



Foto: Tatiana Morales

EFICIENCIA DE TRES HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DE CETOSIS SUBCLÍNICA

DMV MSc Tatiana Morales¹, DMV Natalia Dotti²,
DMV Sebastián Fernández², Lic. CTL Andrea Cartaya³,
DMV PhD Gretel Ruprechter Schölderle⁴

¹Programa de Investigación en Producción de Leche -
INIA La Estanzuela

²Médica/o Veterinaria/o de libre ejercicio

³Laboratorio de calidad de Leche - INIA La Estanzuela

⁴Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal,
Facultad de Veterinaria - Udelar

La importancia económica y el impacto que tiene la cetosis subclínica sobre la productividad y el bienestar de las vacas lecheras hace imprescindible el estudio sobre su diagnóstico. Herramientas precisas y prácticas son requeridas por los productores para monitorear esta enfermedad.

¿QUÉ ES LA CETOSIS Y POR QUÉ SU IMPORTANCIA?

Debido al incremento de los requerimientos de nutrientes (por producción de leche) y la disminución del consumo de alimentos, la vaca durante el posparto temprano sufre un déficit energético que provoca el uso de fuentes de energía alternativa. Una de esas fuentes es el tejido graso, el cual se degrada liberando ácidos grasos no esterificados (NEFA), los que serán metabolizados en

el hígado produciendo cuerpos cetónicos [acetona, ácido acetoacético (AcAc) y beta-hidroxibutírico (BHB)]. Los NEFAs y los cuerpos cetónicos son utilizados como fuente de energía por la vaca, por lo tanto, cierta concentración de ellos en la sangre es parte de una adaptación normal a lactancia temprana. El problema surge cuando existen concentraciones excesivas, lo que lleva a la enfermedad conocida como cetosis. La cetosis se caracteriza por una baja concentración de glucosa y acumulación de cuerpos cetónicos en

sangre (Radostits, 2002). En su forma subclínica no se observan signos clínicos evidentes, por lo tanto, para su diagnóstico es necesario medir la concentración de cuerpos cetónicos en sangre (valores de BHB $\geq 1,2$ mmol/L; Mann y col., 2019).

Esta enfermedad, de alta prevalencia en los rodeos lecheros de todo el mundo ($\approx 50\%$), produce importantes pérdidas económicas debido a la disminución de la producción láctea (1-9%), reducción de la fertilidad y mayor riesgo a otras enfermedades. Por lo tanto su diagnóstico resulta de alta relevancia.

DIAGNÓSTICO DE CETOSIS SUBCLÍNICA

El método de referencia para el diagnóstico de cetosis subclínica es la determinación de BHB en sangre. Sin embargo, es posible determinar los cuerpos cetónicos (BHB, AcAc) en leche u orina, lo que ha llevado a crear diferentes pruebas (por ejemplo, tiras reactivas que miden AcAc en orina). La precisión de las diferentes pruebas (medida a través de la sensibilidad y especificidad) ha sido muy variable dependiendo de la técnica y/o el punto de corte utilizado para el diagnóstico (Abuelo y Alves-Nores, 2016) (Cuadro 1).

Cuadro 1 - Resultados encontrados en la literatura de sensibilidad (Se) y especificidad (Esp) de distintas herramientas diagnósticas para cetosis en vacas lecheras con los correspondientes puntos de corte estudiados.

Prueba	Muestra	Punto de corte	Se (%)	Esp (%)
Keto-test™	Leche	$\geq 0,10$ mmol/L	81,5	81,9
FTIR*	Leche	$\geq 0,10$ mmol/L	70	95
Relación G:P	Leche	$> 1,42$	92	65
Ketostix®	Orina	≥ 5 mg/dL	5	100
Ketostix®	Orina	≥ 5 mg/dL	87,6	89,2

*espectrometría infrarroja transformada de Fourier
Sensibilidad (Se): probabilidad de detectar un animal enfermo en una población enferma.
Especificidad (Esp): probabilidad de detectar un animal sano en una población sana.

La tira para orina más utilizada y validada para el control de la cetosis subclínica ha sido Ketostix® (Bayer, Germany), existiendo otras marcas, como Multistix® 10SG (Siemens Healthcare GmbH, Germany) presentes en Uruguay (uso humano), que no han sido evaluadas. Por otro lado, en los últimos años, se ha estado poniendo a punto en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela, la técnica denominada espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica, que determina las concentraciones de BHB en leche, parece ser prometedora, ya que permitiría diagnosticar

cetosis junto con el análisis de composición de la leche. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue validar dos herramientas de diagnóstico de cetosis subclínica (Multistix® 10SG y FTIR), durante los primeros 20 días luego del parto. Como complemento también evaluamos la utilización de la relación grasa:proteína (G:P) de la leche como método diagnóstico, ya que cocientes G:P > 1.4 han sido reportados como indicadores de presencia de cetosis subclínica en el rodeo.

METODOLOGÍA

En la Unidad de Lechería de INIA “La Estanzuela” se evaluaron 101 vacas Holando, multíparas, bajo una dieta de pastoreo y ración totalmente mezclada. Dos veces por semana, desde el parto hasta 20 días posparto, se realizó el diagnóstico presuntivo de cetosis subclínica de cada vaca a través de las tiras reactivas para orina Multistix® 10SG. Para esto se embebió la tira en orina (Figura 1), procediendo a leerla luego del tiempo estipulado por el proveedor (40 segundos).



Figura 1 - Utilización de las tiras reactivas en orina Multistix® 10SG con el animal en el cepo.

La utilización de la medición de BHB en leche por el método FTIR (Laboratorio de calidad de leche de INIA La Estanzuela), es una buena herramienta de diagnóstico de cetosis subclínica para ser utilizada de forma rutinaria en el tambo.

Se registró el resultado de AcAc, siendo el valor mínimo detectable 5mg/dL y el máximo 160mg/dL (Figura 2). A su vez, se extrajo sangre en tubos con anticoagulante (Figura 3), la que fue enviada al Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (Facultad de Veterinaria, Udelar) para la determinación de las concentraciones de BHB. Con los resultados del análisis de laboratorio se realizó el diagnóstico definitivo de cetosis subclínica; animales con una concentración de BHB en sangre $\geq 1,2$ mmol/L eran considerados positivos.

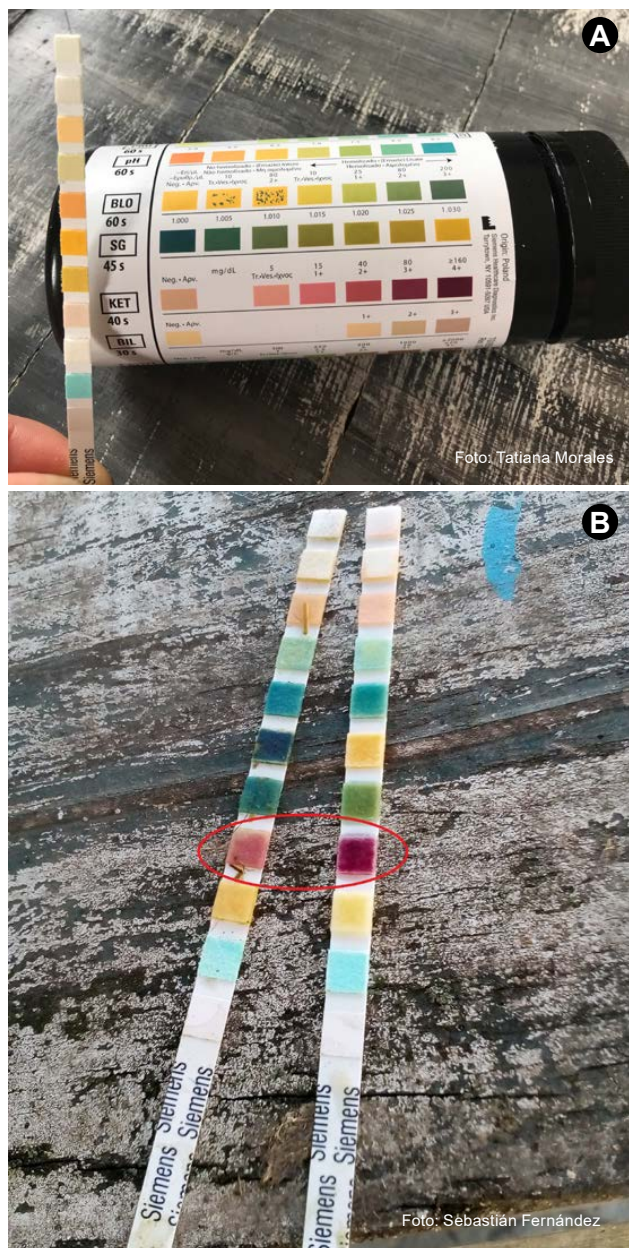


Figura 2 - A) Tiras reactivas Multistix® 10SG: escala de referencia y B) tiras embebidas en orina mostrando diferentes coloraciones para cetosis (círculo rojo).



Figura 3 - Extracción de sangre de una vaca para luego determinar su nivel de BHB en plasma.

También se tomaron muestras de leche (Figura 4), durante el ordeño previo a la revisión clínica, para la determinación de BHB, grasa y proteína en el Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela a través del método FTIR (Figura 5).

Se analizó la correlación entre las concentraciones de BHB en sangre, leche y AcAc en orina. Para el análisis de la eficiencia de las tres herramientas, Multistix® 10SG, FTIR, y G:P, se calcularon los verdaderos positivos, verdaderos negativos, falso positivos y falsos negativos, y con ellos se calcularon la sensibilidad (Se): probabilidad de detectar un animal enfermo en una población enferma; y la especificidad (Esp): probabilidad de detectar un animal sano en una población sana.

Para esto se consideró cetosis subclínica para las tiras Multistix® 10SG cuando los resultados fueron ≥ 5 mg/dL; para la técnica FTIR tuvimos que calcular el punto de corte óptimo, ya que no contábamos con uno previo; para la G:P se consideró cetosis subclínica cuando esta fue mayor a 1,42.

Debido a que la cetosis es una enfermedad que produce pérdidas productiva y económica, es importante 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.



Foto: Natalia Dotti

Figura 4 - Obtención de muestra de leche para su posterior determinación de los niveles de BHB, grasa y proteína láctea.

¿QUÉ SIGNIFICAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS?

La concentración de BHB en sangre se correlacionó positivamente con la concentración de AcAc en orina ($r=0,67$) y con la concentración de BHB en leche ($r=0,44$). Esto significa que, cuanto mayores son los niveles de BHB en sangre de una vaca, mayores son las concentraciones de BHB en leche y de AcAc en orina. También la concentración de BHB en sangre se correlacionó positivamente con la G:P de la leche ($r=0,19$), pero con menor fuerza, lo que dependió del porcentaje de grasa en leche ($r=0,22$). A mayor BHB en sangre, mayor grasa en leche.

En relación al desempeño de las tiras Multistix®10SG, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, debido a la baja capacidad del método para detectar animales enfermos (baja Se) (Cuadro 2).

Cuadro 2 - Sensibilidad (Se) y Especificidad (Esp) de diferentes herramientas diagnósticas de cetosis subclínica [concentración de AcAc en orina con tiras reactivas Multistix® 10SG, concentración de BHB en leche por espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR, punto de corte obtenido) y relación grasa-proteína en leche (G:P)].

Índices	Multistix®10SG ($\geq 5\text{mg/dL}$)	FTIR ($\geq 0,14\text{mmol/L}$)	G:P ($>1,42$)
Se	37,8 %	75,0 %	94,4 %
Esp	94,4 %	60,0 %	16,2 %

Se obtuvo un alto número de falsos negativos (animales que estaban enfermos, eran diagnosticados como sanos). Por lo tanto, esta herramienta nos da un valor de prevalencia de la enfermedad más bajo de lo real, y no nos dice la magnitud del problema en nuestro rodeo. La baja precisión de esta herramienta podría estar relacionada a que la lectura se realiza visualmente (subjetiva), ya que cuando se hace en un medidor automático los valores mejoran (da Fonseca Ferreira y col., 2018). Por otro lado, al aumentar las concentraciones de BHB en sangre se aumentan las concentraciones de AcAc en orina, pero estos aumentos podrían no ser proporcionales, necesitando una concentración mínima de AcAc en orina para la detección de cetosis subclínica.

Este es el primer trabajo que evalúa el diagnóstico de cetosis subclínica por el método FTIR utilizando como prueba de referencia las concentraciones de BHB en sangre, y la primera publicación de un punto de corte óptimo para esta técnica. El punto de corte óptimo calculado fue de $0,14\text{ mmol/L}$. Esto significa que si clasificamos a los animales como enfermos cuando presentan valores de BHB en leche $\geq 0,14\text{ mmol/L}$, se maximiza la Se y Esp, obteniendo la menor cantidad de falsos positivos y negativos. El FTIR fue la herramienta con mayor precisión (Cuadro 2).

El diagnóstico de cetosis subclínica a través del análisis de G:P estuvo condicionada por el porcentaje de grasa en leche, lo que es lógico ya que durante los primeros días posparto el animal moviliza principalmente reservas grasas.



Foto: Juan Cabrera

Figura 5 - Equipo de espectrometría infrarroja transformada de Fourier (FTIR) del Laboratorio de Calidad de Leche de INIA La Estanzuela.

El uso de estas técnicas para diagnosticar cetosis subclínica en vacas lecheras necesita aún mayor estudio con el fin de mejorar sus precisiones y determinar factores que puedan influenciar en los resultados, por ejemplo, días posparto.

La movilización de grasa corporal se ve reflejada en el aumento de la cantidad de grasa y BHB en leche. El cálculo de G:P nos permite identificar a los animales enfermos (alta Se), pero no así los sanos (baja Esp) cuando utilizamos el punto de corte descrito en la literatura (Cuadro 2).

Esto significa que animales sanos serán identificados como enfermos, provocando un valor de prevalencia de cetosis en nuestro rodeo mayor al real. Por lo tanto, esta herramienta no es suficientemente exacta.

CONCLUSIONES

Las diferentes herramientas tuvieron diferentes grados de precisión (Se y Esp) y esto debe ser considerado a la hora de elegir el mejor método de diagnóstico.

Respecto a las tiras Multistix® 10SG, la baja detección de animales enfermos, lo hace un método no efectivo

para su uso a campo para el diagnóstico de cetosis subclínica a nivel de rodeo.

La determinación de la concentración de BHB en leche por FTIR, resultó tener el mejor desempeño, cuando se lo utiliza durante los primeros días posparto y con el punto de corte calculado. Más estudios sobre esta técnica se vienen llevando a cabo en el Laboratorio de calidad de leche de INIA La Estanzuela.

La utilización de G:P como indicador de cetosis subclínica fue buena para detectar los animales enfermos, pero no los sanos, debido tal vez a que dependa de la concentración de grasa de la leche.

Agradecimientos: A todo el personal de la Unidad de Lechería y del Laboratorio de calidad de Leche de INIA La Estanzuela, especialmente a Esteban López, Tomás López y María López.

BIBLIOGRAFÍA

- 1 - Abuelo, A.; Alves-Nores, V.C. (2016). Point-of-care testing in cattle practice: Reliability of cow-side diagnostic tests. doi:10.1136/inp.i2704.
- 2 - 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.
- 3 - Mann S, McArt J, Abuelo A.; (2019). Production-related metabolic disorders of cattle: ketosis, milk fever and grass staggers. In Practice; 41:205-219.
- 4 - 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.



Foto: Lucía Bentancor

Figura 6 - Vacas pastoreando Festuca.