



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA CETOSIS  
EN BOVINOS LECHEROS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE  
SANGRE Y ORINA EN LA HACIENDA MIRAFLORES BAJO #4.

AUTOR

Karla Verónica Borja Reyes

AÑO

2019



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA CETOSIS EN  
BOVINOS LECHEROS MEDIANTE EL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE  
SANGRE Y ORINA EN LA HACIENDA MIRAFLORES BAJO #4.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Médico Veterinario Zootecnista

Profesor Guía

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Autora

Karla Verónica Borja Reyes

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el trabajo, Comparación de dos métodos diagnósticos para cetosis en bovinos lecheros mediante el análisis de muestras de sangre y orina en la Hacienda Miraflores Bajo #4, a través de reuniones periódicas con la estudiante Karla Verónica Borja Reyes, en el semestre 2019-20, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Cristian Fernando Cárdenas Aguilera

Médico Veterinario Zootecnista

C.I. 1718185778

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Comparación de dos métodos diagnósticos para cetosis en bovinos lecheros mediante el análisis de muestras de sangre y orina en la Hacienda Miraflores Bajo #4, de la estudiante Karla Verónica Borja Reyes, en el semestre 2019-20, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Martín Alonso Ortíz Vinuesa  
Magister En Ciencias Mención  
Reproducción Animal  
C.I. 0601272925

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Karla Verónica Borja Reyes

C.I. 0401528203

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres y docentes quienes han sido un pilar fundamental durante el transcurso de mi carrera, al Dr. Joar García y en especial al Dr. Cristian Cárdenas quien fue mi guía durante la realización de este proyecto.

## **DEDICATORIA**

A mis padres por ser un gran ejemplo para mí, a Andrés Hernández por haber estado conmigo en todo momento brindándome su amor y a Andrés Amador por enseñarme el significado de una verdadera amistad.

## RESUMEN

En el Ecuador, varias ganaderías utilizan tiras reactivas de uso humano para el diagnóstico de cetosis en bovinos, sin embargo, se desconoce el nivel de confianza de la prueba, siendo el objetivo de la presente investigación comparar dos métodos diagnósticos diferentes para cetosis, uno específico para bovinos y otro de uso humano mediante el análisis de muestras de sangre (prueba estándar de oro) y orina determinando el nivel de confianza de las tiras reactivas de uso humano. La investigación se realizó en la Hacienda Miraflores Bajo #4 la cual cuenta con 281 bovinos de leche, siendo escogidos 50 bajo criterios de inclusión y exclusión, distribuidos en 5 categorías (vaconas, gestantes 4 meses, parto 15 días, postparto 15 y 42 días) sometidos a un muestreo de sangre (venopunción coccígea) y orina (micción espontánea) el mismo día, utilizando el equipo BHBCheck™ para la medición de  $\beta$ -hidroxibutirato en sangre y Combur10 Test® para la medición de acetoacetato en orina. Para el análisis estadístico se aplicaron medidas de tendencia central a los valores obtenidos de muestras de sangre, posteriormente un ANOVA al 95% de confianza en el cual se obtuvo *p-valor* de 0,000 seguido del Test de Duncan, obteniendo tres subconjuntos, grupo A vaconas, gestantes 4 meses y parto 15 días, grupo B postparto 15 días, grupo C postparto 42 días, por otro lado, para los valores obtenidos de muestras de orina se aplicaron la prueba de Kruskal-Wallis, con *p-valor* de 0,001, finalmente se realizaron las pruebas de signos y Wilcoxon para comparar los resultados entre muestras de sangre y orina, en donde el *p-valor* de ambas pruebas fue de 0,000 concluyendo que con un punto de corte para cetosis de 0,8mmol/L-1,2mmol/L, los resultados de las tiras reactivas de orina alcanzaron un 92% de confianza frente a los de la prueba estándar de oro en sangre.

**Palabras clave:** cetosis, diagnóstico, bovino,  $\beta$ -hidroxibutirato, acetoacetato.



## ABSTRACT

In Ecuador, several farms use human test strips for diagnosis of ketosis in cattle, the confidence level of that test is unknown though, the objective of this study was to compare two different diagnostic methods for ketosis, one is a specific method in dairy cattle and the other one is a human method, using blood (coccygeal venipuncture) which is a gold standard test and urine (spontaneous urination) samples to determine the confidence level of test strips. The research was conducted at Hacienda Miraflores Bajo #4 which has 281 dairy cattle, 50 were chosen under the inclusion and exclusion criteria, distributed into 5 categories (heifer, 4 months pregnant, 15 days antepartum, 15 and 42 days postpartum) subjected to a blood and urine sample the same day, using BHBCheck™ for  $\beta$ -hydroxybutyrate measurement in blood and Combur10 Test® for acetoacetate measurement in urine. For the statistical analysis, measures of central tendency were applied to the values obtained from the blood samples, then a 95% confidence ANOVA was performed getting a *p-value* of 0.000 followed by Duncan Test, attaining three subsets, group A heifer, 4 months pregnant and 15 days antepartum, group B 15 days postpartum, group C 42 days postpartum, on the other hand, for the urine values were applied the Kruskal-Wallis test, with a *p-value* of 0.001, finally the signs and Wilcoxon tests were performed to compare the results between blood and urine samples, where the *p-value* of both tests was 0.000 concluding with a cut point of 0.8mmol/L-1,2mmol/L for ketosis, the results of the urine test strips reached 92% confidence against the standard gold blood test results.

**Key words:** ketosis, diagnosis, bovine,  $\beta$ -hydroxybutyrate, acetoacetate.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Capítulo I: Introducción .....                        | 1  |
| 1.1. Objetivos.....                                   | 2  |
| 1.1.1. Objetivo general.....                          | 2  |
| 1.1.2. Objetivos específicos.....                     | 2  |
| 1.2. Hipótesis.....                                   | 2  |
| Capítulo II: Marco teórico.....                       | 3  |
| 2.1. Fisiología del periparto.....                    | 3  |
| 2.2. Cambios endocrinos en el periparto .....         | 5  |
| 2.3. Balance energético negativo.....                 | 8  |
| 2.4. Cetosis bovina .....                             | 11 |
| 2.4.1. Etiología.....                                 | 11 |
| 2.4.2. Patogenia de la enfermedad.....                | 18 |
| 2.4.3. Signos clínicos.....                           | 20 |
| 2.4.4. Factores de riesgo .....                       | 21 |
| 2.4.5. Diagnóstico .....                              | 22 |
| 2.4.6. Monitoreo de la cetosis a nivel de rebaño..... | 25 |
| 2.4.7. Tratamiento.....                               | 26 |
| Capítulo III: Materiales y métodos .....              | 27 |
| 3.1. Ubicación .....                                  | 27 |

|  |    |
|--|----|
| 3.2. Población y muestra .....                   | 28 |
| 3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión .....  | 29 |
| 3.3. Materiales .....                            | 29 |
| 3.3.1. Campo y laboratorio.....                  | 29 |
| 3.3.2. Oficina.....                              | 30 |
| 3.4. Metodología .....                           | 30 |
| 3.4.1. Levantamiento de información .....        | 30 |
| 3.4.2. Toma de muestras .....                    | 31 |
| 3.4.3. Análisis de las muestras .....            | 32 |
| 3.4.4. Variables.....                            | 32 |
| 3.5. Análisis estadístico .....                  | 33 |
| 3.5.1. Estadística paramétrica .....             | 33 |
| 3.5.2. Estadística no paramétrica .....          | 34 |
| Capítulo IV: Resultados y discusión .....        | 35 |
| 4.1. Resultados .....                            | 35 |
| 4.2. Discusión .....                             | 48 |
| 4.3. Limitantes.....                             | 51 |
| Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones ..... | 53 |
| 5.1. Conclusiones .....                          | 53 |
| 5.2. Recomendaciones .....                       | 53 |

|                   |    |
|-------------------|----|
| REFERENCIAS ..... | 55 |
| ANEXOS .....      | 68 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1 Formación de cuerpos cetónicos en sangre y orina en bovinos sanos. ....   | 16 |
| Tabla 2 Punto de corte para cetosis subclínica y cetosis clínica. ....  | 18 |
| Tabla 3 Medias de los datos meteorológicos entre los años 2010-2015. ....   | 28 |
| Tabla 4 Criterios de inclusión y exclusión. ....  | 29 |
| Tabla 5 Operacionalización de variables de estudio. ....  | 32 |
| Tabla 6 Medidas de tendencia central de los valores de $\beta$ HB en sangre (mmol/L). ....  | 37 |
| Tabla 7 ANOVA para valores de $\beta$ HB en sangre del total de animales. ....  | 40 |
| Tabla 8 Test de Duncan y formación de subconjuntos entre medias de los valores de $\beta$ HB en sangre. ....  | 41 |
| Tabla 9 Análisis porcentual y de frecuencias de los valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de animales. ....   | 42 |
| Tabla 10 Tabla cruzada Categoría * Valor Orina (mmol/L). ....   | 43 |
| Tabla 11 Prueba de Kruskal-Wallis para valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de animales. ....  | 46 |
| Tabla 12 Prueba de signos y de rangos con signo de Wilcoxon para valores de AcAc (mmol/L) en orina y de $\beta$ HB (mmol/L) en sangre del total de animales. .... | 47 |
| Tabla 13 Resultados para cetosis en muestras de sangre y orina de los 50 animales muestreados. ....   | 48 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Ingesta de materia seca (dry matter intake); Peso vivo (live weight);<br>Producción de leche (milk yield) durante las 12 semanas iniciales de lactancia..... | 10 |
| Figura 2. Relación entre producción lechera, ingesta de materia seca y balance de<br>energía en las primeras 12 semanas de lactancia.. .....                           | 10 |
| Figura 3. Ubicación geográfica de la Hacienda Miraflores Bajo #4. ....   | 27 |
| Figura 4. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de vaconas. ....   | 38 |
| Figura 5. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de gestantes 4 meses. ....   | 38 |
| Figura 6. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de preparto 15 días. ....  | 39 |
| Figura 7. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de postparto 15 días.....  | 39 |
| Figura 8. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de postparto 42 días.....  | 40 |
| Figura 9. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina del total de animales. ....   | 42 |
| Figura 10. Gráfico de barras de los valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de<br>animales. ....   | 43 |
| Figura 11. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en vaconas.....  | 44 |
| Figura 12. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en gestantes 4 meses. 44   |    |
| Figura 13. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en preparto 15 días.....   | 45 |
| Figura 14. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en postparto 15 días. ..   | 45 |
| Figura 15. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en postparto 42 días. ..   | 46 |

## Capítulo I: Introducción

La investigación presente, se basa en determinar el nivel de confianza del uso de dos métodos diagnósticos diferentes para cetosis en bovinos de leche para permitir al ganadero y médico veterinario obtener resultados precisos en cuanto a la detección de cetosis. El proyecto se llevó a cabo en la Hacienda Miraflores Bajo #4 ubicada en el cantón Mejía, en la provincia de Pichincha, Ecuador.

La cetosis es una enfermedad metabólica común en el ganado lechero que ocurre típicamente al inicio de la lactancia y se caracteriza por presentar un estado de inapetencia, ocasionalmente se observan signos de disfunción nerviosa, como pica, incoordinación y marcha anormal (Oetzel, 2015).

La condición de la cetosis es más común donde las vacas lecheras se reproducen constantemente y se manejan para una producción alta de leche, la cetosis clínica y subclínica causa una caída en la producción lechera y en la capacidad reproductiva incrementando el riesgo de desplazamiento de abomaso (Finney & Eastridge, 2014; Galvão, Vieira Neto, Peña, Bittar, & Ibarbia, 2017).

La evolución genética ha permitido desarrollar ciertas razas para llegar a producir hasta 20000 litros por lactancia, esta raza es la Holstein Friesian, sin embargo, estos altos niveles de producción llevan consigo varios problemas funcionales, reproductivos y metabólicos como es la cetosis en el ganado bovino (Weigel, VanRaden, Norman, & Grosu, 2017).

El diagnóstico se realiza midiendo niveles de acetoacetato (AcAc) o  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ HB) en sangre, orina o leche respectivamente, adicionalmente se basa en los signos clínicos y factores de riesgo (Cucunubo, Strieder-Barboza, Wittwer, & Noro, 2013).

Se ha venido utilizando como método diagnóstico la medición y control de cetonas en orina, por medio de la aplicación de tiras reactivas de uso humano,

debido a su bajo costo, sin embargo, no se sabe si realmente este mecanismo funciona o no de una manera adecuada, por lo cual, es sugerente la ejecución de un estudio comparativo entre un método diagnóstico específico para bovinos (BHBCheck™) y la medición de cetonas en orina con el uso de la tira reactiva para humanos (Combur10 Test®).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo general**

Comparar dos métodos diagnósticos para cetosis en bovinos de leche mediante el análisis de muestras de sangre y orina en la Hacienda Miraflores Bajo #4 con el fin de determinar el nivel de confianza de las tiras reactivas de uso humano.

### **1.1.2. Objetivos específicos**

- Seleccionar aleatoriamente un grupo de bovinos de la Hacienda Miraflores Bajo #4 y obtener datos homogéneos y representativos para analizar una muestra de sangre y una de orina con dos distintas pruebas diagnósticas de cetosis por cada animal seleccionado.
- Contrastar los valores de la concentración de cuerpos cetónicos en sangre y orina de los animales muestreados con dos métodos diagnósticos, mediante el uso de herramientas estadísticas para evaluar los resultados de las tiras reactivas de uso humano.

## **1.2. Hipótesis**

Existen diferencias entre los resultados para cuerpos cetónicos obtenidos de las tiras reactivas de uso humano, frente a los resultados del método diagnóstico específico para ganado bovino.



## Capítulo II: Marco teórico

### 2.1. Fisiología del periparto

Grummer (1995) definió el período de transición como las 3 semanas anteriores al parto y las 3 posteriores al mismo, basándose en los cambios correspondientes en las hormonas, el metabolismo y los requisitos energéticos, por lo tanto, el período de transición se refiere al cambio del ganado lechero desde la última etapa de la gestación hasta el parto y el inicio o el reinicio de la lactancia.

La utilización de glucosa en el ganado lechero en el período del periparto está impulsada por el requerimiento de glucosa placentaria y fetal en la última fase de la gestación y la producción de lactosa a partir de la glucosa en la glándula mamaria durante el inicio de la lactancia (Kawashima, Kida, Schweigert, & Miyamoto, 2009).

En bovinos, el 30-50% del aumento de los requerimientos de glucosa en la gestación tardía (tercer tercio de gestación) se debe a los requerimientos de un feto en crecimiento, un tercio de los que utiliza la placenta (Jolicoeur, Brito, Santschi, Pellerin, Lefebvre, Berthiaume & Girard, 2014).

Aunque los requerimientos de glucosa son altos en el último tercio de gestación, el aumento es modesto en comparación con las necesidades de glucosa en el inicio de la lactancia para la producción de calostro y leche, aproximadamente el 60% de la glucosa de los rumiantes lactantes es utilizada por la glándula mamaria para producir lactosa (Tatone, 2016).

Antes del aumento de los requisitos energéticos de la lactancia, hay una caída de aproximadamente 30% de ingesta de materia seca en las 3 semanas previas al parto en todas las vacas, el 12% de esa disminución se produce en la última

semana de gestación (Astessiano, Pérez, Quintans, Soca, Meikle, Crooker & Carriquiry, 2014).

Una caída más pronunciada en la ingesta se ha asociado con enfermedades posparto, aunque la necesidad general de glucosa es mayor en el pico de lactancia, el aumento repentino de los requisitos al inicio de la lactancia combinado con la disminución de la ingesta de energía, hace de este un período crítico (Kawashima et al., 2009).

El período de parto se acompaña también de cambios en los patrones de tráfico de leucocitos, que llegan a afectar las respuestas inmunitarias (Grummer, 1995).

Los cambios hormonales son el principal motivo para que se produzca un impacto negativo sobre el sistema inmunológico del bovino, siendo el incremento del cortisol el cambio más significativo y a su vez la disminución de la progesterona junto con el aumento de los estrógenos (Trevisi & Minuti, 2018).

La producción de cuerpos cetónicos en el hígado y liberación de ácidos grasos desde el tejido adiposo provocan un efecto antagonista sobre los procesos inmunitarios del organismo, debido a que el tejido adiposo no sólo corresponde a una reserva energética, también cumple un papel sumamente importante sobre el sistema inmune ayudando como tejido proinflamatorio en la liberación de mediadores químicos (Ametaj, 2017).

Trevisi y Minuti (2018) demostraron que el porcentaje de linfocitos T en la circulación periférica cambió del 45% durante el segundo tercio de la lactancia al 20% en las vacas pertenecientes al último tercio de gestación, esto fue acompañado por una disminución de las células T CD4 + y un aumento de las células T CD8 + con funciones supresoras.

## 2.2. Cambios endocrinos en el periparto

Aproximadamente 3 semanas antes del parto, las concentraciones de estrógeno en plasma comienzan a aumentar y el punto máximo es alcanzado al momento del parto, antes de una drástica disminución de la concentración (Vargová, Petrovič, Konvičnâ, Kadaši, Zaleha, & Kováč, 2015).

Por otro lado, la progesterona permanece alta hasta el último tercio de gestación para el mantenimiento de la preñez y luego disminuye significativamente en el momento del parto, estos cambios, pueden jugar un papel importante en la caída en cuando a la ingesta de materia seca que se produce días antes al parto (Tatone, 2016).

Los estrógenos aumentan la movilización de ácidos grasos y contribuyen a disminuir la capacidad de respuesta de la insulina periférica (Moore, Laporta, Crenshaw, & Hernandez, 2015).

La hormona del crecimiento o somatotropina aumenta durante la preñez hasta su punto máximo en el parto y luego disminuye gradualmente al inicio de la lactancia, el aumento de somatotropina alrededor del parto puede ser iniciado por la hipoglucemia a causa de la disminución de ingesta de materia seca (Huzzey, Mann, Nydam, Grant, & Overton, 2015).

La exposición a la hormona del crecimiento aumenta la capacidad de respuesta a la lipólisis, disminuye la sensibilidad a la insulina y aumenta la gluconeogénesis, la acción sobre la gluconeogénesis puede ser directa e indirecta a través de alteraciones en la respuesta a la insulina (Astessiano et al., 2014).

Los receptores de la hormona del crecimiento se encuentran en numerosos tipos de tejidos, las ubicaciones más abundantes son el hígado y el tejido adiposo (De Koster & Opsomer, 2013).

La hormona del crecimiento y su efecto en los hepatocitos tiene varias funciones, incluida la estimulación de la producción y la secreción del factor de crecimiento 1 que viene del inglés *insulin-like growth factor 1* (IGF1) similar a la insulina a través de la regulación negativa del receptor de la hormona del crecimiento que se produce al inicio de la lactancia (Astessiano et al., 2014).

La disminución del receptor de la hormona del crecimiento reduce la cantidad de IGF1 sintetizado y secretado, por lo que, la hormona del crecimiento se libera cuando la concentración de IGF1 disminuye debido a un circuito de retroalimentación (Haga, Miyaji, Nakano, Ishizaki, Matsuyama, Katoh & Roh, 2018).

El aumento de la hormona de crecimiento al inicio de la lactancia y acentuado balance energético negativo aumenta tanto la liberación de ácidos grasos no esterificados (AGNE) como la gluconeogénesis (Hayirli, Keisler, Doepel, & Petit, 2011).

La insulina participa en la captación de glucosa en los tejidos con los transportadores de glucosa dependientes de insulina GLUT4, el tejido adiposo y el transporte de glucosa muscular son principalmente una función de los transportadores GLUT4 y GLUT1, siendo GLUT1 responsable de la captación de glucosa basal, la captación de glucosa mamaria, placentaria y fetal se controla a través de los transportadores GLUT1 y GLUT3, ambos son independientes de la insulina (Tatone, 2016).

La insulina funciona aumentando el uso de glucosa y el almacenamiento de energía a través de la estimulación de la glucogénesis hepática, y la formación de proteínas y triglicéridos, además, la insulina también afecta el uso de la glucosa y la cetona en los tejidos periféricos, la glucogénesis y la formación de proteínas en el tejido muscular, así como la lipogénesis y la captación en el tejido adiposo de glucosa, la insulina que funciona dentro del hígado puede desviar los

ácidos grasos libres de la oxidación hacia la esterificación (Astessiano et al., 2014; Thatcher, 2017).

El glucagón que actúa en oposición a la insulina ya que es lipolítico, lo que aumenta el suministro de ácidos grasos libres en momentos de balance energético negativo (Mendonça, Abade, da Silva, Litherland, Hansen, Hansen, & Chebel, 2013).

Los rumiantes se someten a un período de resistencia a la insulina al inicio de la lactancia, la sensibilidad del tejido adiposo y muscular a la insulina disminuye después del parto y la capacidad de respuesta del transportador GLUT4 en el tejido muscular y adiposo disminuye durante la lactancia máxima y aumenta hacia el final de la lactancia, de modo que la glucosa está disponible para la producción de lactosa (De Koster & Opsomer, 2013).

Vargová (2015) indica que cuando la producción de leche es alta, varios factores pueden contribuir al nivel de resistencia a la insulina, uno de esos factores es la condición corporal en el parto a lo que Hayirli (2011) informa que las vacas con CC 5 tienen niveles más altos de resistencia a la insulina que las vacas con CC 3, incluso cuando los niveles de AGNE eran comparables.

Los niveles de resistencia a la insulina se encuentran respaldados por la evidencia de que los animales obesos producen más factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) que los animales delgados, no sólo porque tienen una mayor masa de tejido adiposo, sino también porque los animales sobre condicionados producen más TNF $\alpha$  por unidad de grasa que magra, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  es una citoquina proinflamatoria que puede inducir resistencia a la insulina con una exposición prolongada (Trevisi & Minuti, 2018; Vargová et al., 2015).

### **2.3. Balance energético negativo**

El balance energético (BE) en vacas lecheras se define como la diferencia entre la ingesta de energía del alimento y la energía requerida para su mantenimiento, producción y gestación (Mazila, 2013).

El balance energético negativo (BEN) resulta de la incapacidad del bovino para mantener un equilibrio entre la energía que ingiere mediante el alimento y la energía que gasta, presentando como consecuencia la disminución de la condición corporal, además, el estrés metabólico y de parto afecta la relación grasa-proteína en la leche (Campbell & Marshall, 2016).

La relación grasa-proteína difiere entre todas las vacas y depende de la etapa de lactancia, a menudo es alta en el comienzo de la lactancia cuando es más probable que ocurra BEN (Risco & Melendez Retamal, 2011).

La demanda de nutrientes de la lactancia generalmente excede el potencial de ingesta en la dieta en el período inicial del posparto, lo que resulta en un grado variable de BEN (Mazila, 2013).

Las vacas lecheras de alta producción movilizan su grasa corporal y en menor medida, reservas de proteínas para mantener su producción de leche, lo que lleva a los animales a entrar en un estado de BEN hasta que la ingesta de energía cumple con los requisitos de producción (Esposito, Irons, Webb, & Chapwanya, 2014).

La pérdida de energía en la alimentación reduce la capacidad de los microorganismos del rumen para digerir las proteínas vegetales y sintetizar las proteínas animales, reduciendo así el porcentaje de proteínas en la leche, la movilización de la grasa corporal aumenta los ácidos grasos no esterificados (AGNE) en el hígado y, en consecuencia, la cantidad de grasa en porcentaje de la leche (Krattenmacher, Thaller, & Tetens, 2019).

A medida que aumenta la cantidad de grasa en porcentaje de la leche y disminuye el porcentaje de la proteína, aumenta la relación grasa-proteína, los BEN resultantes y las demandas metabólicas influyen en el intervalo posparto a la primera ovulación y, por lo tanto, afectan el intervalo hasta la concepción que eventualmente disminuyen el potencial reproductivo de las vacas (Esposito et al., 2014).

Muchos estudios han demostrado que, si bien la ingesta de alimento y la producción de leche aumentan después del parto, la ingesta máxima de alimento solo se logra algunas semanas después del rendimiento máximo de leche (Wisnieski, Norby, Pierce, Becker, Gandy, & Sordillo, 2019).

La ingesta de materia seca, el peso vivo y la producción de leche son tres componentes que entran en juego durante la lactancia, por lo tanto, es biológicamente plausible que las vacas pierdan peso al empezar la lactancia ya que la producción de leche aumenta rápidamente y la ingesta de materia seca no puede hacer frente a la creciente demanda de producción (Erdmann et al., 2019).

La figura 1 muestra una relación entre los componentes, ingesta de materia seca, peso vivo y producción de leche; y que la pérdida de peso en vivo es el resultado de un consumo bajo de materia seca y una abrupta subida en la producción de volumen de leche después del parto, lo que lleva al BEN durante las primeras semanas de lactancia hasta la tercera en donde el balance energético se vuelve positivo (Mazila, 2013).

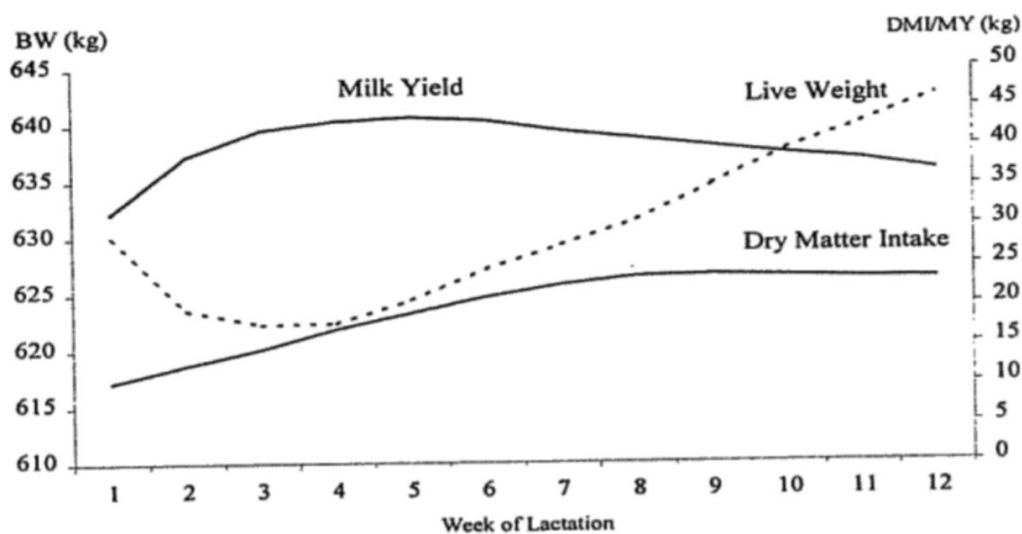


Figura 1. Ingesta de materia seca (dry matter intake); Peso vivo (live weight); Producción de leche (milk yield) durante las 12 semanas iniciales de lactancia. Tomado de (Mazila, 2013).

El estado energético después del parto es el más bajo en el momento de máxima producción de leche, como se muestra en la figura 2, por lo tanto, sería una tarea difícil prevenir el BEN en vacas que son naturalmente altas productoras, debido a la interacción de los factores producción lechera, ingesta de materia seca y balance de energía (Campbell & Marshall, 2016).

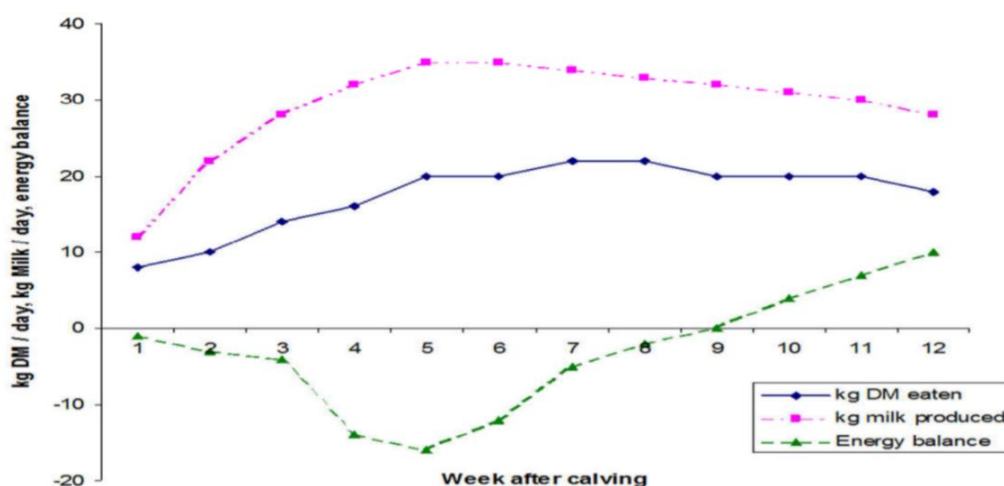


Figura 2. Relación entre producción lechera, ingesta de materia seca y balance de energía en las primeras 12 semanas de lactancia. Tomado de (Mazila, 2013).



Se han investigado y documentado varias consecuencias adversas del BEN que incluyen trastornos metabólicos como la cetosis, trastornos de la reproducción como el anestro y la infertilidad, y otros problemas de salud como la mayor susceptibilidad a la mastitis (Liinamo, Mäntysaari, & Mäntysaari, 2012).

Algunos de los métodos propuestos para diagnosticar BEN incluyen la estimación de la diferencia entre la ingesta de energía y los requisitos energéticos, la calificación de la condición corporal, el peso vivo y el análisis de proteína y grasa de la leche, especialmente al inicio de la lactancia (Macrae, Burrough, Forrest, Corbishley, Russell, & Shaw, 2019).

## **2.4. Cetosis bovina**

### **2.4.1. Etiología**

Se considera a la cetosis, una enfermedad de la ganadería de la última década debido a que los bovinos han sido seleccionados genéticamente con la finalidad de obtener un alto rendimiento en cuanto a producción de leche se refiere, lo que sugiere un aumento en la producción en la etapa inicial de la lactancia (Smith, 2014).

Al incrementar la producción de leche, la energía demandada por el animal es mayor, sin embargo, el alimento ingerido, es insuficiente para satisfacer el requerimiento de energía, por lo tanto, el ingreso de energía que obtenga el animal debe ser igual o mayor a la salida de la misma, para así evitar un balance energético negativo, mismo que es la puerta de inicio para la cetosis (Tatone, 2016).

La formación de cuerpos cetónicos ocurre en el hígado y pared del rumen, además, la glándula mamaria contribuye de manera secundaria para la cetogénesis a través de la utilización de glucosa para la producción de lactosa (Brunner, Groeger, Raposo, Bruckmaier, & Gross, 2018).

Exceptuando al hígado, todos los tejidos en condiciones normales de un bovino, están en la capacidad de adaptarse al uso de cuerpos cetónicos como una reserva adicional de energía, por lo que, es pertinente tomar en cuenta que la mayoría de vacas de alta producción van a tener un grado de cetosis, hasta que la producción de leche se equilibre con la ingesta de energía (Smith, 2014).

Durante el pico de la lactancia, las vacas pierden un peso que va de 30 a 100 kg aproximadamente y lo que se vuelve complicado en este período, es identificar y prevenir los factores que provocan que un animal pase de la formación y movilización normal de cuerpos cetónicos a las fases subclínica y clínica de cetosis (Bradley, Barkema, Biggs, Green, & Lam, 2012).

#### 2.4.1.1. Gluconeogénesis en rumiantes

Los rumiantes reciben solo del 5 al 10% de sus requerimientos de glucosa por absorción dietética, como resultado de la fermentación de almidones dietéticos en el rumen, la glucosa restante se produce principalmente a través de la gluconeogénesis hepática (Tatone, 2016).

Debido a que el rumiante no obtiene la mayor parte de su glucosa directamente de la dieta, sino que necesita sintetizarla, la gluconeogénesis se produce tanto en el estado de ayuno como en el de alimentación (Engelking, 2015).

Los carbohidratos de la dieta se fermentan en el rumen a ácidos grasos de cadena corta: propionato, acetato, valerato e isobutirato, los ácidos grasos se absorben a través del epitelio ruminal por difusión pasiva y viajan mediante la vena porta en dirección al hígado (Guo, Bi, Kang, Zhang, Long, Huang, Shan, Anderson, 2018).

El propionato proporciona la contribución más significativa a los precursores gluconeogénicos, una vez absorbido en el hepatocito, el propionato se transporta

a la mitocondria, donde se convierte en propionil-CoA y luego en metilmalonil CoA, el metilmalonil-CoA ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico para producir oxalacetato (Engelking, 2015).

El D-lactato es otro subproducto de la fermentación ruminal que se puede usar como un sustrato para la gluconeogénesis, pero a un ritmo más lento que la isoforma del L-lactato (Zhang, Koser, Bequette, & Donkin, 2015).

Para ser utilizado para la gluconeogénesis, el lactato y la alanina se convierten en piruvato dentro del citosol del hepatocito, antes de ser transportados a la mitocondria, una vez allí, el piruvato se puede convertir en oxalacetato por la piruvato carboxilasa o el piruvato se convierte en acetil-CoA antes de ingresar al ciclo del ácido tricarboxílico (Ametaj, 2017; Ashton, 2017).

#### 2.4.1.2. Metabolismo de los ácidos grasos no esterificados

Los AGNE en plasma comienzan a aumentar aproximadamente 2 semanas antes del parto, alcanzan su punto máximo en el parto y pueden permanecer altos durante 2-3 semanas después del parto (Allen & Piantoni, 2013).

Los controles subyacentes de la lipomovilización tienen varios factores influyentes que han sido bien descritos, la movilización de ácidos grasos aumenta con el decremento de la ingesta de materia seca, sin embargo, las concentraciones de AGNE aumentarán en preparto incluso cuando el consumo de alimento se mantenga, lo que indica que existen otros controles endocrinos (Vanholder, Papen, Bemers, Vertenten, & Berge, 2015).

En la lipomovilización, el sistema nervioso simpático juega un importante papel a través de la acción de las lipasas sensibles a las hormonas (Ametaj, 2017).

En una investigación, una infusión venosa de norepinefrina causó un incremento en la concentración a nivel de plasma de ácidos grasos libres en 30 minutos, la

capacidad del tejido adiposo para responder a la norepinefrina y otros agonistas  $\beta$ -adrenérgicos depende de la etapa de la gestación y la lactancia (Chapinal, Carson, LeBlanc, Leslie, Godden, Capel, Santos, Overton, Duffield, 2012).

Al comienzo de la gestación, la respuesta lipolítica máxima se mitiga y aumenta hacia el último tercio de la gestación con la respuesta máxima alrededor del momento del parto y continúa hasta el comienzo de la lactancia (Allen & Piantoni, 2013).

Los ácidos grasos, unidos a la albúmina, y el glicerol viajan a través de la circulación y son absorbidos por los hepatocitos, el glicerol se puede usar para apoyar la gluconeogénesis (De Koster & Opsomer, 2013).

En presencia de hidratos de carbono abundantes, los AGNE permanecen en el citosol de los hepatocitos debido a la supresión del transportador mitocondrial carnitina palmitoil transferasa I (Samani, 2019).

Dentro del citosol de los hepatocitos, los AGNE se pueden re esterificar para formar triacilglicerol (TG) que se puede transportar nuevamente a la circulación como lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) cuando hay un suministro adecuado de proteínas, de lo contrario, el TG se acumulará dentro de los hepatocitos y va a contribuir a la lipidosis hepática (Berge & Vertenten, 2014).

Una pequeña cantidad de AGNE dentro de los hepatocitos también se someterá a una oxidación  $\beta$  peroxisomal para reducir la longitud de los ácidos grasos de cadena larga y producir peróxido de hidrógeno como un subproducto (McArt, Nydam, & Oetzel, 2012).

Los rumiantes parecen tener una mayor capacidad para utilizar la oxidación  $\beta$  peroxisomal que los no rumiantes y la capacidad aumenta con un mayor déficit de energía, lo que sugiere que puede ser una adaptación para reducir la deposición de TG en el hígado (Lean, Van Saun, & DeGaris, 2013).

Cuando haya un suministro limitado de carbohidratos, los ácidos grasos se transportarán a las mitocondrias a través del transportador carnitina palmitoil transferasa I y pueden sufrir una oxidación  $\beta$  mitocondrial (McArt et al., 2012).

La oxidación completa de AGNE produce energía para apoyar la gluconeogénesis, sin embargo, la oxidación parcial va a producir cuerpos cetónicos: acetoacetato (AcAc),  $\beta$ -hidroxibutirato ( $\beta$ HB) y en menor medida, acetona (Ac) (Tatone, 2016).

#### 2.4.1.3. Formación de cuerpos cetónicos

La oxidación  $\beta$  mitocondrial de AGNE produce acetoacetyl-CoA, que puede oxidarse aún más a acetyl-CoA, un sustrato necesario para el ciclo del ácido tricarboxílico (Ametaj, 2017).

La oxidación completa a través del ciclo del ácido tricarboxílico es preferible ya que produce más energía neta, sin embargo, si se ve abrumada por la cantidad de AGNE presente y con una escasez de precursores para el ciclo del ácido tricarboxílico, como el oxalacetato, los ácidos grasos solo se oxidarán parcialmente (Allen & Piantoni, 2013).

La acetoacetyl-CoA es un paso intermedio en la formación de AcAc, el acetoacetato es relativamente inestable y se convierte fácilmente en  $\beta$ HB en el citosol del hepatocito a través de la enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa o se descompondrá en acetona (Ac) y dióxido de carbono (Esposito et al., 2014).

En la tabla 1 se encuentran referenciados los niveles de cuerpos cetónicos aceptables en bovinos sanos en las distintas vías de eliminación de los mismos.

Tabla 1

*Formación de cuerpos cetónicos en sangre y orina en bovinos sanos.*

|                     | Sangre | Orina | Leche |
|---------------------|--------|-------|-------|
| $\beta$ HB (mmol/L) | 0,32   | 0,22  | 0,28  |
| AcAc (mmol/L)       | 0,06   | 0,84  | 0,01  |

Tomado de (Horber, Mäder, & Jucker, 1980).

#### 2.4.1.4. Utilización de cuerpos cetónicos

Para comprender la utilización de los cuerpos cetónicos se debe saber que un aumento de estos en circulación durante los períodos de glucemia limitada es un mecanismo de adaptación (Wisnieski et al., 2019).

Varios tejidos pueden utilizar cuerpos cetónicos como combustible: músculo, corazón y riñón (Denis-Robichaud, Dubuc, Lefebvre, & DesCôteaux, 2014).

El acetoacetato se convierte en acetil-CoA que luego se puede usar en el ciclo del ácido tricarboxílico, la utilización de la cetona periférica aumenta durante el período del parto, proporcionalmente al incremento de la disponibilidad de cetona hasta un punto de saturación del tejido (Dubuc & Buczinski, 2018).

La glándula mamaria, los tejidos fetales y placentarios, requieren glucosa como combustible y no pueden utilizar cuerpos cetónicos, la mayoría de la glucosa disponible será absorbida preferentemente por estos tejidos en la última etapa de la gestación y primera etapa de la lactancia, ya que tienen una gran demanda de glucosa y transportadores de glucosa independientes de la insulina (Stevens, 2012).

La glándula mamaria requiere glucosa para la producción de lactosa, sin embargo, va a utilizar  $\beta$ HB y AcAc para la formación de grasa de leche (Denis-Robichaud et al., 2014).

Hasta un 40% de la grasa de la leche en animales que se encuentran en el inicio de la lactancia podría deberse a la captación de AGNE y el resto proviene de la síntesis de moléculas complejas a partir de moléculas simples (Compton, Young, & McDougall, 2015).

#### 2.4.1.5. Eliminación de cuerpos cetónicos

Los cuerpos cetónicos se pueden eliminar por tres vías principales, excretadas en la orina, exhaladas mediante la respiración como la acetona y por medio de la leche (Smith, 2014).

Las concentraciones de cuerpos cetónicos varían según el tipo de muestra que se tome simultáneamente, la proporción de AcAc en leche es mayor que en sangre, mientras que la proporción de  $\beta$ HB en sangre es mayor que en leche (Allen & Piantoni, 2013).

Existen variaciones especialmente en la correlación entre los niveles de  $\beta$ HB en leche y en sangre debido a la incorporación de  $\beta$ HB en la grasa de la leche al inicio de la lactancia (Samani, 2019).

La excreción urinaria de cuerpos cetónicos sigue un patrón simultáneo con la cantidad de cetonas plasmáticas o de sangre total presente (Campbell & Marshall, 2016).

Una vez que la cantidad de cetona en el plasma o la sangre supera los 0,34mmol/L, el logaritmo de la excreción urinaria es aproximadamente 1,5 veces el logaritmo de la concentración en la sangre, esto se traduce a 0,51mmol/L (Samani, 2019).

### 2.4.2. Patogenia de la enfermedad

En primer lugar, se debe tomar en cuenta el nivel de cuerpos cetónicos que dan lugar a la enfermedad de cetosis ya sea esta subclínica o clínica, esto se define como punto de corte, el mismo que se establece midiendo el cuerpo cetónico  $\beta$ HB debido a su mayor estabilidad en una muestra de sangre, siendo considerada como una prueba estándar de oro (Oetzel, 2015).

El punto de corte comúnmente aplicado en investigaciones que utilizan herramientas diagnósticas de campo es de 0,8 a 1,2mmol/L sin discriminar si se habla de cetosis subclínica o clínica, es decir, es considerado únicamente como un animal positivo a cetosis (Ghanem, Mahmoud, Abd El-Raof, & El-Attar, 2016; Sailer et al., 2018).

En la tabla 2 se aprecian los puntos de corte que dan inicio a la cetosis subclínica y clínica.

Tabla 2

*Punto de corte para cetosis subclínica y cetosis clínica midiendo  $\beta$ HB en sangre.*

|                         | Cetosis Subclínica | Cetosis Clínica |
|-------------------------|--------------------|-----------------|
| Punto de corte (mmol/L) | 0,8 – 1,0          | 1,1 – 1,6       |

Tomado de (Oetzel, 2015).

Para satisfacer los requerimientos para la producción de leche, la vaca puede utilizar dos fuentes de nutrientes, la ingesta de alimento y las reservas corporales (Bradley et al., 2012).

Durante el inicio de la lactancia, la ingesta de materia seca no es suficiente para entregar la energía indispensable para la producción de leche y el animal se encuentra en un balance energético negativo (Tatone, 2016).



En la ganadería convencional, se considera al balance energético negativo una situación fisiológica normal en bovinos lecheros de alta producción, por lo tanto, las vacas con una producción lechera alta que comienzan la etapa de lactancia y que se encuentren cursando un balance energético negativo están en una situación predisponente ya que cualquier estímulo que cause una reducción en la ingesta de alimento puede llevar a la aparición de cetosis clínica (Esposito et al., 2014).

Si la ingesta de alimento de la vaca no cubre la demanda de energía, no hay suficiente producción ruminal de ácido propiónico, el principal precursor de la glucosa en los rumiantes, lo que resulta en hipoglucemia (Smith, 2014).

La hipoglucemia conduce a una movilización de ácidos grasos libres y glicerol de las reservas de grasa que se oxidan, sin embargo, el hígado no puede lidiar con la Acetil-CoA, que resulta de la oxidación de estos ácidos grasos, debido a la falta de energía (Hayirli et al., 2011).

El exceso de acetil-CoA se convierte en los cuerpos cetónicos acetoacetato y  $\beta$ -hidroxibutirato y, en menor cantidad, acetona (Tatone, 2016).

Otros tejidos además del hígado pueden usar cuerpos cetónicos, pero si su producción excede la velocidad a la que los músculos y otros tejidos los utilizan, se acumulan y el resultado es la cetosis (Campbell & Marshall, 2016; Risco & Melendez Retamal, 2011).

La reducción de la producción de ácido propiónico suele ser el resultado de una alimentación insuficiente o una ingesta reducida de alimento causada por la reducción del apetito o la falta de alimentación (calidad, cantidad y acceso) (Garro, Mian, & Cobos Roldán, 2014).

Un período de desbalance es normal alrededor del parto, pero puede empeorar en el período inicial del postparto debido a un deterioro de la calidad del forraje, cambios repentinos en la dieta o exceso de grasa en el parto (Samani, 2019).

El butirato es un precursor de la acetil-CoA y, por lo tanto, es cetogénico, el contenido de ácido butírico del ensilaje es de cierta importancia para causar la enfermedad, ya que las condiciones húmedas predisponen su fermentación, además que el ensilaje que contiene altos niveles de ácido butírico es menos apetecible para el ganado (Garro et al., 2014).

### **2.4.3. Signos clínicos**

Los signos que se encuentran son los niveles elevados de cetonas en sangre y pueden excretarlos en la orina y la leche (Ametaj, 2017).

Es importante reconocer que muchos casos de cetosis son subclínicos, con el rendimiento y la salud de la vaca comprometidos, pero sin signos clínicos visibles (Risco & Melendez Retamal, 2011).

Los signos clínicos de la cetosis incluyen una negativa a comer cereales y alimentos concentrados y una caída repentina en la producción de leche, hay un olor a acetona en el aliento y la leche caracterizado por ser dulce (Campbell & Marshall, 2016).

Entre los hallazgos físicos se encuentran heces duras y secas depresión moderada y en ocasiones, negativa a moverse, la motilidad ruminal está disminuida si el animal ha estado anoréxico durante varios días, ocasionalmente se observa pica (Gordon, 2013).

Algunas vacas pueden exhibir signos nerviosos, que incluyen salivación excesiva, movimientos de masticación anormales, lamido de paredes, puertas o barras de metal, falta de coordinación con aparente ceguera y un grado de

agresión, los signos nerviosos a menudo sólo duran unas pocas horas (Trevisi & Minuti, 2018).

Las vacas afectadas con cetosis tienen infiltración grasa y degeneración del hígado, además de tener mayor riesgo para presentar retención de membranas fetales, desplazamiento del abomaso, menor fertilidad y es altamente probable que se incremente el intervalo entre partos (Smith, 2014; Tatone, 2016).

Debido a un sistema inmunológico deprimido, las vacas que se encuentran bajo un estado de cetosis, son más susceptibles a mastitis y metritis (McArt et al., 2012).

#### **2.4.4. Factores de riesgo**

El sobre condicionamiento puede estar asociado con un mayor riesgo de cetosis por múltiples razones, las vacas multíparas con una CC  $\geq 4.0$  tienen mayores concentraciones de leptina en el parto y AGNE postparto elevados en comparación con las vacas con una CC más baja (Pires, Delavaud, Faulconnier, Pomiès, & Chilliard, 2013).

La leptina participa en la lipólisis y el control de la ingesta de materia seca, una CC más alta también sugiere una mayor masa de tejido adiposo disponible para la movilización (Garro et al., 2014).

Los animales obesos producen mayor cantidad de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) aumentando la resistencia a la insulina y el grado de movilización de AGNE (De Koster & Opsomer, 2013; Vanholder et al., 2015).

El número de partos también se asocia con un mayor riesgo de cetosis, este riesgo se debe en parte a un aumento en la producción de leche y a una disminución en la ingesta dietética, conduciendo a un mayor balance energético negativo (Hayirli et al., 2011).

Otros factores de riesgo que se puede mencionar son, la temporada, la cetosis es más probable en invierno, las vacas con fiebre de la leche tienen una mayor disminución en el consumo de alimento después del parto, lo que predispone al balance energético negativo, aumentando el riesgo de cetosis, el porcentaje promedio de proteína de leche en el comienzo de la lactancia, también se considera como factor de riesgo (Garro et al., 2014).

#### **2.4.5. Diagnóstico**

Para la determinación de cetosis en bovinos, las herramientas diagnósticas tienen un porcentaje de sensibilidad y especificidad, medidas estadísticas del rendimiento de una prueba de clasificación binaria (Cucunubo et al., 2013).

La sensibilidad mide la proporción de reales positivos que se identifican correctamente como tales, mientras que la especificidad mide la proporción de reales negativos que se identifican correctamente como tales (Powers, 2012).

- Medición de  $\beta$ HB en sangre en un laboratorio

La medición de  $\beta$ HB en suero o sangre en un laboratorio es el método de detección estándar de oro (Sailer, Pralle, Caputo, Erb, Oetzel & White, 2018).

Un método de laboratorio común para medir la concentración de  $\beta$ HB en suero o sangre es el ensayo espectrofotométrico, el mismo que mide la capacidad de la enzima  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa para catalizar la oxidación de  $\beta$ HB a AcAc, el proceso provoca la reducción de la nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) en su forma oxidada a nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) (eClinpath, 2013).

La espectrofotometría mide la cantidad de NADH en la muestra, que es proporcional a la cantidad de  $\beta$ HB presente (Ospina, Nydam, Stokol, & Overton, 2010).

- Medición de  $\beta$ HB en sangre utilizando un dispositivo de mano

Hay varios medidores de punto de atención disponibles para medir la concentración de cetonas en la sangre, sin embargo, el medidor de mano Precision Xtra tiene la mejor evidencia de su precisión diagnóstica (Weingart, Lotz, & Kohn, 2012).

El sistema diagnóstico consiste en dos componentes: las tiras reactivas y el medidor (Sailer et al., 2018).

El test está destinado a la medición cuantitativa de  $\beta$ -hidroxibutirato en muestras de sangre bovina, proporcionando resultados en plasma en unidades de mmol/L de sangre o en mg/dL de sangre (Denis-Robichaud, Dubuc, Lefebvre, & DesCôteaux, 2014).

Las tiras medidoras reportan los mismos resultados que el método de laboratorio, pero en lugar de usar espectrofotometría para medir la cantidad de NADH en la muestra, la NADH presente se oxida a  $\text{NAD}^+$  utilizando químicos de tiras reactivas y el medidor mide el cambio en la carga eléctrica proporcional directamente a la cantidad de  $\beta$ HB en la muestra (Weingart et al., 2012).

- Medición de  $\beta$ HB en leche

Para la detección de cetosis en leche se requiere de tiras reactivas a base de nitroprusiato siendo un método semicuantitativo para detectar  $\beta$ HB en la leche (Samani, 2019).

La leche se coloca en la porción de reactivo de la tira, el  $\beta$ HB presente se convierte en AcAc a través de la acción de la  $\beta$ -hidroxibutirato deshidrogenasa, el proceso produce NADH a partir de NAD<sup>+</sup> y reduce el reactivo químico azul de nitrotetrazolio, por último, la cantidad de cambio de color es similar a la cantidad de  $\beta$ HB en la leche (Elanco, 2010).

Las pruebas de leche de vaca tienen enormes ventajas sobre las pruebas de orina en cuanto a facilitar la recolección y garantizar que todas las vacas elegibles puedan ser examinadas, sin embargo, las pruebas de leche generalmente no son tan sensibles como las pruebas de orina para detectar cetosis (Denis-Robichaud et al., 2014).

Las tiras de nitroprusiato se pueden usar para probar cualitativamente el acetoacetato de leche, sin embargo, estas pruebas generalmente tienen una sensibilidad muy baja para la cetosis en comparación con el  $\beta$ HB en sangre y no pueden recomendarse como pruebas para el monitoreo basado en rebaños (Oetzel, 2015).

La sensibilidad y especificidad imperfectas de la prueba  $\beta$ HB de la leche distorsionan la prevalencia de la cetosis en un rebaño, la verdadera prevalencia de cetosis en el hato puede ser más alta o más baja que la prevalencia medida por la tira de prueba  $\beta$ HB de sangre, dependiendo del punto de corte elegido (Ospina et al., 2010; Stevens, 2012).

- Medición de AcAc en orina

Esta herramienta corresponde a un método semicuantitativo, que se basa en detectar cuerpos cetónicos según su concentración, específicamente el acetoacetato (AcAc) en la orina del bovino (Galvão et al., 2017).

La tira de la prueba contiene reactivos para realizar una prueba simplificada de nitroprusiato, similar a la prueba utilizada en leche, los reactivos que incluye este

test son nitroprusiato sódico, glicina y tampones para proporcionar un pH óptimo de 9 (Cucunubo et al., 2013).

El nitroprusiato sódico en presencia de acetoacetato cambiará de color, la concentración en la orina de cuerpos cetónicos está dada en mg/dL o en mmol/L (Rosales, 2013).

#### **2.4.6. Monitoreo de la cetosis a nivel de rebaño**

El monitoreo de la incidencia y prevalencia de la cetosis a nivel de manada es importante para detectar cambios en el patrón de la enfermedad y para monitorear el impacto de los cambios en el manejo (McArt, Nydam, Oetzel, Overton, & Ospina, 2013; Suthar, Canelas-Raposo, Deniz, & Heuwieser, 2013).

Ospina (2010) determinó que cuando la prevalencia de hipercetonemia en la manada de animales postparto era >15%, la incidencia de desplazamiento de abomaso y cetosis clínica aumentó en 1.8%, la tasa de preñez disminuyó en 1.2% y la producción de leche disminuyó en 282 kg, por lo tanto, los rebaños con una prevalencia de hipercetonemia superior al 15% deben evaluar los factores de gestión para identificar áreas de mejora.

La temporada de partos, el tamaño del hato y el manejo de la alimentación se han asociado con una mayor prevalencia de cetosis, los animales que paren en la primavera, vacas de rebaños con raciones parcialmente mezcladas y los bovinos de rebaños más pequeños tuvieron una prevalencia cetosis numéricamente más alta en un estudio, sin embargo, no se realizó una evaluación estadística formal sobre la diferencia en la prevalencia (Berge & Vertenten, 2014; LeBlanc, 2010).

### 2.4.7. Tratamiento

El objetivo inicial del tratamiento de la cetosis es restaurar la falta de glucosa en el organismo, se requiere inmediatamente un suplemento de glucosa de acción rápida, el tratamiento de seguimiento está dirigido a proporcionar un suministro a largo plazo de glucosa (Gordon, LeBlanc, & Duffield, 2013).

- Reemplazo de glucosa

La administración intravenosa de una solución de dextrosa por parte de un veterinario es efectiva a corto plazo, pero el tratamiento de seguimiento es esencial para evitar las recaídas (Samani, 2019).

Dietas con propilenglicol tiene efectos a largo plazo y el tratamiento debe continuarse durante tres o cinco días (Gordon, 2013).

- Terapia hormonal

Muchos de los corticosteroides de acción prolongada tienen efectos beneficiosos en la cetosis y son administrados como una sola aplicación, tienen la capacidad de descomponer las proteínas en los músculos para producir glucosa, que repone de inmediato los bajos niveles de la misma en sangre (Smith, 2014).

Cuando se usan corticosteroides, es importante suministrar una cantidad adecuada de glucosa, ya sea como una dieta alta en carbohidratos o en propilenglicol para prevenir la descomposición excesiva de la proteína muscular (Gordon et al., 2013).



## Capítulo III: Materiales y métodos

### 3.1. Ubicación

El presente estudio se ejecutó en la Hacienda Miraflores Bajo #4, ubicada al norte del cantón Mejía, en la parroquia de Tambillo perteneciente a la provincia de Pichincha Ecuador, la misma que tiene acceso por medio de la Troncal de la Sierra (E35) y La Vía Colectora Quito-Tambillo (E28A).

En la figura 3, se muestra la ubicación geográfica exacta de la hacienda con las coordenadas correspondientes a 0°25'25.8"S 78°33'44.4"W.



*Figura 3.* Ubicación geográfica de la Hacienda Miraflores Bajo #4.

Tomado de (Google Maps, 2018).

En cuanto a las condiciones climáticas para el estudio, se tomaron en cuenta los promedios de los datos de temperatura, precipitación, humedad relativa y heliofanía del INAMHI de la estación de Izobamba del año 2010 al año 2015 y de los meses de diciembre a marzo, siendo esto un punto de referencia para considerar los datos climáticos de la hacienda donde se realizó el estudio.

La información climática se encuentra descrita en la tabla 3.

Tabla 3

*Medias de los datos meteorológicos entre los años 2010-2015.*

| <b>Parámetro / Mes</b> | Diciembre | Enero | Febrero | Marzo |
|------------------------|-----------|-------|---------|-------|
| Temperatura (°C)       | 12.2      | 11.1  | 11.1    | 12.2  |
| Precipitación (mm)     | 118.2     | 125.7 | 161.5   | 176.5 |
| Humedad Relativa (%)   | 81        | 81    | 84      | 84    |
| Heliofanía (horas)     | 138.4     | 155   | 109     | 107.5 |

Tomado de (INAMHI, 2015).

### **3.2. Población y muestra**

La hacienda cuenta con 281 bovinos de leche, los mismos que se distribuyen en diferentes razas, trabajando principalmente con las razas Holstein, Jersey y Brown Swiss, a su vez, los 281 bovinos se disponen en distintas categorías según el estado fisiológico, productivo o reproductivo en el que se encuentren, siendo así, existen 51 terneras, 35 medias, 34 fierros, 39 vientres, 38 vacas secas y 84 vacas en producción.

Para el estudio se tomaron en cuenta las categorías a las que pertenecen los animales según su estado fisiológico, es decir, vaconas, vacas gestantes de 4 meses, bovinos preparto a 15 días, animales de 15 días postparto y bovinos de 42 días postparto, dando como resultado 5 categorías.

Para obtener la muestra se seleccionaron aleatoriamente a 10 animales de cada categoría dando un total de 50 animales para arrancar con el estudio.

### 3.2.1. Criterios de inclusión y exclusión

Se muestran representados los criterios de inclusión y de exclusión en la tabla 4, los mismos que fueron aplicados a la población total del predio.

Tabla 4

*Criterios de inclusión y exclusión.*

| Inclusión   | Exclusión  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vaconas.</li> <li>• Vacas gestantes de 4 meses.</li> <li>• Vacas parto a 15 días.</li> <li>• Vacas postparto a 15 días.</li> <li>• Vacas postparto a 42 días.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Terneras.</li> <li>• Partos distócicos.</li> <li>• Patologías pre o postparto.</li> </ul> |

### 3.3. Materiales

#### 3.3.1. Campo y laboratorio

- Registros de los bovinos del predio que fueron muestreados (#50).
- Registro para toma de muestra (#50).
- Esferográficos (#2).
- Caja de guantes de examinación no estériles (#1).
- Aguja de seguridad calibre 20 G (#50)
- Capuchón o camisa de aguja vacutainer (#1).
- Tubo vacutainer tapa roja (#10)
- Pipeta mecánica 10 – 100 µl (#1)
- Puntas desechables para pipeta mecánica (#50)
- Torundas con alcohol y sin alcohol (#50; #50).
- Recipiente estéril para muestra de orina 10ml (#50).
- Jeringas de 3ml (#50).
- Equipo lector para cetosis BHBCheck™ (#1).
- Tiras BHBCheck™ para el equipo lector de cetosis (#50).

- Tiras Combur10 Test ® (#50).

### **3.3.2. Oficina**

- Ordenador.
- Cámara fotográfica.

## **3.4. Metodología**

### **3.4.1. Levantamiento de información**

La información fue obtenida en base a los registros individuales de los animales de la hacienda para posteriormente iniciar con el proceso de muestreo de los animales de las distintas categorías, vaconas, vacas gestantes de 4 meses, bovinos en preparto a 15 días, animales postparto a 15 días, vacas postparto a 42 días.

Para la categorización de los animales se utilizaron los criterios de inclusión y exclusión.

En el caso de las vacas preparto y postparto, se determinó la fecha más probable de parto mediante un cálculo basado en los registros reproductivos proporcionados por el predio y en base a esta información se realizó la toma y el análisis de muestra a los animales confirmados preñez a los 4 meses, a los 15 días preparto y 15 y 42 días postparto.

De esta manera se obtuvieron 5 categorías independientes y homogéneas, cada una con 10 animales sometidos a muestreo y análisis de cuerpos cetónicos tanto en orina como en sangre.

### 3.4.2. Toma de muestras

La realización de toma de muestras de sangre se ejecutó en base al protocolo de LIVEXLAB (Anexo 1).

La toma de muestra de cada animal se realizó en distintos tiempos, tomando en cuenta los registros principalmente de las vacas que se encontraban en estado de gestación o a su vez, recién paridas.

De cada animal, se tomó 1ml de sangre fresca mediante venopunción de la vena coccígea, levantando la cola del bovino y utilizando guantes de examinación no estériles por vaca (Anexo 2 literal a).

Seguido de la obtención de la muestra de sangre, se empleó la pipeta mecánica para obtener una cantidad mínima de sangre del tubo de ensayo (Anexo 2 literal b) y proceder a utilizar el dispositivo BHBCheck™ para conseguir un resultado ya sea positivo o negativo a cetosis (Anexo 2 literal c).

La toma de muestras de orina se realizó en base al protocolo de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo 3).

Del mismo animal, se recolectó una muestra de orina, limpiando el área de la vulva para evitar que caigan restos de heces (Anexo 4 literal a), mediante micción espontánea para su posterior análisis (Anexo 4 literal b).

Una vez obtenida la muestra de orina, se utilizó una jeringa de 3ml (Anexo 4 literal c) para obtener aproximadamente 1ml de muestra del recipiente estéril respectivo y emplear una tira reactiva Combur10 Test ® (Anexo 4 literal d) colocando gota a gota sobre cada analito de la tira (Anexo 4 literal e).

Se repitió el mismo procedimiento tanto en sangre como en orina para los 50 animales pertenecientes a 5 categorías diferentes.

### 3.4.3. Análisis de las muestras

Para la interpretación de los resultados de cuerpos cetónicos se utilizaron los protocolos de instrucciones adjuntos a las pruebas diagnósticas BHBCheck™, en sangre (Anexo 5) y Combur10 Test®, en orina (Anexo 6).

Los resultados de la prueba BHBCheck™ se reflejaron inmediatamente después de colocar la muestra de sangre, los resultados de las tiras reactivas Combur10 Test® se contrastaron con la escala colorimétrica correspondiente (Anexo 7).

Los resultados finales de los bovinos fueron ingresados en tablas de registro para ser tabulados en el programa Microsoft Excel y posteriormente tabulados mediante el programa informático SPSS®.

### 3.4.4. Variables

Para la ejecución de este estudio, se consideraron las variables especificadas en la tabla 5.

Tabla 5

*Operacionalización de variables de estudio.*

| <b>Variables</b>        | <b>Tipo Variable</b>               | <b>Definición</b>                        | <b>Indicador</b>                       | <b>Unidad de medida</b> | <b>Ítems</b> | <b>Instrumentos</b> |
|-------------------------|------------------------------------|--|--|-------------------------|--------------|---------------------|
| Cuerpos cetónicos (βHB) | Cuantitativa/ Continua/Dependiente | Medición de cuerpos cetónicos en sangre. | Número de cuerpos cetónicos por animal | mmol/L                  | 1ml          | Medición directa    |

|                          |                                   |  |  |                            |                            |                    |
|--------------------------|-----------------------------------|--|--|----------------------------|----------------------------|--------------------|
| Cuerpos cetónicos (AcAc) | Cualitativa/Ordinal/Dependiente   | Medición de cuerpos cetónicos en orina.                      | Número de cuerpos cetónicos por animal | mmol/L                     | 3ml                        | Medición directa   |
| Categoría                | Cualitativa/Nominal/Independiente | Etapa fisiológica en la que se encuentra el bovino de leche. | Vacuna / Parto / Postparto             | Vacuna / Parto / Postparto | Vacuna / Parto / Postparto | Medición indirecta |

### 3.5. Análisis estadístico

#### 3.5.1. Estadística paramétrica

Corresponde a los datos numéricos del estudio, es decir, la variable de cuerpos cetónicos medidos en sangre ( $\beta$ HB).

En primer lugar, se realizó la estadística descriptiva, en donde se determinaron medidas de tendencia central como son, media, mediana, moda, rango, mínimo, máximo, error y desviación estándar a los valores obtenidos de las muestras de sangre.

Posterior a esto se efectuaron comparaciones de todas las categorías, por lo tanto, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de confianza del 95% para comprobar si existe o no diferencia entre grupos.

Luego se aplicaron pruebas Post-Hoc, las mismas que se basan en la comparación de medias obtenidas y la formación de subconjuntos, se utilizó el Test de Duncan, que trabaja con un umbral de medias cambiante.

### 3.5.2. Estadística no paramétrica

Aplicable para los datos ordinales del estudio, es decir, la variable de cuerpos cetónicos medidos en orina (AcAc).

Se realizaron análisis porcentuales y de frecuencias de todos los animales muestreados para orina, adicionalmente, se efectuó la tabla cruzada para los valores obtenidos de orina y la categoría a la que pertenece cada animal.

Para la comparación de los metabolitos de cuerpos cetónicos en las 5 categorías de animales muestreados para orina se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, con el propósito de observar si entre la distribución de los valores en orina existe diferencia significativa.

En cuanto a la comparación de toda la población entre los valores de los cuerpos cetónicos  $\beta$ HB en sangre y AcAc en orina se realizaron dos pruebas no paramétricas, la prueba de signos y la prueba de rango con signo de Wilcoxon, con el fin de decidir si la distribución de las variables coincide o no en ciertos valores aceptando o rechazando la hipótesis nula, en base a la comparación de dos mediciones de rango (medianas).



## Capítulo IV: Resultados y discusión

### 4.1. Resultados

- Prueba BHBCheck™ en sangre

Para los resultados de las muestras de sangre, en la tabla 6 se exponen las medidas de tendencia central de las categorías de animales que fueron muestreados para el cuerpo cetónico  $\beta$ -hidroxibutirato en sangre.

La media, que corresponde a la suma de todas las mediciones dividida entre el total de observaciones en un conjunto de datos de la categoría de las vaconas, resultó 0,450mmol/L, mientras que, en el grupo preparto de gestantes de 4 meses, arrojó un valor de 0,430mmol/L, en la categoría preparto de 15 días, la media fue de 0,530mmol/L, en los grupos postparto las medias fueron de 0,860mmol/L para los animales de 15 días y 1,070mmol/L para los animales de 42 días posteriores al parto.

El error estándar de la media mide a qué distancia es probable que esté la media de la muestra y los datos del estudio. En la categoría de vaconas, el valor para el error fue de 0,0307mmol/L, en la categoría de preparto, para los animales gestantes de 4 meses el valor resultó de 0,0213mmol/L y para los animales preparto a 15 días fue de 0,0367mmol/L, por último, para el grupo de animales postparto, los resultados obtenidos fueron 0,0859mmol/L para postparto 15 días y 0,0857mmol/L para postparto 42 días.

La mediana, corresponde al valor medio que separa la mitad superior de la mitad inferior del conjunto de datos, por lo tanto, la mediana para la categoría de vaconas fue de 0,500mmol/L, mientras que para los animales preparto fue de 0,400mmol/L en los gestantes de 4 meses y 0,500mmol/L en los animales preparto de 15 días, la mediana en el grupo postparto de 15 días fue de 0,800mmol/L mientras que en el grupo postparto de 42 días fue de 1,100mmol/L.

La moda, el valor más frecuente en el conjunto de datos fue de 0,5mmol/L en vaconas, de 0,4mmol/L en gestantes de 4 meses, de igual manera 0,4mmol/L en animales preparto a 15 días, por último, la moda en las categorías de postparto fue de 0,6mmol/L en postparto 15 días y de 1,1mmol/L en postparto 42 días.

La desviación estándar, mide la dispersión de un conjunto de datos en relación con su media. Por lo tanto, la desviación estándar para vaconas fue de 0,0972mmol/L, para gestantes de 4 meses fue de 0,0675mmol/L, para animales preparto 15 días fue de 0,1160mmol/L, mientras que en los grupos postparto fue de 0,2716mmol/L para 15 días y de 0,2710mmol/L para 42 días.

La varianza, es la expectativa de la desviación al cuadrado de una variable aleatoria de su media. El resultado de la varianza para vaconas fue de 0,009mmol/L, mientras que en preparto fue de 0,005mmol/L para gestantes 4 meses y de 0,013mmol/L para preparto 15 días y finalmente, en el grupo de postparto, la varianza fue de 0,074mmol/L para 15 días y 0,073mmol/L para 42 días.

El rango, corresponde a la diferencia existente entre los valores más grandes y pequeños del conjunto de datos, resultando así los valores de rango para las 5 categorías. Para vaconas resultó 0,3mmol/L, para gestantes de 4 meses 0,2mmol/L, para preparto 15 días 0,3mmol/L, para postparto 15 días 0,7mmol/L y finalmente para postparto 42 días resultó un rango de 0,9mmol/L.

Los valores mínimos y máximos representan los valores menores o mayores que más se repiten en el conjunto de datos. El mínimo en la categoría de vaconas fue de 0,3mmol/L mientras que el máximo de la misma categoría fue de 0,6mmol/L. En el grupo de gestación a 4 meses el mínimo fue de 0,3mmol/L y el máximo fue de 0,5mmol/L. En los animales de preparto a los 15 días el resultado del mínimo fue de 0,4mmol/L y el resultado del máximo fue de 0,7mmol/L. Para los animales de postparto, el mínimo en 15 días fue de 0,5mmol/L y el máximo

de la misma categoría fue de 1,2mmol/L, por otro lado, el mínimo en 42 días fue de 0,6mmol/L y el máximo del mismo grupo fue de 1,5mmol/L.

Tabla 6

*Medidas de tendencia central de los valores de  $\beta$ HB en sangre (mmol/L).*

| <b>Categoría</b>           | <b>Vaconas</b> | <b>Gestantes 4 meses</b> | <b>4Preparto días</b> | <b>15Postparto días</b> | <b>15Postparto 42 días</b> |
|----------------------------|----------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Media</b>               | ,450           | ,430                     | ,530                  | ,860                    | 1,070                      |
| <b>Error estándar</b>      | ,0307          | ,0213                    | ,0367                 | ,0859                   | ,0857                      |
| <b>Mediana</b>             | ,500           | ,400                     | ,500                  | ,800                    | 1,100                      |
| <b>Moda</b>                | ,5             | ,4                       | ,4 <sup>a</sup>       | ,6 <sup>a</sup>         | 1,1                        |
| <b>Desviación estándar</b> | ,0972          | ,0675                    | ,1160                 | ,2716                   | ,2710                      |
| <b>Varianza</b>            | ,009           | ,005                     | ,013                  | ,074                    | ,073                       |
| <b>Rango</b>               | ,3             | ,2                       | ,3                    | ,7                      | ,9                         |
| <b>Mínimo</b>              | ,3             | ,3                       | ,4                    | ,5                      | ,6                         |
| <b>Máximo</b>              | ,6             | ,5                       | ,7                    | 1,2                     | 1,5                        |

a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.

En la figura 4 se observa el histograma para la categoría de vaconas con los valores resultantes en sangre, en donde no se encuentran animales positivos a cetosis. Se aprecia una curva de normalidad parcialmente homogénea ya que sí existe algo de dispersión entre los datos.

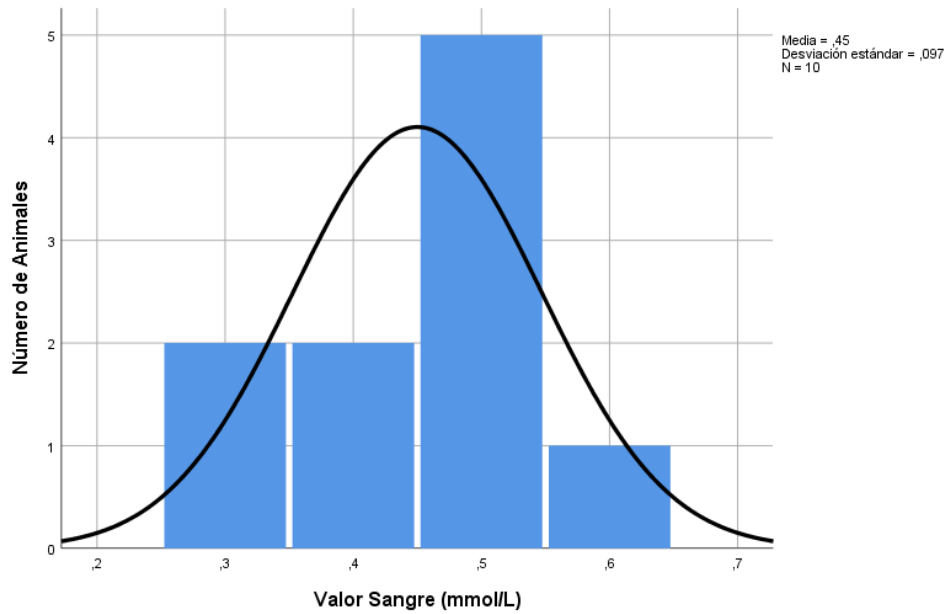


Figura 4. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de vacas.

En la figura 5 se aprecia que no existen animales positivos a cetosis, además, se muestra un ajuste de distribución adecuado para los animales gestantes de 4 meses, sin embargo, no todos los datos se encuentran dentro de la campana de Gauss.

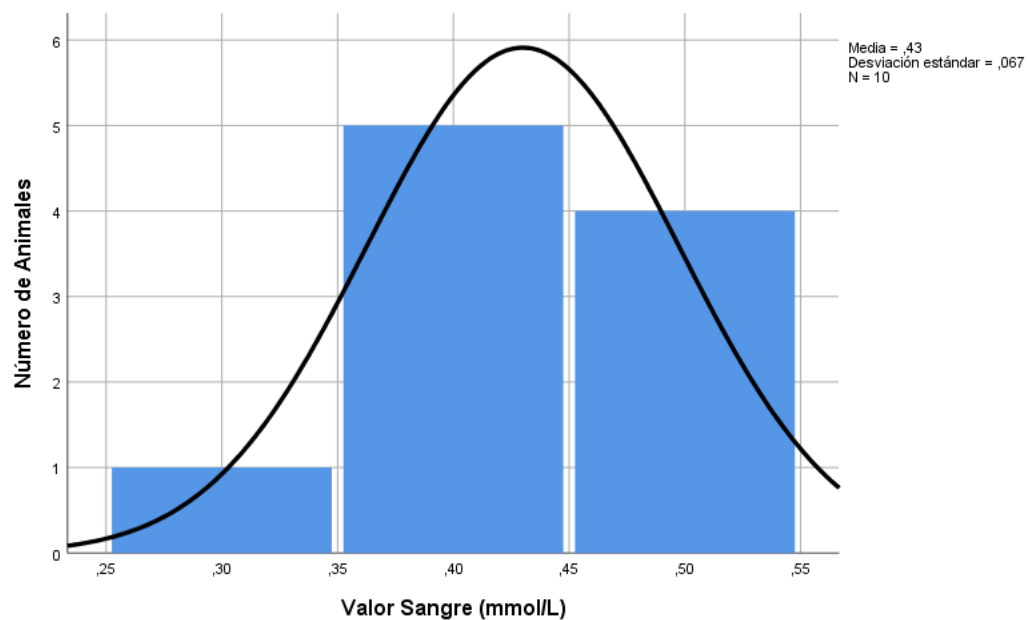


Figura 5. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de gestantes 4 meses.

En la figura 6, se muestra cómo los datos de la categoría preparto 15 días forman una curva de normalidad homogénea por lo que su distribución es adecuada, adicionalmente, se observa que no existen bovinos positivos a cetosis.

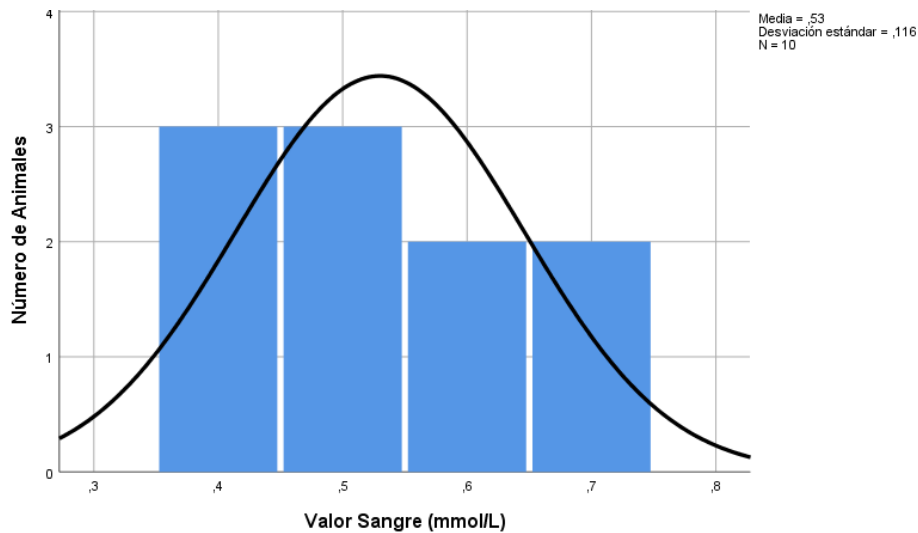


Figura 6. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de preparto 15 días.

En la figura 7 se muestran los valores en sangre de los animales postparto 15 días, en donde se aprecian 5 animales positivos para cetosis (5/10), presentando un ajuste de distribución deficiente al trabajar con datos multimodales, obteniendo así, varios picos de datos.

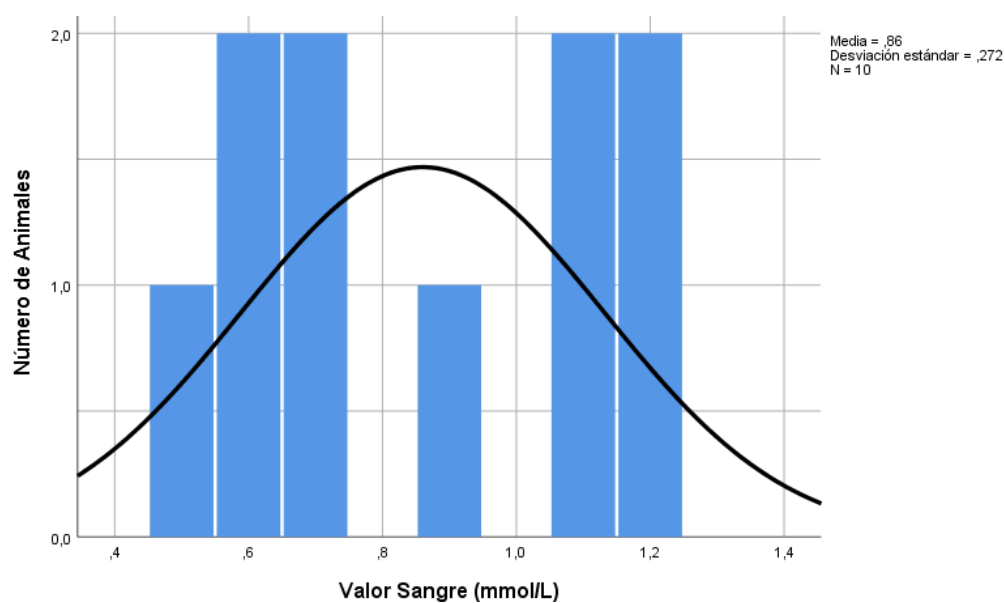


Figura 7. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de postparto 15 días.

En la figura 8, están representados los datos en sangre para el grupo postparto 42 días, en donde se observa que existen 8 animales positivos para cetosis (8/10) y que hay dispersión de los datos ya que se forman conglomerados de datos en el gráfico.

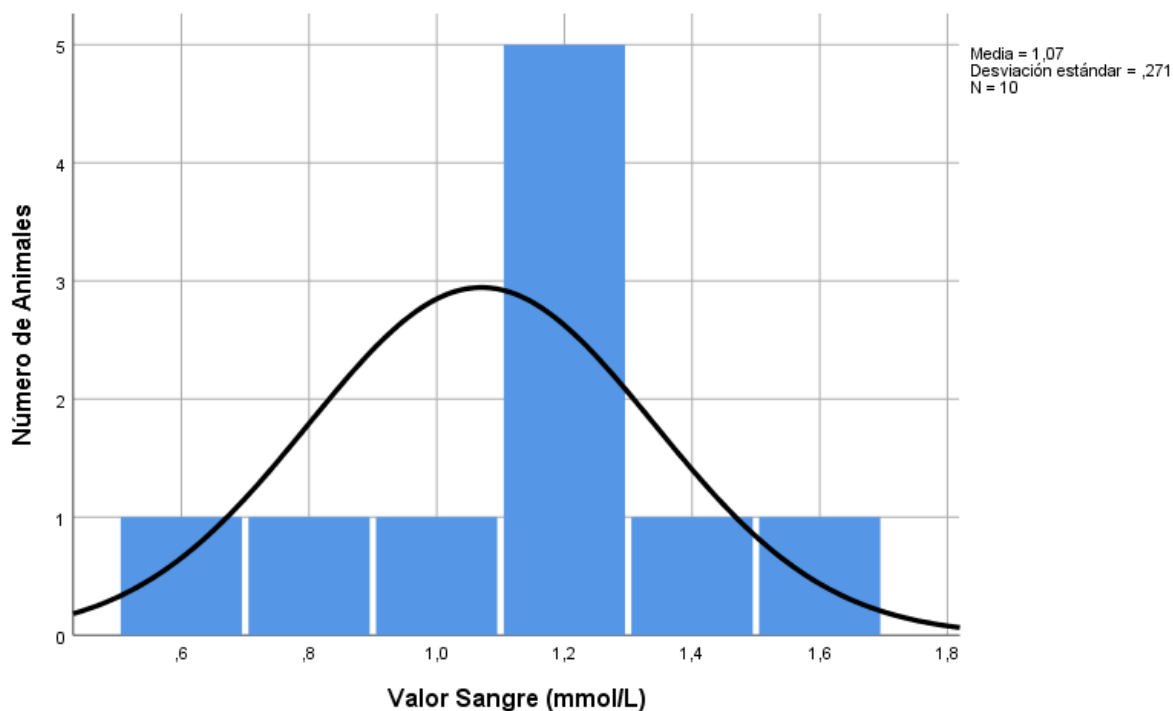


Figura 8. Gráfico de barras para valor en sangre (mmol/L) de postparto 42 días.

En la tabla 7 se muestra la prueba de ANOVA que se realizó para comparar todos los resultados de las 5 categorías en cuanto a valores de  $\beta$ -hidroxibutirato en sangre, en donde, el *p* valor es menor a 0,05, lo que quiere decir existe diferencia significativa entre el conjunto de valores.

Tabla 7

ANOVA para valores de  $\beta$ HB en sangre del total de animales.

|                         | Suma de<br>cuadrados | gl | Media<br>cuadrática | F      | Sig. |
|-------------------------|----------------------|----|---------------------|--------|------|
| <b>Entre grupos</b>     | 3,217                | 4  | ,804                | 23,021 | ,000 |
| <b>Dentro de grupos</b> | 1,572                | 45 | ,035                |        |      |
| <b>Total</b>            | 4,789                | 49 |                     |        |      |

En la tabla 8 se observa la prueba Post-Hoc, de Duncan, para la formación de subconjuntos y comparación de medias, en donde, se forman 3 grupos, de los cuales, las medias de las categorías de gestantes 4 meses, vaconas y parto a 15 días forman el subconjunto A y son estadísticamente iguales ya que no existe diferencia significativa, el subconjunto B está formado por la media de la categoría de postparto a 15 días y el subconjunto C lo está conformando la media del grupo de animales postparto a 42 días.

De los subconjuntos formados, se debe identificar la media mayor, por lo que, la media del subconjunto C es mayor que la media del subconjunto B y esta a su vez es mayor que las medias del subconjunto A.

La formación de subconjuntos en el test de Duncan se realiza con el fin de comparar las medias de cada categoría y tener la certeza de que existen diferencias entre las categorías de un conjunto de datos, agrupando las medias que encajan en una misma curva de normalidad, de esta manera se pueden llegar a formar más de dos subconjuntos (Myers, Well, & Lorch, 2013).

Tabla 8

*Test de Duncan y formación de subconjuntos entre medias de los valores de  $\beta$ HB en sangre.*

|                     | <b>Categoría</b> | <b>N</b> | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> |
|---------------------|------------------|----------|----------|----------|----------|
| Duncan <sup>a</sup> | G4m              | 10       | ,430     |          |          |
|                     | Vacona           | 10       | ,450     |          |          |
|                     | Pre15d           | 10       | ,530     |          |          |
|                     | Pos15d           | 10       |          | ,860     |          |
|                     | Pos42d           | 10       |          |          | 1,070    |
|                     | Sig.             |          |          | ,266     | 1,000    |

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

- Prueba Combur10 Test ® en orina

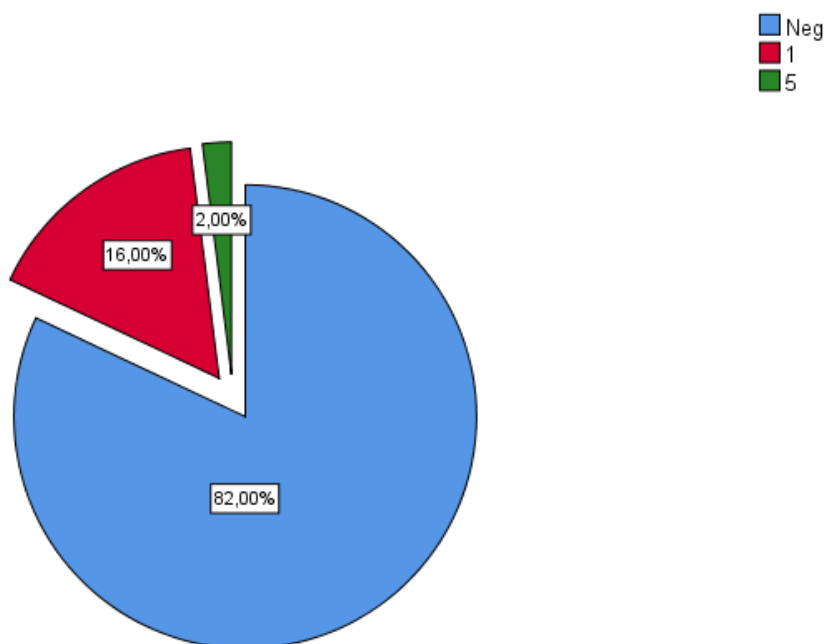
Para los resultados de las muestras de orina, en la tabla 9 se observan los resultados porcentuales del análisis de los valores no paramétricos de AcAc

medido en orina en el total de animales con su respectivo gráfico representado en la figura 9, en donde el 82% del total de animales resultaron negativos para cetosis y el 18% restantes resultaron positivos para la enfermedad, de este último porcentaje, el 16% de los animales positivos arrojó un resultado de 1mmol/L de AcAc en orina y el 2% de positivos corresponden a un valor de 5mmol/L de AcAc en orina.

Tabla 9

*Análisis porcentual y de frecuencias de los valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de animales.*

| mmol/L       | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------|------------|------------|
| <b>Neg</b>   | 41         | 82,0       |
| <b>1</b>     | 8          | 16,0       |
| <b>5</b>     | 1          | 2,0        |
| <b>Total</b> | 50         | 100,0      |



*Figura 9. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina del total de animales.*

En la tabla 10 se observa la formación de una tabla cruzada entre la categoría a la cual pertenecen los animales y el valor de AcAc en orina con su respectivo



gráfico de barras ilustrado en la figura 10, en donde se muestra la distribución de los resultados en las 5 categorías de animales.

Tabla 10

Tabla cruzada Categoría \* Valor Orina (mmol/L).

|           |        | Valor Orina (mmol/L) |   |   |       |
|-----------|--------|----------------------|---|---|-------|
|           |        | Neg                  | 1 | 5 | Total |
| Categoría | Vacona | 10                   | 0 | 0 | 10    |
|           | G4m    | 10                   | 0 | 0 | 10    |
|           | Pre15d | 10                   | 0 | 0 | 10    |
|           | Pos15d | 7                    | 3 | 0 | 10    |
|           | Pos42d | 4                    | 5 | 1 | 10    |
| Total     |        | 41                   | 8 | 1 | 50    |

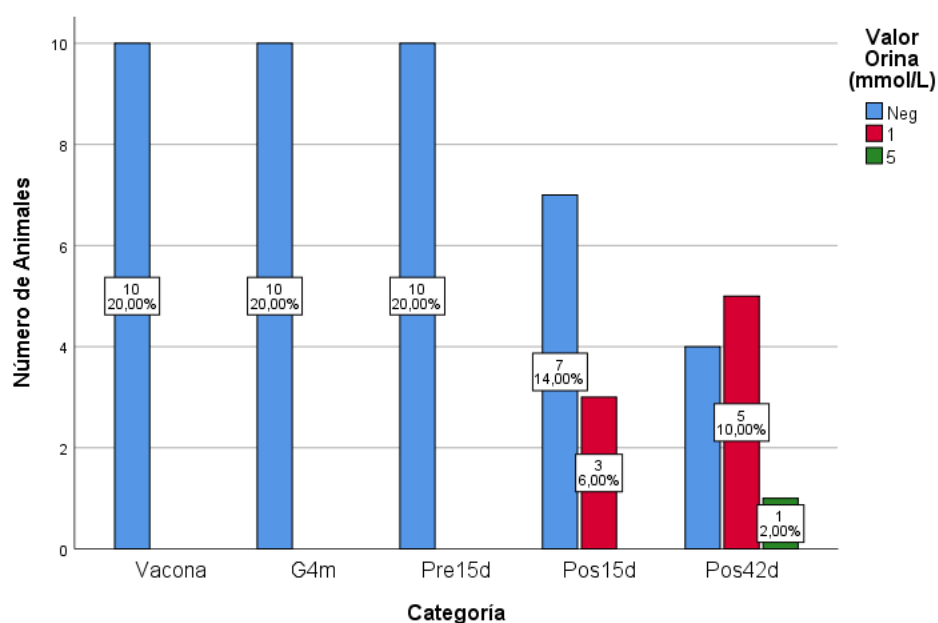
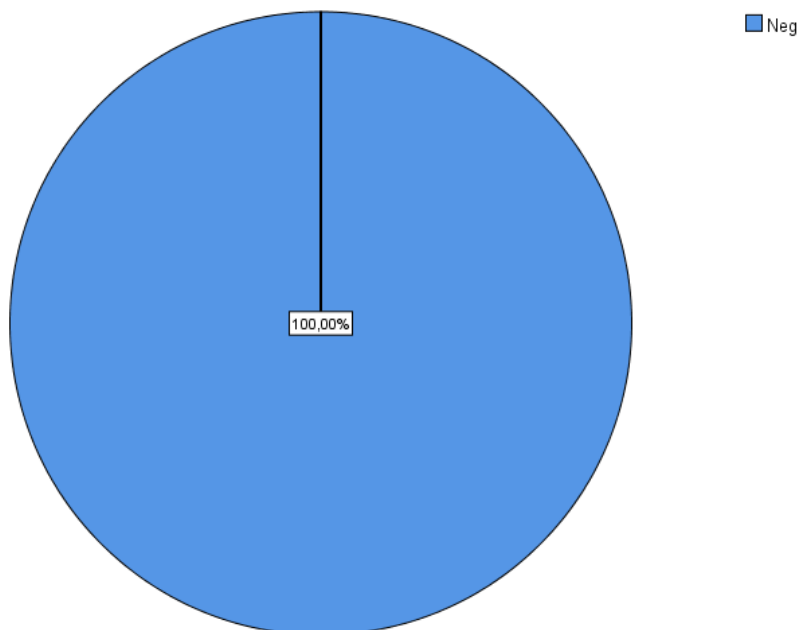


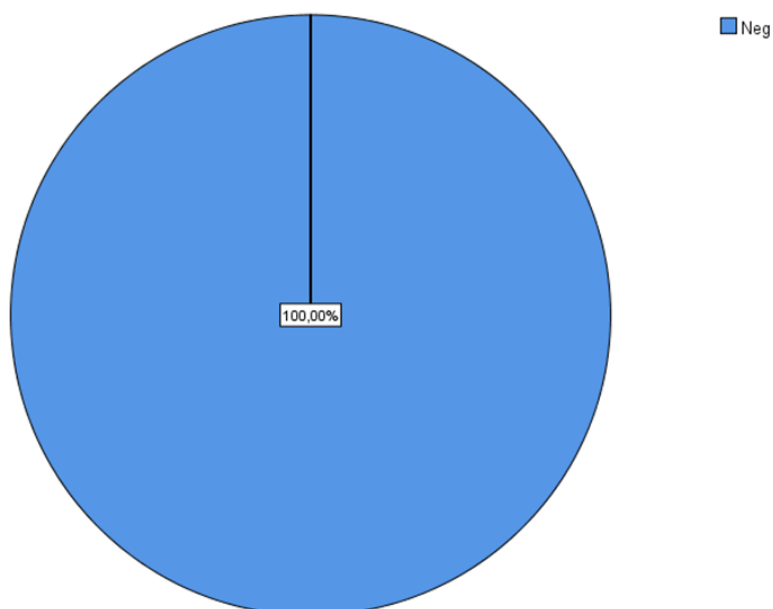
Figura 10. Gráfico de barras de los valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de animales.

En la figura 11 se muestra el análisis porcentual de los valores de AcAc en orina para la categoría de vaconas, en donde el 100% de los animales resultaron negativos a cetosis.



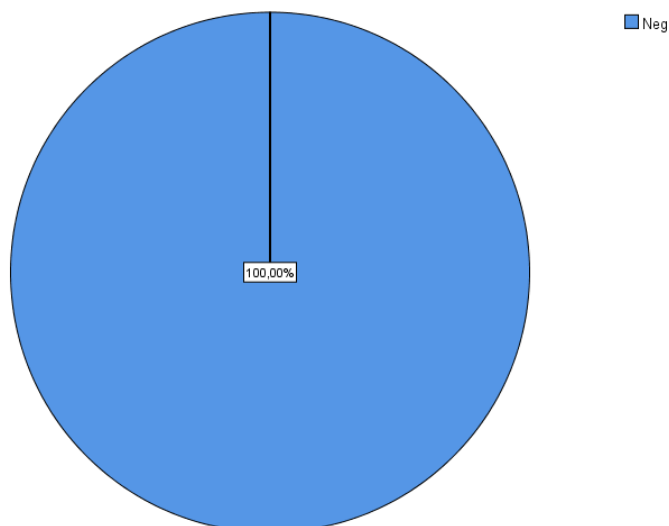
*Figura 11.* Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en vaconas.

En la figura 12 se muestra el análisis porcentual de los valores de AcAc en orina para la categoría de gestantes 4 meses, en donde el 100% de los animales resultaron negativos a cetosis.



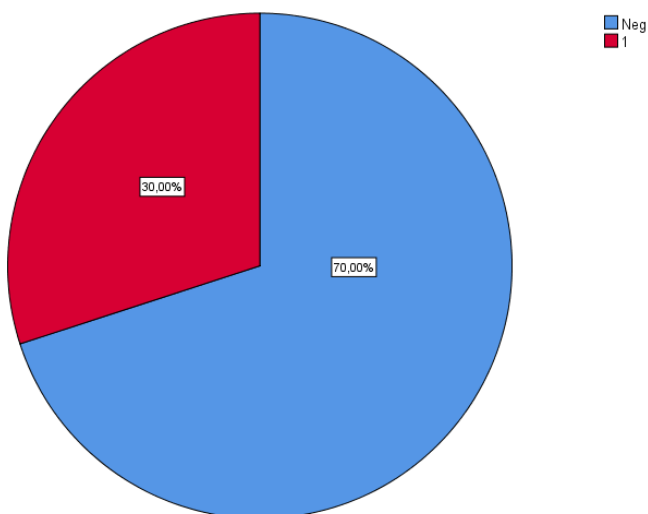
*Figura 12.* Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en gestantes 4 meses.

En la figura 13 se muestra el análisis porcentual de los valores de AcAc en orina para la categoría de preparto 15 días, en donde el 100% de los animales resultaron negativos a cetosis.



*Figura 13.* Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en preparto 15 días.

En la figura 14 se muestra el análisis porcentual de los valores de AcAc en orina para la categoría de postparto 15 días, en donde el 70% (7/10) de los animales resultaron negativos a cetosis, mientras que el 30% (3/10) resultaron positivos con un valor de 1mmol/L de AcAc.



*Figura 14.* Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en postparto 15 días.

En la figura 15 se muestra el análisis porcentual de los valores de AcAc en orina para la categoría de postparto 42 días, en donde el 40% (4/10) de los animales resultaron negativos a cetosis, mientras que el 50% (5/10) resultaron positivos con un valor de 1mmol/L de AcAc y el 10% (1/10) fueron positivos con un valor de 5mmol/L de AcAc en orina.

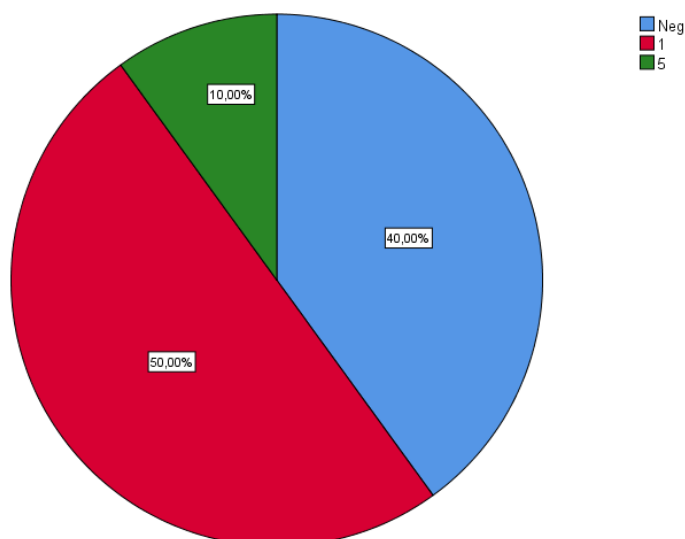


Figura 15. Distribución porcentual del valor de AcAc en orina en postparto 42 días.

En la tabla 11 se observa la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, la misma que se aplicó para comprobar si los valores de AcAc en orina entre las categorías del total de animales, provienen de la misma población, lo que resulta en el rechazo de la hipótesis nula, lo que quiere decir que los datos no provienen de una misma población y, además, al ser el *p* valor menor que 0,05 hay diferencia significativa entre el conjunto de datos.

Tabla 11

*Prueba de Kruskal-Wallis para valores de AcAc (mmol/L) en orina del total de animales.*

| Hipótesis nula   | Prueba  | Sig. | Decisión                   |
|--|---|------|----------------------------|
| La distribución de valor orina es la misma entre categorías. | Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes | ,001 | Rechace la hipótesis nula. |

En la tabla 12 se observan los resultados de la prueba de signos y de la prueba de rangos con signo de Wilcoxon, las mismas que fueron aplicadas con el fin de comparar los valores de sangre y los valores de orina en el total de los animales. En ambas pruebas no paramétricas, el *p* valor es menor que el nivel de significancia de 0,05 por lo cual se debe rechazar la hipótesis nula dando como resultado que existe diferencia entre los dos métodos diagnósticos para cetosis aplicados en los 50 bovinos y que la mediana de diferencias entre los valores de cetosis en orina y los valores en sangre no es igual a 0.

Tabla 12

*Prueba de signos y de rangos con signo de Wilcoxon para valores de AcAc (mmol/L) en orina y de  $\beta$ HB (mmol/L) en sangre del total de animales.*

| <b>Hipótesis nula</b>  | <b>Prueba</b>   | <b>Sig.</b> | <b>Decisión</b>            |
|--|---|-------------|----------------------------|
| La mediana de diferencias entre Valor Orina (mmol/L) y Valor Sangre (mmol/L) es igual a 0. | Prueba de signos para muestras relacionadas                       | ,000        | Rechace la hipótesis nula. |
| La mediana de diferencias entre Valor Orina (mmol/L) y Valor Sangre (mmol/L) es igual a 0. | Prueba de rangos con signo de Wilcoxon para muestras relacionadas | ,000        | Rechace la hipótesis nula. |

Se muestran significaciones asintóticas. El nivel de significación es de ,050.

Los resultados de  $\beta$ HB (mmol/L) en sangre fueron obtenidos con la prueba estándar de oro BHBCheck™, destinada para uso animal, mientras que, los resultados de AcAc (mmol/L) en orina fueron alcanzados con la prueba de uso humano Combur10 Test®.

Para la obtención de los animales verdaderos positivos y verdaderos negativos entre los dos métodos diagnósticos para cetosis, se contabilizaron los valores en orina que no coincidieron con los valores en sangre, con el fin de dar un nivel de confianza al uso de las tiras reactivas de uso humano en el diagnóstico de cetosis en bovinos de leche como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13

*Resultados para cetosis en muestras de sangre y orina de los 50 animales muestreados.*

| Resultados en muestras de sangre |           | Resultados en muestras de orina |           |
|----------------------------------|-----------|---------------------------------|-----------|
| Positivos                        | Negativos | Positivos                       | Negativos |
| 13                               | 37        | 9                               | 41        |

Del total de 50 animales muestreados, 4 animales resultaron como falsos negativos con la prueba de orina. Por lo tanto, del 100% de animales que fueron sometidos al diagnóstico de cetosis con la prueba de orina Combur10 Test®, el 8% no mostró un resultado similar al alcanzado en la medición de  $\beta$ HB, mientras que el 92% restante mostró confiabilidad en los valores resultantes.

## 4.2. Discusión

En este estudio se alcanzó un resultado que difiere entre categorías en cuanto a las medias de los valores de  $\beta$ HB en sangre (mmol/L), por lo que en la prueba Post-Hoc se formaron tres subconjuntos, el grupo A con medias de 0,430mmol/L (gestantes 4 meses); 0,450mmol/L (vaconas); 0,530mmol/L (preparto 15 días), el grupo B con una media de 0,860mmol/L (postparto 15 días) y el grupo C con una media de 1,070 (postparto 42 días), resultados que concuerdan con un estudio de Oetzel (2015) en el que afirma que el punto de corte para establecer un estado de cetosis subclínica en un bovino, es de 0,8 mmol/L en donde encajan las medias del subconjunto B que son animales en postparto a los 15 días y las medias del subconjunto C que se encuentran en postparto a los 42 días con un grado de cetosis mayor pero sin llegar a ser clínico, a su vez, el mismo autor indica que el punto de corte para el diagnóstico de cetosis clínica es 1,6 mmol/L. Por otro lado, Sailer et al. (2018) concuerda con que el valor en mmol/L para diagnosticar hipercetonemia debe ser mayor o igual a 1,2 mmol/L, sin discriminar si se trata de una cetosis subclínica o clínica.

En la presente investigación, se realizaron pruebas no paramétricas para comparar los dos métodos diagnósticos de cetosis que fueron aplicados, tanto en sangre como en orina y los resultados mostraron diferencias entre la prueba de sangre y la prueba de orina, se debe tomar en cuenta que la medición de cuerpos cetónicos en este estudio fueron diferentes para ambas muestras, en sangre se evaluó  $\beta$ HB y en orina se evaluó AcAc, esto se justifica con la descripción de la concentración y circulación de cuerpos cetónicos de varios autores en estudios pasados.

Horber, Mäder, & Jucker (1980) realizaron un estudio en el que se comparó los niveles de  $\beta$ HB y AcAc tanto en sangre como en orina mediante un método diagnóstico en laboratorio en vacas sanas y en vacas con cetosis, obteniendo que en vacas sanas el valor en sangre de AcAc es de 0,06 mmol/L y el valor de  $\beta$ HB es de 0,3 mmol/L, mientras que en vacas sanas el valor en orina de AcAc es de 0,8 mmol/L y el valor de  $\beta$ HB es de 0,2 mmol/L, por otra parte en vacas con cetosis el valor en sangre de AcAc es de 0,4 mmol/L y el valor de  $\beta$ HB es de 1,2 mmol/L, mientras que en vacas con cetosis el valor en orina de AcAc es de 9,4 mmol/L y el valor de  $\beta$ HB es de 7 mmol/L, de igual manera, el autor Rosenberger (1978) presenta la misma tendencia de resultados en porcentajes. De igual manera, esto se complementa con el estudio de Schultz (1971) que indica que en un estado clínico de cetosis el nivel de AcAc en orina es 4 veces mayor al nivel de  $\beta$ HB en sangre utilizando pruebas de laboratorio para ambas muestras. Esto no concuerda con los valores obtenidos del presente estudio debido a que se trabajó con la comparación de  $\beta$ HB y AcAc en muestras diferentes e interpretación de resultados en campo, mientras que en las investigaciones mencionadas se comparó el mismo cuerpo cetónico en diferentes muestras y mediante el análisis de resultados en un laboratorio.

Työppönen & Kauppinen (1980) afirman que el cuerpo cetónico más estable para diagnosticar cetosis en bovinos es  $\beta$ HB, razón por la cual Keltanen (2015) afirma que el AcAc es el primer cuerpo cetónico en formarse y posteriormente se reduce a  $\beta$ HB mediante la enzima beta-hidroxibutirato deshidrogenasa, esto ocurre una

y otra vez ya que la formación de cuerpos cetónicos forman parte del ciclo del ácido tricarbóxico. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente investigación debido a que los valores del cuerpo cetónico AcAc medido en orina fueron diferentes en 4 de 50 animales frente a la medición en sangre del cuerpo cetónico  $\beta$ HB, de esta manera se afirma la estabilidad del  $\beta$ HB en sangre y la volatilidad del AcAc en orina.

En una investigación realizada por Sailer et al. (2018) se muestra una comparación entre la sensibilidad y especificidad de dos métodos diagnósticos para cetosis detectando  $\beta$ HB en sangre, las herramientas diagnósticas implicadas fueron Precision Xtra™ y BHBCheck™ en donde se concluyó que el medidor Precision Xtra™ tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 92% versus el medidor BHBCheck™ que cuenta con una sensibilidad del 91% y una especificidad del 93%. En el presente estudio se utilizó el equipo BHBCheck™ que, a pesar de tener un valor más bajo en sensibilidad, es decir, de detectar los animales verdaderos positivos, no le quita valor diagnóstico ya que sigue siendo considerado como una prueba estándar de oro. Adicionalmente, Oetzel (2015) indica los valores de sensibilidad y especificidad de pruebas diagnósticas de cetosis en bovinos en sangre y en orina, en donde en sangre se tiene una sensibilidad del 98% y una especificidad del 92% mientras que en orina se tiene una sensibilidad de 70% y una especificidad de 97%, además, se afirma que la toma de muestra para orina es más complicada a diferencia de la toma de muestra de sangre, dificultando la aplicación de la herramienta diagnóstica. En esta investigación, el 92% de los resultados de las muestras de orina fueron similares a los valores obtenidos en sangre, lo que no sucedió con el 8% (4 de 50) restante de los resultados en muestras de orina, los cuales no concordaron con los valores en mmol/L de las muestras de sangre, esto puede deberse a la baja sensibilidad que tienen las tiras reactivas colorimétricas en el diagnóstico de cetosis en orina.

En este estudio, se utilizó el kit de uso humano Combur10 Test® el mismo que proporcionó un nivel de confianza del 92% y el 8% restante de los resultados no



coincidieron con la prueba estándar de oro, esto se pudo presentar debido a que el kit está destinado para uso humano, como lo indican los autores Vuljanić, Dojder, Špoljarić, Saračević, Dukić, Leniček-Krleža, Vlašić-Tanasković, Maradin, Grzunov, Vogrinc & Šimundić (2019) en donde afirman que las tiras Combur10 Test ® tienen una sensibilidad de 97% y una especificidad de 81% en relación al metabolito glucosa, estos valores obtenidos pueden ser similares en el metabolito cuerpos cetónicos debido a que no existen investigaciones realizadas en cuanto a su sensibilidad y especificidad, sin embargo, con relación al metabolito de cuerpos cetónicos, Stodulska (2013) indica que usando las tiras COMBINA Urine Test Strips para diagnóstico de cetosis en humanos, la sensibilidad analítica corresponde a 98% y la especificidad analítica a 97% medidas con la cantidad mínima de 0,15 mmol/L de AcAc. De igual manera, un estudio realizado por Redrovan (2019) afirma que las tiras reactivas de uso humano Combina 10 HUMAN son una herramienta útil para el diagnóstico de cetosis en bovinos midiendo AcAc en orina.

Para el contraste de la hipótesis del presente estudio, se rechaza la hipótesis nula que se opone a los argumentos de la hipótesis alterna, la misma que es aceptada en esta investigación, afirmando que existen diferencias entre los resultados para cuerpos cetónicos obtenidos de las tiras reactivas de uso humano, frente a los resultados del método diagnóstico específico para ganado bovino.

### **4.3. Limitantes**

Una de las principales limitantes del estudio fue, una población distribuida en diferentes categorías según su estado fisiológico, lo que imposibilitó la disponibilidad de los animales en un mismo momento y lugar para el muestreo, además si el objetivo fuera trabajar al mismo tiempo con todos los bovinos en estudio, se necesita incrementar el personal habitual.

En cuanto a la toma de muestra de orina, la limitante ocurrió al momento de la estimulación para poder obtener orina por micción espontánea, ciertos bovinos demostraban incomodidad y debido a demasiada manipulación se resistían a orinar.

Las pruebas de laboratorio son más confiables que las herramientas de campo, por lo que no trabajar con un laboratorio externo fue otra de las limitantes, debido a los recursos elevados que esto conlleva, además, la muestra de sangre se puede conservar durante 72 horas en refrigeración, sin embargo, la volatilidad de los cuerpos cetónicos incrementa con el paso del tiempo, por otro lado, la muestra de orina sin conservantes únicamente se la puede refrigerar por 4 horas antes de ser procesada.

## Capítulo V: Conclusiones y recomendaciones

### 5.1. Conclusiones

La herramienta Combur10 Test ® de uso humano puede ser extrapolada a medicina veterinaria para el diagnóstico de cetosis en bovinos, sabiendo que hay un nivel de confianza del 92% y un margen de error del 8%, ya que en este estudio se obtuvo un 8% de falsos negativos (4/50) al confrontarlos con la prueba estándar de oro BHBCheck™.

La circulación y volatilidad de los cuerpos cetónicos en el organismo de los bovinos bajo estudio fue diferente para  $\beta$ HB en sangre y AcAc en orina, esto como consecuencia de la estabilidad de cada cuerpo cetónico, siendo más estable en sangre  $\beta$ HB que AcAc y más estable en orina AcAc que  $\beta$ HB.

Al finalizar el estudio, los resultados obtenidos con la prueba de uso humano para el diagnóstico de cetosis en bovinos en orina midiendo AcAc difirieron en 8% a los resultados que se consiguió con la prueba estándar de oro en las muestras de sangre midiendo  $\beta$ HB, esto debido a que la prueba para orina tiene como destino diagnóstico humanos y no animales.

El punto de corte para el diagnóstico de cetosis en bovinos para este estudio fue de 0,8 mmol/L a 1,2 mmol/L sabiendo que los puntos de corte dependen de la calibración de cada equipo y marca comercial que se utilice, esto se debe también a la sensibilidad y especificidad de cada medidor de  $\beta$ HB en sangre, lo cual no interfiere con su característica de prueba estándar de oro.

### 5.2. Recomendaciones

Es recomendable realizar la evaluación de todos los cuerpos cetónicos, AcAc,  $\beta$ HB y cetona, de esta manera alcanzar mayores niveles de confianza en el diagnóstico de la enfermedad.

Para la selección de la muestra y población, se recomienda agrupar a los animales por el número de partos, genética o volumen de producción lechera, con el fin de evaluar la manera en que influyen estos factores para la presentación de cetosis.

Para futuros estudios es recomendable considerar una población más grande y homogénea, es decir, someter a estudio una categoría de animales según su estado fisiológico y evaluar la formación de los cuerpos cetónicos.

Se recomienda realizar un estudio prospectivo a un rebaño sospechoso a cetosis antes y después de aplicar un tratamiento con el objetivo de evaluar la tendencia que sigue la formación y eliminación de cuerpos cetónicos.

Para investigaciones próximas, es recomendable realizar la evaluación de varios cuerpos cetónicos en la misma muestra con distintos métodos diagnósticos, para poder analizar de mejor manera la cantidad circulante de los mismos.

## REFERENCIAS

- Allen, M. S., & Piantoni, P. (2013). Metabolic Control of Feed Intake. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.04.001>
- Ametaj, B. N. (2017). *Periparturient diseases of dairy cows: A systems biology approach*. *Periparturient Diseases of Dairy Cows: A Systems Biology Approach*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1>
- Ashton, W. M. (2017). Dairy Cattle Feeding and Management. *Outlook on Agriculture*, 4(4), 199–199. <https://doi.org/10.1177/003072706400400413>
- Astessiano, A. L., Pérez-Clariget, R., Quintans, G., Soca, P., Meikle, A., Crooker, B. A., & Carriquiry, M. (2014). Metabolic and endocrine profiles and hepatic gene expression in periparturient, grazing primiparous beef cows with different body reserves. *Livestock Science*, 170, 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.10.008>
- Berge, A. C., & Vertenten, G. (2014). A field study to determine the prevalence, dairy herd management systems, and fresh cow clinical conditions associated with ketosis in western European dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 97(4), 2145–2154. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7163>
- Bradley, A., Barkema, H., Biggs, A., Green, M., & Lam, T. (2012). *Control of mastitis and enhancement of milk quality*. *Dairy herd health*. <https://doi.org/10.1079/9781845939977.0117>
- Brunner, N., Groeger, S., Raposo, J., Bruckmaier, R. M., & Gross, J. J. (2018).

Prevalence of subclinical ketosis and production diseases in dairy cows in Central and South America, Africa, Asia, Australia and New Zealand, and Eastern Europe.

Campbell, J. R., & Marshall, R. T. (2016). *Dairy Production and Processing: The Science of Milk and Milk Products*. Waveland Press. Retrieved from <https://books.google.com.ec/books?id=53aBCwAAQBAJ>

Chapinal, N., Carson, M. E., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., ... Duffield, T. F. (2012). The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *Journal of Dairy Science*, *95*(3), 1301–1309. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4724>

Compton, C., Young, L., & McDougall, S. (2015). Subclinical ketosis in post-partum dairy cows fed a predominantly pasture-based diet: defining cut-points for diagnosis using concentrations of beta-hydroxybutyrate in blood and determining prevalence. *New Zealand Veterinary Journal*, *63*(5), 241–248. <https://doi.org/10.1080/00480169.2014.999841>

Cucunubo, L. G., 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*, *XXIII*, 111–119. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95926276004>

De Koster, J. D., & Opsomer, G. (2013). Insulin Resistance in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *29*(2), 299–322.

<https://doi.org/10.1016/J.CVFA.2013.04.002>

Denis-Robichaud, J., Dubuc, J., Lefebvre, D., & DesCôteaux, L. (2014). Accuracy of milk ketone bodies from flow-injection analysis for the diagnosis of hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*(6), 3364–3370. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2013-6744>

Dubuc, J., & Buczinski, S. (2018). Short communication: Cow- and herd-level prevalence of hypoglycemia in hyperketonemic postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *101*(4), 3374–3379. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2017-13773>

eClinpath. (2013). BHB | eClinpath. Retrieved April 23, 2019, from <http://eclinpath.com/chemistry/energy-metabolism/β-hydroxybutyrate/>

Elanco. (2010). Keto-Test™ | Cow Side Milk Strip Test for Ketone Levels | Elanco US. Retrieved April 23, 2019, from <https://www.elanco.us/products-services/dairy/keto-test>

Engelking, L. R. (2015). Gluconeogenesis. In *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry* (pp. 225–230). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391909-0.50037-2>

Erdmann, S., Derno, M., Schäff, C. T., Börner, S., Kautzsch, U., Kuhla, B., ... Röntgen, M. (2019). Comparative analyses of estimated and calorimetrically determined energy balance in high-yielding dairy cows. *Journal of Dairy Science*. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15017>

Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., & Chapwanya, A. (2014). Interactions

between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144(3–4), 60–71. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2013.11.007>

Finney, S., & Eastridge, M. (2014). *Methods of Detecting Ketosis in Jersey and Holstein Herds*. Retrieved from <https://kb.osu.edu/bitstream/handle/1811/59709/1/Thesis.pdf>

Galvão, K. N., Vieira Neto, A., Peña, G., Bittar, J., & Ibarbia, L. (2017). *Comparing the Urine Ketone Strip Test and the Handheld Ketone Meter to Diagnose Ketosis in Early Lactation Dairy Cows 1*. Retrieved from <http://jama.ama-assn.org/cgi/content/>

Garro, C. J., Mian, L., & Cobos Roldán, M. (2014). Subclinical ketosis in dairy cows: prevalence and risk factors in grazing production system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(5), 838–844. <https://doi.org/10.1111/jpn.12141>

Ghanem, M., Mahmoud, E., Abd El-Raof, M., & El-Attar, M. (2016). Efficacy of different cow side tests for diagnosis of ketosis in lactating cows. *Benha Veterinary Medical Journal*, 31(2), 225–230. <https://doi.org/10.21608/bvmj.2016.31302>

Google Maps. (2018). 0°25'25.8"S 78°33'44.4"W - Google Maps. Retrieved December 4, 2018, from <https://www.google.com/maps/place/0°25'25.8%22S+78°33'44.4%22W/@-0.4238279,-78.564522,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d-0.4238333!4d-78.5623333>



- Gordon, J. (2013). Risk Factors for and Treatment of Ketosis in Lactating Dairy Cattle, (August). Retrieved from <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/7297>
- Gordon, J., LeBlanc, S., & Duffield, T. (2013). Ketosis Treatment in Lactating Dairy Cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 433–445. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.001>
- Grummer, R. R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of Animal Science*, 73(9), 2820–2833. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8582873>
- Guo, W., Bi, S., Kang, J., Zhang, Y., Long, R., Huang, X., ... Anderson, R. C. (2018). Bacterial communities related to 3-nitro-1-propionic acid degradation in the rumen of grazing ruminants in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Anaerobe*, 54, 42–54. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.07.013>
- Haga, S., Miyaji, M., Nakano, M., Ishizaki, H., Matsuyama, H., Katoh, K., & Roh, S. G. (2018). Changes in the expression of  $\alpha$ -tocopherol-related genes in liver and mammary gland biopsy specimens of peripartum dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5277–5293. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13630>
- Hayirli, A., Keisler, D. H., Doepel, L., & Petit, H. (2011). Peripartum responses of dairy cows to prepartal feeding level and dietary fatty acid source. *Journal of Dairy Science*, 94(2), 917–930. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3674>
- Horber, H., Mäder, F., & Jucker, H. (1980). Ketonkörperkonzentration in Blut, Milch und Urin bei gesunden und an primärer Ketose erkrankten Milchkühen.

- Huzzey, J. M., Mann, S., Nydam, D. V., Grant, R. J., & Overton, T. R. (2015). Associations of peripartum markers of stress and inflammation with milk yield and reproductive performance in Holstein dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, *120*(3–4), 291–297. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.04.011>
- INAMHI. (2015). Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología. Retrieved April 29, 2019, from <http://www.serviciometeorologico.gob.ec/>
- Jolicoeur, M. S., Brito, A. F., Santschi, D. E., Pellerin, D., Lefebvre, D., Berthiaume, R., & Girard, C. L. (2014). Short dry period management improves peripartum ruminal adaptation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*(12), 7655–7667. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8590>
- Kawashima, C., Kida, K., Schweigert, F. J., & Miyamoto, A. (2009). Relationship between plasma  $\beta$ -carotene concentrations during the peripartum period and ovulation in the first follicular wave postpartum in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, *111*(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.008>
- Keltanen, T. (2015). *Postmortem Biochemistry - Analysis of Metabolic Imbalance*. Retrieved from <http://ethesis.helsinki.fi>
- Krattenmacher, N., Thaller, G., & Tetens, J. (2019). Analysis of the genetic architecture of energy balance and its major determinants dry matter intake and energy-corrected milk yield in primiparous Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, *102*(4), 3241–3253. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15480>
- Lean, I. J., Van Saun, R., & DeGaris, P. J. (2013). Energy and Protein Nutrition

Management of Transition Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 29(2), 337–366.  
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2013.03.005>

LeBlanc, S. (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *The Journal of Reproduction and Development*, 56 Suppl, S29-35.  
 Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20629214>

Liinamo, A.-E., Mäntysaari, P., & Mäntysaari, E. A. (2012). Short communication: Genetic parameters for feed intake, production, and extent of negative energy balance in Nordic Red dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95(11), 6788–6794. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5342>

LIVEXLAB. (2017). *TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS AL LABORATORIO MANUAL DE PROCEDIMIENTOS*. Retrieved from <http://www.livex.com.ec/uploads/documentos/Manual de Toma de muestras.pdf>

Macrae, A. I., Burrough, E., Forrest, J., Corbishley, A., Russell, G., & Shaw, D. J. (2019). Prevalence of excessive negative energy balance in commercial United Kingdom dairy herds. *The Veterinary Journal*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2019.04.001>

Mazila, M. (2013). *Analysis of effects of negative energy balance in dairy animals using data from three regions of New Zealand's North Island*. Retrieved from <https://www.massey.ac.nz/massey/fms/Colleges/College of Sciences/epicentre/Docs/Manley Mazila MVS Dissertationl.pdf?02DBE502E8F2E078A64D746434C03D37>

- McArt, J., Nydam, D., & Oetzel, G. (2012). Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *95*(9), 5056–5066. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5443>
- McArt, J., Nydam, D., Oetzel, G., Overton, T., & Ospina, P. (2013). Elevated non-esterified fatty acids and  $\beta$ -hydroxybutyrate and their association with transition dairy cow performance. *The Veterinary Journal*, *198*(3), 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.011>
- Mendonça, L. G. D., Abade, C. C., da Silva, E. M., Litherland, N. B., Hansen, L. B., Hansen, W. P., & Chebel, R. C. (2013). Comparison of peripartum metabolic status and postpartum health of Holstein and Montbéliarde-sired crossbred dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*(2), 805–818. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7159>
- Moore, S. A. E., Laporta, J., Crenshaw, T. D., & Hernandez, L. L. (2015). Patterns of circulating serotonin and related metabolites in multiparous dairy cows in the peripartum period. *Journal of Dairy Science*, *98*(6), 3754–3765. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8841>
- Myers, J. L., Well, A. (Arnold), & Lorch, R. F. 1952-. (2013). Research design and statistical analysis. *Choice Reviews Online*, *48*(08), 48-4538-48–4538. <https://doi.org/10.5860/choice.48-4538>
- Oetzel, G. R. (2015). Herd-Level Ketosis – Diagnosis and Risk Factors, 67–91.
- Ospina, P. A., Nydam, D. V., Stokol, T., & Overton, T. R. (2010). 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. *Journal of Dairy Science*, 93(4), 1596–1603. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2852>
- Pires, J. A. A., Delavaud, C., Faulconnier, Y., Pomiès, D., & Chilliard, Y. (2013). Effects of body condition score at calving on indicators of fat and protein mobilization of periparturient Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science*, 96(10), 6423–6439. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6801>
- Powers, D. (2012). Evaluation: From Precision, Recall and F-Factor to ROC, Informedness, Markedness & Correlation.
- Redrovan Passato, D. C. (2019). *IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE RIESGO PARA LA PRESENTACIÓN DE CETOSIS SUBCLÍNICA MEDIANTE ANÁLISIS DE REGISTROS EN GANADO BOVINO LECHERO DE LA HACIENDA EL PLACER*. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/11012/4/UDLA-EC-TMVZ-2019-16.pdf>
- Risco, C. A., & Melendez Retamal, P. (2011). *Dairy production medicine*. Wiley-Blackwell, a John Wiley & Sons, Inc., Publication. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=oRMNBAAAQBAJ&dq=negative+energy+balance+dairy+cattle&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=oRMNBAAAQBAJ&dq=negative+energy+balance+dairy+cattle&source=gbs_navlinks_s)
- Rosales, C. (2013). Cetosis Bovina. *Revista de Cooprinsem*, 3(3), 45–53. Retrieved from <http://cooprinsem.cl/home/pdf/cooprinforma/cooprinforma119.pdf>
- Rosenberger, G. (1978). *Krankheiten des Rindes*. Parey.

- Sailer, K. J., Pralle, R., Caputo, R., Erb, S., Oetzel, G., & White, H. (2018). Technical note: Validation of the BHBCheck blood  $\beta$ -hydroxybutyrate meter as a diagnostic tool for hyperketonemia in dairy cows. *Journal of Dairy Science*.
- Samani, A. D. (2019). Ketosis (acetonemia) in dairy cattle farms: practical guide based on importance, diagnosis, prevention and treatments. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 7(6). <https://doi.org/10.15406/jdvar.2018.07.00230>
- Schultz, L. H. (1971). Management and Nutritional Aspects of Ketosis. *Journal of Dairy Science*, 54(6), 962–973. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(71\)85952-0](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(71)85952-0)
- Smith, B. P. (2014). *Large Animal Internal Medicine*. Elsevier Health Sciences. Retrieved from [https://books.google.com.ec/books?id=H3DkAwAAQBAJ&dq=bradford+smith+large+animal+medicine&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.com.ec/books?id=H3DkAwAAQBAJ&dq=bradford+smith+large+animal+medicine&source=gbs_navlinks_s)
- Stevens, K. D. (2012). *MONITORING THE INCIDENCE OF KETOSIS IN FRESH COWS USING MILK COMPOSITION, URINE KETONES, AND MILK KETONES*. Retrieved from [https://kb.osu.edu/bitstream/handle/1811/51906/1/TR1104HonorsResearchThesis\\_KETONES-2\\_Stevens.pdf](https://kb.osu.edu/bitstream/handle/1811/51906/1/TR1104HonorsResearchThesis_KETONES-2_Stevens.pdf)
- Stodulska M., D. V. D. (2013). COMBINA Urine Test Strips, (SST1M-DVD/131016). Retrieved from <http://www.human-de.com/data/gb/vr/us-vis.pdf>

- 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 of Dairy Science*, *96*(5), 2925–2938. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6035>
- Tatone, E. H. (2016). A Multi-faceted Approach to the Exploration of Ketosis in Dairy Cattle: Detection, Treatment & Risk Factors. *PhD Thesis*, 207.
- Thatcher, W. W. (2017). A 100-Year Review: Historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *100*(12), 10272–10291. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13399>
- Trevisi, E., & Minuti, A. (2018, February 1). Assessment of the innate immune response in the periparturient cow. *Research in Veterinary Science*. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.12.001>
- Työppönen, J., & Kauppinen, K. (1980). The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *21*(1), 55–61. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7386330>
- UNAL. (2014). *Toma muestra orina bovinos*. Retrieved from [http://medicinaveterinariaydezootecnia.bogota.unal.edu.co/fileadmin/FVMZ/Servicios/bioetica/Pro\\_autorizados/004\\_Toma\\_muestra\\_orina\\_bovinos.pdf](http://medicinaveterinariaydezootecnia.bogota.unal.edu.co/fileadmin/FVMZ/Servicios/bioetica/Pro_autorizados/004_Toma_muestra_orina_bovinos.pdf)
- Vanholder, T., Papen, J., Bemers, R., Vertenten, G., & Berge, A. C. B. (2015). Risk factors for subclinical and clinical ketosis and association with production parameters in dairy cows in the Netherlands. *Journal of Dairy Science*, *98*(2), 880–888. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8362>

- Vargová, M., Petrovič, V., Konvičnâ, J., Kadaši, M., Zaleha, P., & Kováč, G. (2015). Hormonal profile and body condition scoring in dairy cows during pre partum and post partum periods. *Acta Veterinaria Brno*, 84(2), 141–151. <https://doi.org/10.2754/avb201584020141>
- Vuljanić, D., Dojder, A., Špoljarić, V., Saračević, A., Dukić, L., Leniček-Krleža, J., ... Šimundić, A.-M. (2019). Analytical verification of 12 most commonly used urine dipsticks in Croatia: comparability, repeatability and accuracy. *Biochemia Medica*, 29(1), 010708. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.010708>
- Weigel, K. A., VanRaden, P. M., Norman, H. D., & Grosu, H. (2017). A 100-Year Review: Methods and impact of genetic selection in dairy cattle—From daughter–dam comparisons to deep learning algorithms. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10234–10250. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12954>
- Weingart, C., Lotz, F., & Kohn, B. (2012). Validation of a portable hand-held whole-blood ketone meter for use in cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 41(1), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2011.00389.x>
- Wisnieski, L., Norby, B., Pierce, S. J., Becker, T., Gandy, J. C., & Sordillo, L. M. (2019). Predictive models for early lactation diseases in transition dairy cattle at dry-off. *Preventive Veterinary Medicine*, 163, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.12.014>
- Zhang, Q., Koser, S. L., Bequette, B. J., & Donkin, S. S. (2015). Effect of propionate on mRNA expression of key genes for gluconeogenesis in liver of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 98(12), 8698–8709.



<https://doi.org/10.3168/jds.2015-9590>

## **ANEXOS**

## **Anexo 1**

Protocolo de toma de muestra de sangre LIVEXLAB.

### **Muestra de sangre**

Para la colección de sangre debe tenerse en cuenta el sitio de punción y el calibre de aguja a utilizar para cada especie. Siempre utilizar aguja y tubo vacutainer (sistema al vacío), no jeringuilla ya que esta propicia que se dañe la muestra por hemolisis y además representa un alto riesgo de bioseguridad para las personas que se transportan o las manejan en el laboratorio

### **Consideraciones generales para la toma de muestras de sangre:**

- a) No colocar el bisel de la aguja hacia abajo pues imposibilita el paso de sangre.
- b) No usar agujas húmedas ya que se hemolizan los glóbulos rojos.
- c) Utilizar siempre aguja y tubo vacutainer individual por cada animal.
- d) En caso de que se requiera anticoagulante es aconsejable utilizarlo en polvo y no en forma líquida, pues se diluye la sangre.
- e) Homogenizar la sangre con el anticoagulante para evitar la formación de coágulos.

Tomado de (LIVEXLAB, 2017).

## Anexo 2

Toma y procesamiento de muestras de sangre.



a.



b.



c.

Nota descriptiva:

- a. Venopunción de vena coccígea levantando la cola del bovino.
- b. Extracción de muestra de sangre con pipeta mecánica.
- c. Lectura de resultados en el equipo BHBCheck™.

## **Anexo 3**

### **Protocolo de toma de muestra de orina Universidad Nacional de Colombia.**

#### **Materiales por usar**

Para realizar el masaje es necesario acercarse al animal sin causarle ningún tipo de daño, ya sea del operario al animal y viceversa. Por ello se requiere que la hembra esté semi inmovilizada, normalmente haciendo uso de una manga en un corral. Puede utilizarse un brete, pero se recomienda realizar el procedimiento en la manga con más de un animal, ya que los bovinos se estresan menos al observar y estar en contacto con otros animales de su especie.

Para realizar el masaje, una vez los animales se encuentren en la manga, se requiere:

1. Un par de guantes de látex o nitrilo por operario mínimo.
2. Recipientes pequeños para coleccionar la orina de los animales.
3. Recipientes grandes para depositar la orina colectada.
4. Envases con agua fría para limpiar la vulva de cada hembra y para aplicar a los animales en caso de que requieran mayor estímulo para miccionar.

#### **Descripción del procedimiento**

Es preferible realizar este protocolo en horas de la mañana (8 am), pues es el momento del día donde se consigue mayor volumen de orina, además de aprovechar un clima más fresco.

1. Los animales son traídos en conjunto del potrero hacia el corral, este debe tener una manga de manejo.
2. Inmediatamente llegan, los animales son ubicados dentro de la manga, uno detrás del otro, este contacto disminuye el estrés de las vacas en comparación de manejarlas en solitario.
3. Desde la parte superior de la manga se realiza un lavado manual de la vulva del animal, utilizando agua y guantes de látex, con la finalidad de eliminar posible materia fecal de la zona.
4. Una vez limpia, se realiza el masaje vulva, aplicando presión con la mano sobre la zona de la vulva, realizando movimientos verticales y circulares, a fin de lograr la estimulación.
5. Cuando el animal comience la micción, esta será colocada en una vasija. Una vez termine, la muestra será depositada en un contenedor.
6. Después que todos los animales hayan miccionado, se esperan 15 minutos para iniciar nuevamente el procedimiento. Si en este periodo de espera algún animal orina, rápida y cuidadosamente se debe ubicar la vasija bajo su vulva para coleccionar lo excretado.
7. Una vez terminado el procedimiento (por haber conseguido los litros requeridos o por vencimiento del periodo de muestreo), las vacas serán devueltas a su respectivo potrero.
8. De ser necesario, al día siguiente (en horas de la mañana) se reinicia el protocolo desde el punto 1.

Tomado de (UNAL, 2014).

## Anexo 4

Toma y procesamiento de muestras de orina.



a.



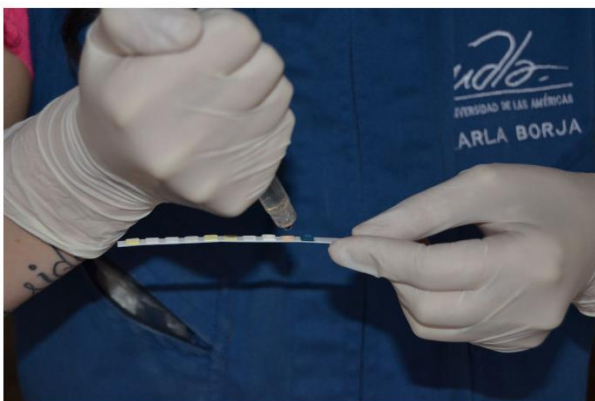
b.



c.



d.



e.

Nota descriptiva:

- a. Limpieza del área vulvar del bovino.
- b. Obtención de muestra de orina mediante micción espontánea.
- c. Extracción de 1ml de muestra de orina con jeringuilla de 3ml.

- d. Utilización de una tira reactiva del test Combur10 Test ®.
- e. Aplicación de una gota de orina en cada analito de la tira reactiva.

## Anexo 5

### Instrucciones de uso de la prueba BHBCheck™.

#### TESTING WITH BLOOD SAMPLE

BHBCheck™ blood ketone and glucose test strips use the same procedure.

**STEP 1. Apply the code strip to set the meter for that specific blood measurement**

To perform a blood glucose test, insert the glucose code strip first to set the meter ready for the blood glucose test; insert the blood ketone code strip instead for a blood ketone test. Do not use the glucose test strip while the meter is set to measure the blood ketone and vice versa.

**STEP 2. Insert the test strip to start the measurement.**

Wait for the meter to display ambient temperature value, code number and then a flashing blood drop symbol.

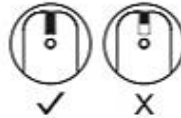
**STEP 3. Select the appropriate measuring mode by pressing M (for the blood glucose test only)**

Press M to select "Gen" or "CTL".

**STEP 4 Obtain a blood sample.**

a) Obtain a drop of blood that is at least 0.7 µL of volume for a blood glucose or a blood ketone test.

b) Gently apply the drop of blood to the absorbent hole at the very tip of the test strip at a tilted angle. Confirmation window should be completely filled if enough blood sample has been applied.

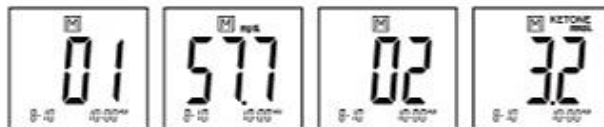


c) If the confirmation window is not filled completely before the meter begins to count down, do not add more blood to the test strip. Discard the test strip and start again. If you have trouble filling the test strip, please contact your veterinarian or your local customer service representative for assistance.

**STEP 5. RESULTS WILL APPEAR AFTER THE METER COUNTS DOWN TO 0.**

**STEP 6. GET RESULTS.**

The test results will be stored in meter memory automatically.



#### WARNING

- Strips are for single use only.
- Please do not change your treatment of animals based on the results without first consulting your veterinarian.
- Turn the meter off by removing the test strip. Discard the used test strip and syringes / lancets carefully according to your local regulations.
- Keep test strips away from small children. If swallowed, contact a doctor immediately for advice.



## Anexo 6

### Instrucciones de uso de la prueba Combur10 Test ®.

## Combur<sup>10</sup> Test<sup>®</sup> parameters

#### How to do it

- Collect urine sample in clean, sterile specimen container (preferably a disposable cup).
- Dip test strip into urine for not more than 1 second.
- When withdrawing the strip wipe side edge of the test strip along the rim of vessel to remove excess urine.
- After 60 seconds (leukocytes 60 – 120 seconds), compare reaction colours of the test patches with the colour scales on the label.
- Colour changes appearing only at the edges of the test patch or developing after more than 2 minutes are not relevant for diagnosis.

#### Some «do's» of urinalysis

- Use only clean, sterile urine specimen containers. Preferably disposable cups.
- Examination of the urine with test strips should be carried out as soon as possible, but within 2 hours at the latest. Mix the sample first.
- Always store the sample in the fridge (+4° C) if the urine test cannot be performed within 2 hours.
- The sample must be at room temperature for the test. Mix it first.
- Close the tube again immediately after removing the test strip.
- Store the test strips at a temperature between +2° and 30° C.
- Don't forget to write the patient's name on the urine specimen cup.

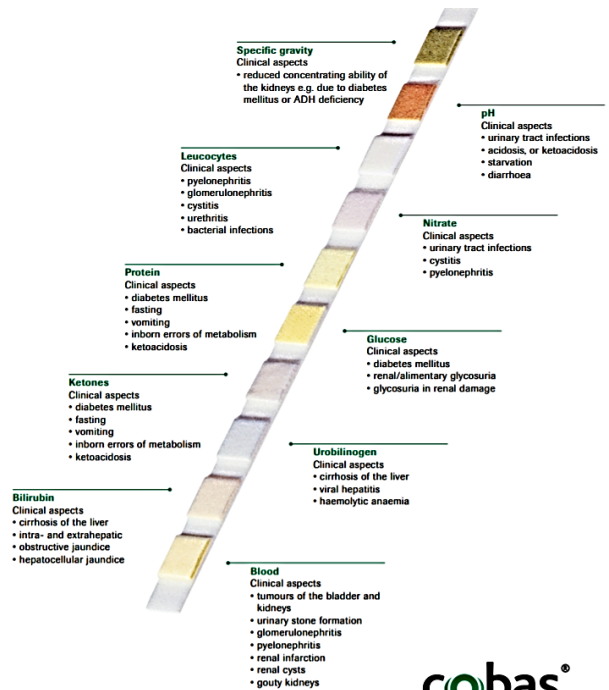
#### Some «don't's» of urinalysis

- Cleaning agents and disinfectants can distort results (false positive findings for blood and glucose).
- Freezing or centrifuging the urine destroys leucocytes and erythrocytes and renders the sample useless for further microscopic examination.
- If the urine is allowed to stand at room temperature for more than 2 hours, the composition changes (greatly increased bacterial growth). Never place the sample in direct sunlight.

Ascorbic acid – no problem with the Combur-Test® Product Line



COBAS, COMBUR-TEST and LIFE NEEDS ANSWERS are trademarks of Roche.  
© 2010 Roche  
Roche Diagnostics Ltd. · CH-6343 Rotkreuz · Switzerland · www.roche.com



**cobas**<sup>®</sup>  
Life needs answers

## Anexo 7

Escala colorimétrica de la prueba en orina Combur10 Test ®.

