



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**VALIDACIÓN DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE CETOSIS SUBCLÍNICA  
DURANTE EL POSPARTO DE VACAS LECHERAS**

**Por**

**DOTTI RIVA, Natalia  
FERNÁNDEZ GUERRA, Sebastián**

TESIS DE GRADO presentada como uno  
de los requisitos para obtener el título de  
Doctor en Ciencias Veterinarias.  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2020**

T6  
964

# PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. MSc. PhD. Luis Albornoz

Segundo miembro (Tutor):

Dra. MSc. Tatiana Morales Piñeyrúa

Tercer miembro:

Dra. MSc. Elena de Torres Tajés

Cuarto miembro (Cotutor)

Dra. MSc. PhD. Gretel Ruprechter Schölderle

Fecha:

18/12/2020

Autores:

Br. Natalia Dotti Riva

Br. Sebastián Fernández Guerra

S20672 Donacion Contad 10/6/2020 2021.

FACULTAD DE VETERINARIA  
Aprobado con M (one) 101

34 253

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer a todas aquellas personas que de alguna u otra manera han hecho de este sueño una realidad.

A nuestras familias y de manera especial a nuestros padres, Gustavo Fernández, Mabel Guerra, Sebastián Dotti y Mariela Riva, que siempre estuvieron al pie del cañón, en los buenos y no tan buenos momentos.

A nuestra tutora Tatiana Morales y a nuestra cotutora Gretel Ruprecht por su dedicación, experiencia, profesionalismo y amabilidad en el transcurso de este trabajo.

Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, a sus técnicos y funcionarios, en especial a la familia López por brindarnos sus instalaciones, conocimientos y su excelente predisposición que resultaron de gran ayuda y motivación.

Al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal de Facultad de Veterinaria que cumplió un rol fundamental en la realización de este trabajo.

También a docentes y amigos que esta casa de estudio nos regaló y de alguna u otra manera aportaron su granito de arena para nuestra formación como personas y profesionales.

Es difícil poder plasmar con palabras los sentimientos de haber cumplido esta etapa que está llegando a su final, pero como dice el maestro, “El camino es la recompensa” y estamos agradecidos de que así haya sido.

A todos los que hicieron posible que hoy estemos culminando esta etapa, permitiéndonos que comience otra con muchas expectativas.

Muchas gracias...

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	3
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS .....	5
1 - RESUMEN.....	6
2 - SUMMARY .....	8
3 - INTRODUCCIÓN .....	9
4 - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	11
4.1 Período de transición de la vaca lechera .....	11
4.2 Balance energético negativo .....	11
4.3 Cetosis .....	12
4.3.1 Etiopatogenia y epidemiología.....	13
4.3.2 Diagnóstico de cetosis subclínica.....	15
5 - HIPOTESIS.....	19
6 - OBJETIVOS .....	19
6.1 Objetivo general .....	19
6.2 Objetivos específicos.....	19
7 - MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
7.1 Animales y manejo.....	20
7.2 Determinaciones.....	20
7.2.1 Determinación de AcAc en orina.....	20
7.2.2 Determinación de BHB en sangre.....	21
7.2.3 Determinación de BHB y composición de la leche .....	22
7.3 Análisis estadístico.....	22
8 - RESULTADOS.....	24
8.1 Asociación entre pruebas diagnósticas de cetosis subclínica.....	24
8.2 Características operativas de las pruebas diagnósticas.....	25
9 - DISCUSIÓN .....	27
10 - CONCLUSIONES .....	30
11 - BIBLIOGRAFÍA .....	31

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
<b>Figura 1:</b> Interacciones entre el sistema inmunológico, endocrino y metabólico en vacas lecheras durante el período de transición	12
<b>Figura 2:</b> Tira reactiva Multistix® 10SG (Siemens, Alemania) y la escala de referencia sugerida por el fabricante para interpretar los resultados.	21
<b>Figura 3:</b> Curvas ROC para el diagnóstico de cetosis subclínica para dos pruebas: tiras reactivas en orina (orina) y determinación de [BHB] en leche con FTIR (leche).	26
<b>Cuadro 1:</b> Características operativas de las diferentes pruebas diagnósticas para cetosis subclínica evaluados por distintos autores.	18
<b>Cuadro 2:</b> Tabla de contingencia 2X2 usada para los cálculos de los índices: sensibilidad (Se), especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).	23
<b>Cuadro 3:</b> Correlaciones entre las diferentes pruebas diagnósticas de cetosis subclínica y componentes de la leche.	24
<b>Cuadro 4:</b> Sensibilidad (Se), Especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de diferentes herramientas diagnósticas de cetosis subclínica [Concentración de AcAc en orina con tiras reactivas Multistix® 10SG, concentración de BHB en leche por FTIR (dos puntos de corte) y relación grasa-proteína en leche (G:P)]	25

## 1. RESUMEN

La cetosis es una de las patologías más prevalentes en los rodeos lecheros y conlleva a grandes pérdidas económicas, por lo que el diagnóstico temprano es especialmente importante. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar tres herramientas de diagnóstico de cetosis subclínica [tiras reactivas en orina Multistix® 10SG (Siemens®, Alemania); espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR); y relación grasa:proteína (G:P) de la leche] en vacas Holando, durante los primeros 20 días posparto. El trabajo se realizó en la Unidad de Lechería del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, “La Estanzuela”, Uruguay, durante dos años. Se utilizaron 101 vacas multíparas Holando, las cuales fueron evaluadas para el diagnóstico de cetosis subclínica, dos veces por semana desde el parto hasta el día 20 posparto. Se realizó un diagnóstico presuntivo de cetosis subclínica a través de la recolección de muestras de orina y medición de las concentraciones de Acetoacetato (AcAc) con tiras reactivas Multistix® 10SG. Luego de esto, se tomaron muestras de sangre de todos los animales, determinando la concentración de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) sanguíneo, considerada la prueba de referencia. Durante el ordeño, previo a la revisión clínica, se obtuvieron muestras de leche para determinación de BHB, grasa y proteína láctea con el método FTIR, y se calculó la relación G:P de la leche. Durante los dos años de evaluación la frecuencia de cetosis clínica fue 8,9% (9/101) y de 49,5% (50/101) para cetosis subclínica. La correlación entre las concentraciones de BHB en sangre y de AcAc en orina fue positiva ( $r=0,67$ ;  $P< 0,0001$ ), y se obtuvo una sensibilidad (Se) de 37,8% y una especificidad (Esp) de 94,4% para las tiras Multistix® 10SG. Por otro lado, se encontró una correlación positiva entre las concentraciones de BHB en sangre y BHB en leche ( $r=0,44$ ;  $P< 0,0001$ ). Al evaluar dos puntos de corte para la concentración de BHB en leche ( $\geq 0,07$  mmol/L y  $\geq 0,10$  mmol/L), se obtuvo una Se de 95,9% y Esp de 16,7% para el primer punto de corte; mientras que para el segundo la Se fue de 72,6% y la Esp de 62,1%. El punto de corte óptimo que se calculó en este trabajo para el diagnóstico de cetosis subclínica por el método FTIR en leche fue  $\geq 0,14$  mmol/L (Se= 75% y Esp= 60%). Las concentraciones de BHB en sangre se correlacionaron positivamente con el valor de relación G:P ( $r=0,19$ ;  $P=0,04$ ) a través de su relación con los % de grasa ( $r=0,22$ ;  $P=0,02$ ), no así con los de proteína ( $r=-0,04$ ;  $P<0,10$ ) de la leche. La Se de la relación G:P, para el diagnóstico de cetosis subclínica fue de 94,4% y la Esp de 16,2%. Si bien las tres herramientas evaluadas para diagnóstico de cetosis subclínica se asociaron con el diagnóstico por la prueba de referencia (concentración de BHB en sangre), el método de medición de BHB en leche con FTIR obtuvo

un mejor desempeño de diagnóstico que las tiras Multistix® 10SG, detectando mejor a los animales enfermos del rodeo. La utilización de la relación G:P como indicador de cetosis subclínica resultó condicionada al porcentaje de grasa en leche.

## 2. SUMMARY

Ketosis is one of the most frequent and costly metabolic disorders in dairy herds, so its early diagnosis is particularly important. The objective of this study was to evaluate three tools to diagnose subclinical ketosis in Holstein cattle [test strips Multistix® 10SG (Siemens, Germany); Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR); and milk fat:protein ratio (F:P)], during the first 20 days after calving. The work was made at Unidad de Lechería of Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, La Estanzuela, Uruguay), in a two-year period. One hundred one multiparous cows were clinically evaluated two times a week, from calving to day 20 postpartum. Urine Acetoacetate (AcAc) concentration were individually evaluated by test strips Multistix® 10SG. At the same time, blood samples were taken to determine serum  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB), it was considered the gold standard for Ketosis diagnosis. Individual milk samples were obtained during milking, previous clinical evaluation of the cows, to determine BHB, fat (F) and protein (P), using the FTIR technique. Also, milk F:P ratio was calculated. The frequency of clinical ketosis was 8.9% (9/101) and 46.5% (50/101) for subclinical ketosis during the two years of evaluation. The correlation between concentrations of blood BHB and urine AcAc was positive ( $r=0.67$ ;  $P<0.0001$ ). The sensitivity (Se) and specificity (Sp) for Multistix® 10SG were 37.8% and 94.4%, respectively. A positive correlation between concentrations of blood and milk BHB was found ( $r=0.44$ ;  $P<0.0001$ ), evaluating two cut-off points for BHB concentration in milk ( $\geq 0.07$  mmol/L y  $\geq 0.10$  mmol/L); the Se obtained was 95.9% and the Sp was 16.7% for the first cut-off point, and 72.6% and 62.1% for the second, respectively. The cut-off point optimal calculated in this study for the diagnosis of subclinical ketosis by FTIR method was  $\geq 0.14$  mmol/L (Se= 75% and Sp= 60%). The BHB concentrations in blood correlated positively with the milk F:P ratio ( $r=0.19$ ;  $P=0.04$ ), it was conditioned to fat percentage ( $r=0.22$ ;  $P=0.02$ ), since there was no correlation with protein percentage ( $r=0.04$ ;  $P<0.10$ ) in milk. The Se of G:P ratio for the subclinical ketosis diagnosis was 94.4% and the Sp 16.2 %. Although the three tools evaluated for subclinical ketosis diagnosis were associated with gold standard (concentration of BHB in blood), the best method was FTIR since it was able to detect effectively sick animals. The use of the milk F:P ratio as an indicator of subclinical Ketosis was conditioned by the percentage of fat in milk.



### 3. INTRODUCCIÓN

Uruguay ocupa el lugar número 45 en el ranking de producción mundial de leche con 2.110.000 toneladas producidas anualmente (INALE, 2018). La leche y sus derivados abarcan el 9% de todas las exportaciones (MGAP, 2019). En 2018, fueron exportadas 233.623 toneladas de productos lácteos (INALE, 2018), representando el 70% de lo producido en el país, siendo el 30% restante para consumo interno.

La lechería se extiende por todo el territorio nacional, siendo la llamada "Cuenca Lechera Sur" (departamentos de Canelones, Colonia, Florida y San José) donde se encuentra la mayor concentración de tambos del país (73% de los establecimientos) y la mayor parte de la producción (71% del volumen de leche producido) (MGAP, 2016). La superficie explotada por la producción lechera es de 754.000 hectáreas, siendo el 60% pasturas mejoradas (MGAP, 2019). De los 3.688 establecimientos lecheros que existen en Uruguay, 2.662 remiten a planta industrial. La producción total de leche comercial es de 2.173 millones de litros, remitiendo a planta 1.872 millones de litros/año.

Los sistemas lecheros de Uruguay se caracterizan por ser explotaciones de mediano porte, con un promedio de 250 hectáreas, 150 vacas en ordeño, y una producción de 18 litros de leche por vaca por día (INALE, 2014). Sin embargo, este sistema productivo ha sufrido un proceso de intensificación en la última década. Esta intensificación se ha dado a través de una mayor producción individual en una superficie menor; lo que se visualiza con el aumento de un 5,3% de la producción nacional entre 2002 y 2014, con una reducción en el número de explotaciones de un 3% anual (INALE, 2014). El sistema de alimentación característico es alimentación mixta (pasturas, reservas y suplementación) (Chilibroste, 2011). La estrategia se basa en un incremento significativo en el uso de concentrados y reservas de forraje (MGAP, 2009), principalmente en los períodos de baja producción de pasto (invierno), mientras que la cosecha directa de forraje por parte de los animales ha permanecido sin cambios significativos (Chilibroste y col., 2012). Este tipo de sistema de alimentación, aunque no se caracteriza por una alta intensificación, como lo son los sistemas totalmente confinados, presenta características propias que podrían generar animales propensos a alteraciones metabólicas, reproductivas y problemas de salud. Esto es dado principalmente por el desacople entre los requerimientos nutricionales de las vacas y la oferta de nutrientes proveniente de las pasturas, ya que la cantidad y calidad de estas últimas podrían ser insuficientes para sostener altas producciones marcadas por la genética animal (Chilibroste y col., 2012).

La problemática antes mencionada se hace aún más evidente durante el período de transición (PT), período que comprende desde la tercera semana preparto hasta la tercera semana postparto (Grummer, 1995). En este momento es donde ocurren la mayoría de los problemas de salud en la vaca, debido a la dificultad del animal para adaptarse al balance energético negativo (BEN) característico de este período (Ingvarsen, 2006). Las patologías mayormente observadas durante el PT están dadas por la alta movilización grasa (hígado graso, cetosis, acidosis ruminal), la mala utilización de los minerales (hipocalcemia) y la depresión del sistema inmune (retención de placenta, metritis y mastitis) (Esposito, 2014). La cetosis es una de las patologías de mayor prevalencia en los rodeos lecheros, siendo una enfermedad relevante debido a las pérdidas productivas que conlleva, así como los altos costos de tratamientos que genera (Corbellini, 2000; Van Saun, 2010). Su diagnóstico se realiza principalmente por el análisis de  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) en sangre (Cucunubo y col, 2013), el cual a pesar de ser el método de referencia presenta algunas limitaciones prácticas, como son el costo moderado, la capacitación adecuada para la recolección de muestras y el envío posterior a laboratorios de referencia para su determinación. Estas características del método podrían resultar en una desventaja para su aplicación rutinaria por parte de los productores. Por lo tanto, validar métodos diagnósticos alternativos, no invasivos y de menor costo podrían mejorar la adopción por parte de los productores lecheros de las herramientas, optimizando la detección temprana de la enfermedad.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1. Período de transición de la vaca lechera**

El período de transición es un período particularmente importante para la vaca lechera ya que durante este ocurren grandes modificaciones a nivel endócrino/metabólico que permiten que el animal se prepare para el parto y la lactogénesis (Grummer, 1995). Dichos cambios metabólicos están dados por el aumento repentino y marcado de los requerimientos de nutrientes para la producción de leche, en un momento en el que el consumo de materia seca (CMS) es menor al requerido (Drackley, 1999). A medida que avanza la edad gestacional, la demanda de energía, proteína y minerales aumenta, por un lado, por la demanda por parte del feto, y por otro por la formación del calostro y la leche (Goff y Horst, 1997), lo que lleva a un BEN. Por lo tanto, el manejo de la alimentación resulta crucial para la adaptación metabólica de la vaca lechera en el PT (Loor y col., 2007; Graugnard y col., 2013; Roche y col., 2013).

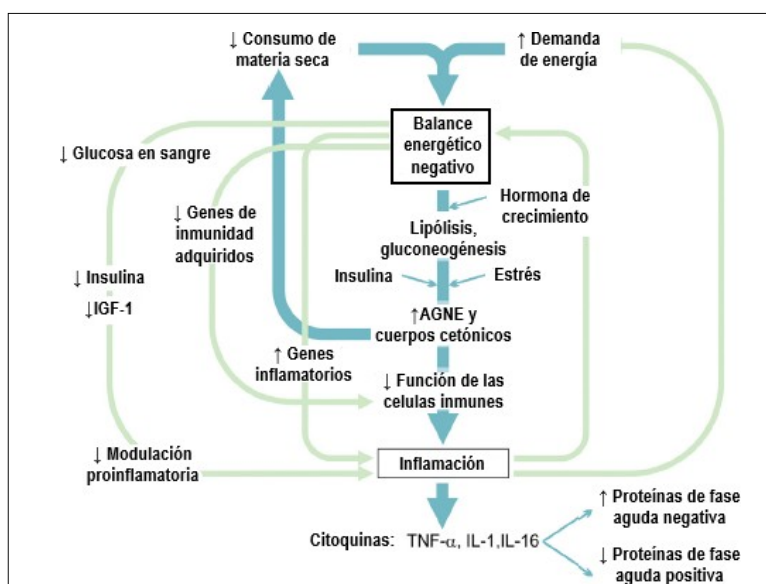
Los marcados cambios en el metabolismo y en el sistema inmune del animal, característicos del PT (Fig. 1), hacen a las vacas extremadamente susceptibles a distintas patologías digestivas, metabólicas e infecciosas (Ingvarsen y col., 2003; Lacetera y col., 2005; Sordillo, 2005; Ospina y col., 2010). Durante este período se producen el 75% de las enfermedades observadas en la lactancia (LeBlanc y col., 2005), siendo la cetosis, metritis, retención de placenta y de desplazamiento de abomaso las más importantes. Las prevalencias de estas enfermedades dependerán de muchos factores, entre ellos el tipo de producción. La aparición de cetosis clínica es observada principalmente en vacas lecheras de alta producción, con una prevalencia de 3,7% (Suthar y col., 2013); llegando al 52% para cetosis subclínica (Garzón Audor y Espinosa, 2018). Tres funciones básicas deben ser mantenidas durante el PT para evitar las enfermedades, la adaptación del rumen a la dieta de la lactancia (alta en energía), mantener los niveles normales de calcio en sangre y el buen funcionamiento del sistema inmunológico (Goff y Horst, 1997).

### **4.2. Balance energético negativo**

El BEN característico del PT se produce a causa de la disminución del CMS en el parto y primeras semanas posparto, y el incremento en la demanda energética para la producción de leche en el posparto, lo que conlleva a una movilización lipídica para suplir los requerimientos energéticos. Los requerimientos de energía neta de lactación (ENL) y proteína metabolizable en vacas sanas a los 4 días posparto exceden la ingesta en un 25%. Además, la

utilización de esta ENL y proteína para la producción de leche representa entre el 83 y el 97%, dejando así una muy baja cantidad disponible para las necesidades de mantenimiento de la vaca (Drackley, 1999). Durante las tres últimas semanas preparto, el CMS puede llegar a disminuir entre un 30 y un 35%, sin embargo, es en la semana posterior al parto donde el balance energético y proteico negativo es más acentuado (Grummer, 1995). El consumo de agua también está correlacionado con el CMS, por lo que en vacas con baja ingesta de agua se podría exacerbar el BEN (Goldhawk y col., 2009).

Las principales alteraciones debidas a lo expuesto anteriormente son la pérdida de condición corporal (Grummer y col., 2004), cambios en los perfiles metabólicos-hormonales (Bell, 1995; Meikle y col., 2013), aumento de incidencias de enfermedades e infertilidad (McArt y col., 2013; Aleri y col., 2016) pudiendo estar comprometido el bienestar animal (Logue y Mayne, 2014).



**Fig. 1.** Interacciones entre el sistema inmunológico, endocrino y metabólico en vacas lecheras durante el período de transición (modificado de Espósito, 2014).

#### 4.3. Cetosis

La cetosis es un trastorno multifactorial del metabolismo energético, que se caracteriza bioquímicamente por la presencia de hipoglucemia (baja en la concentración de glucosa en sangre) y cetonemia (acumulación de cuerpos cetónicos en sangre) (Radostits, 2002). La cetosis puede presentarse en forma clínica, o subclínica según la aparición de síntomas clínicos. Existen varios factores que predisponen al animal a presentar cetosis, entre ellas se

encuentra la paridad, ya que vacas multíparas son más susceptibles que vacas primíparas (McArt y col., 2013; Vanholder y col., 2015; Morales-Piñeyrúa y col., 2018). A pesar de que la cetosis se ha relacionado con una mayor producción de leche, Ingvarsen y col. (2003), determinaron que vacas con altas producciones no presentan mayor riesgo de esta enfermedad en el parto, sugiriendo que la patogénesis no está directamente relacionada con la producción de leche *per se*, sino con otras variables (Ingvarsen y col., 2006). Por otro lado, las enfermedades del parto frecuentemente están interrelacionadas y en este sentido, la cetosis se relaciona con la hipocalcemia, así como con la retención de placenta (Mulligan y Doherty, 2008).

#### 4.3.1. Etiopatogenia y epidemiología

Los rumiantes se diferencian de los monogástricos debido a las particularidades en la digestión ruminal de los nutrientes (Mann, McArt y Abuelo, 2019). Los rumiantes absorben muy pocos carbohidratos de la dieta en forma de hexosa, debido a que son fermentados en el rumen hasta ácidos grasos de cadena corta (ácidos grasos volátiles, AGV), principalmente acetato (70%), propionato (20%) y butirato (10%). En consecuencia, las necesidades de glucosa del rumiante deben ser satisfechas por la gluconeogénesis, dependiendo la producción hepática de glucosa, en gran medida de la concentración de los AGV en sangre (Mann, McArt y Abuelo, 2019). Los precursores glucogénicos cuantitativamente más importantes de este período son el propionato en primer lugar durante todo el PT, y en segundo lugar el lactato, relevante en la primera semana posparto (Larsen y Kristensen, 2013). Durante el PT, la concentración de estos precursores disminuye, comprometiendo la capacidad gluconeogénica del hígado. En ese momento, la vaca debe utilizar fuentes alternativas de energía, por lo tanto, aumenta el catabolismo de su tejido adiposo (Mann, McArt y Abuelo, 2019). La lipomovilización resulta en un incremento de la concentración plasmática de los ácidos grasos no esterificados (AGNE), que serán utilizados por el hígado para 1) su oxidación completa y producción de energía, 2) oxidación parcial a través de la cetogénesis [producción de cuerpos cetónicos: BHB, acetoacetato (AcAc) y acetona (Ac)], 3) esterificación a triglicéridos para empaquetamiento en lipoproteínas, o 4) almacenamiento de esos triglicéridos en el tejido hepático (Sun y col., 2016). Los cuerpos cetónicos resultan en una importante fuente de energía complementaria, y su aumento durante el BEN es normal dentro de ciertos rangos fisiológicos (Bell, 1995). El problema surge cuando su producción se vuelve excesiva debido a la oxidación parcial o incompleta de los AGNE (White, 2015).

La cetosis clínica se identifica por la aparición abrupta de signos clínicos digestivos o nerviosos (Baird, 1982; Duffield, 2000). Sin embargo, es posible clasificar en cetosis clínica si se presentan concentraciones de BHB en sangre mayores a 3,0 mmol/L aún sin signos clínicos aparentes. El cuadro digestivo representa del 85 a 95% de los casos (Cote y col., 1969). Las vacas presentan apetito selectivo (Herdt, 2000), reducción de la producción láctea, incremento de la pérdida de peso con la consecuente pérdida de condición corporal (Gillund y col., 2001). En muchos casos existe olor a acetona en la espiración y/o en la leche. También se puede observar heces secas, depresión moderada y rechazo a caminar (Fleming, 2006). La forma nerviosa representa entre el 5 y 15% de los casos (Cote y col., 1969). Las vacas presentan signos de inicio agudo, incluyendo salivación, masticación, andar tambaleante, incoordinación motora, ceguera, caminar en círculos, déficit propioceptivo, presión de la cabeza contra objetos, pica, hiperestesia, vocalización constante, temores moderados, tetania y algunas vacas pueden tornarse agresivas con las personas.

La cetosis subclínica se caracteriza por cambios bioquímicos en el animal, presencia de hipoglicemia y cetonemia, sin presencia de signos clínicos evidentes. Por lo tanto, para determinar si una vaca presenta cetosis subclínica es necesario medir la concentración de cuerpos cetónicos en sangre, la cual se define cuando los valores de BHB están entre 1,2 mmol/L y 3,0 mmol/L (Mann, McArt y Abuelo, 2019). Las principales consecuencias en el animal son la disminución de la producción láctea (1-9%), la reducción de la fertilidad (Walsh y col., 2007), y un mayor riesgo a otras enfermedades, incluyendo hígado graso, desplazamiento de abomaso y metritis (Suthar y col., 2013).

La alta prevalencia de esta patología en los rodeos lecheros, las pérdidas de producción y los costos de tratamiento y prevención, hacen que sea una patología relevante para el productor. McArt y col. (2012) reportaron que las vacas con cetosis subclínica pierden de 1,2 a 2,1 kg de leche/día en sus primeros 30 días de lactancia en comparación con vacas no afectadas en sistema intensivo de alimentación (TMR con 60% de forraje, 40% de concentrados). Otros estudios determinaron que las pérdidas de leche en 305 días de lactancia son entre 130 kg y 680 kg en vacas con cetosis subclínica (Duffield y col., 2009; Ospina y col., 2010). El 50% de las vacas lecheras pasan por un período temporal de cetosis subclínica en el primer mes de lactancia (Esposito, 2014), reportándose valores entre el 4% y el 52% (Garzón Audor y Espinosa, 2018). La incidencia también es variable según país y/o sistema de producción, por ejemplo, en sistemas en pastoreo es más baja (10-30%) que en sistemas confinados (12-60%)

(Garzón Audor y Espinosa, 2018). Tanto en sistemas confinados como pastoriles el pico de casos se observa entre la primera y la segunda semana posparto (McArt y col., 2012; Compton y col., 2014).

#### 4.3.2. Diagnóstico de cetosis subclínica

El diagnóstico de cetosis subclínica se realiza a través de la determinación de cuerpos cetónicos en sangre, leche y/u orina (Goff y Horst, 1997). La determinación de BHB plasmático es considerada la prueba de referencia (Cucunubo y col., 2013), ya que la concentración de BHB es más estable que la de Ac o AcAc (Työppönen y Kauppinen, 1980). La extracción de sangre para la determinación de BHB puede ser realizada tanto de la vena coccígea como de la yugular. Las diferentes técnicas para determinación de BHB en sangre ya han sido revisadas por algunos autores (Oetzel, 2004; Zhang y col., 2012), siendo la técnica de elección la espectrofotometría. Si bien se define como cetosis subclínica cuando BHB en sangre se encuentra entre 1,2 mmol/L y 3,0 mmol/L (Mann y col., 2019; Suthar y col., 2013), Duffield y col. (2009), establecieron el umbral de BHB en sangre con impacto en los animales, encontrando que las concentraciones séricas de BHB  $\geq 1,2$  mmol/L en la primera semana después del parto se asociaron con un mayor riesgo de desplazamiento de abomaso y metritis, y menor rendimiento de leche con mayor porcentaje de grasa y menor porcentaje de proteína.

Además del análisis de BHB en sangre realizado en un laboratorio, este se puede determinar al pie de la vaca con un medidor electrónico (Precision Xtra, Abbott®, Estados Unidos), obteniendo el resultado instantáneamente (Oetzel y McGuirk, 2010). La prueba presenta una sensibilidad entre 88 y 96,3% y una especificidad entre 96 y 98,2% para el valor umbral  $\geq 1,2$  mmol/L en sangre (Iwersen y col., 2009; Konkol y col., 2009).

Debido a la dificultad que conlleva extraer sangre a los animales y al ser una técnica invasiva, se han desarrollado otras pruebas para el diagnóstico de cetosis, las cuales determinan cuerpos cetónicos de forma cuali y/o cuantitativa en leche u orina (Enjalbert y col., 2001). Generalmente, para la medición de BHB se utiliza sangre o leche, siendo el AcAc más comúnmente evaluado en orina (Duffield, 2000; Krogh y col., 2011). Se han reportado altas correlaciones entre la concentración de BHB en sangre tanto con las concentraciones de BHB y AcAc en leche ( $r=0,66$  y  $0,62$ , respectivamente) (Enjalbert y col., 2001; Iwersen y col., 2009) como con la concentración de AcAc en orina ( $r=0,42$ ,  $P<0,05$ ) (Cucunubo y col., 2013). Sin embargo, a pesar de que existen estas correlaciones entre la cantidad de cuerpos cetónicos

en sangre, leche y orina, la sensibilidad y especificidad de las diferentes pruebas han sido muy variables (Geishauser y col., 2000; Oetzel, 2004; Iwersen y col., 2009) dependiendo de la técnica y/o el punto de corte para el diagnóstico de cetosis subclínica.

En el cuadro 1 se muestran las características operativas de diferentes pruebas diagnósticas para cetosis subclínica en vacas lecheras, evaluadas por distintos autores. Para la medición de cuerpos cetónicos en leche las pruebas semicuantitativas que existen son: tiras reactivas para determinación de BHB, o polvo de nitroprusiato de sodio para determinación de AcAc (prueba de Rothera) (Geishauser y col., 2000; Oetzel, 2004; Krogh y col., 2011; Tatone y col., 2016). Este último presenta un valor limitado debido a la poca sensibilidad para la determinación de cetosis en comparación con las pruebas de BHB en sangre y las tiras de BHB en leche (Oetzel, 2004; Carrier y col., 2004). Para el caso de las tiras reactivas de BHB en leche, la sensibilidad (2-90%) y la especificidad (93-99%) presentan una amplia variación según el punto de corte (Geishauser y col., 2000; Carrier y col., 2004). La tira reactiva disponible comercialmente más utilizada y validada es Keto-Test™ (Elanco, Greenfield, IN, EE. UU.) con una sensibilidad del 81,5% y una especificidad del 81,9%, cuando se utiliza el punto de corte sugerido por el fabricante ( $\geq 0.1$  mmol/L) relativo a los umbrales de referencia de 1,2 y 1,4 mmol/L en suero (Tatone y col., 2016). Por otro lado, existe la medición directa de BHB en leche, para la cual se han evaluado principalmente dos técnicas. Una de ellas es enzimática, en la cual se utiliza la enzima BHB deshidrogenasa para formar NADH, que luego es leído por un espectrofotómetro determinando así la concentración de BHB; para esto es necesaria la desproteínización de la leche antes del análisis (Enjalbert y col., 2001). Enjalbert y col. (2001) quienes estudiaron el punto de corte para el diagnóstico de cetosis subclínica individual con esta técnica establecieron la concentración de BHB  $\geq 0,07$  mmol/L, para definir cetosis subclínica presentando una Se de 91,7% y una Esp de 64,4% comparada con el diagnóstico en sangre. La otra metodología es la espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR) que fue utilizada para determinar concentraciones de Ac y BHB en leche, la cual es rápida y económica, por lo tanto, fácil de implementar a gran escala (Hansen, 1999; Heuer y col., 2001; de Roos y col., 2007). De Roos y col. (2007) evaluaron la FTIR utilizando como prueba de referencia la determinación de cuerpos cetónicos con métodos químicos en leche (análisis de flujo segmentado). Estos autores, al utilizar puntos de cortes de 0,15 mmol/L para Ac y 0,10 mmol/L para BHB con el método FTIR, encontraron una sensibilidad de 69 y 70%, respectivamente, y una especificidad de 95% para ambas (de Roos y col, 2007). La FTIR, en general, es utilizada para la evaluación de la prevalencia de cetosis en un rodeo,



como método de vigilancia, para lo cual se utiliza concentraciones  $< 0,15$  mmol/L de BHB en leche para clasificar a los animales como negativos, los que tienen entre 0,15 y 0,19 mmol/L como sospechosos; y  $\geq 0,20$  mmol/L como positivos (Denis-Robichaud y col., 2014).

En adición, también en leche es posible determinar la composición de grasa y proteína, y utilizar la relación grasa:proteína (G:P) como indicador de cetosis subclínica, ya que este sería un indicador del metabolismo energético (Cejna y Chládek, 2005). La relación G:P óptima varía de 1,0 a 1,25; vacas con valores de relación G:P superiores a 1,3 al inicio de lactancia presentan mayor riesgo de cetosis (Cucunubo y col., 2013; Denis-Robichaud y col., 2014). La relación G:P  $> 1,33$  resultó en una sensibilidad (58%) y especificidad (69%). El mejor punto de corte resultó en una relación G:P  $> 1,42$  con 92% de sensibilidad y 65% de especificidad (Jenkins y col., 2015).

La evaluación de cuerpos cetónicos en orina también puede ser utilizada para el diagnóstico de cetosis subclínica. El fundamento de la técnica es que vacas con BEN y cetosis subclínica, demuestran una excreción urinaria de BHB mayor que vacas metabólicamente sanas (Cucunubo y col., 2013). La presencia de cuerpos cetónicos en orina puede ser medida semi cuantitativamente a través de tiras reactivas Ketostix® (Bayer, Germany) y tabletas Acetest™ (Bayer, Germany). La primera determina los niveles de AcAc a través de la reacción con el nitroprusiato de sodio dando una escala colorimétrica la cual va desde negativo, rosa claro hasta púrpura (concentración de AcAc entre 5mg/dL y 160mg/dL). La segunda mide Ac por el mismo método (Tatone y col., 2016). Las tiras más utilizadas y validadas para el control de la cetosis subclínica son las Ketostix® (Bayer, Germany) (Geishauser y col., 1998; Carrier y col., 2004; Oetzel, 2004; Tatone y col., 2016). Estudios que han evaluado la eficacia de estas tiras reportaron que la prueba puede presentar una sensibilidad aceptable (50-78%) y especificidad muy buena (95-97%) tomando el punto de corte de 15 mg/dL de AcAc (Carrier y col., 2004; Oetzel, 2004; Krogh y col., 2011; Iwersen y col., 2009; Tatone y col., 2016). Otros autores para un punto de corte de 5mg/dL reportaron una Se muy variable (5-94,1%) y una Esp que va desde 70,7 a 100% (Oetzel, 2004; Williamson, 2019; Tatone y col., 2016; Iwersen y col., 2009; Geishauser y col., 1998).

Existen otras marcas de tiras reactivas en orina que evalúan AcAc, como son las Multistix® 10SG (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany). Estas tiras son de uso humano, y no han sido evaluadas para el diagnóstico de cetosis en bovinos, a pesar de que han sido

utilizadas en varios trabajos científicos para evaluación de pH o proteína en orina de vacas lecheras (Cheong y col., 2012; Constable y col., 2019; Afsahi y col., 2020).

La evaluación al pie de la vaca de cuerpos cetónicos proporciona una herramienta útil y práctica para la monitorización de la cetosis subclínica en rodeos lecheros (Abuelo y Alves Nores, 2016). La determinación en leche es más conveniente en comparación con los análisis de sangre y orina, debido a la facilidad de recolección de muestra durante el ordeño, y la certeza de obtener una muestra, lo que no ocurre cuando se realiza una prueba con orina (Oetzel, 2004). La precisión de la prueba, el costo, la facilidad de uso y el tiempo requerido son factores que los productores tienen en cuenta cuando van a elegir qué método utilizar. La importancia económica y el impacto que tiene la cetosis subclínica sobre el bienestar animal, sumado a la limitada información sobre algunos métodos diagnósticos alternativos de cetosis subclínica en conjunto (Multistix® 10SG y FTIR), en sistemas lecheros de alimentación mixta, hacen imprescindibles los estudios sobre estos temas en los sistemas lecheros característicos uruguayos.

**Cuadro 1.** Características operativas de las diferentes pruebas diagnósticas para cetosis subclínica evaluados por distintos autores.

Prueba	Muestra	Punto de corte	Sensibilidad(%)	Especificidad(%)	Autor
Keto-test™	Leche	≥0,10 mmol/L	81,5	81,9	Tatone y col. (2016)
Prueba enzimática	Leche	≥0,07 mmol/L	91,7	64,4	Enjalbert y col. (2001)
FTIR	Leche	≥0,10 mmol/L	70	95	de Roos y col. (2007)
Relación G:P	Leche	> 1,42	92	65	Jenkins y col. (2015)
Ketostix®	Orina	≥5 mg/dL	5	100	Geishauser y col. (1998)
Ketostix®	Orina	≥5 mg/dL	87,6	89,2	Tatone y col. (2016)
Ketostix®	Orina	≥5 mg/dL	94,1	70,7	Williamson (2019)

## **5. HIPÓTESIS**

El diagnóstico de cetosis subclínica en vacas Holando a través de la determinación de cuerpos cetónicos en orina o leche, y la evaluación de la relación G:P de la leche, presentan similar desempeño a la prueba de referencia (concentración de BHB en sangre).

## **6. OBJETIVOS**

### 6.1. Objetivo general

Validar tres herramientas de diagnóstico de cetosis subclínica (tiras reactivas en orina Multistix® 10SG, FTIR, y relación G:P de la leche), durante los primeros 20 días luego del parto.

### 6.2. Objetivos específicos

En vacas Holando, durante los primeros 20 días postparto:

- describir la frecuencia de cetosis clínica y subclínica,
- validar el uso de tiras reactivas para cuerpos cetónicos en orina, Multistix® 10SG, como método de diagnóstico de cetosis subclínica, comparando con el método de referencia (espectrofotometría para la medición de la concentración de BHB en sangre),
- validar el uso de la metodología FTIR (medición de BHB en leche) como método de diagnóstico de cetosis subclínica en relación al método de referencia,
- evaluar la asociación entre la relación G:P en leche y la cetosis subclínica determinada por el método de referencia.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

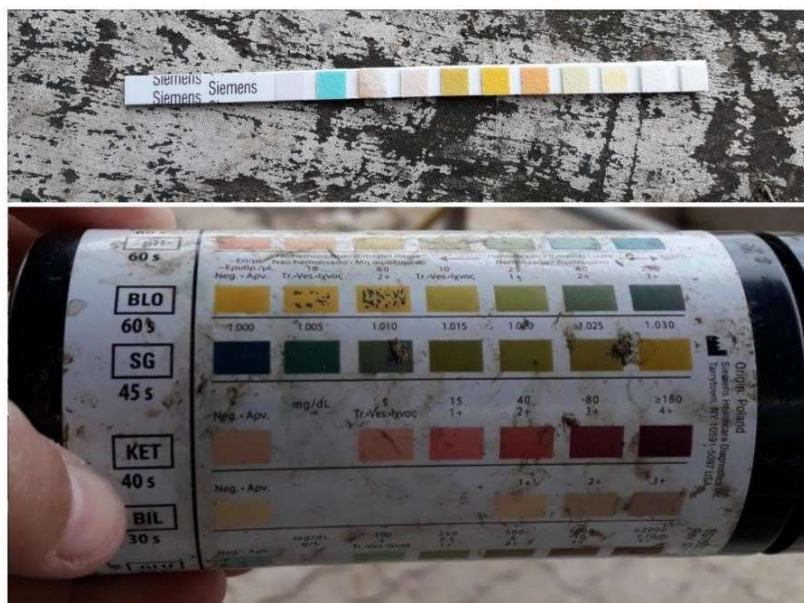
### **7.1. Animales y manejo**

El trabajo cuenta con la aprobación de la Comisión de Ética en el Uso de Animales de INIA (número de expediente INIA 2019.11). Este fue realizado en la Unidad de Lechería de INIA “La Estanzuela” (ruta 50 km 11, Colonia, Uruguay). Se utilizaron 101 vacas Holando multíparas, las cuales fueron ordeñadas dos veces al día (AM, PM). Entre el ordeño AM y PM los animales pastorearon una pastura compuesta por Alfalfa, Dactylis, Festuca y Avena, siendo asignado 12,1 kg de materia seca/vaca. Luego del ordeño PM se les ofreció una ración totalmente mezclada (TMR) compuesta por grano de maíz húmedo, harina de soja, urea, Bovimilk Premium, bicarbonato de Na, fosfato bicálcico, cáscara de soja, grano de maíz seco, óxido de magnesio, silo de maíz, silopack de pradera, a razón de 13,7 kg de materia seca/vaca, en comederos colectivos. En todo momento los animales tuvieron acceso al agua *ad libitum*.

### **7.2. Determinaciones**

#### **7.2.1. *Determinación de AcAc en orina***

El muestreo de todas las vacas se realizó dos veces por semana, desde el parto hasta 20 días posparto luego del ordeño PM, en un cepo a la salida del tambo. Se realizó el diagnóstico presuntivo de cetosis subclínica a través de las tiras reactivas comerciales para orina Multistix® 10SG. Para esto se tomó una muestra de orina por animal realizando un masaje en la zona subvulvar estimulando la micción, se embebió la tira procediendo a leer los resultados luego del tiempo estipulado por el proveedor (40 segundos). Se registró el valor de AcAc calibrado en dichas tiras tomando como referencia la escala sugerida por el fabricante, siendo el valor mínimo detectable para las tiras 5mg/dL y el máximo 160mg/dL (Fig. 2).



**Fig. 2.** Tira reactiva Multistix® 10SG (Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany), y su escala de referencia sugerida por el fabricante para interpretar los resultados.

### 7.2.2. Determinación de BHB en sangre

Desde el parto hasta el día 20 posparto, dos veces por semana, luego del ordeño de PM y de la evaluación clínica, se realizó la extracción de sangre a todas las vacas evaluadas. Las muestras fueron obtenidas por punción de la vena coccígea en tubos con heparina, utilizando una aguja por animal. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos, inmediatamente de su colección. El plasma resultante se almacenó a -20°C hasta su envío al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (Facultad de Veterinaria, UdelaR) para la determinación de las concentraciones de BHB por espectrofotometría. Las concentraciones de BHB fueron determinadas por el método enzimático colorimétrico (ACS-ACOD con D-3-hidroxiacetato de butirato kit, BioSystem, España) en espectrofotómetro automático BA200 de la misma empresa. La sensibilidad analítica fue de 0,016 mmol/l. El coeficiente de variación para los controles comerciales utilizados para BHB fue menor al 10%. Con los resultados del análisis de laboratorio se realizó el diagnóstico definitivo de cetosis subclínica, los animales positivos fueron aquellos que presentaron una concentración de BHB en sangre  $\geq 1,2$  mmol/L, y los animales con cetosis clínica aquellos con concentración de BHB en sangre  $\geq 3,0$  mmol/L.

### **7.2.3. Determinación de BHB y composición de la leche**

Desde el parto hasta el día 20 posparto, se registró automáticamente la producción de leche diaria a través del programa informático del tambo. Durante el ordeño PM, previo a la revisión clínica, se tomó una muestra de leche compuesta de los 4 cuartos, por vaca para la determinación de la composición de la misma. Las muestras se almacenaron en frascos individuales con conservante (Lactopol) y se refrigeraron para luego ser enviadas al Laboratorio de Calidad de Leche de INIA “La Estanzuela”. Se determinó concentración de BHB, porcentaje de grasa, proteína y lactosa por espectrofotometría infrarroja (FTIR) (IDF, 2000).

### **7.3. Análisis estadísticos**

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SAS (versión 9.4, SAS Inst., Inc., Cary, NC) y se consideró significancia un  $P \leq 0,05$  y tendencia a un  $P \leq 0,10$ .

Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson entre las pruebas diagnósticas (sangre, orina y leche) a través del procedimiento PROC CORR. Se analizaron las características operativas de las pruebas a evaluar (Multistix® 10SG, FTIR, y relación G:P) definidas por Tarabla y Signorini (2020) como: sensibilidad (Se): probabilidad de detectar un animal enfermo en una población enferma; especificidad (Esp): probabilidad de detectar un animal sano en una población sana; valor predictivo positivo (VPP): probabilidad que un animal positivo a la prueba, esté realmente enfermo; valor predictivo negativo (VPN): probabilidad que un animal negativo a la prueba, esté realmente sano. Para esto se tomaron los siguientes criterios: 1) se consideró cetosis subclínica cuando la concentración de BHB en sangre fue  $\geq 1,2$  mmol/L ( método de referencia); 2) no se tomaron en cuenta los datos de cetosis clínica (concentraciones de BHB  $\geq 3,0$  mmol/L); 3) para las tiras Multistix® 10SG se consideró el punto de corte definido por el fabricante (5mg/dL) considerando para el análisis estadístico todos los positivos sin importar valor de AcAc obtenido en la muestra (desde 5mg/dL a 160 mg/dL); 4) para la técnica FTIR se consideraron dos puntos de corte: concentración de BHB en leche  $\geq 0,07$  mmol/L y  $\geq 0,10$  mmol/L; 5) para relación G:P se consideró cetosis subclínica cuando esta fue  $>1,42$ .

Se calcularon los verdaderos positivos (VP), verdaderos negativos (VN), falso positivos (FP) y falsos negativos (FN) de la forma que muestra el cuadro 2. La Se, Esp, VPP y VPN y sus correspondientes intervalos de confianza comprendiendo el 95% (IC 95%), se calcularon a

través del procedimiento PROC FREQ. Además, se analizó la asociación entre las pruebas diagnósticas evaluadas y la prueba de referencia con un análisis de  $\chi^2$ . Se calculó el área bajo la curva (AUC) a través de curvas ROC con el procedimiento PROC LOGISTIC, comparando estas entre las diferentes pruebas y determinando el punto de corte óptimo para las pruebas a través del índice de Youden.

**Cuadro 2.** Tabla de contingencia 2X2 usada para los cálculos de características operativas: sensibilidad (Se), especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN).

Herramienta evaluada	Prueba de referencia = [BHB] en sangre		Índices
	Positivo	Negativo	
Positivo	Verdadero positivo (VP)	Falso positivo (FP)	$VPP = VP / (VP + FP) * 100$
Negativo	Falso negativo (FN)	Verdadero negativo (VN)	$VPN = VN / (FN + VN) * 100$
Índice	$Se = VP / (VP + FN) * 100$	$Esp = VN / (VN + FP) * 100$	

## 8. RESULTADOS

Durante los dos años de evaluación, la frecuencia de presentación de cetosis clínica fue 8,9% (9/101) diagnosticada por concentración de BHB en sangre  $\geq 3,0$  mmol/L, y de 49,5% (50/101) para cetosis subclínica (concentración de BHB en sangre  $\geq 1,2$  mmol/L).

La concentración media ( $\pm$  EE) de BHB en el año 2017 fue de  $1,00 \pm 0,5$  mmol/L, siendo los valores mínimo y máximo de 0,32 y 2,74 mmol/L, respectivamente. Durante el 2018, la concentración sanguínea de BHB fue de  $1,42 \pm 0,77$  mmol/L, mientras que el valor mínimo fue de 0,45 mmol/L y el máximo de 4,64 mmol/L.

### 8.1. Asociación entre pruebas diagnósticas de cetosis subclínica

**Cuadro 3.** Coeficientes de correlación de Pearson entre las diferentes pruebas diagnósticas de cetosis subclínica (BHB en sangre, AcAc en orina y BHB en leche), producción y composición de la leche en vacas Holando durante los primeros 20 días posparto.

	AcAc Orina (Multistix)	BHB Leche (FTIR)	Relación G:P Leche	Grasa en Leche (%)	Proteína en Leche (%)	Producción de Leche (Litros)
BHB Sangre	$r=0,67$ $P<0,001$	$r=0,44$ $P<0,001$	$r=0,19$ $P=0,04$	$r=0,22$ $P=0,02$	$r=-0,04$ *NS	$r=-0,07$ *NS
AcAc Orina (Multistix)		$r=0,25$ $P=0,009$	$r=0,06$ *NS	$r=-0,01$ *NS	$r=-0,13$ *NS	$r=-0,08$ *NS
BHB Leche (FTIR)			$r=0,57$ $P<0,0001$	$r=0,61$ $P<0,0001$	$r=-0,06$ *NS	$r=-0,17$ $P=0,05$

\*NS= estadísticamente no significativo ( $P>0.05$ )

En el Cuadro 3 se muestra los coeficientes de correlación de Pearson y sus valores P, entre las diferentes pruebas diagnósticas de cetosis subclínica y producción y composición de la leche. La concentración de BHB en sangre se correlacionó positivamente con la concentración de AcAc en orina (Multistix® 10SG) y con la concentración de BHB en leche (método FTIR). También la concentración de BHB en sangre se correlacionó positivamente con la relación G:P de la leche, pero con menor fuerza, lo que estuvo condicionado por la correlación de esa variable con el porcentaje de grasa en leche, ya que no hubo correlación con el % de proteína.

También se observó que la concentración de AcAc en orina se correlacionó con la concentración de BHB en leche de forma positiva. La concentración de BHB en leche se correlacionó positivamente con la relación G:P de la leche a través de la correlación de esta



con el porcentaje de grasa. Por otro lado, la concentración de BHB en leche se correlacionó negativamente con la producción de leche.

## 8.2. Características operativas de las pruebas diagnósticas

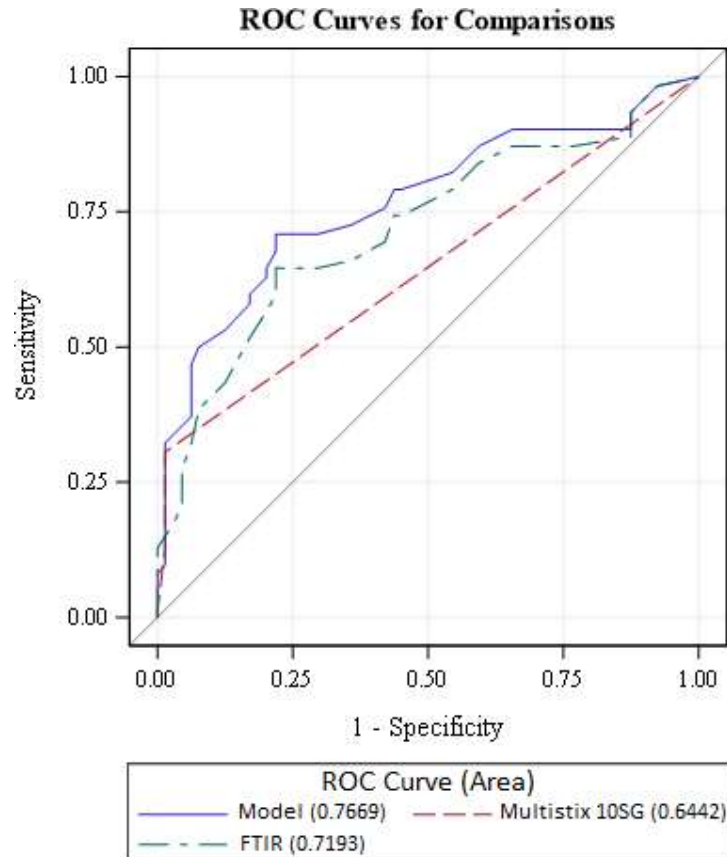
La Se, Esp, VPP y VPN son presentados en el cuadro 4. A través del análisis de  $\chi^2$  se encontró una asociación significativa entre el diagnóstico de cetosis subclínica por sangre con los diagnósticos por las herramientas evaluadas (Multistix® 10SG:  $P < 0,00001$ ; FTIR  $\geq 0,07$ mmol/L:  $P = 0,02$ ; FTIR  $\geq 0,10$ mmol/L:  $P < 0,0001$ ). El diagnóstico de cetosis subclínica a través de relación G:P de la leche también resultó estar significativamente asociada con el diagnóstico en sangre ( $P = 0,04$ ).

**Cuadro 4.** Sensibilidad (Se), Especificidad (Esp), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de diferentes herramientas diagnósticas de cetosis subclínica [Concentración de AcAc en orina con tiras reactivas Multistix® 10SG, concentración de BHB en leche por FTIR (dos puntos de corte) y relación grasa-proteína en leche (G:P)].

Índices	Multistix®10SG ( $>5$ mg/dL)	FTIR ( $\geq 0,07$ mmol/L)	FTIR ( $\geq 0,10$ mmol/L)	G:P ( $>1,42$ )
Se	37,8 (22,4-45,7)	95,9 (88,1-99,1)	72,6 (60,9- 82,4)	94,4 (86,4-98,5)
Esp	94,4 (87,5-98,1)	16,7 (8,6-27,8)	62,1 (49,3- 73,8)	16,2 (8,4-27,1)
VPP	84,8 (63,1-93,9)	56,0 (46,0-64,2)	67,9 (56,4- 78,1)	54,4 (45,3-63,3)
VPN	64,9 (56,0-73,0)	78,6 (49,2-95,3)	67,2 (55,4- 79,0)	73,3 (44,9- 92,2)

\*IC= intervalos de confianza comprendiendo el 95%

El valor del AUC para Multistix® 10SG fue de 0,64 (IC= 0,58-0,70), y para la concentración de BHB en leche por FTIR fue 0,72 (IC= 0,62- 0,80), estando ambas por encima de la curva teórica (Model) (Fig. 3) ( $P=0,04$  para curva de Multistix® 10SG; y  $P=0,0009$  para FTIR). Al comparar las AUC entre Multistix® 10SG y FTIR; se observó que éstas fueron similares ( $P=0.13$ ). El punto de corte óptimo calculado por índice de Youden fue de 5mg/dL (Se= 37,8 %, Esp= 94,4%) para las tiras reactivas Multistix® 10SG y de 0.14 mmol/L (Se= 75%, Esp= 60%) para FTIR.



**Fig. 3.** Curvas ROC para el diagnóstico de cetosis subclínica para dos pruebas: tiras reactivas en orina Multistix® 10SG y determinación de [BHB] en leche con FTIR. Curva teórica (Model).

## 9. DISCUSIÓN

La frecuencia de cetosis subclínica obtenida en este trabajo coincide con los valores reportados en la bibliografía (43,2%: McArt y col., 2012; 47,2%: Vanholder y col., 2015; 40%: Morales-Piñeyrúa y col., 2018); sin embargo, para cetosis clínica los valores fueron superiores a lo encontrado por Suthar y col. (2013) quienes reportaron una incidencia de 3,7% de esta enfermedad. Esta diferencia podría deberse a que los factores predisponentes para esta enfermedad fueron distintos entre los trabajos, cómo ser BEN más acentuado, función inmunológica reducida, vacas melliceras y/o partos distócicos (LeBlanc y col., 2005). El número de animales evaluados, así como la metodología de diagnóstico de cetosis clínica (generalmente determinado por la presencia de signos clínicos, en este trabajo fue realizado por la concentración de BHB en sangre) fueron diferentes en comparación con la de los distintos autores mencionados previamente, pudiendo haber influenciado en los resultados obtenidos.

Este es el primer trabajo que evalúa el diagnóstico de cetosis subclínica en base a la determinación de la concentración de BHB en leche por el método FTIR utilizando como prueba de referencia las concentraciones de BHB en sangre. Debido a que no se encontró un punto de corte óptimo para esta técnica se evaluaron dos publicados en la bibliografía. Uno de ellos,  $BHB \geq 0,07$  mmol/L, fue descrito como óptimo por Enjalbert y col. (2001) para un método enzimático de detección de BHB en leche. Con este punto, la técnica detectó muy bien a los animales enfermos (alta Se) pero resultó en muchos falsos positivos (muy baja Esp). La Se coincide con otros autores (Enjalbert y col. 2001; De Roos y col., 2007), pero los valores de Esp fueron más bajo (64,4%, Enjalbert y col., 2001; 95%, De Roos y col., 2007), pudiendo deberse esta diferencia a que la técnica empleada fue distinta (FTIR, enzimático, flujo segmentado). Al utilizar otro punto de corte también encontrado en la bibliografía, concentración de BHB en leche  $\geq 0,10$  mmol/L (De Roos y col., 2007), se obtuvo un mejor desempeño, con una buena detección de los verdaderamente sanos y enfermos.

Debido a la falta de información sobre qué punto de corte es el ideal para la técnica de FTIR, se calculó el punto de corte óptimo con los datos de este trabajo. Las concentraciones de BHB en leche  $\geq 0,14$  mmol/L maximizaron la Se y Esp, para la detección de cetosis subclínica. En adición, la correlación entre la concentración de BHB en sangre y en leche fue positiva, lo que concuerda con la bibliografía. En este sentido, Enjalbert y col. (2001) también reportaron una

correlación positiva, pero más alta ( $r=0,66$ ) que la de este estudio pudiendo deberse esta diferencia a que estos autores utilizaron un método enzimático para cuantificar BHB en leche.

Al evaluar el desempeño de la relación G:P en leche como herramienta para diagnóstico de cetosis subclínica, se observó que cuando aumenta la concentración de BHB en sangre también aumenta la relación G:P de la leche, lo cual se da a través del aumento del porcentaje de grasa en leche. Esto es de esperarse ya que al aumentar la producción y disminuir el consumo de MS durante los primeros días posparto, el animal en BEN moviliza reservas grasas. Dicha lipomovilización se ve reflejada con el aumento de la cantidad de grasa en leche; y si el animal no tiene suficientes precursores para la gluconeogénesis se tendrá una excesiva formación de cuerpos cetónicos. La relación G:P nos permite identificar a los animales enfermos, pero no así los sanos al utilizar el punto de corte descrito en la literatura para esta herramienta. Jenkins y col. (2015) reportan una Esp mayor (65%) para el mismo punto de corte, detectando mejor a los animales sanos del rodeo. Estas diferencias pueden deberse a que el aumento en la relación G:P no está dado solo por una mayor lipomovilización, sino que existen otros factores del metabolismo de los rumiantes y su manejo que pueden derivar en un aumento de la relación G:P. El aumento de grasa y la disminución de la proteína láctea pueden deberse a bajas producciones individuales, con un efecto de concentración de la grasa más marcado que el de la proteína. También dietas con bajos niveles de energía, en base a forrajes con alto contenido de fibra de baja calidad y mala relación energía-proteína con bajo nivel de suplementación de concentrados, favorecerían el aumento de grasa y la disminución de proteína en leche aumentando el cociente (Gallardo y col., 1996).

En relación al desempeño de las tiras reactivas Multistix® 10SG para diagnosticar cetosis subclínica, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, debido a la baja capacidad del método para detectar animales enfermos (baja Se). Estas tiras reactivas fueron diseñadas para la determinación en orina de varios metabolitos en humanos, siendo escasos los trabajos donde hayan sido utilizadas dichas tiras en vacas lecheras (Afsahi y col., 2020; Cheong y col., 2012; Kandeel y col., 2019). En dichos estudios, las tiras fueron utilizadas como una prueba más de diagnóstico de alguna enfermedad (endometritis, mastitis e incluso cetosis), pero no se han realizado trabajos para validarlas en esta especie animal frente a una prueba de referencia. Las tiras reactivas en orina (Ketostix®, Bayer, Germany) ya validadas para diagnóstico de cetosis en vaca lechera, han presentado valores de características operativas muy variables (Se= 5-94,1%; Esp=70,7-100%) (Oetzel., 2004; Williamson, 2019; Tatone y col., 2016;

Iwersen y col., 2009; Geishauser y col., 1998), y en algunos casos mejores que las encontradas en este trabajo para Multistix® 10SG, al utilizar el mismo punto de corte (5mg/dL). Las diferencias en estas características observadas entre tiras reactivas o trabajos pueden deberse a varios factores como son: la prueba de referencia utilizada para validarlas, el punto de corte de concentración de BHB en sangre usado ( $\geq 1,2\text{mmol/L}$ ;  $\geq 1,4\text{mmol/L}$ ), los días posparto de las vacas evaluadas, la cantidad de muestras y/o las variaciones en la interpretación de las tiras reactivas por parte del observador que está realizando la prueba.

La baja Se de Multistix® 10SG nos informa que las tiras nos dan un alto número de falsos negativos, no detectando a todos los animales enfermos. Sin embargo, se puede confiar en que los positivos realmente estaban enfermos ya que el valor de VPP fue bueno. Por otro lado, la Esp resultó muy alta, siendo Multistix® 10SG efectivo en detectar a los animales sanos. Debido a que la cetosis es una enfermedad que produce una importante pérdida productiva y presenta alto costo, es de suma importancia lograr detectar la mayor cantidad de animales enfermos del rodeo. Por lo tanto, el uso visual de Multistix® 10SG no se presentaría como un método de diagnóstico de cetosis subclínica de elección. Esta afirmación coincide con otros autores, los cuales reportaron que el uso de estas tiras para diagnóstico de otras patologías (por ejemplo, acidosis o mastitis) no sería eficaz en vacas lecheras (Constable y col., 2019; Kandeel y col., 2019). Esto podría estar relacionado con lo encontrado por da Fonseca Ferreira y col. (2018), quienes reportaron que la medición automática (analizador CLINITEK Status®, Siemens) de estas tiras presenta mayor precisión que la visual. A pesar de que las correlaciones entre la concentración de BHB en sangre y la de AcAc en orina son positivas (García y col., 2011; Cucunubo y col., 2013), como lo reafirman estos resultados, no se conoce completamente si los cambios en las concentraciones de las cetonas en orina reflejan los cambios de estas en la sangre durante el curso de la cetosis. La concentración de AcAc en orina es aproximadamente 4 veces más alta que la de BHB en sangre (Enjalbert y col., 2001), y un aumento en la concentración en orina se corresponde con un aumento en la concentración de BHB en sangre, sin embargo, estos incrementos podrían no ser proporcionales, necesitando una concentración mínima de AcAc en orina para la detección de cetosis subclínica.

## **10. CONCLUSIONES**

De los 3 métodos de diagnóstico de cetosis subclínica evaluados, la determinación de concentraciones de BHB en leche por FTIR, resultó tener el mejor desempeño, con la mayor Se y Esp, considerando como punto de corte óptimo la concentración de BHB en leche  $\geq 0,14$  mmol/L. Por lo tanto, es una buena alternativa para ser utilizada de forma rutinaria en los tambos para el diagnóstico de la enfermedad en el rodeo.

La utilización de la relación G:P como indicador de cetosis subclínica resultó condicionada por la concentración de grasa en la leche, demostrando una alta Se pero baja especificidad en relación a las demás pruebas.

Respecto al uso de tiras reactivas Multistix® 10SG, la baja detección de animales enfermos, no lo hace un método efectivo para su uso a campo para el diagnóstico de cetosis subclínica a nivel de rodeo.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Abuelo, A.; Alves Nores, V.M. (2016). Point-of-care testing in cattle practice: Reliability of cow-side diagnostic tests. *In Practice*; 38:293-302.
2. Afsahi, A.; Ahmadi-hamedani, M.; Khodadi, M. (2020). Comparative evaluation of urinary dipstick and pH-meter for cattle urine pH measurement. *Heliyon*; 6(2), e03316.
3. Aleri, J.W.; Hine, B.C.; Pyman, M.F.; Mansell, P.D.; Wales, W.J.; Mallard, B.; Fisher, A.D. (2016). Periparturient immunosuppression and strategies to improve dairy cow health during the periparturient period. *Research Veterinary Science*; 108: 8-17.
4. Baird G.D. (1982). Primary Ketosis in the High-Producing Dairy Cow: Clinical and Subclinical Disorders, Treatment, Prevention, and Outlook. *Journal Dairy Science*;65:1-10.
5. Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science*; 73(9): 2804-2819.
6. Carrier, J; Stewart, S; Godden, S; Fetrow, J; Rapnicki, P. (2004). Evaluation and use of three cow side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *Journal Dairy Science*; 87(11):3725-3735.
7. Cejna, V.; Chládek, G. (2005) The importance of monitoring changes in milk fat to milk protein ratio in Holstein cows during lactation. *Journal Central European Agriculture*; 6: 539–546.
8. Cheong, S.H.; Nydam, D.V.; Galvão, K.N.; Crosier, B.M.; Ricci, A.; Caixeta, L.S.; Sper, R.B.; Fraga, M.; Gilbert, R.O. (2012). Use of reagent test strips for diagnosis of endometritis in dairy cows. *Theriogenology*; 77(5): 858–864.
9. Chilibroste, P. (2011). IFCN Dairy Report 2011, International Farm Comparison Network. Kiel, FCN Dairy Research Center, 210 p.
10. Chilibroste, P., Soca, P.; Mattiauda, D. (2012). Estrategias de alimentación en Sistemas de Producción de Leche de base pastoril. *Jornada Técnica Pasturas 2012: Hacia una ganadería competitiva y sustentable*. Mar del Plata, Argentina, p.91-100.
11. Compton, C.; McDougall, S.; Young, L.; Bryan, M. (2014). Prevalence of subclinical ketosis in mainly pasture-grazed dairy cows in New Zealand in early lactation. *New Zealand Veterinary Journal*; 62(1):30-7.
12. Constable, P.D.; Megahed, A.A.; Hiew, M.W.H. (2019). Measurement of urine pH and net acid excretion and their association with urine calcium excretion in periparturient dairy cows. *Journal Dairy Science*; 102:11370-11383.
13. Corbellini, C. (2000). Influencia de la Nutrición en las enfermedades de la producción de las vacas lecheras en transición. *Congreso Mundial de Buiatría, 21°*. Punta del Este, Uruguay, p. 689.
14. Cote, J.F.; Curtis, R.A.; McSherry, B.J.; Robertson, J.M.; Kronfeldt, D.S. (1969) Bovine ketosis: Frequency of clinical signs, complications and alterations in blood ketones, glucose and free fatty acids. *Canadian Veterinary Journal*; 10:179-87.

15. Cucunubo, LG; Strieder-Barboza, C; Wittwer, F; Noro, M. (2013) Diagnóstico de cetosis subclínica y balance energético negativo en vacas lecheras mediante el uso de muestras de sangre, orina y leche. *Revista Científica FCV-LUZ*; 23 (2): 111 – 119.
16. Da Fonseca Ferreira, M.; Garcia Arce, M.; Graham Handel, I.; Robert Bregeny, C.; George Gow, A. (2018). Urine dipstick precision with standard visual and automated methods within a small animal teaching hospital. *Veterinary Record* 183(13):415.
17. De Roos, A. P.; van den Bijgaart H. J.; Horlyk J.; de Jong G. (2007). Screening for Subclinical Ketosis in Dairy Cattle by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Journal Dairy Science*; 90:1761-1766.
18. Denis-Robichaud, J.; Dubuc, J.; Lefebvre, D.; DesCoteaux, L.; (2014). Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. *Journal Dairy Science*; 97:3364-3370.
19. Drackley, JK. (1999) Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *Journal of Dairy Science*; 82:2259-2273.
20. Duffield, T. (2000) Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 16(2): 231-253.
21. Duffield, TF; Lissemore, KD; McBride, BW; Leslie, KE. (2009) Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal Dairy Science*; 92:571-580.
22. Enjalbert, F; Nicot, M; Bayourthe, C; Moncoulon, R; (2001). Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal Dairy Science*; 84:583–589.
23. Esposito, G; Irons, PC; Webb, EC; Chapwanya, A. (2014) Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*; 144: 60-71.
24. Fleming, S.A. (2006) Distúrbios metabólicos. En: Smith, BP. *Medicina interna de grandes animais*. 3a. ed. Barueri: Editora Manole; p. 1241-7.
25. Gallardo, M.R.; Onetti, S.G.; Castillo, A.R.; Nari, J.O. (1996). Proteína en leche y su relación con el manejo nutricional. Estación experimental agropecuaria Rafaela. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
26. García, A. M. B.; Cardoso, F. C.; Campos, R.; Thedy, D. X.; González, F. H. D. (2011). Metabolic evaluation of dairy cows submitted to three different strategies to decrease the effects of negative energy balance in early postpartum. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*; 31(Suppl. 1): 11-17.
27. Garzón Audor, A.M.; Oliver Espinosa, O.J.; (2018). Epidemiology of bovine ketosis: a review. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*;13 (1): 42-61.
28. Geishauser, T; Leslie, K; Kelton, D; Duffield, T; (1998). Evaluation of five cow-side tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal Dairy Science*; 81:438-443.



29. Geishauser, T.; Leslie, K.; Tenhag, J.; Bashiri, A. (2000). Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *J. Dairy Science*. 83: 296-299.
30. Gillund, P.; Reksen, O.; Grohn, Y.T.; Karlberg, K. (2001). Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. *Journal Dairy Science*; 84:1390-6.
31. Goff, JP; Horst, RL. (1997) Physiological Changes at Parturition and Their Relationship to Metabolic Disorders. *Journal of Dairy Science*; 80:1260-1268.
32. Goldhawk, C; Chapinal, N; Veira, DM; Weary, DM; von Keyserlingk, MAG. (2009) Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*; 92, 4971-4977.
33. Graugnard, D.E.; Moyes, K.M.; Trevisi, E.; Khan, M.J.; Keisler, D.; Drackley, J.K.; Bertoni, G.; Loor, J.J. (2013). Liver lipid content and inflammometabolic indices in peripartal dairy cows are altered in response to prepartal energy intake and postpartal intramammary inflammatory challenge. *Journal of Dairy Science*; 96: 918-935.
34. Grummer, R. R. (1995) Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*; 73:2820-2833.
35. Grummer, R. R. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 20(3), 447–470.
36. Hansen, P. W. (1999). Screening of dairy cows for ketosis by use of infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal Dairy Science*; 82:2005–2010.
37. Herdt, T.H.; (2000) Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*; 16:215-30.
38. Heuer, C.; Luinge, H.J.; Lutz, E.T.G.; Schukken, Y.H.; van der Maas, J.H; Wilmink, H. y Noordhuizen, J.P.T.M. (2001). Determination of acetone in cow milk by fourier transform infrared spectroscopy for the detection of subclinical ketosis. *Journal Dairy Science* 84:575-582.
39. INALE (2018). Uruguay lechero. Disponible en: <https://www.inale.org/uruguay-lechero/> Fecha de consulta:27 de octubre de 2020.
40. INALE (2014). Encuesta lechera. Disponible en: <https://www.inale.org/estadisticas/encuesta-2014-produccion-de-leche/> Fecha de consulta: 27 de octubre 2020.
41. Ingvarstsen, KL. (2006) Feeding- and management- related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal Feed Science and Technology*; 126:175-213.
42. Ingvarstsen, KL; Dewhurst, RJ; Friggens, NC. (2003) On the relationship between lactational performance and heath: is it yield or metabolic imbalance that cause

production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livestock Production Science*; 83:277-308.

43. Iwersen, M.; U. Falkenberg; R. Voigtsberger; D. Forderung; and W. Heuwieser. (2009). Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal Dairy Science*; 92:2618–2624.
44. Jenkins, N.T.; Peña, G.; Risco, C.; Barbosa, C.C.; Vieira-Neto, A.; Galvão, K.N. (2015). Utility of inline milk fat and protein ratio to diagnose subclinical ketosis and to assign propylene glycol treatment in lactating dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*; 56, 850–854.
45. Kandeel, S. A.; Megahed, A. A.; Ebeid, M. H.; Constable, P. D. (2019). Ability of milk pH to predict subclinical mastitis and intramammary infection in quarters from lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 102:1417-1427.
46. Konkol, K; Godden, P; Rapnicki, P; Overton, M. (2009). Validation of a rapid cow-side test for the measurement of blood beta-hydroxybutyrate in fresh cows. *Proceedings 42nd Annual Conference. American Association of Bovine Practitioners*; p190.
47. Krogh, M.A.; Toft, N.; Enevoldsen, C. (2011). Latent class evaluation of a milk test, a urine test, and the fat-to-protein percentage ratio in milk to diagnose ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 94: 2360-2367.
48. Lacetera, N.; Scalia, D.; Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Pirazzi, D.; Nardone, A.; (2005). Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *Journal of Dairy Science* ;88:2010–2016.
49. Larsen, M.; Kristensen, B.; (2013). Precursors for liver gluconeogenesis in periparturient dairy cows. *Animal*; 7(10):1640-1650.
50. LeBlanc, SJ; Leslie, KE; Duffield, TF. (2005) Metabolic Predictors of Displaced Abomasum in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*; 88:159-170.
51. Logue, D.N.; Mayne, C.S. (2014). Welfare-positive management and nutrition for the dairy herd: A European perspective. *The Veterinary Journal*; 199:31–38.
52. Loor, J.J.; Everts, R.E.; Bionaz, M.; Dann, H.M.; Morin, D.E.; Oliveira, R.; Rodriguez-Zas, S.L.; Drackley, J.K.; Lewin, H.A. (2007). Nutrition-induced ketosis alters metabolic and signaling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics*; 32:105–116.
53. Mann S, McArt J, Abuelo A.; (2019). Production-related metabolic disorders of cattle: ketosis, milk fever and grass staggers. *In Practice*; 41:205-219.
54. McArt, J.A.A; Nydam, D.V; Oetzel, G.R. (2013). Dry period and parturient predictors of early lactation hyperketonemia in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 96; 198-209.
55. McArt, J.A.A; Nydam, D.V; Oetzel, G.R. (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 95(9):5056-5066.
56. Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Rupprechter G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de

- Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilbroste P. (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia Uruguay*. 17 (1):141-152.
57. MGAP.DIEA. (2019). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf> Fecha de consulta: 27 de octubre de 2020
58. MGAP.DIEA (2016). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/est\\_prod\\_leche\\_2016.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-02/est_prod_leche_2016.pdf)  
Fecha de consulta: 27 de octubre de 2020
59. MGAP.DIEA. (2009). Anuario estadístico agropecuario. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/anuario-estadistico-diea-2009>  
Fecha de consulta: 27 de octubre de 2020
60. Morales-Piñeyría, J.T.; Fariña, S.R.; Mendoza, A. (2018). Effects on parity on productive, reproductive, metabolic and hormonal responses of Holstein cows. *Animal Reproduction Science*; 191:9-21.
61. Mulligan, F.; Doherty, M.; (2008). Production diseases of the transition cow. *The Veterinary Journal*;176:3–9.
62. Oetzel, G. (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics Food Animal Practice*; 20:651-674.
63. Oetzel, G.; McGuirk, S. (2010). Fact Sheet – Cowside Blood BHBA Testing with a Hand-Held “Ketometer”. School of Veterinary Medicine. University of Wisconsin-Madison, Madison. p1-4.
64. Ospina, P.A.; Nydam, D.V.; Stokol, T.; Overton, T.R. (2010) Evaluation of nonesterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. *Journal of Dairy Science*; 93: 546-554.
65. Ospina, P.A.; Nydam, D.V.; Stokol, T.; Overton, T.R. (2010) Association between the proportion of sampled transition cows with increased non esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *Journal of Dairy Science*; 93:3595-3601.
66. Radostits, OM; Gay, CC; Blood, DC; Hinchcliff, KW. (2002) *Medicina Veterinaria: Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*, 9a ed. Madrid, McGraw Hill, V. 2.
67. Roche, J.R.; Kay, J.K.; Friggens, N.C.; Loor, J.J.; Berry, D.P. (2013) Assessing and managing body condition score for the prevention of metabolic disease in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*; 29(2):323-36.

68. Sheldon, I.M.; Lewis, G.S.; LeBlanc, S.; y Gilbert, R.O. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*; 65:1516-30.
69. Sordillo, L.M., (2005). Factors affecting mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Livestock Production Science*; 98: 89–99.
70. Sun, F.; Cao, Y.; Cai, C.; Li, S.; Yu, C.; y Yao, J. (2016). Regulation of nutritional metabolism in transition dairy cows: Energy homeostasis and health in response to post-ruminal choline and methionine. *PLoS ONE*, 11(8), e0160659.
71. Suthar, V.S; Canelas-Raposo, J; Deniz, A; Heuwieser, W. (2013). Prevalence of subclinical ketosis and relationships with postpartum diseases in European dairy cows. *Journal Dairy Science*; 96(5):2925-2938.
72. Tarabla, H.D. y Signorini, M. (2020). *Epidemiología diagnóstica*. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral. Santa Fe, Argentina. Editorial UNL. 1a Ed, 164p.
73. Tatone E.H.; Duffield T.F.; Capel M.B.; DeVries T.J.; LeBlanc S.J.; Gordon J.L. (2016) A randomized controlled trial of dexamethasone as an adjunctive therapy to propylene glycol for treatment of hyperketonemia in postpartum dairy cattle. *Journal of Dairy Science*; 99: 8991-9000.
74. Työppönen, J.; Kauppinen, K. (1980). The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*; 21: 55–61.
75. Van Saun, RJ. (2010) Indicators of dairy cow transition risks Metabolic profiles revisited. *Congreso Mundial de Buiatría, 26°*. Santiago, Chile, p. 65-77.
76. Vanholder T.; Papen J.; Bemers R.; Vertenten G.; y Berge A.C. (2015) Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*; 98:880-888.
77. Walsh, RB; Walton, JS; Kelton, DF; LeBlanc, SJ; Leslie, KE; Duffield, TF. (2007). The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*; 90(6):2788-2796.
78. White, H. M. (2015). The role of TCA cycle anaplerosis in ketosis and fatty liver in periparturient dairy cows. *Animals*, 5(3), 793–802.
79. Williamson, M.E.; (2019). An exploration of diagnostic patterns for ketosis and an innovative management approach to ketosis treatment in lactating dairy cows. University of Guelph.
80. Zhang, Z.; Liu, G.; Wang, H.; Li, X.; Wang, Z. (2012). Detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Pakistan Veterinary Journal*; 32: 156–160.