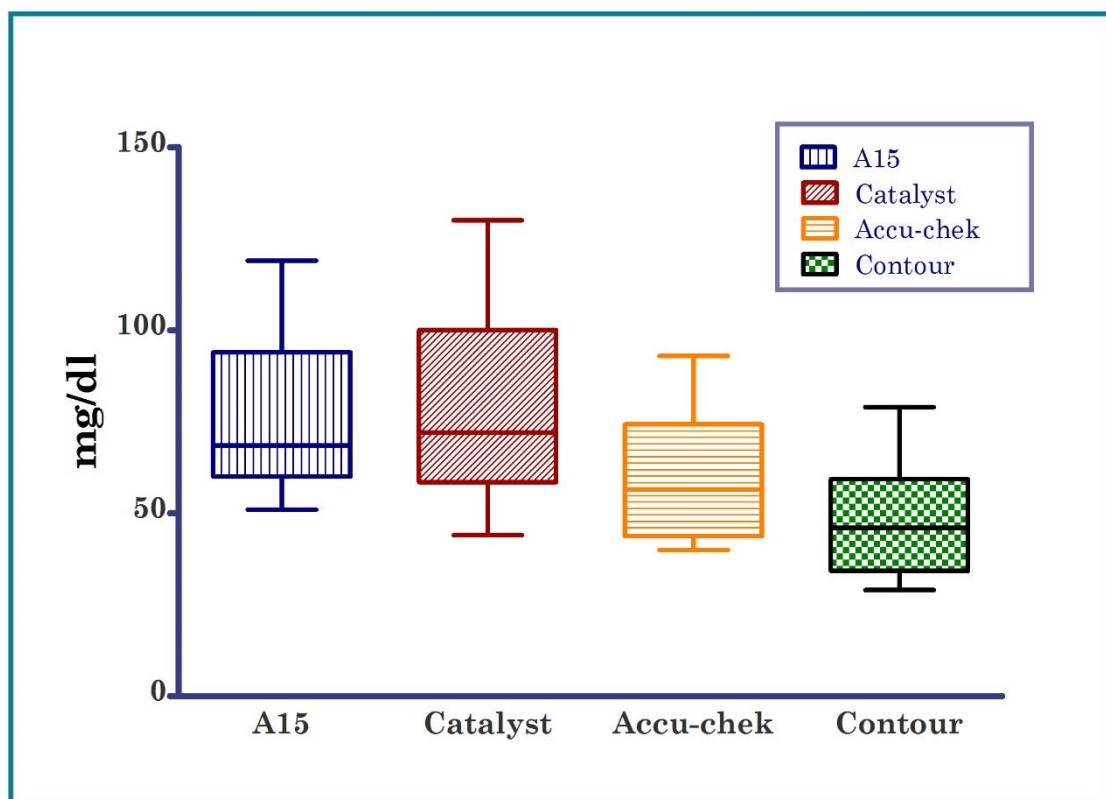
4.1 ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

Al calcular la estadística descriptiva, observamos que los cuatro métodos realizaron mediciones dentro del rango de normoglucesmia en *Trachemys scripta elegans*, siendo éste de 20-113 mg/dl (Chitty y cols, 2013d). Y siendo las medias de las mediciones del A15, Catalyst®, Accu-Chek® y Contour® de $76,5 \pm 24,02$ mg/dl, $78,4 \pm 27,77$ mg/dl, $60,8 \pm 19,66$ mg/dl y $48,30 \pm 17,39$ mg/dl respectivamente (Tabla 3).

Ambos métodos de referencia presentan una media de los valores de glucemia muy parecidas. Las mediciones del Catalyst® son las que tienen una media más elevada de los cuatro métodos, pero también tienen una mayor desviación estándar (SD) debido a que presentan una mayor dispersión de las muestras, la glucemia mínima fue de 44 mg/dl y la máxima de 130 mg/dl, lo que significa una diferencia entre animales de 86 mg/dl de glucosa. La amplitud fue menor para los glucómetros por su tendencia a registrar valores más bajos de glucemia en comparación con los métodos de referencia. En general, el glucómetro Contour® es el que obtuvo valores más bajos (Gráfica 1).

	A15 (mg/dl)	Catalyst® (mg/dl)	Accu- Chek® (mg/dl)	Contour® (mg/dl)	Hto (%)	PT (g/dl)
Número de valores	10	10	10	10	10	10
Mínimo	51,00	44,00	40,00	29,00	18,00	4,20
Mediana (percentil 50)	68,50	72,00	56,50	46,00	23,00	5,50
Máximo	119,0	130,0	93,00	79,00	32,00	6,8
Media	76,50	78,40	60,80	48,30	23,40	5,53
Desviación estándar	24,02	27,77	19,66	17,39	4,169	0,89
Error estándar	7,597	8,78	6,216	5,500	1,318	0,281
Límite inferior (IC de la media del 95%)	59,31	55,26	46,74	35,86	20,42	4,90
Límite superior (IC de la media del 95%)	93,69	90,14	74,86	60,74	26,38	6,17
Test de normalidad KS						
Valor de P	0,032	0,800	> 0,10	> 0,10	> 0,10	>0,10
¿P ≥ α? (α = 0,05)	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí

Tabla 3. Estadísticos descriptivos de los valores de glucemia en sangre venosa obtenidos por los 4 métodos ensayados, del hematocrito (Hto) y las proteínas totales (PT). KS: test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov.



Gráfica 1. Diagrama del tipo cajón y patas (*box and whiskers*) de los 4 métodos de determinación de glucemia ensayados. La línea central se corresponde con la mediana o percentil 50 y las patas corresponden a los valores mínimo y máximo.

En el caso del hematocrito, se consiguió una media de 23,4%, con un mínimo de 18% y un máximo de 32%, estos resultados son algo más bajos del rango normal para *T.s.e.*, que es de 25-33% (Chitty y cols, 2013d).

Respecto a las proteínas totales, sólo hacer la observación de que los valores (la media fue de $5,53 \pm 0,89$ g/dl) estaban dentro del rango normal para *T.s.e.*, siendo éste de 2,8-6,6 g/dl (Chitty y cols, 2013d). Los niveles de proteínas totales no influyen sobre la determinación de la glucemia ni en sangre completa ni en plasma. Sin embargo, una disminución en la concentración de proteínas plasmáticas puede ser indicativa de hemodilución por lo que se consideró importante su determinación.

En el test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov se determinó que sólo los valores de glucemia determinados con el A15 no siguen una distribución normal ($P=0,032$), mientras que los valores de los otros 3 métodos, los del hematocrito y las proteínas totales sí lo hacían ($P \geq 0,05$).

4.2 PRECISIÓN

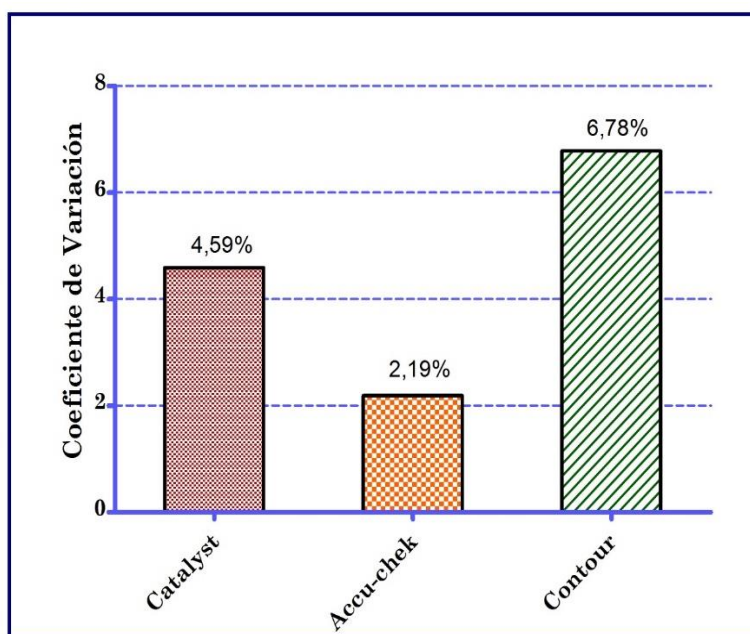
En el cálculo de la precisión se obtuvieron unos valores máximos y mínimos de glucemia de 86 mg/dl y 75 mg/ml, respectivamente, con el sistema Catalyst®; de 71 mg/dl y 66 mg/dl con el glucómetro Accu-Chek®; y de 51 mg/ml y 43 mg/ml con el glucómetro Contour® (Tabla 4).

Catalyst® (mg/dl)	Accu-Chek® (mg/dl)	Contour® (mg/dl)
75	67	51
75	68	50
77	71	49
79	70	49
81	68	49
83	68	45
82	67	44
82	68	44
83	67	43
86	66	43

Tabla 4. Mediciones repetidas realizadas sobre la misma muestra con el Catalyst® y los 2 glucómetros.

Estas variaciones de glucemia, en medidas repetidas sobre la misma muestra, proporcionaron un coeficiente de variación (CV) intraensayo del 4,59% para el sistema Catalyst®, del 2,19% para el glucómetro Accu-Chek® y del 6,78% para el glucómetro Contour® (Gráfica 2). Un CV < 5% es aceptable en la precisión de los equipos de medición de glucosa (Brito-Casillas y cols, 2014). Por lo que el glucómetro Contour® sería el único que superaría dicho límite. Además, hay que tener en cuenta que estos valores se obtuvieron en un mismo ensayo y por un mismo operador, y es lógico suponer que los CV interensayo serán más elevados.

Por tanto, solamente el glucómetro Accu-Chek® podría tener una precisión aceptable, considerando que en quelonios las mediciones de glucemia no tienen como objetivo calcular la dosificación de insulina. En personas diabéticas se considera como aceptable un CV entre el 1-2%, pues una impresión mayor resultaría en la administración de dosis inapropiadas de insulina (Gerber y Freeman, 2016).



Gráfica 2. Comparación de los coeficientes de variación de la precisión del Catalyst®, Accu-Chek® y Contour®.

Las mediciones con los glucómetros se realizaron primero con el Accu-chek® y luego con el Contour®, se tardó prácticamente el mismo tiempo, quizás un poco más con el segundo glucómetro porque era algo más dificultoso la absorción de la sangre por capilaridad debido a que la ranura era más estrecha. No consideramos que esto pudiera influir ya que estamos hablando de un intervalo de tiempo muy breve.

En personas, se ha determinado que si no se separa el plasma o el suero de los glóbulos rojos, la concentración de glucosa en la muestra disminuye un 5-7% cada hora, mientras que en aves, las muestras obtenidas con heparina son estables hasta 4 horas después de su obtención (Gerber y Freeman, 2016). No hemos encontrado referencias específicas para quelonios, pero aunque las mediciones sucesivas del glucómetro Contour® sugieren un consumo rápido de la glucosa, no creemos que esta sea la causa, pues el tiempo empleado para realizar las 10 mediciones con ambos glucómetros no fue superior a 15 minutos.

4.3 EXACTITUD

El estudio y la comparación de la exactitud entre los cuatro métodos se basaron en una prueba de comparación de medias, determinación de la correlación y construcción de diagramas de Bland-Altman para valorar el grado de acuerdo entre los glucómetros y los métodos de referencia.

4.3.1 Comparación de valores medios de glucemia

Al realizar el test de Friedman para la comparación de las medias con un grado de confianza del 95%, se obtuvieron diferencias muy significativas ($P < 0,0001$).

Para averiguar entre cuales de los métodos había una diferencia significativa de sus medias, se realizó el post-test de comparación múltiple de Dunn (Tabla 5).

Test de Dunn	Valor de P	¿Significativo ($P < 0,05$)?
A15 vs Catalyst®	> 0,05	No
A15 vs Accu-Chek®	> 0,05	No
A15 vs Contour®	0,001	Sí
Catalyst® vs Accu-Chek®	0,05	Sí
Catalyst vs Contour®	0,001	Sí
Accu-Chek® vs Contour®	> 0,05	No

Tabla 5. Test de comparaciones múltiples de Dunn comparando los valores de glucemia en los 4 métodos ensayados.

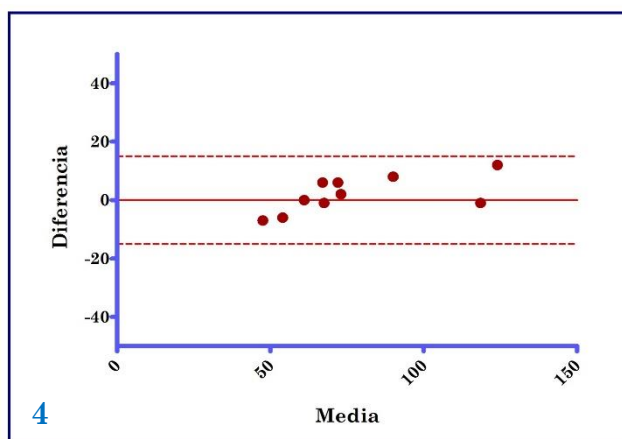
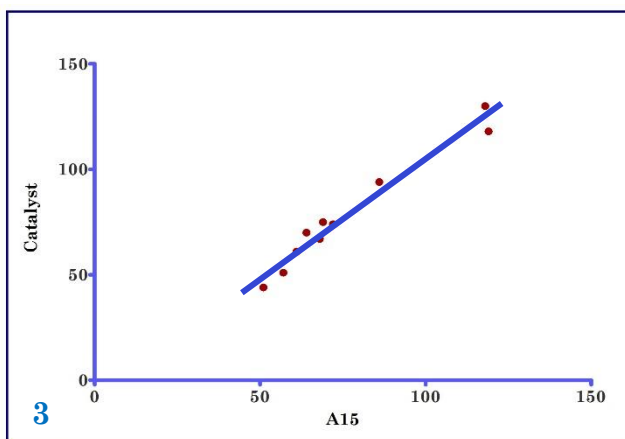
Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones medias de glucosa obtenidas por el Catalyst® y el glucómetro Accu-Chek®, aunque se encuentra justo en el límite ($P=0,05$), y diferencias muy significativas ($P= 0,001$) entre ambos métodos de referencia y el glucómetro Contour®.

La existencia de diferencias significativas indica que los valores de glucemia obtenidos por los glucómetros, especialmente en el caso del modelo Contour®, tienen un sesgo demasiado alto, superior a la variación de ± 15 mg/ml para concentraciones ≤ 100 mg/ml recomendada en perros (Brito-Casillas y cols, 2014) o del 10% establecido para personas diabéticas (Katsoulos y cols, 2011).

4.3.2 Correlación

Para comprobar en qué medida existe correlación entre los valores de los métodos de referencia y cada uno de los glucómetros, se realizó una prueba de correlación de Spearman (no paramétrica; correlación con el equipo A15) o de Pearson (paramétrica; correlación entre el resto de equipos). Aunque la correlación fue lógicamente significativa en todos los casos, el grado de correlación debe ser alto para que sea clínicamente aceptable. En este contexto, coeficientes de correlación inferiores a 0,9 se consideran bajos y entre 0,9 y 0,95 moderados (Domori y cols, 2014). La falta de correlación para la toma de decisiones clínicas, se representa gráficamente mediante el diagrama de Bland-Altman donde las abscisas (eje X) se corresponde con la media de los valores de glucemia obtenidos en una misma muestra por los dos métodos a comparar y el de ordenadas (eje Y) con la diferencia entre los dos métodos. Una vez definido el rango de diferencias aceptables (± 15 mg/ml en nuestro caso (norma ISO 15197: 2013), el gráfico permite apreciar la proporción de medidas tomadas del método a validar que tendrían una interpretación clínica igual a los valores del método de referencia.

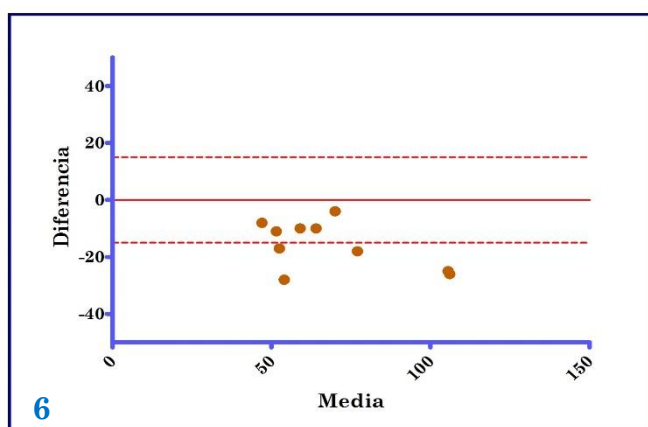
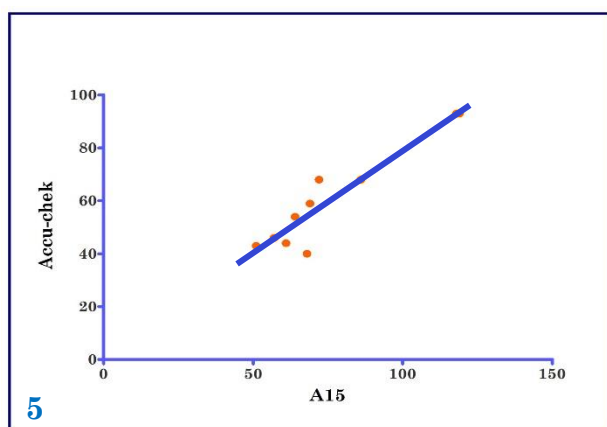
La prueba de correlación de Spearman entre ambos métodos de referencia muestra una asociación muy significativa ($P<0,0001$), con un coeficiente de correlación alto ($r=0,9636$) (Gráfica 3). En la gráfica de Bland-Altman (Gráfica 4), se aprecia como todos los valores de las diferencias respecto al método de referencia (analizador A15), están incluidos en la zona de concordancia clínica, al ser todas menores de 15 mg/ml. Este acuerdo del 100% permite concluir que ambos métodos ofrecen resultados comparables para muestras sin hiperglucemia.



Gráficas 3 y 4. Representación gráfica de la correlación lineal (3) y diagrama de Bland-Altman (4) entre los equipos A15 y Catalyst®.

La prueba de correlación de Spearman entre los valores obtenidos por el analizador A15 y el glucómetro Accu-Chek® determina que hay una asociación significativa ($P=0,002$) con un coeficiente de correlación bajo ($r=0,8598$) (Gráfica 5).

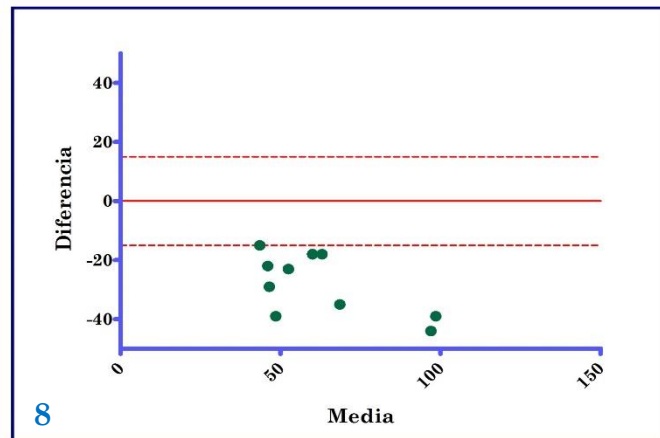
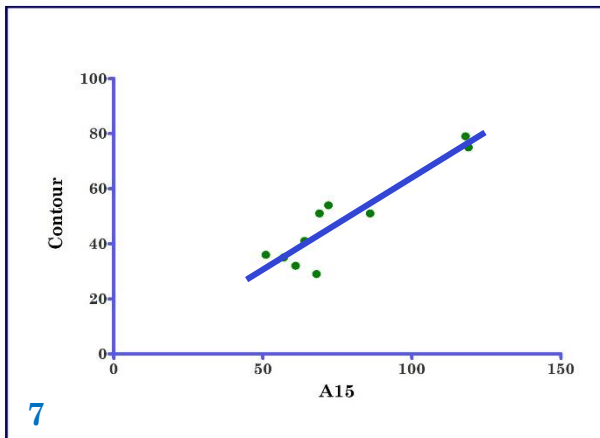
En la gráfica de Bland-Altman se aprecia que el 50% los valores de las diferencias entre las mediciones de la glucemia entre los equipos A15 y Accu-Chek® son mayores de 15 mg/ml (Gráfica 6).



Gráficas 5 y 6. Representación gráfica de la correlación lineal (5) y diagrama de Bland-Altman (6) entre los equipos A15 y Accu-Chek®.

En la comparación del analizador A15 con el glucómetro Contour® por la prueba de Spearman se obtuvo una correlación significativa ($P=0,009$) con un coeficiente de correlación muy bajo ($r=0,7964$) (Gráfica 7).

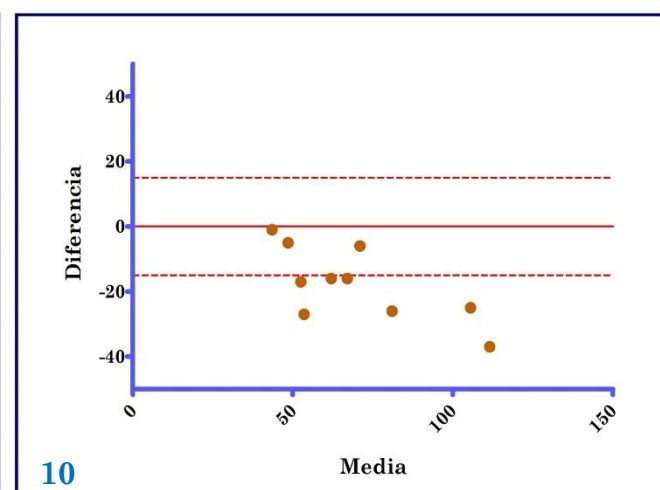
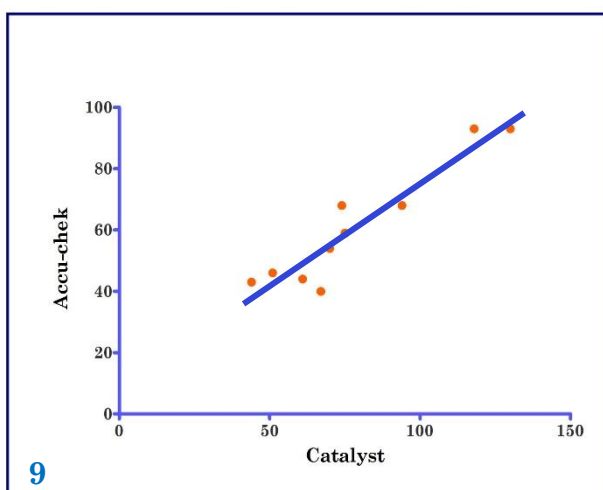
En la gráfica de Bland-Altman se aprecia que tan sólo el 10% los valores de las diferencias entre las mediciones de la glucemia entre el analizador A15 y el glucómetro Contour® son iguales o menores que 15 mg/ml (Gráfica 8).



Gráficas 7 y 8. Representación gráfica de la correlación lineal (7) y diagrama de Bland-Altman (8) entre los equipos A15 y Contour®.

La prueba de correlación de Pearson entre los valores obtenidos por el Catalyst® y el glucómetro Accu-Chek® determina que hay una asociación significativa ($P=0,001$) con un bajo coeficiente de correlación ($r=0,8903$) (Gráfica 9).

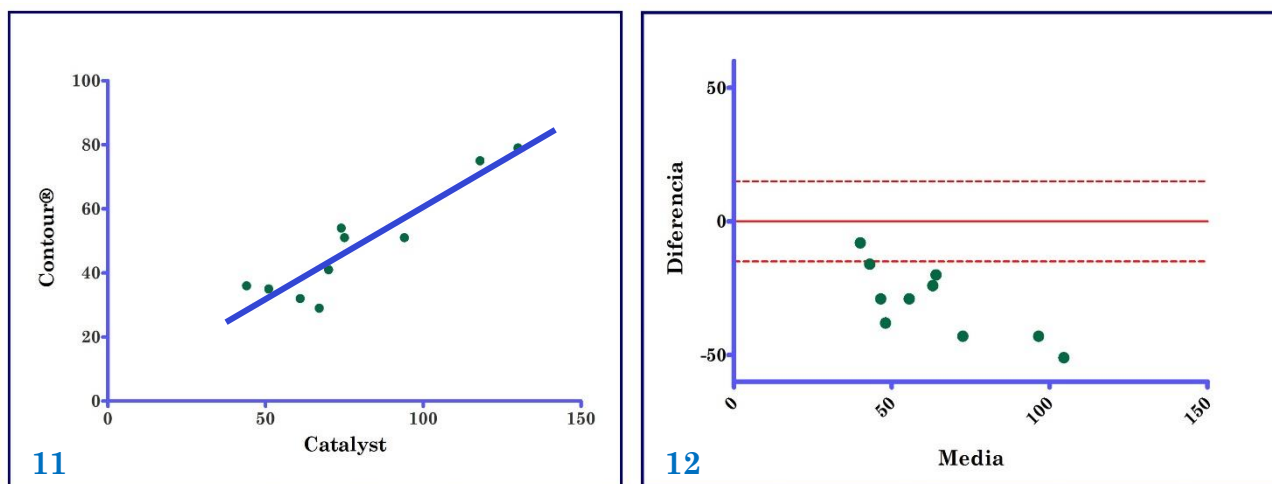
En la gráfica de Bland-Altman se aprecia que sólo el 30% los valores de las diferencias entre las mediciones de la glucemia entre el sistema Catalyst® y Accu-Chek® son iguales o menores que 15 mg/ml (Gráfica 10).



Gráficas 9 y 10. Representación gráfica de la correlación lineal (9) y diagrama de Bland-Altman (10) entre los equipos Catalyst® y Accu-Chek®.

Por último, al estudiar la correlación entre el sistema Catalyst® y el glucómetro Contour®, la prueba de Pearson es significativa ($P=0,0002$) con un coeficiente de correlación moderado ($r=0,9206$) (Gráfica 11).

En la gráfica de Bland-Altman se aprecia que tan sólo el 20% los valores de las diferencias entre las mediciones de la glucemia entre Catalyst® y Contour® son iguales o menores que 15 mg/ml (Gráfica 12).



Gráficas 11 y 12. Representación gráfica de la correlación lineal (11) y diagrama de Bland-Altman (12) entre los equipos Catalyst® y Contour®.

Después de exponer las pruebas estadísticas y gráficos realizados para determinar la exactitud de los dos glucómetros estudiados, nuestros resultados indican que ninguno de ellos presenta una exactitud aceptable. El glucómetro Accu-Chek®, solo obtuvo un 50% de acuerdo respecto al analizador A15 y un 30% respecto al sistema Catalyst®. En el caso del glucómetro Contour®, la falta de acuerdo es del 90% y del 80% respecto a los mismos métodos.

Si consideramos como el valor real de glucemia, aquel obtenido por el método de referencia, nuestros resultados indican que ambos glucómetros tienen poca exactitud debido a que subestiman la concentración de glucosa, especialmente el glucómetro Contour®, que además presenta una precisión reducida. Esta falta de exactitud en muestras normoglucémicas, podría ser mayor en animales con hipoglucemia pues los glucómetros suelen ser menos exactos cuanto menores son los valores de glucemia medidos (Brito-Casillas y cols, 2014; Hwang y cols, 2015). Esta tendencia a subestimar la glucemia se ha encontrado en otros trabajos previos

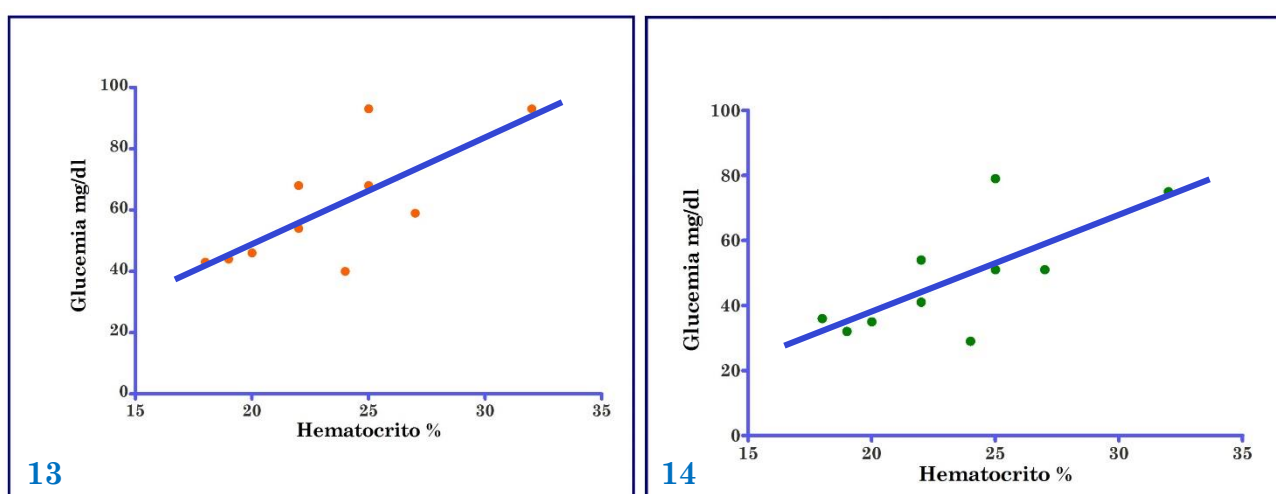
donde se concluyó que la mayoría de glucómetros miden alrededor de un 20% menos del valor real de la glucemia (Stahl, 2006).

Esta falta de exactitud podría ser compensada mediante el cálculo de un intervalo de glucemia normal específico de cada glucómetro o mediante un “coeficiente corrector”. En promedio, los métodos de referencia A15 y Catalyst® obtuvieron respectivamente valores 1,27 y 1,29 veces más altos que el glucómetro Accu-Chek®. En el caso del glucómetro Contour® los valores de los métodos de referencia fueron 1,63 y 1,65 veces más altos. Puesto que el glucómetro Accu-Chek® presenta una precisión aceptable, se podrían usar estos cocientes de corrección para multiplicar el valor de glucemia obtenido por el glucómetro y aproximarlos al valor real que proporciona el método de referencia. Lógicamente, sería necesario emplear un mayor número de animales y disponer de muestras con diferentes rangos de glucemia, pues la proporcionalidad de los resultados no es constante.

4.4 INFLUENCIA DEL HEMATOCRITO

Se ha querido estudiar la posible influencia del hematocrito en las mediciones de glucemia de los glucómetros, para ello se calculó si había correlación entre estas variables con la prueba de correlación de Pearson.

Como resultado, en ambos casos existe una asociación pero no es muy significativa ($P=0,0158$ en el caso de Accu-Chek®, y $P=0,02$ con el Contour®) y un coeficiente de correlación muy reducido ($r=0,5377$ y $r=0,5118$ para cada uno) (Gráficas 13 y 14).



Gráficas 13 y 14. Representación gráfica de la correlación lineal entre el hematocrito y los glucómetros Accu-Chek® (13) y Contour® (14).

En personas y en varias especies de animales, se ha comprobado que un hematocrito elevado reduce el valor de la glucemia cuando se mide en sangre entera respecto al plasma o suero, debido a que la concentración de agua (y por tanto el contenido en glucosa) es menor en los eritrocitos que en el plasma (Gerber y Freeman, 2016). Por el contrario, nuestros resultados no indican que exista un fenómeno similar en quelonios, aunque la muestra estudiada es muy reducida.

4.5 LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Existen diferentes exigencias y protocolos de validación para los equipos de laboratorio en función del parámetro que miden y de sus implicaciones clínicas. Antes de emitir nuestras conclusiones, es importante destacar las limitaciones que presenta este trabajo respecto al protocolo de validación.

La principal limitación ha sido el tamaño de la muestra. Una muestra de 10 animales es insuficiente para establecer un rango normal de glucemia para cada equipo evaluado. El escaso tamaño de la muestra aumenta el riesgo de que datos sesgados influyan significativamente en los resultados de las pruebas estadísticas. Además, todas las muestras procedían de hembras adultas.

Una segunda limitación es que sólo hemos empleado un aparato de cada glucómetro. Aunque ambos aparatos eran de nueva adquisición y nunca dieron mensaje de error alguno o problemas de funcionamiento, una mala calibración o defecto técnico de cualquier tipo no hubiera sido detectado.

Finalmente, dentro del protocolo de validación, no se calculó la variación entre interensayos, no se repitieron los cálculos para diferentes rangos de glucemia, ni se realizaron pruebas de exactitud más específicas como la regresión de Passin Bablok para comparación de métodos laboratoriales o los gráficos de error clínico (*error grid analysis*), que requieren muestras con diferentes rangos de glucemia y el conocimiento de un rango de valores normales para la especie y parámetro que se estudia. Por tanto, entendemos que nuestros resultados deben considerarse de carácter preliminar y que sería necesario un estudio más riguroso para llegar a conclusiones definitivas. No obstante, los resultados obtenidos muestran diferencias clínicamente relevantes entre ambos glucómetros y un estudio más complejo hubiera estado fuera de los requisitos establecidos para trabajos de fin de grado.

5. CONCLUSIONES

1. Los glucómetros Accu-Chek® Aviva y Contour® XT, bajo las condiciones de este estudio, no han alcanzado una exactitud aceptable respecto a los métodos de referencia para la determinación de la glucemia en sangre venosa de galápagos *Trachemys sp.*

2. El glucómetro Accu-Chek® Aviva presenta una buena precisión y sería el más indicado para su uso en quelonios. Su falta de exactitud obligaría no obstante a establecer su propio rango de glucemia normal a partir de una muestra representativa de animales antes de poder ser utilizado con fines clínicos.

6. RESUMEN

La extracción de sangre en quelonios es una técnica usada para la determinación de ciertos parámetros como la glucemia. En la práctica es algo complicado ejecutarla, por lo que este trabajo pretende validar el uso de dos glucómetros portátiles para la determinación de glucemia en sangre venosa de galápagos *Trachemys sp.* Para ello se ha tomado una muestra de sangre venosa de diez galápagos hembras, adultas y clínicamente sanas y se ha determinado la glucemia a través de dos métodos de referencia (analizador A15 de BioSystems y Catalyst® One de Idexx) y de dos glucómetros (Accu-Chek® Aviva de Roche y Contour® XT de Bayer).

Como resultado, estos glucómetros determinan valores de glucemia inferiores a los métodos de referencia, el Contour® menor que el Accu-Chek®. Además de que sólo el glucómetro Accu-Chek® estableció una precisión aceptable, y ambos mostraron un sesgo alto respecto a los métodos de referencia, por lo que no se puede determinar que sean exactos en este estudio.

En conclusión, ninguno de los dos glucómetros ha alcanzado la exactitud aceptable para el objetivo de este trabajo. Sin embargo, el glucómetro Accu-Chek® tiene una buena precisión y se tendría que establecer su propio rango de glucemia normal a partir de una muestra representativa para poder utilizarlo en quelonios.

7. SUMMARY

Blood draw in chelonians is a technique used for the determination of some parameters like glycemia. In practice, it is rather complicated to perform it, so this work intends to validate the use of two portable blood glucose meters (PBGM) for the determination of venous blood glucose in turtles *Trachemys sp.* For this purpose, we have been taken a sample of venous blood from ten female and adult turtles, clinically healthy, and glycemia has been determined using two reference methods (analyzer A15 from BioSystems and Catalyst® One from Idexx) and two glucometers (Accu-Chek® Aviva from Roche and Contour® XT from Bayer).

As a result, these glucometers determine lower glyceimic values than reference methods, Contour® lower than Accu-Chek®. In addition, only the Accu-chek® glucometer established an acceptable precision, and both showed a great difference from the reference methods, therefore we can not determinate that they are accurate in this research.

In conclusion, neither of the two glucometers has achieved an acceptable accuracy for the purpose of this work. However, the Accu-Chek® glucometer has a good precision and it would have to establish its own normal glycemia range from a representative sample to be able to use it with chelonians.

8. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer la Universidad y al Parque Zoológico de Córdoba por haberme brindado la oportunidad de hacer un trabajo tan interesante e innovador.

A mis dos directores en este trabajo, Pedro José Ginel Pérez, veterinario y profesor docente de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, y Rafael Guerra Caro, veterinario del Parque Zoológico Municipal de Córdoba; por toda su dedicación y ayuda en este proyecto, así como su implicación en mi formación y aprendizaje.

Agradecer a mis amigos y compañeros de vocación por haberme acompañado en esta etapa tan bonita de mi vida y animarme hasta la presentación de este trabajo.

Y por último como no, a mi familia que tanto me ha ayudado en mis estudios y que espero que se sientan orgullosos de donde estoy.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Barrows M, McArthur S, Wilkinson R. Diagnosis. En: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell, Oxford. 2004; 109-140.
- Boyer TH, Boyer DM. Turtles, Tortoises and Terrapins. En: Mader DR, Divers SJ, eds. *Reptile Medicine and Surgery, Second edition*. Elsevier, Marathon, Florida. 2006; 78-99.
- Brito-Casillas Y, Figueirinhas P, Wiebe JC, López-Ríos L, Pérez-Barreto D, Melián C, Wägner AM. ISO-Based Assessment of Accuracy and Precision of Glucose Meters in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2014; 28: pp 1405-1413.
- Campbell TW. Clinical Pathology of Reptiles. En: Mader DR, Divers SJ, eds. *Reptile Medicine and Surgery, Second edition*. Elsevier, Marathon, Florida. 2006; 453-470.
- Capdevila-Argüelles L, Iglesias-García A, Orueta JF, Zilletti B, eds. Definición de especie exótica invasora (EEI) y criterios para su identificación. En: *Especies exóticas invasoras: diagnóstico y bases para la prevención y el manejo*. Organismo Autónomo Parques Nacionales. Ministerio del Medio Ambiente, Madrid. 2006; pp 11-29.
- Chitty J, Raftery A, eds. Biology. En: *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. Blackwell, Oxford. 2013a; 3-40.
- Chitty J, Raftery A, eds. Basic Techniques. En: *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. Blackwell, Oxford. 2013b; 80-113.
- Chitty J, Raftery A, eds. Clinical Pathology. En: *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. Blackwell, Oxford. 2013c; 150-178.
- Chitty J, Raftery A, eds. Appendix 2: Haematological Normals. En: *Essentials of Tortoise Medicine and Surgery*. Blackwell, Oxford. 2013d; 318-319.
- Díaz-Paniagua C, Pérez-Santigosa N, Hidalgo-Vila J, Portheault A. Manual de identificación de galápagos autóctonos y exóticos. Convenio CSIC/Consejería de Medio Ambiente-Junta de Andalucía. 2005; pp 9-14.
- Domori A, Sunahara A, Tateno M, Shimokawa T, Setoguchi A, Endo Y. The clinical utility of two human portable blood glucose meters in canine and feline practice. *Veterinary Clinical Pathology*. 2014; 43: pp 55-62.

- Donoghue S. Nutrition. En: Mader DR, Divers SJ, eds. Reptile Medicine and Surgery, Second edition. Elsevier, Marathón, Florida. 2006; 251-298.
- Fyre F, ed. A practical guide for feeding captive reptiles. En: Biomedical and surgical aspects of capture reptile husbandry, vol. 1, Second edition. Krieger, Malabar, Florida. 1991a; 41-100.
- Fyre F, ed. Common pathologic lesions and disease processes. En: Biomedical and surgical aspects of capture reptile husbandry, vol. 2, Second edition. Krieger, Malabar, Florida. 1991b; 529-619.
- Gerber KL, Freeman KP. ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Veterinary Clinical Pathology*. 2016; 45: pp 10-27.
- Hernández-Divers SJ. Diagnostic Techniques. En: Mader DR, Divers SJ, eds. Reptile Medicine and Surgery, Second edition. Elsevier, Marathón, Florida. 2006; 490-532.
- Hidalgo-Vila J, Díaz-Paniagua C, Ribas A, Florencio F, Pérez-Santigosa N, Casanova JC. Helminth communities of the exotic introduced turtle, *Trachemys scripta elegans* in southwestern Spain: Transmission from native turtles. *Research in Veterinary Science*. 2009; 86: pp 463-465.
- Hwang JH, Sohn YH, Chang SS, Kim SY. Evaluation of three glucometers for whole blood glucose measurements at the point of care in preterm or low-birth-weight infants. *Korean J Pediatr*. 2015; 58 (8): pp 301-308.
- Katsoulos PD, Minas A, Karatzia MA, Pourliotis K, Christodopoulos G. Evaluation of a portable glucose meter for use in cattle and sheep. *Veterinary Clinical Pathology*. 2011; 40: pp 245-247.
- Martínez-Silvestre A, Hidalgo-Vila J, Pérez-Santigosa N, Díaz-Paniagua C. Galápagos de Florida – *Trachemys scripta* (Schoepff, 1792). En: Salvador A, Marco A, eds. Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. 2015; pp 2-6.
- McArthur S, Problem-solving approach to Conditions of Marine Turtles. En: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Blackwell, Oxford. 2004; 301-308.

Rodríguez-Guerra M, Guillén-Salazar F. El parque zoológico, un nuevo aliado de la biodiversidad. Guía para la aplicación de la Ley 31/2003 de conservación de la fauna silvestre en los parques zoológicos, Segunda edición. 2010; pp 6-11.

Stahl SJ. Hyperglycemia in Reptiles. En: Mader DR, Divers SJ, eds. Reptile Medicine and Surgery, Second edition. Elsevier, Marathon, Florida. 2006; 822-830.

Schumacher J, Yelen T. Anesthesia and Analgesia. En: Mader DR, Divers SJ, eds. Reptile Medicine and Surgery, Second edition. Elsevier, Marathon, Florida. 2006; 442-452.

Stein JE, Greco DS. Portable Blood Glucose Meters as a Means of Monitoring Blood Glucose Concentrations in Dogs and Cats With Diabetes Mellitus. Clinical Techniques in Small Animal Practice. 2002; 17 (2): pp 70-72.

Stoot LJ, Cairns NA, Cull F, Taylor JJ, Jeffrey JD, Morin F, Mandekman JW, Clark TD, Cooke SJ. Use of portable blood physiology point-of-care devices for basic and applied research on vertebrates: a review. Conservation Physiology. 2014; 2: pp 1-21.

Wilkinson R. Clinical Pathology. En: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J, eds. Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles. Blackwell, Oxford. 2004; 141-186.

<https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>