

DIAGNÓSTICO DE CETOSIS SUBCLÍNICA Y BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO EN VACAS LECHERAS MEDIANTE EL USO DE MUESTRAS DE SANGRE, ORINA Y LECHE

Use of Blood, Urine and Milk Samples in the Diagnosis of Subclinical Ketosis and Negative Energy Balance in Grazing Dairy Cows

Luis Gabriel Cucunubo¹, Clarissa Strieder-Barboza², Fernando Wittwer³ y Mirela Noro^{3*}

¹Departamento de Salud Animal, FMVZ, Universidad de Tolima, Ibagué, Colombia. ²Grupo de Investigación en Nutrición, Toxicología y Reproducción Animal, FMVZ, Universidad Cooperativa de Colombia, Bucaramanga, Colombia.

³Inst. Cs. Clín. Vet, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, FMVZ. *mirelanoro@gmail.com

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comparar y asociar la presentación de cetosis subclínica y balance energético negativo (BEN), diagnosticados mediante las concentraciones de β -hidroxibutirato (β HB) plasmático, con indicadores sanguíneos, urinarios y lácteos de energía en vacas lecheras. Setenta y cuatro vacas Holstein-Friesian fueron empleadas desde la tercera semana pre-parto hasta la octava posparto, obteniéndose muestras de plasma, orina y leche semanalmente; en plasma se determinó las concentraciones de β HB, ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glucosa; en orina se realizó la prueba de Rothera y se determinó la excreción de β HB y el pH; en leche se determinó el contenido de grasa y proteína. Se consideró como puntos de corte para cetosis β HB >1,0 >1,2 y >1,4 mmol/L y para la presentación de BEN cuando NEFA >300 μ mol/L en preparto y β HB >0,6 mmol/L en el posparto. La intensidad de la reacción de la prueba de Rothera y la concentración de β HB urinario se relacionaron con las concentraciones de β HB plasmático ($r=0,57$, $P<0,05$ y $r=0,42$, $P<0,05$, respectivamente). La prueba de Rothera se asoció con los distintos puntos de corte de cetosis ($P<0,05$), así como con BEN ($P<0,05$). La concentración plasmática de β HB presentó una asociación leve ($P<0,05$) con NEFA y glucosa y nula ($P>0,05$) con los indicadores lácteos y el pH urinario. Se concluye que las reacciones leve y moderada de la prueba de Rothera en orina son indicadores de BEN, mientras que las reacciones moderada e intensa son indicadoras de cetosis subclínica.

Palabras clave: Cetosis, balance energético negativo, prueba de Rothera, NEFA, glucosa, β HB.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare and associate plasma concentrations of β -hydroxy-butyrate (β HB) and subclinical ketosis with blood, urinary and milk indicators in dairy cow. Seventy four Holstein-Friesian cows were used from the third week pre-partum until the eighth week post-partum. Samples of blood, urine and milk were obtained weekly to determine the plasma concentrations of β HB, non-esterified fatty acids (NEFA) and glucose. Rothera test reaction, excretion of β HB and pH were determined in urine samples. The concentrations of fat, protein and urea were determined on milk samples. The for subclinical ketosis were considered as: β HB > 1.0, > 1.2 and >1.4 mmol/L. Negative energetic balance (NEB) presentation was considered when NEFA >300 μ mol/L during pre-partum and when β HB > 0.6 mmol/L during post-partum. The intensity in the reaction of Rothera test and the excretion of urinary β HB were related with plasmatic concentrations of β HB ($r=0.57$, $P<0.05$ and $r=0.42$, $P<0.5$, respectively). The Rothera test associated with ketosis at the three desition limits ($P<0.05$), BEN ($P<0.05$). The relations between plasma β HB with NEFA and glucose were lower ($P<0.05$), and not significant ($P>0.05$) with milk fat or protein content or urinary pH. In conclusion, slight and moderate reactions of the Rothera test are good indicators of NEB, while an intense test result indicates subclinical ketosis.

Key words: Ketosis, negative energetic balance, Rothera test, glucose, β HB.

INTRODUCCIÓN

Las vacas lecheras (*Bos taurus*), desde el periodo preparto hasta la octava semana posparto presentan balance energético

negativo (BEN) debido a la disminución del consumo de materia seca en el parto y al incremento en la demanda energética para la producción de leche en el posparto, que conlleva a una movilización lipídica para suplir sus requerimientos energéticos [11]. La movilización lipídica incrementa la concentración plasmática de los ácidos grasos no esterificados (NEFA), los cuales son transportados al hígado para su esterificación o producción de triacilgliceroles. Sin embargo, está asociado a una mayor demanda de oxalacetato para la gluconeogénesis durante el BEN, hay un mayor ingreso de NEFA a la mitocondria para producir cuerpos cetónicos, β -hidroxibutirato (β HB), acetoacetato (AcAc) y acetona (Ac), los cuales son una fuente de energía en los bovinos adultos. A su vez, cuando su producción excede la capacidad del organismo para utilizarlos, sus concentraciones se incrementan produciendo cetosis [17].

La cetosis es una enfermedad metabólica que afecta principalmente a vacas lecheras de alta producción, entre la 2^{da} y 8^{va} semana posparto. Se caracteriza por disminución en la glucemia y aumento de la concentración de los cuerpos cetónicos en los tejidos y fluidos orgánicos [5]. La cetosis, en sus formas clínica y subclínica es una de las enfermedades metabólicas más frecuentes en los rebaños lecheros generando un impacto negativo debido al costo de tratamiento, merma en la producción de leche y mayor incidencia de enfermedades y problemas reproductivos [14].

La cetosis subclínica se caracteriza por presentar concentraciones plasmáticas de β HB mayores a 1,4 mmol/L, sin signos clínicos aparentes, por lo cual pasa desapercibida en los rebaños lecheros [3]. Se describe que, concentraciones plasmáticas $\geq 1,2$ mmol/L incrementan en 4,7 veces la presentación de cetosis clínica [22], y que concentraciones $\geq 1,0$ mmol/L en la primera semana posparto reduce en un 25% la tasa de preñez en la primera inseminación [26]. Por otro lado, las concentraciones de β HB plasmático $\geq 0,6$ mmol/L son indicadoras de BEN en el rebaño [27].

La determinación de β HB plasmático es considerada la prueba de oro para el diagnóstico de cetosis subclínica [3, 15]; a su vez, existen otras pruebas diagnósticas como la de Rothera [3] que determina cuerpos cetónicos mediante la reacción de la Ac y AcAc con nitroprusiato de sodio. La prueba de Rothera en muestras de leche presenta una alta especificidad (98 al 100%) y una baja sensibilidad (5 al 44%), al utilizar como punto de corte la concentración de β HB plasmático $\geq 1,4$ mmol/L [9]; por otro lado, utilizando muestras de orina con el mismo punto de corte, la misma prueba presenta una especificidad de 96 a 99% y un incremento en la sensibilidad (49 a 76 %) [3].

El monitoreo del balance energético con la determinación de la concentración plasmática NEFA, es otra herramienta diagnóstica de la movilización lipídica, desde el parto [25] y para predecir el riesgo de presentación de cetosis subclínica [15], visto que concentraciones de NEFA mayores a 300 μ mol/L en el parto incrementan la presentación de cetosis en 3,6%

[15]. Por otro lado, la determinación de la glucemia es otra forma de monitorear el BEN pero su sensibilidad es baja al presentar un fuerte control homeostático hormonal, el cual mantiene sus concentraciones sin cambios marcados [11].

La composición grasa y de proteínas de la leche, así como su razón (contenido de grasa: proteína, G:P láctea) son también indicadores del metabolismo energético [14]. La razón óptima G:P láctea varía de 1,0 a 1,25; vacas con valores de G:P láctea superiores a 1,5 al inicio de lactancia presentan mayor riesgo de cetosis [6].

El objetivo de este trabajo fue comparar y asociar la presentación de cetosis subclínica y BEN, diagnosticados mediante las concentraciones de β HB plasmático, con indicadores sanguíneos, urinarios y lácteos de energía en vacas lecheras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se utilizaron cincuenta y seis vacas multíparas y dieciocho primíparas Holstein-Friesian, desde la 3^{ra} semana parto hasta la 8^{va} semana posparto, con partos distribuidos entre los meses de marzo a octubre del 2010. Los animales eran parte del rebaño lechero de la unidad de predios experimentales de la Universidad Austral de Chile, ubicado en Valdivia, Región de los Ríos, Chile (39°48'30" LS y 73°14'30" LO), a una altura de 12 m.s.n.m, clima templado húmedo con influencia mediterránea, con una temperatura media anual de 12°C y una precipitación de 1.871 mm anual [4].

Dieta y manejo. En el parto, las vacas se alimentaron en base a pastoreo de forraje verde (*Lolium perenne*) con una oferta máxima de 10 kg/MS/vaca/día (d), además de 2,5 kg/vaca/d de concentrado peletizado (afrecho de trigo [*Triticum aestivum*], melaza [*Saccharum L.*], lupino [*Lupinus albus*], maíz molido [*Zea mays*] y afrecho de raps [*Brassica napus*], 87% materia seca (MS), 18% proteína bruta (PB), 3 Mcal/kg energía metabolizable (EM), 25% fibra en detergente ácido (FDA)), 6 kg/vaca/d de heno (85,5% MS, 12,7% PB, 1,93 Mcal/kg EM, 50,7% fibra en detergente neutro (FDN), 33,5% FDA) y 600 g/vaca/d de una mezcla mineral con sales aniónicas (2,5%), suministrada 2 veces al d.

En el periodo de otoño e invierno, las vacas posparto pastorearon una pradera de *Lolium perenne* (18,4% MS, 25,6% PB, 2,7 Mcal/kg EM, 41,2% FDN, 25,7% FDA, 2,7% extrato etéreo (EE), 10,2% cenizas totales (CT) 18,2 g/kg carbohidratos solubles (CHSO)) con una oferta aproximada de 17 kg MS/vaca/d y recibieron 35 kg/vaca/d de ensilaje de *Lolium perenne* (44,1% MS, 9,5% PB, 2,32 Mcal/kg EM 62,4% FDN, 38,3% FDA), además de 2 kg/vaca/d de torta de rap (90% MS, 34,5% PB, 3,25 Mcal/kg EM, 26,3% FDN, 12,3% EE), 5 kg/vaca/d de maíz húmedo (70% MS, 7,7 PB, 3,52 Mcal/kg EM 10,8% FDN, 3% FDA), y 600 g de mezcla mineral con afrechillo de trigo en el patio de alimentación. En el periodo de primavera se ofertó aproximadamente 25 kg MS/vaca/d de *Lolium perenne* (19,2% MS, 18,2% PB, 2,85 Mcal/kg EM, 38,8%

FDN, 23,4% FDA, 2,4 % EE, 6,7% CT, 25,5 g/kg CHSO), más 3 kg/vaca/d de concentrado peletizado (86,7% MS, 14,1% PB, 2,98 Mcal/kg EM, 16,2% FDA, 5,2% FDA, 1,4% EE, 5,28 CT). Las vacas tuvieron libre acceso al agua y eran ordeñadas 2 veces al d.

Muestreros y análisis. Semanalmente, desde la 3^{ra} semana previa al parto hasta la 8^{va} semana posparto se obtuvieron de cada vaca, muestras de orina (n= 800) por medio de estimulación subvulvar y de sangre heparinizada (n= 870) por punción de la vena coccígea, además de registrar la condición corporal (1,0= vaca flaca; 5,0= vaca obesa) [8]. En las muestras de orina se determinó, inmediatamente de las obtenidas el valor de pH mediante un pHmetro portátil (Checker 3, Hanna Instruments®, EUA) calibrado con solución buffer 9,0; 7,0 y 4,0; posteriormente se realizó la prueba de Rothera (0,2 mL de orina con 300 mg de reactivo Rothera) y se calificó la intensidad de la reacción como negativa (sin cambio de color); leve (color lila); moderada (color morado leve) e intensa (morado fuerte) (FIG. 1). Una alícuota de 1 mL de orina se centrifugó (Spectrafuge FM, Labnet International inc., EUA) a 14.300 g durante 5 minutos (min) y el sobrenadante se congeló a -20°C (Freezer 420, Consul®, CFC Free, Brasil) en microtubos, para posteriormente determinar la concentración de β HB (Ranbut®, Randox). Otra alícuota de las muestras de orina se diluyó en agua destilada (1:50) para determinar las concentraciones de creatinina (Human®) para el cálculo de la excreción urinaria de β HB corregida por creatinina (concentración de β HB urinaria/ concentración de creatinina urinaria).

Las muestras de sangre se centrifugaron a 780 g durante 5 min (Centra CL3E, Thermo IEG, EUA), para la determinación de las concentraciones plasmáticas de β HB (Ranbut®, Randox), NEFA (Wako®) y glucosa (Human®) en un autoanalizador Metrolab 2300® (Wierner Lab, Argentina).

En el posparto se obtuvieron semanalmente muestras de leche (n=1.108) de los ordeños de la mañana y tarde, mediante sistema Waikato de 42 kg (Mk V Milk Meter, Waikato® Milking Systems Ltd., Hamilton, Nueva Zelanda). En las muestras de leche se determinaron las concentraciones de grasa, proteína y urea mediante el Milko-Scan System 4300 (Foss

Electric, Dinamarca), se calculó el porcentaje de grasa y proteína diaria de cada vaca proporcional a la producción láctea de cada ordeño, obteniendo 554 valores. Los resultados de proteína verdadera se calcularon sustrayendo el porcentaje correspondiente a la urea láctea (proteína corregida= proteína láctea-[urea láctea en g/dL x 2,88]). Además se calculó la razón entre grasa y proteína láctea (G: P) y la razón entre grasa y la proteína corregida (G: P corregida).

Diagnóstico de cetosis y de BEN. Para el diagnóstico de cetosis subclínica se utilizaron tres puntos de corte en base a las concentraciones plasmáticas de β HB de 1,0 [26]; 1,2 [22] y 1,4 mmol/L [3] y como indicador de movilización lipídica y de BEN se empleó la concentración de NEFA >400 mmol/L en el preparto y las concentraciones de β HB > 0,6 mmol/L [27] o de NEFA de > 700 μ mol/L en el posparto [15].

Análisis estadístico. Para la presentación de cetosis subclínica y BEN se consideraron como unidad a las vacas, mientras que para los análisis de asociación y factores de riesgo de cetosis y BEN se consideraron las muestras. Los datos se analizaron por periodo preparto y posparto separadamente y en conjunto mediante el programa estadístico Statistix 8.0 [23]. Se evaluó la normalidad de los datos mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad por la prueba de Bartlett [21]. Se compararon mediante ANDEVA ($Y_i = \mu + C_i + \varepsilon_i$, donde μ = media general, C_i = condición [cetosis subclínica o BEN], ε_i = error experimental) o Kruskal Wallis las variables paramétricas y no paramétricas, respectivamente [20]. Se empleó el coeficiente de correlación de Pearson [19] entre las variables paramétricas y se ajustaron los modelos para determinar la relación del β HB plasmático con otras variables (TABLA I), se compararon proporciones por medio de Ji-cuadrado entre la presentación de cetosis subclínica y BEN con los indicadores lácteos [% de grasa (>4,1), % proteína (<2,8), G:P (>1,5) y G:P corregida (1,5) [6], urinarios [reacción a la prueba de Rothera (leve, moderada, intensa) y la excreción de β HB (>0,1 mmol/L)], y plasmáticos [hiperglucemia (>4,1 mmol/L), hipoglucemia (<2,5 mmol/L), NEFA (preparto >300, >400, posparto >700 μ mol/L) [16]; en aquellos significativos (P<0,05) se determinó la razón de probabilidad (OR) y se realizó un análisis de concordancia mediante índice de Kappa en el programa MedCalc 11.6.1.0 [13]. Se utilizó un nivel de significancia del 95%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Presentación de BEN y cetosis subclínica. La mayor frecuencia de casos de BEN se observó en la primera semana posparto (47,3%), de igual manera, el mayor porcentaje de vacas con cetosis subclínica se observó en el posparto, siendo más frecuente para los tres puntos de corte $\geq 1,4$, $\geq 1,2$, $\geq 1,0$ y mmol/L en la segunda semana (10,8; 14,8; 21,6 %, respectivamente) (FIG. 2). El 24,3% de las vacas presentaron cetosis en semanas sucesivas con β HB $\geq 1,4$ mmol/L; 36,5% con $\geq 1,2$ mmol/L y 43,2% con $\geq 1,0$ mmol/L. Otros es-

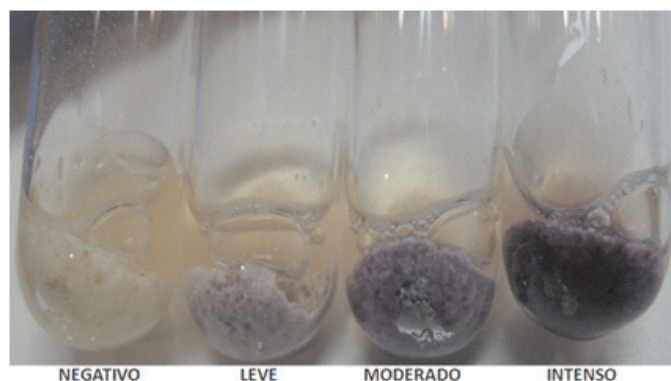


FIGURA 1. INTENSIDADES DE LA REACCIÓN A LA PRUEBA DE ROTHERA EN ORINA DE VACAS LECHERAS.

TABLA I
RELACIÓN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE β HB PLASMÁTICO Y DE LA REACCIÓN A LA PRUEBA DE ROTHERA EN ORINA CON INDICADORES URINARIOS, SANGUÍNEOS Y LÁCTEOS DEL BALANCE ENERGÉTICO

Variable (X)	Variable (Y)	N	pendiente	r	r ² %	Modelo
BHB plasma	Rothera en orina	800	1,00	0,57	32,1	Cuadrado Y
	β HB urinario	796	0,70	0,42	18,2	Cuadrado doble
	pH orina	810	0,10	0,10	1,1	Doble inverso
	pH orina preparto	193	-0,11	0,06	0,43	Doble inverso
	pH orina posparto	587	0,02	0,04	0,19	Doble inverso
	NEFA	870	71,66	0,18	3,26	Logaritmo de X
	Glucosa	870	-0,19	-0,23	5,29	Inversa Y cuadrado X
	G:P láctea	554	0,02	0,08	0,67	Raíz ² de X
	G:P corregida láctea	554	0,03	0,09	0,95	Raíz ² de X
	% grasa	554	0,07	0,07	0,45	Cuadrado de Y
	% proteína láctea	554	-0,06	0,04	0,18	Inversa Y log X
	% proteína corregida	554	-0,03	0,07	0,53	Inversa Y log X
Rothera orina	β HB urinario	768	0,18	0,31	9,99	Raíz ² de X-cuadrado X
	pH orina	781	0,002	-0,04	0,16	Inversa Y cuadrado X
	pH orina preparto	174	-0,28	-0,25	6,56	Cuadrado Y
	pH orina posparto	539	-0,02	-0,06	0,47	Cuadrado Y raíz cuadrada X
	NEFA	800	38,83	0,19	3,8	Cuadrado X
	Glucosa	800	-0,10	-0,24	5,88	Log Y cuadrado X
	G:P láctea	530	0,03	0,20	4,08	Inversa Y raíz cuadrada de X
	G:P corregido láctea	530	0,032	0,21	4,65	Inversa Y raíz cuadrada de X
	% grasa láctea	530	0,07	0,15	2,19	Raíz ² doble
	% proteína láctea	530	-0,021	0,09	0,85	Inversa Y raíz cuadrada de X
	% proteína corregida	530	-0,02	0,12	1,4	Inversa Y raíz cuadrada de X

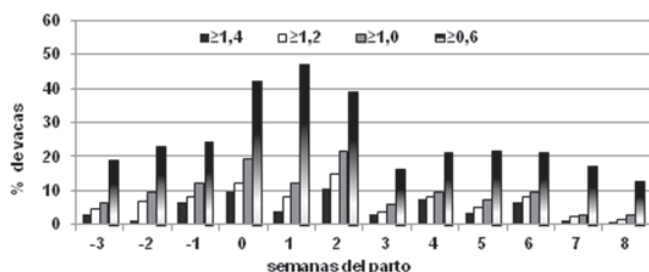


FIGURA 2. PORCENTAJE DE VACAS DIAGNOSTICADAS CON CETOSIS SUBCLÍNICA PARA LOS PUNTOS DE CORTE DE 1,4 (■), 1,2 (□), 1,0 mmol/L (▒) DE β OH BUTIRATO PLASMÁTICO Y BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO (β OH BUTIRATO $>0,6$ mmol/L, ▩) DESDE LA TERCERA SEMANA PREPARTO HASTA LA OCTAVA SEMANA POSPARTO.

tudios también indican una mayor presentación de cetosis subclínica en la segunda, tercera y sexta semana posparto [7, 9], lo cual se asocia con la disminución en el consumo de alimento y al incremento en la producción láctea en las primeras semanas posparto [18].

Relación entre las concentraciones de β HB con indicadores energéticos sanguíneos, urinarios y lácteos. La concentración de β HB plasmático se relacionó levemente con la reacción positiva a la prueba de Rothera que refleja la presencia de AcAc y Ac en la orina ($r = 0,57$; $P < 0,05$) y con la excreción urinaria de β HB ($r = 0,42$; $P < 0,05$), sin embargo, no se asoció con los otros indicadores sanguíneos, lácteos y urinarios (TABLA I). Por otro lado, la prueba de Rothera en orina presentó una asociación leve con la excreción de β HB urinario, lo que difiere con la alta correlación ($r = 0,85$) observada en otro estudio [2]. La diferencia observada entre las excreciones urinarias de β HB con las de AcAc y acetona estaría asociada a las diferentes vías metabólicas de los tres cuerpos cetónicos, siendo el β HB utilizado para la síntesis de la leche y no necesariamente excretado en su totalidad por el riñón [5]; cuando la concentración plasmática de β HB se incrementa, también lo hacen las concentraciones de AcAc y Ac plasmáticos ($r = 0,71$ y $0,53$, respectivamente) [7]. A su vez, el incremento de las concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre conlleva a un aumento en su excreción urinaria, por lo que la determinación

de cuerpos cetónicos en orina puede ser empleado para el diagnóstico de cetosis subclínica [2].

Si bien no se observó asociación entre las concentraciones de β HB plasmático con indicadores lácteos, se describe que en los casos de cetosis subclínica el contenido de grasa láctea se incrementa y el de proteína láctea disminuye, asociados a la deficiencia de energía, que culmina en un incremento de la G:P láctea, asociación que no siempre se presenta [6].

Tampoco se observó asociación entre las concentraciones de β HB plasmático y Rothera en orina con el pH urinario (TABLA I), divergiendo de otro estudio que observó una leve asociación entre pH urinario y β HB plasmático ($r= 0,50$) así como con AcAc urinario ($r= 0,65$) [2]. Se describe que la cetosis origina una cetoadicidosis, por lo que en casos de cetosis subclínica el pH urinario disminuiría, sin embargo siendo su asociación débil no es útil como indicador de cetosis subclínica [2].

Se encontró una relación negativa leve de la glucemia con el resultado de Rothera en orina y la concentración plasmática de β HB (TABLA I). También se observó una relación leve entre la concentración plasmática de NEFA con el resultado de Rothera en orina (TABLA I). Si bien el BEN y la cetosis se originan por déficit de energía, la glucemia tiene un fuerte control homeostático hormonal que mantiene su concentración en el organismo dentro de límites fisiológicos estrechos, por lo que no es muy sensible como criterio diagnóstico en los casos de cetosis subclínica [1].

Indicadores sanguíneos, lácteos, urinarios y cambios de la condición corporal en vacas con BEN y cetosis.
El cambio de la condición corporal fue similar entre las vacas con y sin BEN o con y sin cetosis subclínica considerando los

puntos de corte de β HB plasmático $\geq 1,4$ - $\geq 1,2$ así como entre las distintas reacciones a la prueba de Rothera. Sin embargo, cuando se empleó como punto de corte β HB plasmático $\geq 1,0$ mmol/L, se observó una mayor pérdida de condición corporal en vacas positivas a cetosis (TABLA II), concordando con lo observado en otro estudio [10].

La glucemia fue menor en las vacas con BEN y cetosis subclínica con los distintos puntos de corte (TABLA II), así como en aquellas con reacción intensa al Rothera (TABLA III). Las muestras negativas a la prueba de Rothera presentaron glucemias más elevadas comparadas a las reaccionantes (leve, moderada e intensa) ($P<0,05$). Por otro lado, la concentración de NEFA plasmático fue mayor ($P<0,05$) en las muestras de vacas con BEN, cetosis subclínica (β HB plasmático $\geq 1,4$; $\geq 1,2$ o $\geq 1,0$ mmol/L) (TABLA II) y reaccionantes al Rothera (leve, moderada o intensa) (TABLA III). A su vez, las concentraciones de NEFA fueron similares ($P>0,05$) entre las reacciones intensa y moderada o entre las moderadas y leves del Rothera, compatibles con las distintas magnitudes de BEN y lipomovilización [6].

La excreción urinaria de β HB fue mayor en las vacas con BEN y cetosis subclínica (β HB plasmático $\geq 1,4$; $\geq 1,2$ y $\geq 1,0$ mmol/L) (TABLA II), indicando que cuanto mayor es la concentración de cuerpos cetónicos en sangre mayor es su excreción en la orina. De igual manera, las muestras con reacción intensa a la prueba de Rothera presentaron una mayor concentración de β HB plasmático, seguido por las con reacción moderada, leve y negativa, respectivamente (TABLA III). Este resultado corrobora que la determinación de los cuerpos cetónicos en orina permite diagnosticar la cetosis subclínica en vacas. Las muestras con reacción intensa a la prueba de Rothera presentaron una concentración mayor de β HB urinario, mientras que

TABLA II
VALORES ($\bar{x} \pm DE$) DEL CAMBIO DE CONDICIÓN CORPORAL (Δ CC) Y DE INDICADORES SANGUÍNEOS Y URINARIOS DEL BALANCE ENERGÉTICO EN VACAS LECHERAS CON BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO (β HB $>0,6$ mmol/L) Y CON TRES PUNTOS DE CORTE PARA CETOSIS SUBCLÍNICA (β HB $>1,0$; $>1,2$ Y $>1,4$ mmol/L)

β HB mmol/L	N	Δ CC	Glucosa mmol/L	NEFA μ mol/L	β HB urinario# mmol/L	PH urinario
<0,6	518	-0,04 \pm 0,26	3,81 \pm 0,5 ^a	352 \pm 226 ^a	0,05 \pm 0,27 ^a	7,35 \pm 0,93
>0,6	278	-0,03 \pm 0,26	3,68 \pm 0,6 ^b	435 \pm 274 ^b	0,22 \pm 1,94 ^b	7,49 \pm 0,83
<i>P</i>		0,8100	0,0008	0,0000	0,0420	0,0560
<1,0	691	-0,03 \pm 0,26 ^a	3,80 \pm 0,5 ^a	370 \pm 245 ^a	0,05 \pm 0,24 ^a	7,40 \pm 0,91
>1,0	105	-0,09 \pm 0,25 ^b	3,54 \pm 0,8 ^b	449 \pm 244 ^b	0,56 \pm 3,26 ^b	7,38 \pm 0,92
<i>P</i>		0,0272	0,0000	0,0013	0,0000	0,8558
<1,2	722	-0,03 \pm 0,26	3,79 \pm 0,6 ^a	372 \pm 246 ^a	0,06 \pm 0,34 ^a	7,39 \pm 0,91
>1,2	74	-0,07 \pm 0,24	3,53 \pm 0,8 ^b	454 \pm 240 ^b	0,61 \pm 3,86 ^b	7,46 \pm 0,85
<i>P</i>		0,2808	0,0002	0,0045	0,0231	0,600
<1,4	743	-0,04 \pm 0,26	3,78 \pm 0,6 ^a	373 \pm 245 ^a	0,07 \pm 0,34 ^a	7,39 \pm 0,91
>1,4	53	-0,06 \pm 0,23	3,53 \pm 0,9 ^b	473 \pm 246 ^b	0,90 \pm 4,68 ^b	7,45 \pm 0,83
<i>P</i>		0,4879	0,0018	0,0029	0,0000	0,8102

Índice de excreción, corregido por creatinina.

aquellas con reacciones negativas y leves presentaron concentraciones similares (TABLA III).

Los valores de pH urinario fueron similares ($P > 0,05$) entre vacas negativas o positivas a BEN o cetosis subclínica con los tres puntos de corte (TABLA II) señalando su nula utilidad en el diagnóstico de estas alteraciones.

Con referencia a los resultados obtenidos de los indicadores lácteos se observó que los porcentajes de grasa, proteína y proteína corregida, así como la razón G:P fueron similares entre las muestras negativas y positivas a cetosis subclínica, independiente del punto de corte (TABLA IV) o el resultado a la prueba de Rothera (TABLA III). Las vacas con BEN presentaron un porcentaje de grasa y de razón G:P mayor que las

negativas (TABLA IV). Por otro lado, la razón G:P corregida fue mayor en las muestras de las vacas con BEN o cetosis subclínica con puntos de corte de β HB plasmático $\geq 1,0$ mmol/L o 1,4 mmol/L (TABLA IV). La razón G:P y GP corregida fue mayor en vacas con reacción moderada a la prueba de Rothera en orina comparado con las de reacción negativa (TABLA III). Al respecto se describe que la composición de la leche está influenciada principalmente por la dieta que recibe el animal, de forma que vacas con cetosis subclínica incrementan su contenido de grasa [5, 24], y el déficit de energía en la dieta disminuye el de proteína [5]. El incremento en la razón G:P es un indicador de la presentación de cetosis subclínica, pero presenta una baja especificidad y sensibilidad (58 y 69%, respectivamente) [5], es así que en vacas Holstein en las pri-

TABLA III
VALORES ($\bar{x} \pm DE$) DE INDICADORES SANGUÍNEOS, LÁCTEOS Y URINARIOS DE BALANCE ENERGÉTICO EN VACAS LECHERAS SEGÚN SU REACCIÓN A LA PRUEBA DE ROTHERA EN ORINA

	Negativo	Leve	Moderado	Intenso	Valor P
Plasma, n=	642	95	26	37	-
β HB plasma mmol/L	0,53 \pm 0,33 ^a	0,64 \pm 0,40 ^b	0,99 \pm 0,50 ^c	1,90 \pm 1,55 ^d	0,0000
NEFA plasma μ mol/L	359 \pm 230 ^a	443 \pm 304 ^b	467 \pm 253 ^{bc}	557 \pm 327 ^c	0,0000
Glucemia mmol/L	3,84 \pm 0,54 ^a	3,68 \pm 0,58 ^b	3,56 \pm 1,06 ^b	3,26 \pm 0,60 ^c	0,0000
Leche, n=	427	60	16	27	-
G:P	1,12 \pm 0,19 ^a	1,17 \pm 0,22 ^{ab}	1,27 \pm 0,27 ^b	1,17 \pm 0,18 ^{ab}	0,0023
G:P corregido	1,15 \pm 0,21 ^a	1,22 \pm 0,23 ^b	1,32 \pm 0,28 ^b	1,22 \pm 0,20 ^{ab}	0,0009
Grasa láctea %	3,48 \pm 0,59 ^a	3,67 \pm 0,73 ^b	3,77 \pm 0,73 ^{ab}	3,60 \pm 0,80 ^{ab}	0,0215
Proteína láctea %	3,13 \pm 0,32	3,13 \pm 0,33	3,00 \pm 0,29	3,07 \pm 0,32	0,3624
Proteína láctea corregida %	3,03 \pm 0,32	3,02 \pm 0,33	2,89 \pm 0,28	2,94 \pm 0,31	0,1855
Orina, n=	614	92	26	36	-
β HB orina μ mol/L	109 \pm 430 ^a	105 \pm 247 ^{ab}	467 \pm 746 ^b	1270 \pm 3642 ^c	0,0000

TABLA IV
COMPOSICIÓN PORCENTUAL ($\bar{x} \pm DE$) DE MUESTRAS DE LECHE DE VACAS CON BEN (β HB $> 0,6$ mmol/L) Y CON TRES PUNTOS DE CORTE PARA CETOSIS SUBCLÍNICA ($> 1,0$; $> 1,2$ Y $> 1,4$ mmol/L)

β HB (mmol/L)	N	% grasa	% proteína	% Proteína corregida	GP	G:P corregido
<0,6	352	3,47 \pm 0,56	3,13 \pm 0,30	3,03 \pm 0,31	1,11 \pm 0,17	1,15 \pm 0,19
>0,6	202	3,59 \pm 0,70	3,10 \pm 0,33	2,99 \pm 0,33	1,16 \pm 0,23	1,2 \pm 0,25
P		0,0405	0,3717	0,0520	0,0077	0,0023
<1,0	484	3,50 \pm 0,61	3,12 \pm 0,32	3,02 \pm 0,32	1,12 \pm 0,20	1,16 \pm 0,21
>1,0	70	3,60 \pm 0,69	3,08 \pm 0,26	2,96 \pm 0,26	1,17 \pm 0,20	1,22 \pm 0,21
P		0,2135	0,2070	0,0955	0,0546	0,0449
<1,2	504	3,51 \pm 0,61	3,12 \pm 0,32	3,02 \pm 0,32	1,13 \pm 0,20	1,16 \pm 0,21
>1,2	50	3,55 \pm 0,68	3,07 \pm 0,25	2,96 \pm 0,26	1,15 \pm 0,19	1,20 \pm 0,20
P		0,6583	0,2989	0,1771	0,4018	0,3021
<1,4	516	3,50 \pm 0,62	3,10 \pm 0,10	3,00 \pm 0,32	1,13 \pm 0,20	1,16 \pm 0,21
>1,4	38	3,64 \pm 0,67	3,07 \pm 0,25	3,95 \pm 0,26	1,19 \pm 0,19	1,23 \pm 0,20
P		0,1895	0,3615	0,2600	0,0911	0,0354

meras tres semanas posparto se ha observado una razón G: P>1,25 posiblemente asociada al BEN [5].

Asociación entre los puntos de corte críticos de indicadores sanguíneos y urinarios y la presentación de cetosis subclínica en el pre y posparto. En el preparto, las concentraciones de NEFA >300 y >400 µmol/L incrementaron el riesgo de BEN en 1,55 y 1,71 veces, respectivamente. El NEFA es un indicador preparto de BEN y se ha encontrado que vacas con concentraciones >300 µmol/L, disminuyen la producción láctea en 282 kg de leche en 305 días de lactancia (0,92 L/día) [15], lo que puede deberse al BEN y cetosis en el posparto. Por otro lado, concentraciones plasmáticas de NEFA >700 µmol/L posparto fue un factor de riesgo en la pre-

sentación de cetosis subclínica y la presentación de BEN (TABLA V). El NEFA refleja la movilización lipídica, y esta se puede originar por BEN [11]; se ha sugerido concentraciones plasmáticas de NEFA >260 µmol/L como críticas para la presentación de cetosis subclínica [1].

Por otro lado, en el posparto, las vacas que excretaron cuerpos cetónicos en orina ya sea βHB, AcAc o Ac (reacción leve moderada e intensa a la prueba de Rothera) presentaron una asociación con la presentación de BEN (TABLA V). Cuanto más fuerte fue la reacción a la prueba de Rothera mayor fue su asociación con la presentación de cetosis subclínica. Al respecto, la prueba de Rothera en orina es utilizada normalmente como prueba diagnóstica para la determi-

TABLA V
VALOR DE RAZÓN DE PROBABILIDAD (OR) E ÍNDICE DE CONCORDANCIA (KAPPA) EN LA PRESENTACIÓN DE BEN (βHB >0,6 mmol/L) Y CETOSIS SUBCLÍNICA CONSIDERANDO TRES PUNTOS DE CORTE (βHB >1,0; >1,2 Y >1,4 mmol/L) EN VACAS POSPARTO Y LOS VALORES CRÍTICOS DE INDICADORES SANGUÍNEOS Y URINARIOS

Condición	Valor crítico	N	Ji cuadrado	Kappa	OR	IC OR
BEN	Rothera leve	590	<0,001	0,322	2,43	2,02 - 2,94
	Rothera moderado	590	<0,001	0,261	2,83	2,42 - 3,32
	Rothera intenso	590	<0,001	0,166	2,66	1,46 - 5,55
	GP corregida leche	554	0,006	0,006	1,71	1,25 - 2,34
	Hiperglucemia	622	0,002	-0,116	0,71	0,53 - 0,91
	NEFA > 400 µmol/L	622	0,016	0,087	1,26	1,03 - 1,54
	NEFA > 700 µmol/L	622	0,001	0,092	1,61	1,25 - 2,07
βHB ≥ 1,0	βHB orina > 10 µmol/L	582	0,001	0,134	1,57	1,26 - 1,96
	Rothera leve	590	<0,001	0,360	5,91	3,87 - 8,98
	Rothera moderado	590	<0,001	0,524	9,49	6,61 - 13,6
	Rothera intenso	590	<0,001	0,474	9,49	6,91 - 13,0
	Hiperglucemia	622	0,005	-0,095	0,50	0,29 - 0,86
	NEFA > 400 µmol/L	622	0,014	0,068	1,60	1,07 - 2,39
	NEFA > 700 µmol/L	622	0,002	0,127	2,25	1,40 - 3,61
βHB ≥ 1,2	βHB orina > 10 µmol/L	582	0,002	0,094	1,96	1,27 - 3,03
	Rothera leve	590	<0,001	0,246	4,91	2,97 - 8,12
	Rothera moderado	590	<0,001	0,423	9,00	5,68 - 14,3
	Rothera intenso	590	<0,001	0,449	10,58	6,91 - 16,2
	Hiperglucemia	622	0,003	-0,063	0,55	0,30 - 1,03
	NEFA > 400 µmol/L	622	0,005	0,068	1,94	1,18 - 3,17
	NEFA >700 µmol/L	622	0,046	0,08	1,90	1,02 - 3,55
βHB ≥ 1,4	βHB orina > 10 µmol/L	582	0,040	0,051	2,84	1,45 - 5,55
	Rothera leve	590	<0,001	0,246	7,57	4,02 - 14,2
	Rothera moderado	590	<0,001	0,418	12,17	6,91 - 21,5
	Rothera intenso	590	<0,001	0,494	15,39	9,15 - 25,9
	NEFA > 400 µmol/L	622	0,037	0,044	1,73	0,99 - 3,30
	NEFA >700 µmol/L	622	0,046	0,080	1,90	1,17 - 4,52
	βHB orina > 10 µmol/L	582	0,001	0,074	2,84	1,45 - 5,55

nación de cetosis subclínica [3, 12], con sensibilidad y especificidad de 78 y 96%, respectivamente, utilizando como punto de corte o prueba de oro concentraciones plasmáticas de β HB >1,4 mmol/L [3].

La hipoglucemia (<2,5mmol/L) en el posparto no se asoció con la presentación de BEN y cetosis subclínica; a su vez la hiperglucemia (>4,1 mmol/L) fue un factor de protección para la presentación de BEN y β HB >1,0 mmol/L, pero no para β HB >1,2 ó 1,4 mmol/L (TABLA V). Según Ardavan [1], el punto de corte de la glucemia para el diagnóstico de cetosis es de <2,26 mmol/L, con una sensibilidad del 44,4% y una especificidad de 78,4%.

CONCLUSIONES

La prueba de Rothera en orina de vacas lecheras se asoció con la presentación de BEN y cetosis subclínica, siendo las reacciones leve y moderada indicadora de BEN y la intensa de cetosis subclínica. La composición grasa y de proteínas de la leche, el pH urinario y los cambios de condición corporal no son buenos indicadores de BEN y de cetosis subclínica. La glucemia y NEFA plasmático presentan una buena relación con β HB plasmático y con la prueba de Rothera en orina.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto FIA-CS-C-2004-1-P-002 M2P6 por financiar el estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ARDAVAN, N.; SAEED, N.; ABBAS, R.; AHAD, O. Prevalence of subclinical ketosis in dairy cattle in the Southwestern Iran and detection of cutoff point for NEFA and glucose concentrations for diagnosis of subclinical ketosis. **Prev. Vet. Med.** 100: 38-43. 2001.
- [2] BATEMAN, H.G.; BEEN, A.E.; STANLEY, C.C.; WILLIAMS, C.C.; HUTCHISON, C.F. Case study: Using pH as a predictor for ketosis in transition dairy cows **Prof. Anim. Sci.** 21: 515-520. 2005.
- [3] CARRIER, J.; STEWART, S.; GODDEN, S.; FETROW, J.; RAPNICKI, P. Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. **J. Dairy Sci.** 87: 3725-3735. 2004.
- [4] DIRECCIÓN METEOROLÓGICA DE CHILE. Informe de precipitaciones. 2012. En línea: <http://www.meteochile.cl/precipitacion.html>. 02/15/2012.
- [5] DE ROOS, A.P.; VAN DEN BIJGAART, H.J.; HORLYK, J.; DE JONG, G. Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. **J. Dairy Sci.** 90: 1761-1766. 2007.
- [6] DUFFIELD, T.F.; KELTON, D.F.; LESLIE, K.E.; LISSEMORE, K.D.; LUMSDEN, J.H. Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. **Can. Vet. J.** 38: 713-718. 1997.
- [7] ENJALBERT, F.; NICOT, M.C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. **J. Dairy Sci.** 84: 583-589. 2001.
- [8] FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 77: 2695-2703. 1994.
- [9] GEISHAUSER, T.; LESLIE, K.; TENHAG, J.; BASHIRI, A. Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. **J. Dairy Sci.** 83: 296-299. 2000.
- [10] GILLUND, P.; REKSEN, O.; GROHN, Y.T.; KARLBERG, K. Body condition related to ketosis and reproductive performance in Norwegian dairy cows. **J. Dairy Sci.** 84: 1390-1396. 2001.
- [11] HERDT, T.H. Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver. **Vet. Clin. North Am: Food Anim. Pract.** 16: 215-230. 2000.
- [12] KROGH, M.A.; TOFT, N.; ENEVOLDSEN, C. 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. **J. Dairy Sci.** 94: 2360-2367. 2011.
- [13] MEDCALC. Manual Medcalc Statistical Software. Mariakerke, Belgium. 2011.
- [14] MULLIGAN, F.J.; O'GRADY, L.; RICE, D.A.; DOHERTY, M.L. A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow. **Anim. Reprod. Sci.** 96: 331-353. 2006.
- [15] OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **J. Dairy Sci.** 93: 546-554. 2010.
- [16] OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. **J. Dairy Sci.** 93: 1596-1603. 2010.
- [17] OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy

- rate, and milk production at the herd level. **J. Dairy Sci.** 93: 3595-3601. 2010.
- [18] OVERTON, T.R.; WALDRON, M.R. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. **J. Dairy Sci.** 87: E105-E119. 2004.
- [19] PETRIE, A.; WATSON, P. Linear correlation and regression. In: Petrie, A., Watson, P. (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**, Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 121-140. 2006.
- [20] PETRIE, A.; WATSON, P. Non-parametric statistic methods. In: Petrie, A., Watson, P. (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**, Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 158-173. 2006.
- [21] PETRIE, A.; WATSON, P. Probability and probability distributions. In: Petrie, A., Watson, P. (Eds). **Statistics for Veterinary and Animal Science**, Wiley-Blackwell: Oxford. Pp 28-44. 2006.
- [22] SEIFI, H.A.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. **Vet. J.** 188: 216-220. 2010.
- [23] STATISTIX. Statistix 8.0: User's manual. Analytical software. Tallahassee, FL, USA. 396pp. 2003.
- [24] STEEN, A.; OSTERAS, O.; GRONSTOL, H. Evaluation of bulk milk analyses of acetone, urea, and the fat-lactose-quotient as diagnostic aids in preventive veterinary medicine. **Zentralbl. Veterinarmed A.** 43: 261-269. 1996.
- [25] VAN SAUN, R. Indicators of dairy cow transition risks: metabolic profiling revisited. In: Wittwer, F.; Chihuailaf, R.; Contreras, H.; Gallo, C.; Kruze, J.; Lanuza, F.; Letellier, C.; Monti, G., Noro, M. (Eds.). **Updates on ruminant production and medicine**, Andros impresores: Santiago. Pp 65-77. 2010.
- [26] WALSH, R.B.; WALTON, J.S.; KELTON, D.F.; LEBLANC, S.J.; LESLIE, K.E.; DUFFIELD, T.F. The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. **J. Dairy Sci.** 90: 2788-2796. 2007.
- [27] WESCHENFELDER, M.; BARBOZA, C.; WAGEMANN, C.; BÖHMWALD, H.; CHIHUAILAF, R.; WITTEWER, F.; NORO, M. Presentación de desbalances energéticos y alteraciones hepáticas en rebaños lecheros de Chile durante 1986-2010. **XXXV Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal**. Coyhaique, 11/ 27-29. Chile. Pp 179-180. 2010.