



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JULIANA MASSITEL CURTI

**LÍQUIDO CEREBROESPINHAL DE RUMINANTES:
CONSERVAÇÃO, ESTABILIDADE E VALIDAÇÃO**

Londrina
2022

JULIANA MASSITEL CURTI

**LÍQUIDO CEREBROESPINHAL DE RUMINANTES:
CONSERVAÇÃO, ESTABILIDADE E VALIDAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr^a. Karina Keller Marques da Costa Flaiban

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Curti, Juliana .

Líquido cerebrospinal de ruminantes : conservação, estabilidade e validação / Juliana Curti. - Londrina, 2022.
67 f. : il.

Orientador: Karina Keller Marques da Costa Flaiban.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Diagnóstico - Tese. 2. Encefalite - Tese. 3. Líquor - Tese. I. Keller Marques da Costa Flaiban, Karina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

JULIANA MASSITEL CURTI

**LÍQUIDO CEREBROESPINHAL DE RUMINANTES:
CONSERVAÇÃO, ESTABILIDADE E VALIDAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Orientador: Prof^a. Dr^a. Karina Keller
Marques da Costa Flaiban
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Ellen de Souza Marquez
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Prof. Dr. Julio Augusto Naylor Lisboa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Ana Paula F.R. Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Queiroz
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 30 de setembro de 2022.

Dedico este trabalho ao meu marido, Murilo, e a minha querida filha Lívia por sempre acreditaram que esse sonho era possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e conquistas alcançadas.

Ao meu querido esposo, Murilo Curti, pelos momentos de ausência e incentivo incondicional, sem você eu não conseguiria.

A minha filha, Lívia Massitel Curti, que está comigo, literalmente, desde o início das colheitas do doutorado. Obrigada por ajudar a mamãe e entender os momentos que precisei me ausentar.

Aos meus pais, Eduardo e Olga e irmãs, Isabela e Fernanda, por sempre acreditarem que esse sonho era possível.

À Prof^a Dr^a Karina Keller Marques da Costa Flaiban, por estender a mão e aceitar me orientar em meio a tantas dificuldades. Obrigada pelo conhecimento, apoio, incentivo e por ser calma.

Ao meu amigo e colega de trabalho, Gustavo Romero Gonçalves, pelo auxílio nas colheitas, e pelos momentos de descontração.

A UNINGÁ, por ceder os bovinos e caprinos para o experimento.

Ao Hospital Veterinário da UEL por ceder os ovinos ao experimento

Às minhas amigas, Priscilla e Stefany, que dividem a vida e a profissão comigo, agradeço pelo carinho e apoio nestes anos.

Aos residentes e funcionários do laboratório de Patologia Clínica pelo auxílio nos exames realizados,

As residentes da Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais pela ajuda nas colheitas com os ovinos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal pela oportunidade ofertada.

Às professoras da banca de qualificação, Mônica Vicky Bahr Arias, Giovana Wingeter di Santis e Priscilla Fajardo Valente Pereira, que fizeram boas contribuições ao trabalho.

“É justo que muito custe o que muito vale”
Santa Tereza D’Ávila

CURTI, Juliana Massitel. **Líquido cerebrospinal de ruminantes: conservação, estabilidade e validação.** 2022. 66f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A análise do Líquido cerebrospinal (LCE) traz informações importantes ao clínico como apoio ao diagnóstico de enfermidades neurológicas inflamatórias/infecciosas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade e comparar os métodos para determinar a concentração de lactato líquido de bovinos, caprinos e ovinos sadios sob refrigeração e congelamento. Foram colhidas e avaliadas 30 amostras de LCE de bovinos (n=10), caprinos (n=10) e ovinos (n=10). O LCE foi colhido por punção no espaço atlanto-occipital sob sedação. Após a colheita as amostras foram distribuídas em sete alíquotas de acordo com o momento de sua análise 0h, 24h, 48h, 72h refrigeradas a 4°C, e 3 meses, 6 meses e 12 meses congeladas a -20°C. A concentração de lactato foi mensurada pelo lactímetro portátil (LP) e pelo analisador bioquímico automatizado (ABA), padrão ouro. Nas amostras refrigeradas foram realizadas as análises físicas, bioquímicas (proteína e glicose) e celulares rotineiras. Nas amostras congeladas foram mensurados concentração de eletrólitos sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e cloreto (Cl⁻) e concentração de lactato. A análise de variância bifatorial foi empregada para comparação entre os diferentes momentos em cada espécie e o teste de Bland-Altman foi utilizado para observar se havia concordância entre os métodos. A correlação de Pearson foi empregada para verificar as relações entre o lactímetro portátil e o analisador bioquímico automatizado. O lactímetro portátil avaliado não pode ser empregado como método de avaliação do lactato líquido em bovinos, caprinos e ovinos. Constatou-se que no LCE as espécies avaliadas possuem estabilidade de até 72 horas sob refrigeração a 4°C para a densidade, concentração de proteína e glicose e contagem total de células (leucócitos e hemácias), e congelado a -20°C por até 12 meses de eletrólitos. A estabilidade do lactato no LCE no ABA variou de acordo com a espécie, nos bovinos apresentou estabilidade por até 72 horas refrigerado, nos caprinos por até 3 meses congelado e nos ovinos por até 12 meses congelado. Os resultados encontrados indicam que o LCE pode ser colhido a campo e encaminhado ao laboratório a 4°C em até 72 horas sem comprometer a análise.

Palavras-chave: Diagnóstico. Encefalite. Líquor.

CURTI, Juliana Massitel. **Ruminant cerebrospinal fluid: conservation, stability and validation.** 2022. 66p. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

Cerebrospinal fluid (CSF) analysis provides important information to the clinician to support the diagnosis of inflammatory/infectious neurological diseases. The aim of this study was to evaluate the stability and compare the methods to determine the concentration of lactate in CSF in healthy cattle, goats and sheep under refrigeration and freezing. Thirty samples of CSF from cattle (n=10), goats (n=10), and sheep (n=10) were collected and evaluated. The CSF was collected by puncture in the atlanto-occipital space under sedation. After collection, the samples were distributed in seven aliquots determined according to the moment of their analysis, such as 0h, 24h, 48h, 72h refrigerated at 4°C, and 3, 6 and 12 months frozen at -20°C. Lactate concentration was measured by portable lactometer (PL) and by automated biochemical analyzer (ABA), gold standard. In the refrigerated samples physical, biochemical (protein and glucose) and cellular analyzes were performed. In the frozen samples, concentration of electrolytes sodium (Na⁺), potassium (K⁺) and chloride (Cl⁻) and lactate concentration were measured. Analysis of variance bifactorial was used to compare the diferente moments in each species and the Bland-Altman test was used to observe whether there was agreement between the methods. Pearson's correlation was used to verify the relationships between the PL and the ABA. The evaluated PL cannot be used as a method of evaluating lactate in CSF in cattle, goats, and sheep. It was found that in the CSF the species evaluated have stability of up 72 hours under refrigeration at 4°C for density, protein and glucose concentration and total cell count (leukocytes and red blood cells), and frozen at -20°C for up to 12 months of electrolytes. The stability of lactate in the CSF in the ABA varied according to the species, in cattle it was stable for up to 72 hours refrigerated, in goats for up to 3 months frozen and in sheep for up to 12 months frozen. The results found indicate that CSF can be collected in the field and sent to the laboratory at 4°C within 72 hours without compromising the analysis.

Keywords: Diagnosis. Encephalitis. Cerebrospinal fluid

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1** – Imagem demonstrativa de colheita de LCE no espaço atlanto occiptal em bovinos20
- Figura 2** – Imagem demonstrativa de colheita de LCE no espaço lombossacro em equinos.....21
- Figura 3** – Lactímetro portátil Accutrend Plus®.....25
- Figura 4** – Componentes de um espectrofotômetro de absorbância simples.....26

ARTIGO A

- Figura 1** – Gráfico de Bland-Altman no LCE de caprinos e ovinos sadios42

ARTIGO B

- Figura 1** – Gráfico de Bland-Altman no LCE de bovinos sadios56

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Taxa de formação de líquido cefalorraquidiano (LCR) nos ruminantes.....	18
---	----

ARTIGO A

Table 1 – Goat and sheep CSF sample biochemical analysis and cellularity at 0 h and after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C.....	40
--	----

Table 2 – Concentration of electrolytes in CSF samples from healthy goats and sheep at 0 h, after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C, and after 3, 6, and 12 months of being frozen at -20°C.....	41
--	----

Table 3 – Lactate concentrations in the CSF of healthy goats and sheep measured using a portable lactometer (PL) and automated biochemical analyzer (ABA).	43
--	----

ARTIGO B

Table 1 – Cattle CSF sample biochemical analysis and cellularity at 0 h and after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C. The data was presented with mean and SEM or median and percentile 25 and 75 in the non-parametric distribution.....	46
--	----

Table 2 – Concentration of electrolytes in the CSF of healthy cattle at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h refrigerated at 4°C, and 3, 6, and 12 months frozen at -20°C. The data are presented with mean and SEM.....	57
--	----

Table 3 – Lactate concentrations in the CSF of healthy cattle measured using a portable lactometer (PL) and automated biochemical analyzer (ABA). The data are presented with mean and SEM.....	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca	Cálcio
Cl ⁻	Cloreto
CK	Creatina quinase
FA	Fosfatase alcalina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K ⁺	Potássio
LCE	Líquido cerebrospinal
Mg	Magnésio
Na ⁺	Sódio
P	Fósforo
SNC	Sistema Nervoso Central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	LÍQUIDO CEREBROESPINHAL	17
2.1.1	Histórico	17
2.1.2	Produção, circulação e absorção do líquido cerebroespinal	18
2.1.3	Colheita e análise de líquido cerebroespinal	19
2.1.4	Lactato	23
2.1.5	Estabilidade dos componentes do líquido cerebroespinal.....	24
2.1.6	Lactímetro portátil	24
2.1.7	Espectrofotometria	26
3	REFERÊNCIAS	28
4	HIPÓTESE	32
5.	OBJETIVOS	33
5.1	OBJETIVO GERAL.....	33
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
6	ARTIGO A – O LACTÍMETRO PORTÁTIL PODE SER UTILIZADO PARA MENSURAR A CONCENTRAÇÃO DE LACTATO PLASMÁTICO E LIQUÓRICO DE BOVINOS, CAPRINOS E OVINOS?	34
7	ARTIGO B – ESTABILIDADE DO LÍQUIDO CEREBROESPINHAL DE BOVINOS, CAPRINOS E OVINOS SADIOS	50
8	CONCLUSÕES	62
9	PERSPECTIVAS FUTURAS	63
	ANEXOS	64
	ANEXO A – Aprovação e registro na comissão de ética no uso de animais	65

1 INTRODUÇÃO

O rebanho brasileiro de bovinos, caprinos e ovinos representa um montante de 238,77 milhões de cabeças, sendo que esse número equivale a um aumento de 1,5% em relação ao ano de 2019 segundo o IBGE (BRASIL, 2022). Com o aumento progressivo do rebanho espera-se também um acréscimo nas enfermidades, dentre elas as doenças do sistema nervoso central (SNC). O exame laboratorial que auxilia no diagnóstico das doenças do SNC é a colheita e análise de líquido cerebrospinal (LCE), que faz parte da rotina e traz informações importantes ao clínico como, por exemplo, se a doença é de origem inflamatória ou não (NAGY, 2017).

Convencionalmente a análise liquórica inclui a avaliação física, química e contagem de células nucleadas (SCOTT, 2004; NAGY, 2017), entretanto há outras variáveis que podem ser mensuradas e que auxiliam no diagnóstico de determinadas enfermidades. Entre os compostos que podem ser analisados encontram-se o lactato, o sódio (Na^+), o cálcio (Ca) e o magnésio (Mg) (CURTI et al., 2020).

Na medicina, a concentração do lactato tem sido utilizada para auxiliar no diagnóstico das meningites, diferenciando se é de causa viral ou bacteriana (CHEN et al., 2012; GRILLE et al., 2012; MASKIN et al., 2013). Na medicina veterinária sabe-se que há aumento na concentração de lactato no LCE no trauma encefálico em gatos (INAO, et al 1988), nas doenças intracranianas de cães (CAINES et al., 2013) e em convulsões (MARIANI et al., 2020). Nos ruminantes quase não existem estudos, porém nos bovinos a concentração do lactato no LCE pode ser utilizada como biomarcador nas encefalites (CURTI et al., 2020). É desconhecido, pelo presente autor, o estudo na área em pequenos ruminantes.

O aumento da concentração de lactato é considerado um marcador de hipóxia tecidual e a sua produção está diretamente relacionada com condições de anaerobiose (GONZÁLEZ; SILVA, 2006). Com o advento dos diagnósticos realizados por meio da mensuração da concentração do lactato observa-se também a necessidade de facilitar o atendimento a campo do médico veterinário que atua na área de grandes animais, bem como avaliar a estabilidade do LCE. A utilização de um lactímetro portátil (LP) traz agilidade e praticidade. Em cães, o LP Lactate plus® foi validado e seu uso foi considerado eficaz em LCE refrigerado até 48 horas após a

colheita (NYE et al., 2018).

Deste modo, o objetivo do presente trabalho é comparar o lactímetro portátil com o analisador bioquímico automatizado e avaliar a estabilidade dos componentes, proteína, glicose, densidade e celularidade, do LCE refrigerado e congelado em bovinos, caprinos e ovinos sadios.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 LÍQUIDO CEREBROESPINHAL

O líquido cerebroespinal (LCE) é um fluido biológico que está em contato direto com o sistema nervoso central (SNC) e seus envoltórios, as meninges. É um ultrafiltrado produzido pelos plexos coróides e permanece nos ventrículos laterais e no espaço subaracnoide que posteriormente é absorvido pelas vilosidades aracnoides (VERNAU; VERNAU; BAILEY, 2008; DE LAHUNTA, 2009).

A sua função é baseada em realizar um suporte estrutural do encéfalo, diminuindo os danos em casos de traumatismo, regulação da pressão intracraniana, excreção de metabólitos, transporte e controle de constituintes bioquímicos do SNC (TERLIZZI; PLATT, 2006; VERNAU; VERNAU; BAILEY, 2008).

2.1.1 Histórico

Os primeiros relatos sobre o LCE começam no século XVII a.C. escritos em papiros por Edwin Smith. Já em 430 a.C. Hipócrates faz a primeira dissecação do SNC com acesso aos ventrículos, com auxílio de uma agulha. Nos séculos seguintes são encontrados vários relatos de médicos sobre a descrição do SNC de forma melhor estruturada, com descrição das meninges e dos ventrículos (OLIVEIRA et al., 2020).

No século II d.C., Claudius Galenus relata que o cérebro era preenchido por um líquido claro, no qual presumiu-se que sua função era fornecer energia ao corpo. Este achado atrasou as pesquisas evolutivas da época, pois acreditava-se que o líquido era vital (HERBOWSKI, 2013, OLIVEIRA et al., 2020).

Em 1543, André Vesalius, descreveu o sistema ventricular e em 1587, Giulio Aranzi, publicou a existência do plexo coróide e a circulação do LCE pelo terceiro e quarto ventrículo (HERBOWSKI, 2013). Somente em 1764, Domenico Cotugno, reconheceu a continuidade entre os fluidos cerebrais e espinhais, bem como o espaço subaracnóideo, por meio de dissecação *post-mortem*. Sessenta anos após, François Magendie, deu o nome de LCE (OLIVEIRA et al., 2020).

No Brasil, os estudos com LCE na medicina começaram em 1897, após Miguel Couto, realizar a primeira punção no espaço lombossacro *in vivo*. Em

1928, Cerqueira da Luz e Waldemiro Pires fizeram mais de 5000 punções no espaço atlanto occipital, incluindo esta abordagem clínica em nível mundial (LIVRAMENTO; MACHADO, 2013; OLIVEIRA et al., 2020).

2.1.2 Produção, circulação e absorção do Líquido Cerebroespinal

A produção do LCE é realizada nos capilares localizados ao longo do SNC e pelas leptomeninges, entretanto o principal local de formação são os plexos coroídes. O plexo coroide é caracterizado por vilosidades que se projetam para os ventrículos (DE LAHUNTA, 2009). A produção é caracterizada por ser um ultrafiltrado, que se inicia com a pressão hidrostática dos capilares transferindo água e os íons para o epitélio coroide. Posteriormente o líquido vai para os ventrículos por meio de transporte ativo (VERNAU; VERNAU; BAILEY, 2008).

A formação de LCE é diretamente proporcional ao peso do plexo coroide e é diferente entre as espécies. A taxa de formação é constante, porém pode sofrer pequenas alterações durante o dia (VERNAU; VERNAU; BAILEY, 2008; DE LAHUNTA, 2009).

Tabela 1 – Taxa de formação de líquido cefalorraquidiano (LCR) nos ruminantes

Espécie	Taxa de formação (µL/min)
Bovinos	290
Caprinos	164
Ovinos	118

Fonte: Kaneko, 2008.

A produção pode sofrer variações por diversos fármacos, como por exemplo a furosemida e o diazepam, ou enfermidades. No entanto, o aumento moderado da pressão intracraniana e a desidratação não afetam a taxa de formação (VERNAU; VERNAU; BAILEY, 2008).

Após ser formado nos ventrículos laterais, o LCE circula no espaço subaracnoide de forma contínua. O fluxo ocorre através dos ventrículos laterais, passa no terceiro ventrículo e por meio do aqueduto mesencefálico adentra ao quarto ventrículo. Parte do LCE vai para o espaço subaracnoide e uma pequena fração é destinada ao canal medular (DE LAHUNTA, 2009). A velocidade com a qual o LCE se movimenta no espaço subaracnoide depende diretamente da atividade

cardiovascular, pois de acordo com a pressão e a pulsação ocorre o movimento (DE LAHUNTA, 2009).

A maior parte da absorção do líquido ocorre nas vilosidades aracnoides, que são estruturas projetadas para os seios durais. As vilosidades aracnoides são extensões da membrana aracnoide e do espaço subaracnoide. A outra pequena porção pode ser absorvida nos vasos linfáticos da meninge duramáter ou pelas bainhas perineurais dos nervos cranianos, em particular o olfatório. A absorção ocorre de forma unidirecional, ou seja, do LCE para o sangue venoso (CHODOBSKI et al., 1998; DE LAHUNTA, 2009).

De forma geral, a formação e absorção do LCE ocorrem de forma contínua. A sua taxa de produção não é dependente da pressão intracraniana, dessa forma a absorção do LCE é o principal mecanismo para regulação da pressão (CHODOBSKI et al., 1998; DE LAHUNTA, 2020).

2.1.3 Colheita e Análise do Líquido Cefalorraquidiano

A análise de LCE é o principal exame complementar realizado nos casos de doenças do SNC. Apesar de raramente elucidar o diagnóstico, ele em conjunto com o histórico e exame neurológico, auxilia o médico veterinário nos prováveis diagnósticos diferenciais (NAGY, 2017).

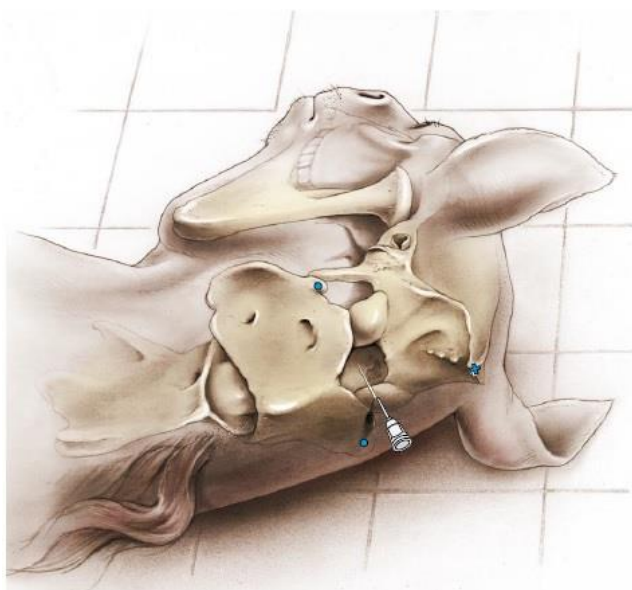
O exame de LCE envolve três etapas fundamentais, pré-analítica, analítica e pós analítica. A fase pré-analítica consiste nos processos antes de avaliar a amostra, como a colheita, armazenamento e transporte. A fase analítica envolve a análise propriamente dita do LCE, e a fase pós analítica a emissão do resultado. Todas as etapas podem incorrer em erros. Por isso, deve-se ter bem estabelecido os padrões para execução das etapas a serem desenvolvidas (DIMAS; PUCCIONI-SOHLER, 2008).

A colheita de LCE pode ser realizada em dois locais: o espaço atlanto-occipital ou lombossacro (SCOTT, 2004; NAGY, 2017). A escolha do local de punção depende do conhecimento da anatomia local, da localização da lesão e segurança de quem o realizará. Na literatura americana comumente encontra-se descrito que a técnica de colheita no espaço lombossacro é segura e de fácil execução (SCOTT, 2004; NAGY, 2017). No entanto, trabalhos no Brasil demonstram a colheita de LCE por meio da atlanto-occipital de forma efetiva, rápida e segura (ISERNHAGEN et al.,

2011; QUEIROZ et al., 2012; QUEIROZ et al., 2018).

A colheita no espaço atlanto-occipital (Figura 1) deve ser realizada em decúbito lateral direito sob sedação ou anestesia geral e o animal não pode se movimentar durante o procedimento. É realizada tricotomia ampla e antissepsia da área com auxílio de clorexidine degermante e álcool 70%, após flexiona-se o pescoço em 90° graus. A colheita deve ser realizada com agulha metálica e a introdução deve ser lenta e progressiva, quando a dura-máter for puncionada o LCE deve fluir (DE LAHUNTA, 2009). Para a maioria dos bovinos e pequenos ruminantes, o mandril metálico do cateter 18G é suficiente para realizar a colheita (QUEIROZ, et al., 2012; QUEIROZ et al., 2018; CURTI et al., 2020). A colheita no espaço atlanto-occipital pode ser guiada por ultrassonografia, o que torna o procedimento mais fácil (BRAUN; ATTINGER; BRAMMERTZ, 2015).

Figura 1. Imagem demonstrativa de colheita de LCE no espaço atlanto occipital em equinos



Fonte: De Lahunta (2009).

Já no espaço lombossacro a sedação é facultativa, os bovinos devem permanecer em estação e os pequenos ruminantes podem ser posicionados em decúbito esternal. A tricotomia ampla e antissepsia com clorexidine degermante e álcool 70% fazem parte do procedimento. No local de punção pode ser realizado um botão anestésico com lidocaína 2%, posteriormente a agulha metálica, com no mínimo 15cm, deve ser introduzida verticalmente no espaço intervertebral entre lombar 6 (L6)

e sacral 1 (S1). Quando as meninges são perfuradas alguns animais podem ter uma reação involuntária de movimentação ou abanar a cauda. Quando a agulha atinge o espaço subaracnoide o LCE deve fluir, e com auxílio de uma seringa de 1mL pode ser puncionado de forma gentil (STOBER, 1993). A análise de LCE do espaço lombossacro ou atlanto-occipital não possuem diferença (DE LAHUNTA, 2009; ANDRADE et al., 2022).

Figura 2. Imagem demonstrativa de colheita de LCE no espaço lombossacro em equinos.



Fonte: De Lahunta (2009).

A análise líquórica rotineira inclui avaliação física, citológica, mensuração de proteína, glicose e densidade. A avaliação física consiste em cor, aspecto e viscosidade, dentre os parâmetros fisiológicos incluem um LCE incolor, límpido e viscosidade similar a água. Entretanto nas enfermidades podem-se encontrar alterações de cor, como por exemplo xantocromia e a eritrocromia. A xantocromia indica a coloração amarelada e está relacionada com a concentração de bilirrubina plasmática proveniente de hemorragia subaracnóidea ou transudação de proteínas do plasma para o LCE. A eritrocromia indica uma coloração avermelhada causada na maioria das vezes por acidente de punção (DIMAS; PUCCIONI-SOHLER, 2008). O LCE que se apresenta turvo indica um provável aumento de células nucleadas e da concentração de proteína. (VERNAU; VERNAU; BAILEY 2008; TERLIZZI; PLATT, 2009)

A contagem total de células nucleadas é realizada por meio da câmara

de Fuchs-Rosenthal e para realizar a diferenciação entre hemácias e leucócitos é necessário conhecer as particularidades de cada célula. Os leucócitos apresentam-se de aspecto granular e refringentes, e as hemácias possuem halos no centro e contornos regulares. No caso de hemácias crenadas projeções finas e pontiagudas podem ocorrer (VERNAU; VERNAU; BAILEY 2008). O aumento do número de leucócitos no LCE é classificado como pleocitose, porém há divergências entre os autores para o limite superior fisiológico nos ruminantes, alguns aceitam até cinco leucócitos por mm^3 e outros até dez (VERNAU; VERNAU; BAILEY 2008; STOKOL et al., 2009).

A contagem diferencial de leucócitos auxilia o clínico no diagnóstico e na escolha da terapêutica adequada. Nos casos de encefalites bacterianas espera-se uma pleocitose com predomínio de polimorfonucleares, já nos casos de encefalites virais encontra-se uma provável pleocitose com predomínio de células mononucleares. Casos de pleocitose eosinofílica estão associados a encefalites por protozoários como o caso da cenurose em ovinos. Em determinadas enfermidades a colheita seriada de LCE se faz necessária para acompanhar a evolução do quadro e/ou resposta ao tratamento (NAGY, 2017). Recente um estudo demonstrou que a colheita seriada a cada sete dias não interfere nos valores de hemácias, leucócitos e proteína total do LCE (ANDRADE et al., 2022).

A concentração fisiológica de glicose no LCE é considerada de 35 a 70 mg/dL, o aumento é denominado de hiperglicorraquia e ocorre nos casos de hiperglicemia. A hiperglicemia em ruminantes pode estar acompanhada por estresse agudo. A diminuição de glicose, hipoglicorraquia, está associada nos casos de encefalites bacterianas, nesses casos há consumo de glicose do SNC. (SMITH, METRE, PUSTERLA; 2019).

O aumento na concentração de proteína, hiperproteínorraquia, pode estar associada a diversos fatores como o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica, produção de globulinas intratecal e interrupção do fluxo ou absorção do LCE. As encefalites virais, bacterianas e parasitárias apresentam hiperproteínorraquia (VERNAU; VERNAU; BAILEY 2008; SMITH, METRE, PUSTERLA; 2019).

Existem outros componentes que podem ser mensurados no LCE, como as concentrações dos eletrólitos sódio (Na^+), potássio (K^+) e cloreto (Cl^-), dos minerais cálcio (Ca) e fósforo (P), dos metabólitos ureia, creatinina, e lactato, bem

como a atividade das enzimas creatinina quinase (CK) e fosfatase alcalina (FA) (WELLES et al., 1992; ST JEAN et al., 1997; CURTI et al., 2020). Entre os componentes citados, a concentração de Na^+ é utilizada para o diagnóstico de intoxicação por sal, em que valores acima de 160 mmol/L determinam o quadro *ante mortem* (NILES, 2017; SMITH, METRE, PUSTERLA; 2019). A concentração de Mg pode ser empregada em casos de hipomagnesemia, os resultados no LCE podem ser mensurados até 12 horas *post-mortem* (GOFF, 1999; NAGY, 2017). Em casos de encefalites bacterianas e virais observou-se diminuição na concentração de Ca, a queda é mais intensa especialmente em casos de meningoencefalite por herpesvírus bovino tipo 5 (BoHV-5). Supõe-se que tal fato pode estar associado ao influxo de Ca para dentro das células em casos de morte celular (CURTI et al., 2020).

2.1.4 Lactato

O lactato é considerado um marcador de hipóxia tecidual e sua produção ocorre em condições anaeróbicas, pois com a privação de oxigênio há bloqueio da oxidação aeróbica da glicose pelo ciclo do ácido tricarbóxico, ou em células sem mitocôndrias, como os eritrócitos. Nesses casos, o piruvato é reduzido a lactato, liberando uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP) (CORLEY; DONALDSON; FURR, 2005; GONZÁLEZ; SILVA, 2006).

O lactato apresenta dois isômeros, o lactato L e o lactato D, sendo o primeiro fisiologicamente predominante, correspondendo de 95 a 99% do lactato corporal. O aumento da concentração sanguínea do lactato é denominado de hiperlactatemia, a qual pode ou não estar correlacionada à acidemia e a distúrbios ácido-base (GILLESPIE et al., 2017).

Na neurologia humana, a concentração de lactato no LCE é empregada para auxiliar no diagnóstico de meningite bacteriana (SAKUSHIMA et al., 2011) e meningite bacteriana pós craniotomia (MASKIN et al., 2013). No entanto, outras enfermidades também apresentam aumento em sua concentração, como por exemplo nos casos de convulsões (TUMANI et al., 2015), na doença de Alzheimer (LIGUORI et al., 2014) e na esclerose múltipla (ALBANESE ET AL., 2016).

Na medicina veterinária a mensuração da concentração de lactato no LCE ainda é pouco empregada, porém existem estudos que comprovam que as doenças intracranianas geram aumento da concentração em cães (CAINES et al.,

2013), bem como nos casos de convulsões (MARIANI et al., 2020). Em grandes animais há trabalhos com equinos (GREEN; CONSTANTINESCU, 1993; TENNENT-BROWN, 2012) e bovinos com encefalites (CURTI et al., 2020). Em bovinos, o lactato pode ser utilizado como biomarcador, e admite-se que valores acima de 3,6mmol/L ocorrem em encefalites (CURTI et al., 2020).

Em episódios de hiperlactatemia, há também aumento da concentração de lactato no SNC em decorrência de passagem pela barreira hematoencefálica (BHE) (ABEYSEKARA et al., 2007), entretanto essa passagem é pontual. A síntese de lactato ocorre no SNC principalmente em casos de encefalites bacteriana (SAKUSHIMA et al., 2011; MASKIN et al., 2013; CURTI et al., 2020).

2.1.5 Estabilidade dos componentes do Líquido Cefalorraquidiano

A recomendação é que a análise de LCE seja realizada entre 30 e 60 minutos após a colheita, evitando dessa forma a lise das células nucleadas e a diminuição da concentração dos componentes bioquímicos (SCOTT, 2004; FRY et al., 2006; VERNAU, VERNAU; BAILEY, 2008).

Um estudo realizado em bezerros comparou os resultados de LCE imediatamente após a colheita e sob refrigeração a 4°C por 24 horas com adição de soro autólogo, e não houve diferença entre os métodos avaliados. Com a adição do soro autólogo foi possível manter a estrutura celular de forma razoável. No entanto há uma correlação positiva entre a quantidade de células nucleadas e a concentração de proteína (D'ANGELO et al., 2009).

A colheita de LCE nos ruminantes comumente é realizada a campo em atendimentos neurológicos, a amostra é acondicionada em caixa isotérmica e posteriormente encaminhada ao laboratório. No entanto, dificilmente a fase analítica ocorrerá em até 60 minutos, pois as propriedades podem ficar distantes do laboratório de apoio, fato que desestimula a avaliação de LCE nesses animais. A escassez de dados na literatura para os bovinos e pequenos ruminantes reforça a necessidade de maiores estudos sobre a estabilidade nessas espécies.

2.1.6 Lactímetro portátil

O lactímetro portátil é um medidor de concentração de lactato

sanguíneo que fornece resultados de forma rápida, dentro de até 60 segundos (Manual, Accutrend Plus, 2012). No mercado brasileiro é possível encontrar diferentes marcas, entre elas o Accutrend Plus®, lactímetro LT-1730® e Lactate Plus®.

O Accutrend Plus® (Figura 3.), utiliza o método de fotometria de refletância para mensurar a concentração de lactato sanguíneo e/ou plasmático (Manual, Accutrend Plus, 2012). A fotometria de refletância é utilizada em alguns analisadores bioquímicos automatizados e em analisadores semiautomatizados menores. A fotometria de refletância é análoga a fotometria de absorvância, em que a reação química que ocorre resulta em um produto que absorve parte da luz. A luz restante é refletida a um fotodetector que mede sua intensidade, porém a intensidade da luz refletida não está relacionada linearmente com a concentração da substância produzida e a aplicação de fórmulas são necessárias para a conversão dos resultados (WEISER, 2022).

Figura 3. Lactímetro portátil Accutrend Plus®.



Fonte: Shoptime (2022)

Na medicina veterinária existem vários trabalhos testando a eficácia do lactímetro portátil Accutrend Plus® para avaliação do lactato plasmático, envolvendo diferentes espécies animais, entre elas bovinos (KARAPINAR et al.,

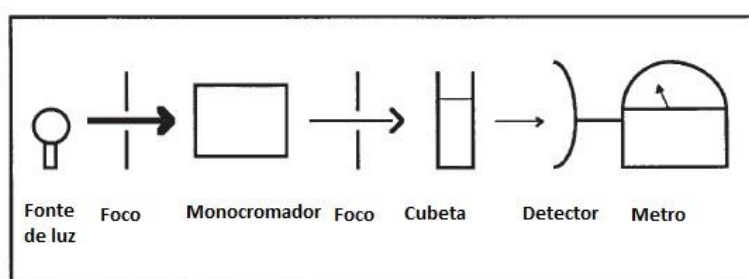
2013), equinos (TEIXEIRA-NETO et al., 2011) e cães (NOSAN et al., 2017). Em cães, o Accutrend Plus®, demonstrou ser eficaz quando comparado ao analisador bioquímico automatizado, Idexx Catalyst Dx®, considerado pelos autores como método ouro de avaliação (NOSAN et al., 2017). Entretanto em bovinos e equinos o mesmo não pode ser afirmado, os resultados não seguiram um padrão quando mensurados no plasma (TEIXEIRA-NETO et al., 2011; KARAPINAR et al., 2013).

2.1.7 Espectrofotometria de absorvância

A espectrofotometria de absorvância é uma técnica analítica em que as concentrações de substâncias são determinadas por direcionar um feixe de luz através de uma solução contendo a substância a ser detectada, ou um produto desta substância, e em seguida medindo a quantidade de luz que as partes absorvem (WEISER, 2022).

Um espectrofotômetro de absorvância básico segue os componentes da imagem abaixo (Figura 4.). Várias fontes de luz podem ser utilizadas, com a escolha sendo baseada na porção do espectro e questões desejadas como a longevidade da lâmpada. Normalmente, o comprimento de onda escolhido é aquele em que a absorvância máxima ocorre. Entretanto, alguns comprimentos de ondas podem ser escolhidos para minimizar interferências, como por exemplo, a hemoglobina e a bilirrubina, que podem estar presentes no soro devido a hemólise *in vitro* ou *in vivo* (WEISER, 2022).

Figura 4. Componentes de um espectrofotômetro de absorvância simples



Fonte: Weiser (2022).

Na medicina veterinária, há descrições de trabalhos que fazem comparações entre a concentração de lactato plasmático no analisador bioquímico

automatizado e no lactímetro portátil (TEIXEIRA-NETO et al., 2011; KARAPINAR et al., 2013; NYE et al., 2016; NOSAN et al., 2017). Entretanto, não há relatos sobre a utilização do lactímetro portátil para uso no LCE em grandes animais, somente em cães (NYE, MARIANI; 2018)

A validação de um lactímetro portátil seria um facilitador nos casos de atendimentos neurológicos a campo, com a praticidade de obter um resultado dentro de poucos minutos, e auxiliar nos diagnósticos diferenciais.

REFERÊNCIAS

ABEYSEKARA, S.; NAYLOR, J.M.; WASSEF, A.W.A.; ISAK, U.; ZELLO, G.A. D-Lactic acid-induced neurotoxicity in a calf model. **The American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**. v.293, p.558-565, 2007.

ALBANESE, M.; ZAGAGLIA, S.; LANDI, D.; BOFFA, L.; NICOLETTI, C.G.; MARCIANI, M.G.; MANDOLESI, G.; MARFIA, G.A.; BUTTARI, F.; MORI, F.; CENTONZE, D. Cerebrospinal fluid lactate is associated with multiple sclerosis disease progression. **Journal of Neuroinflammation**. v.13, p.36-42, 2016.

ANDRADE, D.G.A.; CERRI, F.M.; BARBOSA, G.V.M.; BASSO, R.M.; TAKAHIRA, R.K.; PANTOJA, J.C.F.; OLIVEIRA-FILHO, J.P.; BORGES, A.S. Sequential cerebrospinal fluid sampling in horses: comparison of sampling times and two different collection sites. **Journal of Equine Veterinary Science**. v.108, 103794, 2022.

BRASIL. 2020. Agencia IBGE notícias. Disponível em <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/31725-rebanho-bovino-cresce-1-5-e-atinge-218-2-milhoes-de-cabecas-em-2020>> Acesso em 18 fev. 2022.

BRAUN, U.; ATTIGER, J.; BRAMMERTZ, C. Ultrasonographic examination of the spinal cord and collection of cerebrospinal fluid from the atlanto-occipital in cattle. **BMC Veterinary Research**. p.1-7, 2015.

CAINES, D.; SINCLAIR, M.; WOOD, D.; VALVERDE, A.; DYSON, D.; GAITERO, L.; NYKAMP, S. Evaluation of cerebrospinal fluid lactate and plasma lactate concentrations in anesthetized dogs with and without intracranial disease. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.77, p.297-302, 2013.

CHEN, Z.; WANG, Y.; ZENG, A.; CHEN, L.; WU, R.; CHEN, B.; CHEN, M.; BO, J.; ZHANG, H.; PENG, Q.; LU, J.; MENG, Q.H.; The clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid d-lactate for bacterial meningitis. **Clinica Chimica Acta**. V.413, p.1512-1515, 2012.

CHODOBSKI, A.; SZMYDYNGER-CHODOBSKA, J.; MCKINLEY, M.J. Cerebrospinal fluid formation and absorption in dehydrated sheep. **The American Physiological Society**. p.235-238, 1998.

CORLEY, K.T.T.; DONALDSON, L.L.; FURR, M.O. Arterial lactate concentration, hospital survive, sepsis and SIRS in critically ill neonatal foals. **Equine Veterinary Journal**. v.37, n.1, p.53-59, 2005.

CURTI, J.M.; QUEIROZ, G.R.; PEREIRA, P.F.V.; ANJOS, M.C.; FLAIBAN, K.K.M.C.; LISBÔA, J.A.N. L- lactate in cerebrospinal fluid can be used as a biomarker of encephalitis in cattle. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.84, p.146-152, 2020.

D'ANGELO, A.; MINISCALCO, B.; BELLINO, C.; BORMIDA, S.; BORRELLI, A.; MAURELLA, C.; RIONDATO, F.; BIOLATTI, C.; CAGNASSO, A. Analysis of cerebrospinal fluid from 20 calves after storage for 24 hours. **Veterinary Record**. v.164, p.491-493, 2009.

DE LAHUNTA. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. In: _____. **Veterinary neuroanatomy and clinical neurology**. Elsevier, 2009, p. 54-76.

DIMAS, L.F.; PUCCIONI-SOHLER, M. Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. **Journal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.44, p.97-106, 2008.

FRY, M.M.; VERNAU, W.; KASS, P.H.; VERNAU, K.M. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. **The Veterinary Clinical Pathology**. v.35, p.72-77, 2006.

GILLESPIE, I.; ROSENSTEIN, P.G.; HUGHES, D. Update: Clinical use of plasma lactate. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal**. v.47, p.325-342, 2017.

GOOF, J.P. Treatment of calcium, phosphorus and magnesium balance disorders. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.15, p.619-639, 1999.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. Bioquímica clínica de glicídeos. In: _____. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006. p.153-210.

GREEN, E.; CONSTANTINESCU, G. Equine cerebrospinal fluid: analysis. **Compendium on continuing education for the practicing veterinarian**. v.15, p.288-302, 1993.

GRILLE, P.; TORRES, J.; PORCIRES, F.; BAGNULO, H. Value of cerebrospinal fluid lactate for the diagnosis of bacterial meningitis in postoperative neurosurgical patients. **Neurocirurgia**. v.23, n.4, p.131-135, 2012.

HERBOWSKI, L. The maze of the cerebrospinal fluid Discovery. **Anatomy Research International**. 1-9, 2013.

INAO, S.; MARMAROU, A.; CLARKE, G.; ANDERSEN, B.; FAOUROS, P.P.; YOUNG, H.F. Production and clearance of lactate from brain tissue, cerebrospinal fluid and serum following experimental brain injury. **Journal of Neurosurgical**. v.69, p.736-744, 1988.

ISERNHAGEN, A.J.; COSENZA, M.; COSTA, M.C.; MÉDICI, K.C.; BALARIN, M.R.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; ALFIERI, A.A.; LISBÔA, J.A.N. Asymptomatic encephalitis in calves experimentally infected with bovine herpesvirus-5. **The**

Canadian Veterinary Journal. v.52, p.1312-1318, 2011.

KARAPINAR, T.; KAYNAR, O.; HAYIRLI, A.; KOM, M. Evaluation of 4 point-of-care units for the determination of blood l-lactate concentration in cattle.

Journal of Veterinary Internal Medicine. v.27, p.1596-1603, 2013.

LIGUORI, C.; STEFANI, A.; SANCESARIO, G.; SANCESARIO, G.M.; MARCIANI, M.G.; PIERANTOZZI, M. CSF lactate levels, proteins, cognitive decline: a dynamics relationship in Alzheimer's disease. **Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry.** p.01-05, 2014.

LIVRAMENTO, J.A.; MACHADO, L.R. The history of cerebrospinal fluid analysis in Brazil. **Arquivo de Neuropsiquiatria.** v.71, p. 649-652, 2013.

MANUAL DE INSTRUÇÕES DA ACCUTREND® PLUS. [Acesso 05/08/2021].

Disponível em:

https://betastatic.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/healthcare/technicaldocuments/user-manuals/roche-accutrend-plus-users-manual.pdf

MARIANI, C.L.; NYE, C.J.; RUTERBORIES, L.; TOKARZ, D.A.; GREEN, L.; LAU, J.; ZIDAN, N.; EARLY, P.J.; MUÑANA, K.R.; OLBY, N.J.; LEE, C.S.; GUEVAR, J. Cerebrospinal fluid lactate concentrations in dogs with seizure disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** p.1-9, 2020.

MASKIN, L.P.; CAPPARELLI, F.; MORA, A.; HLAVNIKA, A.; ORELLANA, N.; DÍAZ, M.F.; WAINSZTEIN, N.; DEL CASTILLO, M. Cerebrospinal fluid lactate in post-neurosurgical bacterial meningitis diagnosis. **Clinical Neurology and Neurosurgery.** v.115, p.1820-1825, 2013.

NAGY, D.W. Diagnostics and ancillary tests of neurologic dysfunction in the ruminant. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** v.33, n.2, p.9-18, 2017.

NILES, G.A. Toxicoses of the ruminant nervous system. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.** v.33, n.2., p.111-138, 2017.

NOSAN, A.; MCLAUCHLAN, G.; FLAHERTY, D.; BELL, A. Evaluation of three commercially available point-of-care monitors for assessment of blood lactate concentration in dogs. **BSAVA Congress 2017 proceedings.** p.537, 2017.

NYE, C.J.; MUSULIN, S.E.; HANEL, R.M. MARIANI, C.L. Evaluation of the lactate plus monitor for plasma lactate concentration measurement in dogs. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.** p.1-5, 2016.

NYE, C.J.; MARIANI, C.L. Validation of a portable monitor for assessment of cerebrospinal fluid lactate in dogs. **Veterinary Clinical Pathology.** v.47, p.108-114, 2018.

OLIVEIRA, J.P.; MENDES, N.T.; MARTINS, A.R.; SANVITO, W.L. Líquido cefalorraquidiano: história, técnicas de coleta, indicações, contra-indicações e

complicações. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v.56, p.1-11, 2020.

QUEIROZ, G.R.; RIBEIRO, R.C.L.; ROMÃO, F.T.N.M.A; FLAIBAN, K.K.M.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; LISBÔA, J.A.N. Intoxicação espontânea de bovinos por *Senna obtusifolia* no estado do Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, p.1263-1271, 2012.

QUEIROZ, G.R.; OLIVEIRA, R.A.M.; FLAIBAN, K.K.M.C.; DI SANTIS, G.W.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; HEADLEY, S.A.; ALFIERI, A.A.; LISBÔA, J.A.N. **Diagnóstico diferencial das doenças neurológicas dos bovinos no estado do Paraná**. v.38, p.1264-1277, 2018.

SAKUSHIMA, K.; HAYASHINO, Y.; KAWAGUCHI, T.; JACKSON, J.L.; FUKUHARA, S. Diagnostic accuracy of cerebrospinal fluid lactate for differentiating bacterial meningitis from aseptic meningitis: A meta-analysis. **Journal of Infection**. v.62, p.255-262, 2011.

SCOTT, P.R. Diagnostic techniques and clinicopathologic findings in ruminant neurologic disease. **The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.20, p.215-230, 2004.

SMITH, M.O.; GEORGE, L.W.; MIDDLETON, J.R. Cerebrospinal Fluid. In: SMITH, B.P.; METRE, D.C.V.; PUSTERLA, N. **Large Animal Internal Medicine**. Elsevier, 6 ed, 2019, p. 4291-4298.

ST-JEAN, G.; YVORCHUK-ST JEAN, K.; ANDERSON, D.E.; MOORE, W.E. Cerebrospinal fluid constituents collected at the atlanto-occipital site of xylazine hydrochloride sedated, healthy 8-week-old Holstein calves. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.61, p.108-112, 1997.

STOBER, M. Sistema Nervoso Central. In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.; STOBER, M. **Exame Clínico dos Bovinos**. Guanabara Kogan, 1993, p.341-362.

STOKOL, T.; DIVERS, T.J.; ARRIGAN, J.W.; MCDONOUGH, S.P. Cerebrospinal fluid findings in cattle with central nervous system disorders: a retrospective study of 102 cases (1990-2008). **Veterinary Clinical Pathology**. v.38, p.103-112, 2009.

TEIXEIRA-NETO, A.R.; BOTELHO, R.G.; SOUSA, K.E.; GOMES, J.L.; LIMA, E.M.M. Ineficácia do aparelho portátil accurend plus na clínica médica de equinos. **ARS Veterinária**. v.27, p.17-21, 2011.

TENNENT-BROWN, B.S. Interpreting lactate measurement in critically ill horses: diagnosis, treatment and prognosis. **Compendium Continuing Education for Veterinarians**. p.E1-E6, 2012.

TERLIZZI, R.D.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal fluid in companion animals: Part I – Function and composition. **The Veterinary Journal**. v.172, p.422-431, 2006.

TERLIZZI, R.D.; PLATT, S. The function, composition and analysis of cerebrospinal

fluid in companion animals: Part II – Analysis. **The Veterinary Journal**. v.180, p.15-32, 2009.

TUMANI, H.; JOBS, C.; BRETTSCHEIDER, J.; HOPFNER, A.C.; KERLING, F.; FAUSER, S. Effect of epileptic seizures on the cerebrospinal fluid – A systematic retrospective analysis. **Epilepsy Research**. v.114, p.23-31, 2015.

VERNAU, W.; VERNAU, K.A.; BAILEY, C.S. Cerebrospinal Fluid. In: KANEKO, J.J. HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Academic press, 2008, p.769-819.

WEISER, G. Laboratory Technology for veterinary medicine. In: THRALL, M. A. et al. (Eds.). **Veterinary Hematology, Chemistry and Cytology**. 3 ed., ROCA, 2022. p. 3-29.

WELLES, E.G.; TYER, J.W.; SORJONEN, D.C.; WHATLEY, E.M. Composition and analysis of cerebrospinal fluid in clinically normal adult cattle. **American Journal of Veterinary Research**. v.53, n.11,1992, p.2050-2057.

3 HIPÓTESE

H₀: A concentração de lactato no LCE não difere se mensurado pelo lactímetro portátil e pelo analisador bioquímico automatizado nos bovinos, caprinos e ovinos sadios.

H₁: A concentração de lactato no LCE difere se mensurado pelo lactímetro portátil e pelo analisador bioquímico automatizado nos bovinos, caprinos e ovinos sadios.

H₀: A concentração de lactato no LCE não é estável se conservado sob refrigeração a 4°C ou congelação a -20°C em bovinos, caprinos e ovinos sadios.

H₁: A concentração de lactato no LCE é estável se conservado sob refrigeração a 4°C ou congelação a -20°C em bovinos, caprinos e ovinos sadios.

H₀: A composição eletrolítica do LCE de bovinos, caprinos e ovinos não se altera se conservado sob refrigeração a 4°C por 72 horas ou sob congelação a -20°C por até 12 meses.

H₁: A composição eletrolítica do LCE de bovinos, caprinos e ovinos altera-se se conservado sob refrigeração a 4°C por 72 horas ou sob congelação a -20°C por até 12 meses.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a conservação, a estabilidade e comparar métodos de mensuração de lactato no líquido cerebrospinal de bovinos, caprinos e ovinos sadios.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a estabilidade do líquido cerebrospinal refrigerado e congelado de bovinos, caprinos e ovinos sadios

Comparar a concentração de lactato no lactímetro portátil e no analisador bioquímico automatizado no líquido cerebrospinal de bovinos, caprinos e ovinos sadios.

6 ARTIGO A – CONSERVATION, STABILITY, AND COMPARISON OF METHODS TO DETERMINE THE LACTATE CONCENTRATION IN THE CEREBROSPINAL FLUID OF HEALTHY GOATS AND SHEEP

Conservation, stability, and comparison of methods to determine the lactate concentration in the cerebrospinal fluid of healthy goats and sheep

Abstract

Cerebrospinal fluid (CSF) analysis provides significant *antemortem* information to clinicians in order to direct their diagnoses, especially for encephalitis cases. This study aimed to evaluate the conservation, stability, and methods for determining the concentration of lactate in the cerebrospinal fluid of healthy goats and sheep. Twenty CSF samples from goats (n=10) and sheep (n=10) were collected and evaluated. CSF was collected by puncturing the atlanto-occipital space under sedation. After collection, the samples were distributed in seven aliquots according to their analysis times (refrigerated at 4°C: 0, 24, 48, and 72 h; frozen at -20°C: 3, 6, and 12 months). Physical, biochemical (protein, glucose, and lactate), and cellular analyses were performed on the refrigerated samples. The lactate and electrolyte concentrations (sodium, potassium, and chloride) were measured in the frozen samples. The lactate concentration was measured using a portable lactometer and biochemical analyzer to validate the method. Analysis of variance bifactorial was used to compare the different analysis times, methods and interaction of them in each species, and the Bland–Altman test was used to observe whether there was agreement between the methods evaluated. Portable lactometer and biochemical automatic analyzers tested in the present study are not concordant methods in the CSF of goats and sheep; therefore, their use is not recommended. The CSF samples showed stability in terms of density, protein, glucose, and cellularity for 72 h under refrigeration at 4°C and in electrolyte concentration for 12 months when frozen at -20°C. The lactate concentration was stable for 3 months in goats and 12 months in sheep, as determined using a biochemical analyzer.

Keywords: diagnosis, encephalitis, stability, lactate.

1 Introduction

Cerebrospinal fluid (CSF) is a biological fluid in direct contact with the central nervous system. CSF is classified as an ultrafiltrate, produced in the choroid plexus, and is responsible for providing structural support to the brain (De Lahunta, 2009). The collection and analysis of CSF is a fundamental complementary exam in neurological care, as it provides *antemortem* information about diseases, especially in cases of encephalitis (Scott, 2004; Nagy, 2017).

Routine analysis of CSF samples provides information about the cellularity, density, and concentrations of proteins and glucose. In addition, other components can be measured, including electrolyte, sodium (Na^+), potassium (K^+), and chloride (Cl^-) levels (Scott, 2004; Nagy, 2017). Lactate concentrations are also clinically important in CSF samples. In humans, the concentration of lactate in the CSF is used as a biomarker to differentiate between viral and bacterial encephalitis, which helps in patient care (Chen et al., 2012; Grille et al., 2012; Maskin et al., 2013; Xiao et al., 2016). In veterinary medicine, lactate concentration in the CSF has recently been used in clinical practice (Caines et al., 2013; Curti et al., 2020; Mariani et al., 2020). It is known that cattle with viral and bacterial encephalitis have an increase in lactate concentration (Curti et al., 2020); however, information about lactate concentrations in the CSF of goats and sheep is lacking.

In dogs, the Lactate Plus[®] portable lactometer has been validated for the measurement of lactate in CSF in samples immediately after collection and after being refrigerated for up to 48 hours (Nye and Mariani, 2018). The collection and analysis of CSF is part of typical veterinary practice when providing neurological care; however, sending the sample to the clinical pathology laboratory is time consuming when the distance between the field and laboratory is extensive. Thus, the hypothesis of the present study is that a portable lactometer can be used in routine veterinary practice to facilitate the measurement of lactate in CSF. This study aimed to evaluate the conservation and stability of samples and compare the methods

used to determine the lactate concentration in the CSF of healthy goats and sheep under refrigeration and freezing conditions.

2 Materials and methods

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Estadual de Londrina (No. 9621.2019.04).

2.1 Animals

Twenty CSF samples from healthy goats (n=10) and sheep (n=10) were analyzed. The goats belonged to a herd from the Centro Universitário do Ingá, Maringá, Paraná, Brazil. Included nine non-pregnant and non-lactating females and one male. They were Saanen goats, were 14 months old, and their mean weight was 35.3 ± 7.5 kg. The animals were placed in a field of *Cynodon nlemfuensis*, fed pelleted feed (1% weight) (Cocari goats and sheep adults, Cocari, Mandaguari, Brazil) with probiotics (Organew, Vetnil), and had free access to water and mineral salt (Sal Rural Maringá, Cocamar, Maringá, Brazil). One day before sample collection, the goats were placed in collective stalls without water or food for 12 h.

The sheep belonged to a herd from the Veterinary Teaching Hospital of the Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brazil. Included non-pregnant and non-lactating adult and crossbred females weighing a mean of 41.4 ± 2.6 kg. The animals were placed in a field of *Cynodon dactylon* and received corn silage with free access to water and mineral salt (Ovinofós, Tortuga). One day before sample collection, the sheep were placed in single stalls without water or food for 12 h.

2.2 Data collection

Physical examinations were performed in all animals before data collection (Dirksen, 1993), including heart and respiratory rates, number of ruminal movements, rectal temperature, clinical assessment of mucosal collar, and capillary refill time. Only animals without abnormal physical examination results were included in the experiment. For CSF collection, the animals were sedated with 2% xylazine (0.1 mg/kg of body weight [BW]) intramuscularly and kept in right lateral recumbency. After shaving and antisepsis, CSF was collected in dry tubes (Eppendorf Tubes; Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) by puncturing the atlanto-occipital space using an 18-gauge 5.1 cm catheter stylet (Queiroz et al., 2012). CSF was collected by spontaneous dripping totaling 4.0 mL of total volume. Immediately after collection, the CSF was placed in an isothermal box with ice to maintain the temperature at 4°C and was evaluated at most two hours after collection.

2.3 Laboratory procedures

The total volume of CSF was distributed in seven aliquots of 500 µL. The first sample was analyzed within two hours after collection (time 0 (0 h)), the refrigerated samples (4°C) were evaluated at 24, 48, and 72 h, and the frozen samples (-20°C) were evaluated after 3, 6, and 12 months.

The samples at 0 h and the refrigerated samples were evaluated for color and appearance, and cell counts were performed in a Fuchs-Rosenthal chamber. The concentrations of glucose (Glucose Flex) and protein (Urinary/Cerebrospinal Fluid Protein Flex) were determined by enzymatic colorimetric methods using a biochemical automatic analyzer (Dimension Xpand Plus; Siemens).

The CSF lactate concentrations were measured using a portable lactometer (Accutrend Plus, Roche) and enzymatic colorimetric assays based on the oxidation of lactate to pyruvate

(Lactic acid Flex, Siemens) in a biochemical automatic analyzer (Dimension Xpand Plus, Siemens). The concentrations of Na⁺, K⁺, and Cl⁻ were measured using the selective ion electrode method (QuickLYTE Integrated Multisensor; Siemens).

2.4 Statistical methods

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effect for time in cases in which the variables presented a Gaussian distribution. For lactate concentrations repeated-measures analysis of variance was used to test the effects of time, equipment and interaction between them the two factors (time and equipment). Tukey's test was used when the F-statistic was significant. The agreement between the methods was evaluated using the Bland–Altman test. For CSF red blood cells and total nucleated cells, the Kruskal–Wallis test were used. Pearson's correlation coefficient was used to verify the relationship between the portable lactometer and the biochemical automatic analyzer. The data are presented as mean and standard error of the mean (SEM) or median and percentiles 25 and 75 in the non-parametric distribution. An error probability of 5% was allowed. BioEstat 5.0 and SPSS were used to perform the statistical analyses.

3 Results

The CSF analysis in the goats and sheep revealed stability of protein and glucose concentrations, density, and cellularity when refrigerated at 4°C for 72 h (Table 1) and stable electrolyte concentrations when frozen at -20°C for 12 months (Table 2).

Table 1 – Goat and sheep CSF sample biochemical analysis and cellularity at 0 h and after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C. The data were presented with mean and SEM or median and percentile 25 and 75 in the non-parametric distribution.

	0h	24h	48h	72h	SEM	P
Goats						
Glucose (mg/dL)	46.2	46.6	46.4	46.4	0.57	0.99
Protein (mg/dL)	24.7	24.4	24.4	24.3	0.47	0.99
Density	1007.6	1007.2	1007.2	1007.0	0.15	0.597
TNC (µL)	3.5 (1.0 to 4.25)	3.5 (1.0 to 5.0)	4.5 (2.0 to 8.75)	1.5 (1.0 to 5.25)	-	0.27
RBC (µL)	122.0 (13.0 to 2056.2)	129.5 (11.5 to 2389.2)	113.5 (21.5 to 2649.0)	74.5 (5.2 to 264.0)	-	0.90
Sheep						
Glucose (mg/dL)	48.2	48.1	47.3	45.5	0.98	0.76
Protein (mg/dL)	21.85 (19.57 to 38.1)	22.15 (19.45 to 38.15)	22.65 (20.75 to 38.15)	22.9 (21.40 to 46.62)	-	0.99
Density	1006.4	1006.8	1006.4	1006.4	0.13	0.68
TNC (µL)	1.0 (1.0 to 3.5)	2.0 (1.0 to 2.25)	1.0 (1.0 to 3.0)	2.5 (1.0 to 5.0)	-	0.72
RBC (µL)	108.5 (2.0 to 528.5)	287.0 (2.25 to 1557.25)	274.5 (14.5 to 2361.0)	289.5 (3.0 to 2686.0)	-	0.93

TNC: total nucleated cells; RBC: red blood cells

Table 2 – Concentration of electrolytes in CSF samples from healthy goats and sheep at 0 h, after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C, and after 3, 6, and 12 months of being frozen at -20°C. The data were presented with mean and SEM.

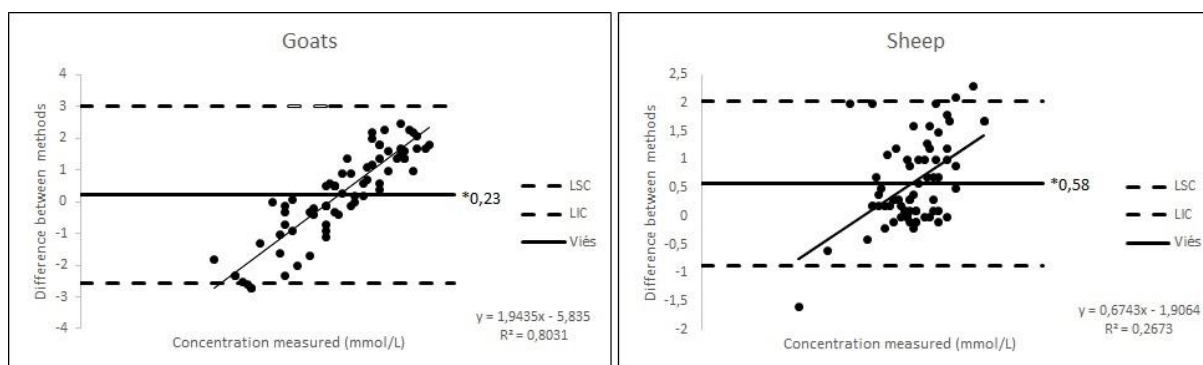
	0h	24h	48h	72h	3m	6m	12m	SEM	P
Goats									
Na ⁺ (mmol/L)	143.1	144.1	142.8	142.6	142.1	140.8	143.5	0.39	0.70
K ⁺ (mmol/L)	2.92	2.93	2.96	2.87	2.91	2.88	2.90	0.01	0.67
Cl ⁻ (mmol/L)	128.5	129.9	128.55	127.22	131.2	126.8	127.11	0.34	0.53
Sheep									
Na ⁺ (mmol/L)	146.3	146.4	145.6	145.6	141.71	144.8	142.4	0.27	0.91
K ⁺ (mmol/L)	2.96	2.95	2.94	2.94	2.89	2.97	2.96	0.005	0.98
Cl ⁻ (mmol/L)	129.62	129.13	128.0	128.75	126.29	131.66	125.5	0.25	0.94

In goats, the lactate concentration in the CSF determined using the portable lactometer differed between the evaluated time points ($p < 0.001$) (Table 3). It showed stability up to 48 h after collection, after which it showed a slight increase at 72 h, and with freezing (-20°C), the concentration decreased. When using the automatic biochemical analyzer, the samples remained stable for 12 months under freezing conditions.

In sheep, the concentration of lactate in the CSF determined using the portable lactometer also showed a difference between the evaluated time points ($p < 0.001$). It remained stable for up to 72 h after refrigeration, but after freezing (-20°C), there was an increase in concentration when compared to previous periods. The automated biochemical analyzer showed stability throughout the refrigerated and frozen periods up to 12 months after collection.

Validation of the portable lactometer was not possible, as in both goats and sheep, the Bland–Altman analysis showed non-agreement between methods (Figure 1), which corroborates the findings of the ANOVA bifactorial test.

Figure 1 –Bland–Altman plot of healthy goats and sheep, respectively, in the CSF



LSC: upper limit of agreement

LIC: lower limit of agreement

Viés: mean difference between methods

There was no correlation between the portable lactometer and automated biochemical analyzer results in goats ($r=-0.220$; $p=0.06$); however, the results in sheep had a mean correlation ($r=0.457$; $p<0.001$).

The results showed that it was possible to estimate the physiological range of lactate concentrations in the CSF of goats and sheep. In goats and sheep, a range of 2.26 to 3.38 mmol/L and from 2.72 to 4.24 mmol/L can be admitted, respectively.

All the animals that underwent CSF collection recovered from sedation without complications within 2 h. In the samples collected, 2/20 were reddened on physical examination due to a puncture accident.

Table 3 – Lactate concentrations in the CSF of healthy goats and sheep measured using a portable lactometer (PL) and automated biochemical analyzer (ABA). The data were presented with mean and SEM.

CSF	0h	24h	48h	72h	3m	6m	12m	SEM	P
Goats									
PL (mmol/L)	3.71 ^{Ab}	3.86 ^{Ab}	4.4 ^{Aab}	4.82 ^{Aa}	2.70 ^{Ac}	1.37 ^{Ad}	1.80 ^{Ad}	0,15	<0.0001
ABA (mmol/L)	2.9 ^{Ba}	3.0 ^{Ba}	2.97 ^{Ba}	2.97 ^{Ba}	2.87 ^{Aa}	3.36 ^{Aa}	2.97 ^{Aa}	0,03	
Sheep									
PL (mmol/L)	3.71 ^{Ab}	3.62 ^{Ab}	3.36 ^{Abc}	3.31 ^{Ab}	4.60 ^{Aa}	4.27 ^{Aab}	5.01 ^{Aa}	0,09	<0.0001
ABA (mmol/L)	3.48 ^{Aa}	3.54 ^{Aa}	3.41 ^{Aa}	3.34 ^{Aa}	3.32 ^{Ba}	3.39 ^{Ba}	3.32 ^{Ba}	0,05	

Different superscript letters, uppercase in column and lowercase in line, indicate statistical difference ($P < 0.05$).

SEM: Standard error of mean

4 Discussion

In this study, the portable lactometer (PL) was not validated for measuring the concentration of lactate in the CSF of goats and sheep because when the Bland–Altman analysis and ANOVA bifactorial were applied, the methods were not in agreement. In dogs, the PL results were validated when samples were refrigerated at 4°C for up to 48 hours after collection. However, after freezing at -20°C or -80°C, the samples' stability changed (Nye and Mariani, 2018). Based on these results, the same cannot be said for small ruminants.

Although the PL was not feasible for use with CSF, the device demonstrated stability in lactate values in samples from goats and sheep that were refrigerated at 4°C for 48 h and 72 h, respectively. The results of the automated biochemical analyzer (ABA) were reliable in goats and in sheep for 12 months after being frozen at -20°C, which is the standard method.

In humans, the CSF lactate concentration is stable for 3 days at room temperature, for 21 days when refrigerated at 4°C, and for 21 days when frozen at -20°C. These results

demonstrate that the compounds have high stability and are not easily degradable. However, the study did not describe the method used for measurements (Zhang, 2015).

A possible explanation for the different results between the evaluated methods can be elucidated by measuring lactate levels. While the PL uses reflectance photometer observations, the ABA uses absorbance spectrophotometry as the method of analysis. The reflectance photometer observation method is based on a test in which the intensity of the color on the test strip is measured after illumination by a LED, in which the intensity of the light reflected by a dye with a detector is calculated, resulting in an enzymatic reaction involving a constituent, such as lactate (Accutrend® Plus Instruction Manual, 2012). The absorbance spectrophotometry method consists of measuring the intensity absorbed light absorbed by a chemical substance when a beam of light passes through the solution in the sample. The basic principle is that each compound absorbs transmitted light within a certain wavelength range (Compri-Nardy et al., 2009).

From the results obtained, the CSF is stable when refrigerated for 72 h in terms of density, total cell count (leukocytes and erythrocytes), protein and glucose concentration. When frozen for 12 months, the CSF is stable in terms of electrolytes (Na^+ , K^+ , and Cl^-) in healthy small ruminants. The literature recommends that analysis of CSF be carried out up to 30–60 min later at most, as cell degradation occurs later (Scott, 2004; Fry et al., 2006; Vernau et al., 2008); however, the results here contradict this information. Studies in dogs (Fry et al., 2006), healthy cattle, and in those with encephalitis (D'angelo et al., 2009; Bellino et al., 2015) have reported a stability up to 48 h after collection in terms of total cell and protein count and used autologous serum for cell preservation. The certainty of stability in the samples reassures veterinarians who collect CSF because regardless of the distance from the laboratory, reliable results can be obtained if the sample is properly stored. The present study did not evaluate cell morphology, as CSF samples from healthy animals with low cell numbers were evaluated and

the differential leukocyte count is recommended when there are at least 20 leukocytes to characterize the predominance of cells (Vernau et al., 2008; Scott, 2010; Nagy, 2017). In addition, the amount of CSF was small to perform cell morphology. The authors chose to worsen other analyses.

In the CSF, the presence of erythrocytes is associated with a puncture accident or intracranial hemorrhage; thus, no erythrocytes are expected when acquiring samples methodically (Scott, 2004; Vernau et al., 2008; Nagy, 2017). Here, the animals had a high median number of red blood cells due to a puncture accident at the time of collection. This is common in small ruminants, as the atlanto-occipital space is small and any movement causes bleeding into the leptomenigeal vessels.

The protein concentration and density remained within normal physiological standards for the species studied (Scott, 2010; Scott, 2013; Smith et al., 2019; Nagy, 2017), which provides security in the refrigerated results up to 72 h after collection. The concentration remained stable in all ruminants; however, in sheep, the physiological range is from 48 to 109 mg/dL (Smith et al., 2019), and it was possible to observe mild hypoglycorrhachia after 48 h of refrigeration. This finding may be related to the consumption of glucose by the blood cells present in the sample.

The determination of lactate concentration in the CSF of small ruminants presents important information such that, in the future, it will be possible to conduct studies in animals with neurological diseases and determine any increases in viral and bacterial encephalitis, as in cattle (Curti et al., 2020).

The present study's results provide important information for clinicians who collect CSF, as proof of the stability of the sample under refrigeration at 4°C for up to 72 h guarantees safety and precision in the data.

The authors acknowledge the limitations of this study, which include the small number

of CSF samples analyzed. However, this study provides new information on the conservation and stability of CSF components under refrigeration and freezing, as well as the lactate concentration in the CSF of goats and sheep. Although no studies have assessed lactate concentrations in small ruminants with encephalitis, it is believed that there may also be increases in encephalitis in these cases and that lactate measurement is a possible diagnostic method. In cattle, the concentration of lactate in the CSF can be used as a biomarker, with values above 3.6 mmol/L indicating encephalitis (Curti et al., 2020). Consequently, studies with animals affected by viral and bacterial encephalitis may be conducted in the future to elucidate any differences between the methods evaluated, in addition to verifying any increase in the CSF lactate concentrations of small ruminants.

5 Conclusion

In conclusion, the PL and biochemical analyzer devices are not concordant methods for CSF assessment; therefore, the use of a PL is not recommended for measuring lactate in the field. CSF components such as protein and glucose concentrations, density, and cellularity demonstrate stability for 72 h under refrigeration, and electrolytes remain stable for 12 months under freezing conditions.

Author's contribution

Curti, J.M. performed the experiment, provides clinical data, carried out laboratory analysis, performed statistical analyses and wrote the manuscript. Gil, C.A., Fracasso, C., Camilo, S.L.O and Pereira, P.F.V. performed the experiment. Alves, L.S.S. carried out laboratory analysis. Flaiban, K.K.M.C designed and supervised the experiment, carried out laboratory analysis and revised the manuscript

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

Curti, J.M. was supported by grant of the Brazilian Federal Government through Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) by one year.

References

- Bellino, C., Miniscalco, B., Bertone, L., Cagnasso, A. Occhiena, E., Gianella, P., D'Angelo, A., 2015. Analysis of cerebrospinal fluid from cattle with central nervous system disorders after storage for 24 hours with autologous sérum. *BMC Vet Res.* 11, 1-5.
- Caines, D., Sinclair, M., Wood, D., Valverde, A., Dyson, D., Gaitero, L., Nykamp, S., 2013. Evaluation of cerebrospinal fluid lactate and plasma lactate concentrations in anesthetized dogs with and without intracranial disease. *Can J Vet Res.* 77, 297-302.
- Chen, Z., Wang, Y., Zeng, A., Chen, L., Wu, R., Chen, B., Chen, M., BO, J., Zhang, H., Peng, Q., Lu, J., Meng, Q.H., 2012. The Clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid d-lactate for bacterial meningitis. *Clin Chim Acta.* 413, 1512-1515.
- Compri-nardy, M., Stella, M.B., Oliveira, C. 2009. *Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica.* Guanaraba Koogan, 1st.

Curti, J.M., Queiroz, G.R., Pereira, P.F.V., Anjos, M.C., Flaiban, K.K.M.C., Lisbôa, J.A.N. 2020. L-lactate in cerebrospinal fluid can be used as a biomarker of encephalitis in cattle. *Can. Vet. J.* 84,146-152.

D'Angelo, Miniscalco, B., Bellino, C., Bormida, S., Borrelli, A., Maurella, C., Riondato, F. 2009. Analysis of cerebrospinal fluid from 20 calves after stored for 24 hours. *Vet Rec.* 164, 491-493.

De Lahunta, 2009. Veterinary neuroanatomy. In:____. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. Elsevier, pp.54-76.

Dirksen, G., 1993. Exame do sistema digestivo. In: Dirksen, G., Grunder, H.D., St'ober, M. (Eds.), Rosenberger: Exame clínico dos Bovinos. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp. 166–193.

Fry, M.M., Vernau, W., Kass, P.H., Vernau, K.M. 2006. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin Path.* 35, 72-77.

Grille, P., Torres, J., Porcires, F., Bagnulo, H. 2012. Value of cerebrospinal fluid lactate for the diagnosis of bacterial meningitis in postoperative neurosurgical patients. *Neurocirurgia.* 23, 131-135.

Manual de instruções da Accutrend® Plus. [Acesso 05/08/2021]. Disponível em: https://betastatic.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/healthcare/t

technicaldocuments/user-manuals/roche-accutrend-plus-users-manual.pdf

Mariani, C.L, Nye, C.J., Ruterbories, L., Tokarz, D.A., Green, L., Lau, J., Zidan, N., Early, P.J., Munãna, K.R., Olby, N.J., Lee, C.S, Guevar, J., 2020 Cerebrospinal fluid lactate concentrations in dogs with seizure disorders. *J Vet Inter Med.* 1-9.

Maskin, L.P., Capparelli, F., Mora, A., Hlavnicka, A., Orellana, N., Díaz, M.F., Wainsztein, N., Del Castillo, M., 2013. Cerebrospinal fluid lactate in post-neurosurgical bacterial meningitis diagnosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 115, 1820-1825.

Nagy, D.W., 2017. Diagnostics and ancillary tests of neurologic dysfunction in the ruminant. *Vet Clin Food Anim.* 33, 9-18.

Nye, C.J., Mariani, C.L., 2018. Validation of a portable monitor for assessment of cerebrospinal fluid lactate in dogs. *Vet Clin Pathol.* 47, 108-114.

Queiroz, G.R., 2012. Intoxicação espontânea de bovinos por *Senna obtusifolia* no Estado do Paraná. *Pesq Vet Bras.* 32, 1263-1271.

Scott, P.R., 2004. Diagnostic techniques and clinicopathologic findings in ruminant neurologic disease. *Vet Clin Food Anim.* 20, 215-230.

Scott, P.R., 2010. Cerebrospinal fluid collection and analysis in suspected sheep neurological disease. *Small Ruminant Research.* 92, 96-103.

Scott, P.R., 2013. Analysis of samples of cerebrospinal fluid, thoracic ultrasonography and arthrocentesis/radiography of joints as ancillary aids to clinical diagnosis and treatment in small ruminant practice. *Small Ruminant Research*. 110, 82-87.

Smith, M.O., George, L.W., Middleton, J.R., 2019. Cerebrospinal Fluid. In: Smith, B.P., Metre, D.C.V., Pusterla, N. *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier, 6ed, pp.4291-4298.

Vernau, W., Vernau, K.A., Bailey, C.S., 2008. Cerebrospinal Fluid. In: Kaneko, J.J. HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic press, pp.769-819.

Xiao, X., Zhang, Y., Zhang, L., Kang, P., Ji, N., 2016. The diagnostic value cerebrospinal fluid lactate for post-neurosurgical bacterial meningitis: a meta-analysis. *BMC Infect Dias*. 16, 1-9.

Zhang, L., Glaber, J., Payto, D., Wang, S., 2015. Stability of lactate and pyruvate in cerebrospinal fluid under typical clinical laboratory storage conditions. *Clin Biochem*. 48, 631-632.

7 ARTIGO B – EFFICACY OF A PORTABLE LACTOMETER TO MEASURE THE LACTATE CONCENTRATION IN CEREBROSPINAL FLUID OF HEALTHY CATTLE

Efficacy of a portable lactometer to measure the lactate concentration in cerebrospinal fluid of healthy cattle

Abstract

Introduction: Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) provides important *antemortem* information to the clinician, aiding in diagnosis, especially in cases of encephalitis. The aim of this study was to evaluate whether a portable lactometer can be used to measure lactate concentration in healthy cattle and the stability of the CSF.

Methods: Ten CSF samples from cattle were analyzed. CSF was collected by puncturing the atlanto-occipital space under sedation. After collection, the samples were distributed in seven aliquots determined according to the time of their analysis at 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h which remained refrigerated at 4°C, and 3, 6, and 12 months of storage at -20°C. In the refrigerated samples, physical, biochemical (protein and glucose), cellular, and lactate concentration analyses were performed. In the frozen samples, the concentration of electrolytes: sodium (Na⁺), potassium (K⁺), chloride (Cl⁻), and lactate were measured. Analysis of variance was used to compare the different moments, and the Bland-Altman test was used to observe whether there was an agreement between the methods evaluated.

Results: The portable lactometer and biochemical analyzer are not concordant methods for the CSF of cattle. The CSF showed stability for 72h under refrigeration at 4°C in density, protein and glucose concentrations, and cellularity for 12 months under freezing at -20°C. The equipment presented differences at all moments; however, in the PL, the lactate concentration was stable for 12 months and 72 h in cattle in the automated biochemical analyzer, the gold standard.

Conclusion: The results of this study indicate that a portable lactometer cannot be used to measure the concentration of lactate in the CSF of healthy cattle, although the PL was stable at all time points.

Keywords: Freezing, encephalitis, refrigeration, bovine.

1. Introduction

The collection and analysis of cerebrospinal fluid (CSF) is a part of the neurological care of cattle with neurological signs, and it is an *antemortem* examination that helps determine the definitive diagnosis, especially in cases of encephalitis.^{1,2}

There are two different locations for CSF collection: in the atlanto-occipital or lumbosacral space; sedation is necessary.³ Physical evaluation, cellularity, density, and concentration of protein and glucose are evaluated in the CSF sample. In addition, other components such as electrolytes: sodium (Na^+), potassium (K^+), and chloride (Cl^-) can be measured.^{1,2}

Lactate concentration is used in medicine to differentiate viral meningitis from bacterial meningitis in children,⁴ and it can also be used as a biomarker for bacterial meningitis after craniotomy.⁵ In veterinary medicine, lactate concentration in the CSF is rarely used, and the work is focused on dogs with neurological diseases.^{6,7} However, it was found that lactate can be used as a biomarker in cattle with encephalitis.⁸

The gold standard for measuring the concentration of lactate in biological fluids is the automated biochemical analyzer (ABA); however, the availability of a portable device helps obtain data and avoids packaging the sample. CSF collection in ruminants is commonly performed in the field, and samples are stored in an isothermal box and later sent to the clinical laboratory. Given this fact, this work aims to elucidate whether the portable lactometer can be used to measure lactate concentration in healthy cattle and the stability of the CSF.

2. Materials e methods

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), under protocol 9621.2019.04.

2.1. Animals

Ten CSF samples from cattle were evaluated. The animals came from the herd of the Centro Universitário Ingá (UNINGÁ), composed of non-pregnant and non-lactating females of the Nelore breed, aged approximately 20 months and weighing 330.50 ± 36.80 kg. Feeding management consisted of staying in a paddock of *Cynodon nlemfuensis* with free access to water and protein mineral salts (Rural Proteico, SRM Nutrição Animal[®]). On the eve of harvest, cattle were placed in a corral for water and food fasting for 12 h.

All cattle underwent physical examination to ensure that they were healthy at the time of collection. Physical examinations included heart and respiratory rates, body temperature, ruminal movements, mucosal staining, and capillary refill time.

2.2 Data collection

For collection, the animals were sedated with 2% xylazine 0.1 mg/kg intravenously, placed in the right lateral decubitus position, and restrained with the aid of ropes. Trichotomy and antisepsis were performed by degerming chlorhexidine and alcohol, followed by collection in the atlanto-occipital space using a 5 cm 18-G metallic needle. The initial volume was discarded, and 4.0 mL of total volume was subsequently collected in a dry tube (Eppendorf Tubes; Thermo Fisher Scientific, São Paulo, Brazil) and stored by spontaneous dripping. Immediately after collection, the CSF was placed in an isothermal box with disposable ice to maintain a temperature of 4°C. The samples were evaluated no more than 2 h after collection.

2.3 Laboratory procedures

CSF samples were distributed in seven 500 μ L aliquots. The first analysis was performed within two hours after collection, and at time 0 (0 h), refrigerated samples (4°C) were evaluated at 24 h, 48 h, and 72 h, and frozen samples (-20°C) were evaluated after 3, 6, and 12 months.

Samples from time 0 h and refrigerated samples were evaluated in terms of color and appearance. Erythrocytes and nucleated cells were counted in a Fuchs Rosenthal chamber. Glucose (Siemens, Glucose Flex[®]) and protein (Siemens, Urinary/Cerebrospinal Fluid Protein Flex[®]) concentrations were determined by colorimetric enzymatic methods using an automatic biochemical analyzer (Dimension Xpand Plus[®], Siemens).

In all the fresh, refrigerated, and frozen samples, the Na⁺, K⁺, and Cl⁻ electrolytes and the lactate concentration were measured. Electrolyte analysis was performed using the ion-selective electrode method in an electrolyte and blood gas analyzer (Rapid Point[®], Siemens). Lactate concentration was measured using a portable lactometer (PL) (Accutrend Plus[®], Roche) and using the colorimetric method, enzymatic test (Siemens Flex[®] reagent cartridge) with spectrophotometric reading using a biochemical analyzer (Dimension Clinical Chemistry System; Siemens), the gold standard in the study, at different time points.

2.4 Statistical methods

Analysis of variance (ANOVA) was used to compare the effect for time in cases in which the variables presented a Gaussian distribution. For lactate concentrations repeated-measures analysis of variance was used to test the effects of time, equipment and interaction between them the two factors (time and equipment). Tukey's test was used when the F-statistic was significant. The agreement between the methods was evaluated using the Bland–Altman test. For CSF red blood cells and total nucleated cells, the Kruskal–Wallis test were used. Pearson's correlation coefficient was used to verify the relationship between the portable lactometer and

the biochemical automatic analyzer. The data are presented as mean and standard error of the mean (SEM) or median and percentiles 25 and 75 in the non-parametric distribution. An error probability of 5% was allowed. BioEstat 5.0 and SPSS were used to perform the statistical analyses.

Results

In this study, it was observed that the CSF from cattle were stable for the concentrations of protein, glucose, density, and cellularity under refrigeration at 4°C for 72 h (Table 1), and for the concentrations of electrolytes frozen at -20°C for 12 months (Table 2).

Table 1- Cattle CSF sample biochemical analysis and cellularity at 0h and after 24, 48, and 72 h of refrigeration at 4°C. The data were presented with mean and SEM or median and percentile 25 and 75 in the non-parametric distribution.

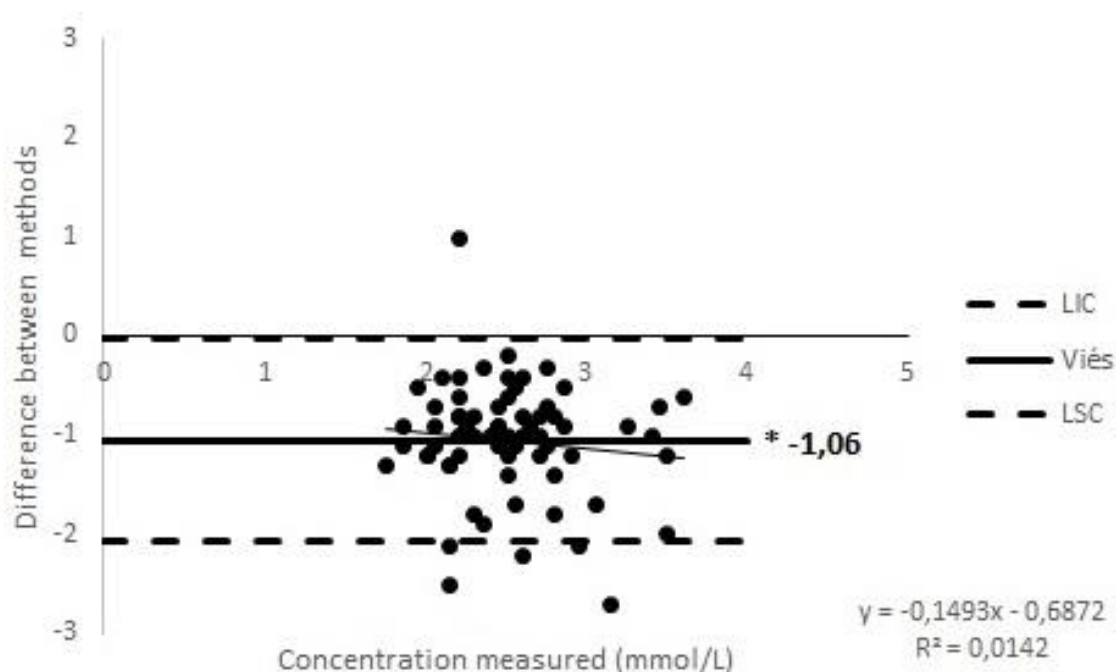
	0h	24h	48h	72h	SEM	P
Glucose (mg/dL)	57.6	58.2	58.7	58.6	1.50	0.99
Protein (mg/dL)	34.6	34.8	35.2	34.5	1.64	0.99
Density	1,007.5	1,007.6	1,008.0	1,007.7	0.10	0.50
TNC (μL)	6.5 (4.75 to 13.75)	5.5 (4.5 to 12.5)	4.0 (3.0 to 12.2)	4.5 (4.0 to 16.5)	-	0.96
RBC (μL)	7.5 (4.2 to 3575.7)	7.0 (5.2 to 4197.7)	4.5 (3.0 to 12097.7)	2.0 (1.25 to 3977.0)	-	0.42

TNC: total nucleated cells; RBC: red blood cells.

PL cannot be used in the CSF of cattle because the methods did not agree after the

Bland-Altman analysis (Figure 1). There was no Pearson's correlation between PL and ABA ($r=0,187$; $p=0,12$) in Pearson's correlation.

Figure 1- Bland-Altman plot of cattle healthy in the CSF



LSC: upper limit of agreement
 LIC: lower limit of agreement
 Vies: mean difference between methods

The lactate concentration in ABA remained stable for 72 h, that is, the entire period in which the CSF was kept refrigerated at 4°C. In the PL, the lactate concentration remained stable throughout the evaluation period, refrigerated, and frozen (Table 2).

All animals that participated in the study recovered well from sedation, in a period of 3 h, and returned to the station position with food intake. Among the CSF samples collected, one was red and two were light yellow. In the analysis, all had an increase in the number of red blood cells, indicating a puncture accident.

Table 2- Concentration of electrolytes in the CSF of healthy cattle at 0 h, 24 h, 48 h, 72 h refrigerated at 4°C, and 3, 6, and 12 months frozen at -20°C. The data were presented with mean and SEM.

	0h	24h	48h	72h	3m	6m	12m	SEM	P
Na ⁺ (mmol/L)	138.6	139.4	138.5	139.0	139.4	138.6	138.9	0,30	0.98
K ⁺ (mmol/L)	2.8	2.9	2.9	2.9	2.8	2.8	2.8	0,01	0.99
Cl ⁻ (mmol/L)	123.7	123.9	124.1	124.2	122.1	122.4	121.6	0,33	0.17

Table 3- Lactate concentrations in the CSF of healthy cattle measured using a portable lactometer (PL) and automated biochemical analyzer (ABA). The data were presented with mean and SEM.

Lactate (mmol/L)	0h	24h	48h	72h	3m	6m	12m	SEM	P
PL	2.15 ^{Ba}	1.98 ^{Ba}	1.85 ^{Ba}	1.78 ^{Ba}	1.95 ^{Ba}	1.79 ^{Ba}	2.33 ^{Ba}	0.05	<0,001
ABA	2.83 ^{Ab}	2.9 ^{Aab}	2.87 ^{Ab}	2.96 ^{Aab}	3.52 ^{Aa}	3.38 ^{Aab}	2.80 ^{Ab}	0.06	

Different superscript letters, uppercase in line and lowercase in column, indicate statistical differences (P< 0.05).

Discussion

In this study, the PL was not validated to measure the concentration of lactate in the CSF because when applied to the Bland-Altman analysis, the methods did not agree. These results may be related to the use of different lactate concentration measurement methods. The PL uses observation by a reflectance photometer and the automated ABA uses absorbance spectrophotometry.^{9,10} The basic difference between the methods is that the spectrophotometer allows the measurement in the spectrum of all wavelengths, whereas the photometer isolates a specific wavelength of light.¹⁰ In dogs, the Lactate Plus PL has been validated for samples freshly collected and stored for up to 48 h refrigerated at 4°C; however, this monitor uses an

enzymatic amperometry method to determine extracellular lactate in biological fluids. This method includes an electrochemical lactate oxidase biosensor to determine the production of hydrogen peroxide resulting from the oxidation of L-lactate to pyruvate, generating an electrical current proportional to the lactate concentration in the sample.¹¹

Although the PL device has not been validated for CSF, its results demonstrated stability throughout the period evaluated, both in samples refrigerated at 4°C and in samples frozen for 12 months at -20°C. The stability of the PL allows determining a reference range for its use, which comprises from 1.73 to 2.57 mmol/L, lower results are expected when measuring the concentration of lactate in the PL when compared to the ABA. ABA was shown to be stable in the refrigerated samples for up to 72 h, generating applicability in the measurement of CSF lactate in the routine of the veterinarians of large animals. One possible explanation for the increase in lactate concentration at 72 h and 3 months may be related to sample interference, with 3/10 cattle presenting reddish CSF, and the presence of hemoglobin in the samples hinders the reading by the absorbance spectrophotometer.

It can be seen that the CSF is stable when refrigerated for 72 h for density, total cell count (leukocytes and erythrocytes), protein and glucose concentration, and frozen for 12 months in the electrolytes Na⁺, K⁺, and Cl⁻. The literature recommends that CSF analysis should be performed within 30 to 60 min; after this period, cells begin to degrade,¹² however, the results found here contradict this information. Studies in sick dogs¹³ and cattle¹⁴ observed stability for up to 48 h after collection of total cell and protein concentrations and used autologous serum for cell preservation. In this study, the cell morphology was not evaluated because the CSF samples were obtained from healthy animals, which have a low number of cells. Differential leukocyte counts were performed in cases of pleocytosis to characterize the predominance of cells.¹²

Electrolyte concentrations were within the physiological standard for the species

throughout the experimental work.¹⁵ In addition, knowing the physiological range and stability of electrolytes is important. As an increase in Na⁺ concentration above 160 mmol/L closes the diagnosis of salt poisoning in cattle, this condition generates neurological signs similar to polioencephalomalacia.²

Protein and glucose concentrations remained within physiological standards for the species², which provide security in refrigerated results up to 72 h after collection.

Physiologically, it is expected that red blood cells are not present in the CSF; however, the most common cause of erythrocytes is a puncture accident in the leptomeningeal vessels.^{1,2} In this study, a median of 7 red blood cells/ μ L was attributed to a puncture accident during procedure collection.

The authors acknowledge the limitations of this study, which include the small number of CSF samples analyzed and the non-evaluation of cell morphology. Further studies are needed to elucidate the stability of the CSF in ruminants with different central nervous system disorders, since the alterations in the CSF vary according to the disease and the degree of lesions in the brain.¹² The authors are not aware of the results of stability for longer periods in cattle, and therefore, this study is an original contribution.

Conclusion

It can be concluded that the PL cannot be used to measure the concentration of lactate in the CSF of healthy cattle; however, stability was observed in the PL, and a confidence interval was suggested for its use. It was shown that it is possible to collect the CSF sample and send it for analysis within 72 h under refrigeration at 4 °C.

References

1. Scott, P.R. Diagnostic techniques and clinicopathologic findings in ruminant neurologic disease. *Vet Clin Food Anim.* 2004; 20: 215-230.
2. Nagy, D.W. Diagnostics and ancillary tests of neurologic dysfunction in the ruminant. *Vet Clin Food Anim.* 2017; 33: 9-18.
3. De Lahunta. Veterinary neuroanatomy. In:____. Cerebrospinal fluid and hydrocephalus. Elsevier, 2009, pp.54-76.
4. Chen, Z., Wang, Y., Zeng, A., Chen, L., Wu, R., Chen, B., Chen, M., BO, J., Zhang, H., Peng, Q., Lu, J., Meng, Q.H.,. The Clinical diagnostic significance of cerebrospinal fluid d-lactate for bacterial meningitis. *Clin Chim Acta.*2012;413:1512-1515.
5. Li, Y., Zhang, G., Ma, R., et al. The diagnostic value of cerebrospinal fluids procalcitonin and lactate for the differential diagnosis of post-neurosurgical bacterial meningitis and aseptic meningitis. *Clin Biochem.*2015;48,50–54.
6. Caines, D., Sinclair, M., Wood, D., Valverde, A., Dyson, D., Gaitero, L., Nykamp, S.,. Evaluation of cerebrospinal fluid lactate and plasma lactate concentrations in anesthetized dogs with and without intracranial disease. *Can J Vet Res.*2013; 77:297-302.
7. Mariani, C.L, Nye, C.J., Ruterbories, L., Tokarz, D.A., Green, L., Lau, J., Zidan, N., Early, P.J., Munãna, K.R., Olby, N.J., Lee, C.S, Guevar, J., 2020 Cerebrospinal fluid lactate concentrations in dogs with seizure disorders. *J Vet Inter Med.* 1-9.
8. Curti, J.M., Queiroz, G.R., Pereira, P.F.V., Anjos, M.C., Flaiban, K.K.M.C., Lisbõa, J.A.N. L-lactate in cerebrospinal fluid can be used as a biomarker of encephalitis in cattle. *Can. Vet. J.*2020; 84:146-152.

9. Manual de instruções da Accutrend® Plus. [Acesso 05/08/2021]. Disponível em: https://betastatic.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/healthcare/technicaldocuments/user-manuals/roche-accutrend-plus-users-manual.pdf
10. Compri-nardy, M., Stella, M.B., Oliveira, C. 2009. Práticas de Laboratório de Bioquímica e Biofísica. Guanaraba Koogan, 1st.
11. Toffaletti JG. Measurement and Clinical Interpretation of Whole Blood Lactate Concentration. Bedford, A:Instrumentation Laboratory;2003:1-4.
12. Vernau, W., Vernau, K.A., Bailey, C.S., 2008. Cerebrospinal Fluid. In: Kaneko, J.J. HARVEY, J.W., BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Academic press, pp.769-819.
13. Fry, M.M., Vernau, W., Kass, P.H., Vernau, K.M. Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. Vet Clin Path. 2006; 35:72-77.
14. Bellino, C., Miniscalco, B., Bertone, L., Cagnasso, A. Occhiena, E., Gianella, P., D'Angelo, A.. Analysis of cerebrospinal fluid from cattle with central nervous system disorders after storage for 24 hours with autologous serum. BMC Vet Res. 2015;11:1-5.
15. Welles EG, Tyler JW, Sorjonen DC, Whatley EM. Composition and analysis of cerebrospinal fluid in clinically normal adult cattle. Am J Vet Res 1992;53:2050-2057.

1 8 CONCLUSÕES

2 Conclui-se, portanto, que o LP e o ABA não são métodos
3 concordantes para o LCE em bovinos, caprinos e ovinos. Desta forma a utilização do
4 lactímetro portátil testado neste estudo não é recomendada para a mensuração do
5 lactato a campo. Entretanto, nos bovinos observa-se uma estabilidade no LP, e um
6 intervalo de confiança foi estabelecido de 1.73 a 2.57 mmol/L.

7 O LCE dos bovinos, caprinos e ovinos sadios é estável por 72 horas
8 refrigerado a 4°C para a contagem total de células (leucócitos e hemácias), densidade,
9 concentração de proteínas e glicose e congelados a -20°C por 12 meses para os
10 eletrólitos. Já a concentração do lactato no LCE no ABA demonstra estabilidade nos
11 bovinos por 72 horas, nos caprinos por 3 meses e nos ovinos por 12 meses. Estes
12 dados geram segurança nos resultados avaliados após 60 minutos de colheita para o
13 clínico de grandes animais.

14 Maiores estudos são necessários com ruminantes acometidos por
15 encefalites para avaliação da estabilidade.

1 **9 PERSPECTIVAS FUTURAS**

2 O presente trabalho foi desenvolvido com animais saudáveis, não foi,
3 portanto, realizada a mensuração da concentração do lactato em animais acometidos
4 por doenças do sistema nervoso central, bem como a comparação do lactímetro
5 portátil e analisador bioquímico nestas condições. Estes estudos são importantes para
6 determinar se há aumento da concentração de lactato nos pequenos ruminantes, e
7 para validação, ou não, do lactímetro portátil. Da mesma maneira, se faz importante o
8 estudo da estabilidade do LCE em animais acometidos por doenças neurológicas, pois
9 com o aumento da proteína e pleocitose pode ter alterações significativas nos
10 resultados obtidos do presente trabalho.

11 Em estudos futuros, se faz importante, dividir em doenças de causa
12 inflamatória (doenças virais e bacterianas) e não inflamatória, além de aumentar o
13 número observacional.

14 A disseminação de informações relevantes por meio dos resultados
15 de pesquisas, estimula a busca e a aquisição de conhecimento por médicos
16 veterinários, aumentando a prática da colheita e análise do LCE em casos
17 neurológicos com resultados que auxiliam no diagnóstico a campo.

18

19


- 1
- 2
- 3
- 4
- 5
- 6
- 7
- 8
- 9
- 10
- 11
- 12
- 13
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37

ANEXOS

ANEXO A

Aprovação e registro na comissão de ética no uso de animais (CEUA/UEL)

1
2
3
4



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 155/2019 Londrina, 05 de novembro de 2019.

Prezado (a) professor (a),

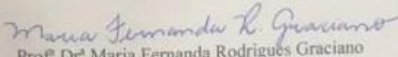
Certificamos que o adendo do projeto de pesquisa intitulado: "**Validação de lactímetro portátil para mensuração em sangue venoso e líquido cefalorraquidiano de bovinos, ovinos e caprinos sadios**" protocolo CEUA n° 9621.2019.04 sob a responsabilidade de **Karina Keller Marques da Costa Flaiban**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) em reunião realizada no dia **05/11/2019**.

Este projeto tem por objetivo verificar se o lactímetro portátil pode ser empregado para a mensuração no sangue venoso e no líquido cefalorraquidiano de bovinos, ovinos e caprinos sadios. Grau de invasividade: 2.

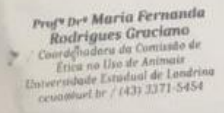
Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/12/2019 a 01/08/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Caprino Saanen e Ovino mestiço
N° de animais	Caprino: 10 (2 machos e 8 fêmeas) Ovino: 10 (2 machos e 8 fêmeas)
Peso/ Idade	40 Kg/ adulto
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Ovinos: Rebanho do Hospital Veterinário da UEL Caprinos: Fazenda Santa Marta, localizada no município de Londrina/PR
Amostras a serem coletadas	Líquido cefalorraquidiano e sangue venoso

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.



Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL



Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a), Karina Keller Marques da Costa Flaiban
Responsável pelo projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
C/C para a Chefia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCA
C/C para a Direção do Centro de Ciências Agrárias

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 002 - Fone (41) 3371-4000 FAX: Fone 3338-4440 - Caixa Postal 19.081 - CEP 86057-970 - Internet: http://www.uel.br
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

5
6
7
8
9

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
OF. CIRC. CEUA N° 107/2019

Londrina, 08 de Agosto de 2019.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Validação de lactímetro portátil para mensuração em sangue venoso e líquido cefalorraquidiano de bovinos sadios**" protocolo CEUA n° 9621.2019.04 sob a responsabilidade de **Karina Keller Marques da Costa Flaiban**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **08/08/2019**.

Este projeto tem por objetivo verificar se o lactímetro portátil pode ser empregado para a mensuração no sangue venoso e no líquido cefalorraquidiano de bovinos sadios. Grau de invasividade: GI2.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa científica
Vigência da autorização	08/08/2019 a 01/06/2021
Espécie/ linhagem/ raça	Bovino/ Mestiço
N° de animais	10 (2 Machos e 8 Fêmeas)
Peso/ Idade	300 kg
Sexo	Machos (2) Fêmeas (8)
Origem	Rebanho do Hospital Veterinário da UEL
Amostras a serem coletadas	Líquido cefalorraquidiano, sangue venoso

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UEL

**Profª Drª Maria Fernanda
 Rodrigues Graciano**
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais
 Universidade Estadual de Londrina
 ceua@uel.br / (13) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Karina Keller Marques da Costa Flaiban
Responsável pelo projeto

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCA

C/C para a Chefia do Depto. Medicina Veterinária Preventiva /CCA

C/C para a Direção de Centro do CCA

C/C para o HV/CCA