UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

VALORACIÓN DE METABOLITOS ENERGÉTICOS (glucosa, β-hidroxibutirato) EN VACAS LECHERAS EN LACTANCIA TEMPRANA

Por

ECHEVERRIA SIERRA, Magdalena

GONZALEZ DASTUGUE, Joaquín

ISASTI ESTEVES, Fernanda

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

Modalidad: Ensayo experimental

MONTEVIDEO

URUGUAY

2018

PÁGINA DE APROBACIÓN

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa: ----------
Dr. Germán Antúnez

Segundo Miembro: ----------
Dr. Jorge Gil

Tercer Miembro: ----------
Dra. Lourdes Adrien

Cuarto Miembro ----------
Ing. Agr. María de los A. Bruni

Fecha: 12/07/2018

Autores: ----------
Br. Magdalena Echeverría

Br. Joaquín González

Br. Fernanda Isasti

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar agradecer a nuestros familiares, amigos y compañeros de facultad por ayudarnos a formarnos como personas en el correr de la carrera.
- Al Doctor Jorge Gil y la Ing. Agr. María de los Ángeles Bruni por brindarnos tiempo y dedicación por la tutoría y co-tutoría.
- Al Ing. Agr. Pablo Chilibroste por el apoyo con los materiales.
- Al Doctor José Piaggio por cooperar con la estadística.
- Al personal de Biblioteca sección Referencias por brindarnos el tiempo y la dedicación en la bibliografía.
- A nuestros compañeros en la parte experimental de la tesis y al personal del tambo de la EEMAC por su ayuda incondicional, sin ellos no hubiese sido posible.
- Y también a todos aquellos que de una forma u otra nos ayudaron a formarnos como personas o como futuros profesionales.

TABLA DE CONTENIDO **Páginas**

Página de aprobación 2

Agradecimientos 3

1. RESUMEN 6

2. SUMMARY 7

3. INTRODUCCIÓN 8

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 10

4.1. Período de transición 10

4.2. Cambios fisiológicos y BEN 10

4.3. Perfiles metabólicos 10

4.4. Metabolitos energéticos 11

4.5. Adaptación digestiva y metabólica 13

4.6. Enfermedades durante la lactancia 13

4.7. Estimación de reservas corporales 17

5. HIPÓTESIS 19

6. OBJETIVOS 19

6.1. Objetivo General 19

6.2. Objetivo Específico 19

7. MATERIALES Y MÉTODOS 19

7.1 Animales y manejo 19

7.2 Muestreo y determinaciones 21

7.3 Análisis estadístico 22

8. RESULTADOS 22

9. DISCUSIÓN 24

10. CONCLUSIONES 26

11. BIBLIOGRAFÍA 27

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

Figura N° 1: Período de transición e incidencias de enfermedades. 14

Figura N°2: Interrelación de desórdenes metabólicos con otros cuadros clínicos. 15

Figura N°3: Secuencia de eventos durante el balance energético negativo. 17

Figura N°4: Grado de condición corporal y sus perspectivas vista en la vértebra en la espalda, aspecto posterior del hueso pélvico, aspecto lateral de la línea entre las caderas, cavidad en la cola y las tuberosidades isquiáticas (posterior y lateral). 18

Cuadro N° 1: Valores de referencia para β-hidroxibutirato y glucosa. 13

Cuadro N°2: Valores recomendados de condición corporal en las diferentes etapas productivas de la vaca. 18

Cuadro N°3: Ingredientes de los concentrados que componen la dieta totalmente mezclada (DTM) ofrecida. 20

Cuadro N° 4: Distintos Reactivos y métodos utilizados en el laboratorio para BHB y Glucosa. 22

Cuadro N° 5: Resultados descriptivos de ambas técnicas para los valores de Glucosa en sangre por OptiumXceed® y por espectrofotometría en laboratorio. 23

Cuadro N° 6: Resultados descriptivos de ambas técnicas para los valores de β-hidroxibutirato en sangre por espectrofotometría en laboratorio y β-hidroxibutirato OptiumXceed® evaluada *in-situ*. 23

1-RESUMEN

La producción lechera en Uruguay es un desafío en materia del manejo de los alimentos, como concentrados y subproductos de la industria. El uso de ellos es de particular importancia en momentos fisiológicamente críticos, como la lactancia temprana. Es de vital importancia reconocer el estado del balance energético a escala individual y colectiva, en la medida que éste se ve afectado por múltiples factores, como: el tipo de dieta, nivel de utilización o consumo, categoría de animales, genética, ambiente, clima, manejo, etc. Monitorear diversos indicadores del balance energético para un control en determinados momentos puede ser la clave de medidas correctivas que podrían implantarse a tiempo, antes de que se instalen otros problemas a consecuencia de éstos disbalances. El objetivo de esta tesis fue la valoración de metabolitos (glucosa, β-hidroxibutirato) en vacas lecheras en lactancia temprana, mediante un método de evaluación *in-situ* (OptiumXceed®, Abbott Diabetes Care, BioerixUruguay) y compararlos con la espectrofotometría estándar en laboratorio, con el fin de validar un método de evaluación más práctico para la corrección y ajustes de dietas. Se utilizaron 42 muestras de sangre de 18 vacas Holando en lactancia temprana para ambas técnicas. Los resultados obtenidos por ambos métodos no tuvieron diferencias significativas, tanto para glucosa como para β-hidroxibutirato (BHB). Respecto a los costos, las determinaciones con el dispositivo OptiumXceed® para ambos metabolitos fueron aproximadamente un 30% más económicas que las determinaciones en el laboratorio. Sin una razón de costo, las diferencias se remiten a la practicidad y la rapidez del resultado, además de la exactitud. La valoración *in-situ* resultó ser un método rápido, sencillo y económico, factible de hacer por un operario, que permitiría intervenir en la corrección y la prevención de enfermedades de origen metabólico.

2-SUMMARY

Milk production in Uruguay is a challenge in terms of food management, as concentrates and by-products of the industry. The use of them is of particular importance at physiologically critical times, such as early lactation. Recognizing the state of the energy balance is of vital importance at the individual and collective level, as it is affected by multiple factors, such as: the type of diet and food offered, time and level of use or consumption, category and interaction of animals in a group, genetics, environment, climate, management, etc. Monitoring various indicators of the energy balance for a control at certain times can be the key to corrective measures that could be implemented in time, before other problems are installed as a result of these imbalances. The aim of this thesis was the evaluation of metabolites (glucose, β-hydroxybutyrate) in dairy cows in early lactation, by means of an *in-situ* evaluation method (OptiumXceed®, Abbott Diabetes Care, BioerixUruguay) and to compare them with standard laboratory spectrophotometry, in order to validate a more practical evaluation method for the correction and adjustments of diets. We used 42 blood samples from 18 Holando cows in early lactation for both techniques. The results obtained by both methods did not have significant differences, both for glucose and for β-hydroxybutyrate. Regarding costs, the determinations with the OptiumXceed® device for both metabolites were approximately 30% cheaper than the determinations in the laboratory. Without a cost reason, the differences refer to the practicality and speed of the result as well as the accuracy. The *in-situ* assessment turned out to be a quick, simple and economical method, feasible to do by an operator, which would allow intervention in the correction and prevention of diseases of metabolic origin.

3- INTRODUCCIÓN

En el Uruguay, la segunda actividad pecuaria ha sido históricamente la lechería (DIEA, 2017), tratándose de un sistema cuya principal base alimenticia es pastoril, aunque está en aumento el uso de dietas totalmente mezcladas suministradas a corral al menos en etapas iniciales de la lactancia (Correa y Carulla, 2009). Los sistemas lecheros necesitan cada día más información y monitoreo del estado de los animales para un mejor control y gestión de la alimentación.

Por costos y resultados, la alimentación es importante en los sistemas lecheros, pero se puede decir que es crítica durante el llamado período de transición, en torno al parto e inicio de la lactancia. Este período de transición está comprendido entre la tercera semana antes del parto y la tercera luego del mismo (Grummer, 1995), enfrentando un desafío de orden metabólico en el final de la gestación e inicio de la lactancia. En dicho período resulta fisiológicamente imposible para el animal compensar sus requerimientos energéticos en base al alimento y debe recurrir a sus reservas corporales. Una mejor producción y eficiencia reproductiva de las vacas lecheras es el resultado de una buena adaptación metabólica de éstas a las exigencias que se presentan al inicio de la lactancia, y para ello es importante una correcta alimentación preparto (Cavestany y col., 2006). Además de procurar que lleguen al parto con un estado corporal deseable de 3,5 (Grigera y Bargo, 2005), es importante proveer una alimentación acorde con los crecientes requerimientos.

Los sistemas lecheros de base pastoril se exponen a situaciones variables de oferta de forraje en términos cualitativos y cuantitativos; para compensar dichas variaciones se buscan alternativas, como el uso de dietas totalmente mezcladas que puedan aportarla energía requerida (Llanos y col., 2013). La selección genética del ganado lechero logró un alto potencial productivo, lo que conlleva una mayor exigencia en los requerimientos nutricionales que se deben atender. Una vaca al final del parto aumenta la demanda de nutrientes como resultado del desarrollo del feto al final de la preñez (Bell y col., 1995), aumentando específicamente la demanda de glucosa y aminoácidos (Bell y col., 1995; Bauman y Ehrhardt, 2000).

Para verificar el balance de nutrientes con la demanda, diversos metabolitos como glucosa y BHB pueden considerarse de valor diagnóstico para monitorear dicho balance energético en ganado en producción, y dependiendo del método será la muestra que usan (orina, suero, leche).

Para el diagnóstico de BHB y glucosa se dispone de métodos como la opción evaluada satisfactoriamente por Iwersen y col. (2009) de los equipos

electrónicos de uso en humanos. Se cree que estas son opciones interesantes que para evaluar diferentes condiciones de producción y manejo.

Iwersen y col. (2009) estudiaron el diagnóstico de BHB mediante un aparato electrónico de uso humano (PrecisiónXtra®) para validarlo en ganado de leche. En dicho estudio concluyeron que la medición de BHB usando sangre entera es una herramienta útil y práctica en el diagnóstico de cetosis subclínica. La sensibilidad (88-100%) y especificidad (96-100%) son excelentes para una prueba *in-situ* y superior a otros dos test químicos en los que se utilizaron tiras reactivas (Ketostix® y Ketolac®). Se estudió la asociación entre cetonas e hipoglicemia mediante las mediciones de BHB y glucosa por dos métodos: 1) utilizando el dispositivo *in-situ* (PrecisiónXtra®) con sangre entera inmediatamente después del muestreo y 2) muestras de suero analizadas con un ensayo de laboratorio estándar (Animal Health Laboratory, Universidad de Guelph, Canadá). Este estudio demostró que el dispositivo analizado por iwersen y col.(2009) fue muy preciso para la medición de BHB con una correlación de 0,95, coincidiendo con otro estudio (Macmillan y col., 2017) que usó un FreeStyle Precisión Neo™ en el que la correlación fue de 0,92, aunque en éste segundo estudio la medición de glucosa resultó menos preciso (correlación de 0,56). En Uruguay, un método electrónico disponible similar al anterior es el OptiumXceed® (Laboratorio Abbott Diabetes Care, USA), y aunque es posible esperar resultados similares, aún no ha sido probado en vacas lecheras.

Otras pruebas diagnósticas *in-situ* comúnmente usadas para la cetosis se basan en tiras reactivas de bioquímica seca (Ketostix®) que miden el cambio de color que ocurre cuando el nitroprusiato de sodio reacciona con acetoacetato y en menor grado con acetona (Adler y col., 1957). Esta prueba usada en orina debe ser leída rápidamente, ya que transcurrido el tiempo estas tiras toman un color más oscuro dando un diagnostico alterado, y resultan en una menor sensibilidad (revisado por LeBlanc, 2010).

El método estándar de valoración de glucosa y BHB es la espectrofotometría. El instrumento proyecta un haz de luz monocromática a través de la muestra y mide la cantidad de luz que es absorbida por dicha muestra. El resultado variará según la concentración del metabolito en evaluación que reacciona con los químicos del kit dando cambios de color del medio modificando la absorbancia de luz del espectro emitida por el equipo (Bosch Ojeda y col., 1995) El OptiumXced en cambio mide pequeñas corrientes eléctricas que se generan de la reacción química entre la sangre de la muestra y los productos químicos de la tirilla. La corriente generada dependerá de la concentración del metabolito y se presenta en el equipo como la concentración correspondiente (Abbott Diabetes Care,Argentina,Manual Optium Xceed).

Las tiras reactivas (para glucosa y β-hidroxibutirato) y el dispositivo son de fácil acceso y de costo relativamente bajo. El equipo garantiza 6000

determinaciones, por lo que el costo y su amortización se tornan insignificantes. La evaluación *in-situ* puede ser un método a utilizar en el diagnóstico individual y colectivo del balance energético de vacas en lactancia temprana, con la ventaja de su simplicidad y rapidez en obtener el resultado. Para el caso de muestras analizadas en el laboratorio, se requiere de más tiempo debido a que luego de extraídas se deben acondicionar y remitir para su posterior análisis mediante espectrofotometría.

El proyecto en estudio es una oportunidad para profundizar en el monitoreo in situ (¨cow-side test" o *in-situ*) del balance energético de vacas en lactancia temprana alimentadas con dietas totalmente mezcladas (DTM) con maíz o glicerol sustituyendo el grano de maíz en la DTM.

Esta tesis busca valorar metabolitos indicadores del balance energético (glucosa y β-hidroxibutirato) en vacas lecheras en lactancia temprana mediante un método de valoración *in-situ* y compararlos con los resultados de espectrofotometría realizados en el laboratorio.

4- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 PERIODO DE TRANSICIÓN:

El período de transición según Calsamiglia (2000), abarca desde tres semanas antes a tres semanas después del parto. En este periodo hay una mayor exigencia energética que está asociada en forma conjunta con la disminución del consumo voluntario, llevando a un desbalance entre los aportes y las necesidades del organismo (Chilliard, 1999).

En este período ocurre lo que se define como Balance Energético Negativo (BEN); se establece un desequilibrio entre los nutrientes (aminoácidos, ácidos grasos, glucosa y calcio, entre otros) que recibe y los que requiere para la producción de leche (Roberts y col., 1981). Esto coexiste con efectos hormonales y físicos que disminuyen el apetito y capacidad de ingesta del animal. Este desequilibrio es aún mayor en vaquillonas que en vacas ya que las mismas tienen mayores requerimientos, además de afrontar la preñez e inicio de la producción, tienen las demandas de su propio crecimiento (Grummer y col., 2004). Naturalmente la vaca recién parida recurre a sus reservas corporales, y si este desbalance no se logra revertir en un corto tiempo, el animal presentará un riesgo mayor para algunas enfermedades y en ocasiones incluso llegar a la muerte (Ingvartsen y Andersen, 2000).

4.2 CAMBIOS FISIOLÓGICOS Y BALANCE ENERGÉTICO NEGATIVO

Uno de los cambios fisiológicos que experimenta el animal al aproximarse al fin de la gestación es el aumento en sus requerimientos energéticos, que podría alcanzar hasta un 23% durante el último mes (Aguilar Caivinagua, 2012). A su vez en dicho período la capacidad de consumo de alimento se encuentra disminuida aproximadamente en un 32% (Grummer, 2000), lo cual lleva a que el animal entre en un BEN desde tres semanas previo al parto y un 89% de este declive ocurre durante la última semana antes del parto (Hayirli y col., 2002). Esto se acentúa en la primera semana posparto pudiendo durar hasta la séptima semana de dicho período (Grant y Albrightt, 1995). El BEN lleva a que el animal movilice sus reservas energéticas con el consiguiente aumento de la concentración plasmática de ácidos grasos no esterificados (AGNE). En el caso del metabolismo de la glucosa, la adaptación primaria que ocurre para afrontar el comienzo de la lactancia es el aumento simultáneo de la gluconeogénesis hepática y una disminución en la oxidación de la glucosa por los tejidos periféricos (homeorhesis) para dirigir la glucosa en forma de lipoproteínas de baja densidad a la glándula mamaria para la síntesis de lactosa (Overton y Waldron, 2004). Esta partición de nutrientes es comandada hormonalmente, dando lugar a una utilización de nutrientes por parte de la glándula mamaria superior a la del resto del cuerpo (Meikle y col., 2013).

Siendo inevitable entrar en BEN, el grado, intensidad y duración del mismo dependen principalmente de las condiciones y el manejo de la alimentación que se realice durante el período de transición (Chilliard, 1999). Para poder evaluar el grado de movilización de los lípidos y la magnitud del desequilibrio energético se han puesto en práctica diversas pruebas para evaluar metabolitos indicadores en dicho periodo. Teóricamente no hay un límite en el número de metabolitos que podrían ser incluidos en un perfil metabólico, pero existen algunos que orientan bien el diagnóstico y evitan las limitaciones de orden práctico por lo sofisticado del método analítico utilizado, automatizado o semi-automatizado (Payne, 1970, citado por Wittwer 1980).

4.3 PÉRFILES METÁBOLICOS

Para evaluar el desequilibrio entre ingestión, metabolismo y excreción de distintos elementos se utilizan los perfiles metabólicos (Payne, 1970 citado por Wittwer, 1980). Éstos son una herramienta de ayuda diagnóstica, dando apoyo a medidas de manejo del sistema y los animales (Wittwer, 2000).

El estudio de los mismos en el ganado lechero en lactancia temprana son de suma importancia para monitorear la relación entre adaptación a la dieta y la incremental producción láctea. Las enfermedades que se presentan en dicho período en vacas lecheras por lo general se manifiestan de forma subclínica.

Los animales pueden llegar a disminuir en 10 a 25% su producción y a su vez verse afectada su fertilidad futura, y aún no manifestar otros cambios evidentes que alerten al propietario a tomar conocimiento de dichos problemas (Aguilar Caivinagua, 2012).

4.4 METABOLITOS ENERGÉTICOS

Los metabolitos más usados para evaluar un BEN pueden ser: glucosa, colesterol, triglicéridos, AGNE, y BHB entre otros. La evaluación de los mismos se realiza en sangre o suero, permitiéndoles al técnico obtener la información necesaria relacionada con la nutrición, salud y determinar los factores de riesgo para dicho lote de vacas (Meikle y col., 2013). Del metabolismo de sustratos energéticos derivan metabolitos que orientan al diagnóstico; entre ellos, los cuerpos cetónicos sirven para valorar la movilización de reservas corporales.

Los principales cuerpos cetónicos son la acetona, acetoacetato y BHB. El BHB es el predominante en los rumiantes. La medición del mismo mediante el suero es útil en la examinación individual, pero también como evaluación de la salud del rebaño para el seguimiento de la alimentación y las prácticas de gestión (Duffield, 2000). El BHB es uno de los cuerpos cetónicos en el plasma de los animales que aumenta cuando existe, además de deficiencia de energía, incapacidad del hígado de procesar los triglicéridos provenientes de la movilización de los lípidos (Campos y col., 2004; Meikle y col., 2013). Si los niveles de BHB exceden lo fisiológico (Daros y col., 2017) se identifica como cetosis subclínica > 1,2 mmol/L, y se asocia con casos de metritis y otros trastornos de la salud (Gröhn y col., 1989, 1990).

Otro de los metabolitos importantes dentro del metabolismo energético es la glucosa. La misma presenta variaciones en su concentración a lo largo del día pero así mismo cumple un rol fundamental en la homeostasis energética de los animales. La molécula de glucosa es de vital importancia para el bovino; se requiere para la síntesis de nutrientes vitales para la vida productiva y reproductiva del animal (Cuervo, 2009). Durante el periodo de transición también se observan cambios de interés de la misma debido al BEN que caracteriza la lactancia temprana (Álvarez, 2001; Cuadro N °1).La glucosa es la primera representante del metabolismo energético, y su concentración en sangre es regulada por la gluconeogénesis (GNG) y un eficiente control endocrino (insulina, glucagón, etc.) que el organismo mantiene sobre su concentración, lo que permite valores muy estables independientemente de los factores asociados a la dieta (Aguilar Caivinagua, 2012; Meikle y col., 2013). Durante el período de transición, la glucosa en el plasma también disminuye en relación con las altas demandas metabólicas de glucosa para la gluconeogénesis, la síntesis de proteína de leche y el crecimiento de tejido, especialmente en el intestino y la glándula mamaria (Dope L y col., 2006).

También la síntesis de lactosa es uno de los destinos de la glucosa que capta el tejido mamario.

Cuadro N°1: Concentraciones de BHB y glucosa (Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal - Facultad de veterinaria - Montevideo-Uruguay).

VALORES DE BHB	**Mmol/L**
BOVINOS	0,1-0,6
BHB INICIO LACTANCIA	Hasta 0,8
CETOSIS SUBCLÍNICA	>1,2
CETOSIS CLÍNICA	2,4
VALORES DE GLUCOSA	**Mmol/L**
BOVINOS	2,5-4,1

4.5 ADAPTACIÓN DIGESTIVA Y METABÓLICA

La adaptación digestiva y metabólica a nivel de rumen en el periodo de transición es uno de los desafíos que enfrenta la vaca. Existen dos procesos de adaptación a nivel digestivo que deben considerarse: adaptación de la flora ruminal, y adaptación de la pared ruminal a la absorción de ácidos grasos volátiles (AGV). Ambos requieren entre 3 y 4 semanas de adaptación, debido a la reducción del tamaño de las papilas ruminales en el periodo seco, lo que provoca la acumulación excesiva de ácido propiónico y láctico en el rumen aumentando el riesgo de acidosis (Calsamiglia, 2000).

4.6 ENFERMEDADES DURANTE LA LACTANCIA

El manejo de la salud del ganado lechero está evolucionando desde un enfoque en el tratamiento para la prevención (revisado por LeBlanc y col., 2006; LeBlanc, 2010). El gran aumento en la producción de leche y los cambios estructurales en la industria han causado cambios importantes tanto en el sistema de manejo como de alimentación, se ha mejorado la calidad de forraje y la proporción de concentrados ofrecidos ha aumentado tratando de equilibrar la dieta (Ingvartsen y Moyes, 2013). Sin embargo, pese a las grandes mejoras en la producción y la eficiencia, las tasas de incidencia de enfermedades registradas en 1991 (Ingvartsen y Moyes, 2013) y el 2001 (Thinderup y col., 2001; citado por Ingvartsen y Moyes, 2013) no han tenido mejoras (Koch y Thinderup, 2008; citado por Ingvartsen y Moyes, 2013) estudio realizado en Dinamarca.

En lo que refiere a las enfermedades durante la lactancia, la cetosis o acetonemia es un desorden metabólico relativamente frecuente en el vacuno lechero (Nielsen y col., 2005).Además de las pérdidas productivas, la presentación de casos de cetosis clínica es causa de pérdidas económicas derivadas de los costos de tratamientos, reducción de la eficiencia reproductiva y el aumento del riesgo de padecer otras patologías (Vinatea, 2013). Éstas conllevan al incremento en el descarte involuntario de vacas que podrían haber permanecido en el rodeo productivo.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es de vital importancia el estado de salud para la eficiencia productiva del rodeo lechero. Durante el periodo de transición suele observarse un aumento de la incidencia de enfermedades infecciosas y metabólicas incluyendo metritis, mastitis, lipidosis hepática y cetosis (Goff y Horst, 1997; Mulligan y Doherty, 2008). Cardo (2017) afirma que el 75% de los problemas de salud ocurren desde los 14 días antes del parto hasta el 30 posparto (Figura N°1). Un estudio hecho por Daros y col. (2017),en vacas de un sistema predominantemente pastoril reporta que la prevalencia de cetosis subclínica, retención de placenta,metritis,vaca caída y desplazamiento de abomaso fueron de 21%, 14% , 11%,6%y1% respectivamente.

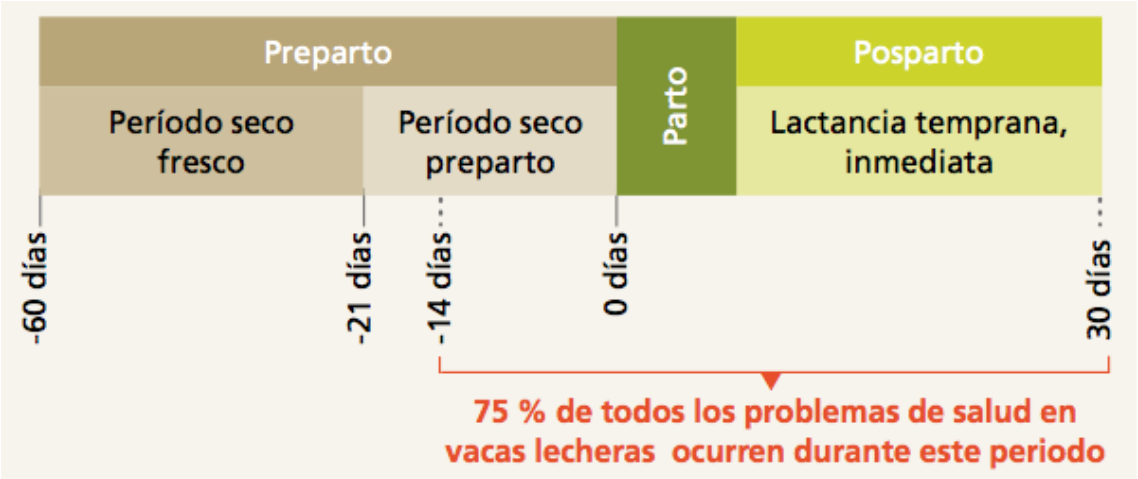

Figura N°1: Período de transición e incidencias de enfermedades (Cardo, 2017).

También hay estudios que asocian los desórdenes metabólicos con eventos clínicos (Gröhn y col., 1990; Figura N°2).

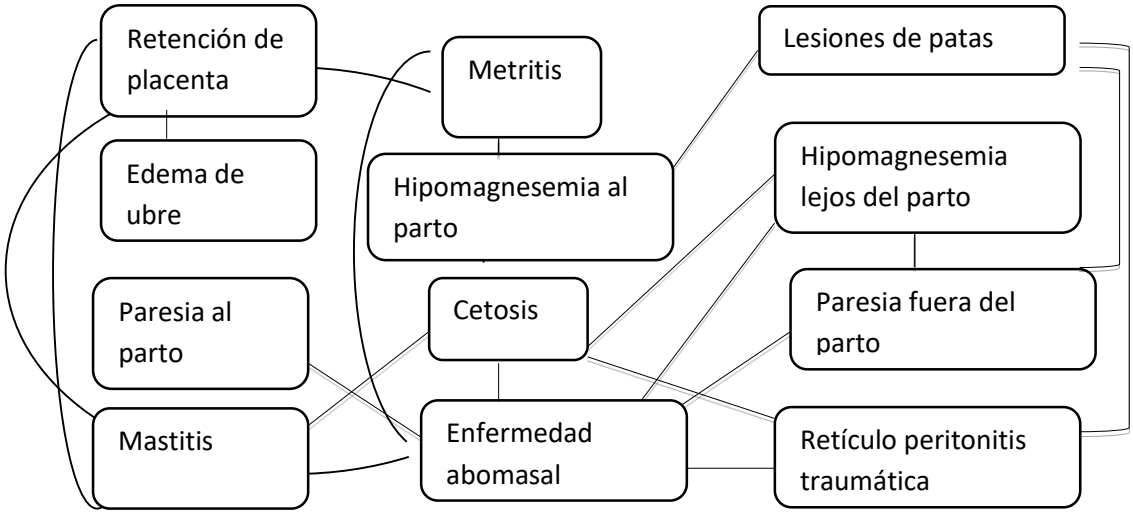

Figura N°2: Interrelación de desórdenes metabólicos con otros cuadros clínicos (Gröhn y col., 1990).

Entre ellas, la mastitis clínicas y subclínicas (Morales, 2011) son un problema mayor, afectando la capacidad funcional de las células secretoras (Kahn, 2007). Esta es una de las enfermedades que conlleva más pérdidas económicas a la producción lechera de Uruguay.

La metritis puerperal cuando aparece de forma aguda, suelen presentar signos generales, fiebre, depresión y anorexia, lo que empeora la situación del BEN. La característica descarga vaginal fétida (Kahn, 2007) se debe a un sinfín de microorganismos que invaden útero; sumado a la depresión inmunitaria típica del posparto que dificulta el restablecimiento del entorno uterino estéril. Cuando la infección persiste durante más de 21 días, se desarrolla la endometritis crónica o subaguda, que ejerce un efecto perjudicial sobre la fertilidad (Kahn, 2007).Al deprimir el consumo de alimento, la metritis es una enfermedad que también afecta la producción de leche (Rajala y Gröhn, 1998). Carvahlo (2013) considera que estas enfermedades son altamente prevalentes en vacas de alta producción y han sido asociadas con disminuciones de la preñez a la inseminación artificial, intervalo parto concepción extendidos, incremento en el refugo, y pérdidas económicas.

La lipidosis hepática afecta más a vacas de alta producción y aquellas con alto estado corporal al parto, debido al déficit de energía el organismo compensa movilizando grasas de las reservas y dicha movilización excesiva eleva los AGNE que infiltran el tejido hepático de grasa alterando su función (Contreras, 1990).

Concomitante con ella, la cetosis también es la enfermedad metabólica de las vacas lecheras en el periodo de transición, caracterizada por una pérdida de peso, pica, inapetencia, disminución de la producción de leche y anormalidades neurológicas que se producen generalmente durante las primeras seis semanas de lactación. La patogenia de esta enfermedad se conoce de forma incompleta, pero requiere de la combinación de una intensa movilización de tejido adiposo, elevada demanda de glucosa y/o un hígado con dificultades para procesar ésta demanda. Ambas se presentan al principio de la lactación, momento en el que el BEN conlleva a la movilización de tejido adiposo y la síntesis de leche que origina una elevada demanda de glucosa (Kahn, 2007). La cetosis subclínica se define como concentraciones anormales de cuerpos cetónicos circulantes en ausencia de signos clínicos de cetosis (Andersson, 1988). El pico de prevalencia de cetosis subclínica ocurre en las 2 primeras semanas de lactancia (Duffield y col., 1997).Según Lama (2013), esta enfermedad tiene consecuencias productivas importantes debido a los efectos de la disminución de la producción, y marcada disminución de la función inmunitaria, llevando al riesgo de padecer otras patologías como metritis, quistes ováricos, retención de placenta, desplazamiento de abomaso, aumento de las células somáticas o mastitis. Las pérdidas económicas por cada caso de cetosis subclínica ha sido evaluada en aproximadamente US$ 325/vaca, considerando la producción, días abiertos, tratamientos e inclusive la muerte (Lama, 2013) datos evaluados en chile. La secuencia de eventos en el BEN se muestra en la Figura N°3.

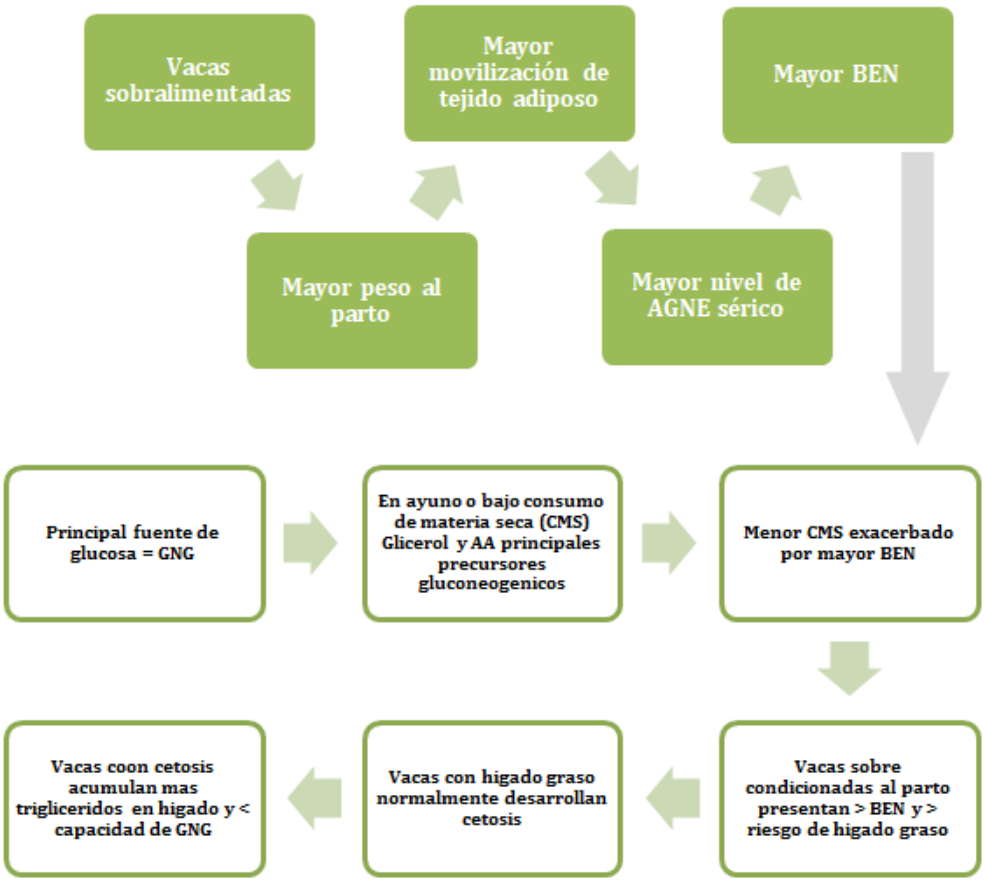

Figura N°3. Secuencia de eventos durante el balance energético negativo (adaptado de Cuervo, 2009).

4.7 ESTIMACIÓN DE RESERVAS CORPORALES

La correcta estimación de las reservas corporales debe hacerse a través de la medición del estado corporal (EC) en forma visual utilizando una escala de 1 a 5 (Edmonson y col., 1989), siendo el escore 1 para la vaca emaciada y 5 para vaca excesivamente gorda (Cuadro N°2). Los intervalos de 0,25 puntos resultan importantes para mejorar la exactitud del promedio a nivel de rodeo, existiendo una alta correlación entre la condición corporal y el porcentaje de grasa corporal de una vaca (Wildman y col., 1982; Edmondson y col., 1989; Grigera y Bargo, 2005).

Cuadro N°2: Valores recomendados de condición corporal (EC)en las diferentes etapas productivas de la vaca (Almeyda, 2018).

VALORACION EC (1-5)	RANGO	DESEABLE
AL PARTO	**3,25 a 3,75**	**3,5**
PICO PRODUCCIÓN	**2,25 a 2,5**	**No menos de 2**
MEDIA PRODUCCIÓN	**2,5 a 3**	**2,75**
BAJA PRODUCCIÓN	**3 a 3,5**	**Final de periodo 3,5**
SECA	**3,25 a 3,75**	**3,5**

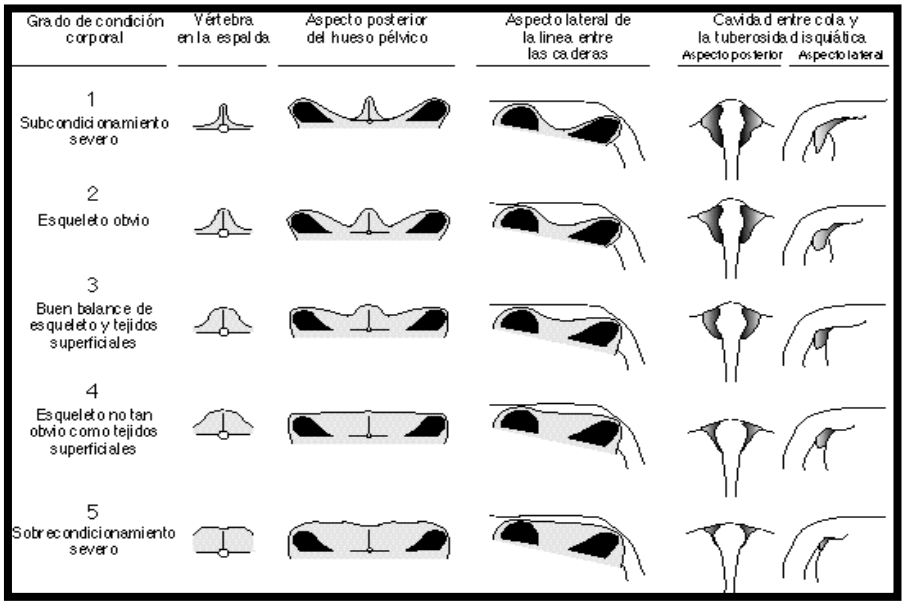

Figura N°4: Grado de condición corporal y sus perspectivas vista en la vértebra en la espalda, aspecto posterior del hueso pélvico, aspecto lateral de la línea entre las caderas, cavidad en la cola y las tuberosidades isquiáticas (posterior y lateral) (adaptado de Edmonson y col., 1988).

La determinación del EC es particularmente importante en momentos claves como el secado, el ingreso al preparto, el parto y el pico de producción. El peso vivo no es un buen indicador de las reservas corporales ya que en vacas de un mismo peso pero de diferente conformación, pueden presentar diferentes niveles de engrasamiento (Grigera y Bargo, 2005). Los detalles de ésta determinación se explican en la Figura N°4.

Siendo de gran relevancia económica el monitoreo del estado energético de vacas lecheras en el período en transición, o cuando se introducen cambios en la dieta, es también de gran importancia evaluar métodos que aseguren

estimaciones precisas sobre el metabolismo, y que no hipotequen practicidad y rapidez para su determinación.

5- HIPÓTESIS

La evaluación *in-situ* en vacas lecheras en lactancia temprana de glucosa y β-hidroxibutirato medida mediante un dispositivo electrónico para humanos (OptiumXceed®) presenta similitud con la evaluación mediante la técnica estándar (espectrofotometría).

6- OBJETIVOS

6.1- OBJETIVO GENERAL

El objetivo de ésta tesis fue valorar metabolitos indicadores del balance energético negativo (glucosa, β-hidroxibutirato) en vacas lecheras en lactancia temprana, mediante un método de evaluación *in-situ* y compararlos con los resultados de espectrofotometría realizados en laboratorio.

6.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar las concentraciones de β-hidroxibutirato obtenidas por espectrofotómetro y el equipo electrónico OptiumXceed, apartir de muestras de sangre de vacas lecheras durante lactancia temprana.

- Comparar las concentraciones de glucosa obtenidas por espectrofotómetro y el equipo electrónico OptiumXceed, a partir de muestras de sangre de vacas lecheras durante la lactancia temprana.

7- MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el departamento de Paysandú, en la Estación Experimental “Mario A. Cassinoni” (EEMAC) en el marco de un proyecto de evaluación de dietas, entre el 27 de agosto y el 27 de octubre del 2012. El mismo contó con la aprobación de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, FVET). Los estudios de laboratorio se realizaron en la Facultad de Veterinaria.

7.1- Animales y manejo

Se utilizaron muestras de suero de 18 vacas Holando, multíparas, al inicio de la lactancia temprana, con ± 9 días de paridas, un peso vivo promedio de 687 ± 52,6 kg y un EC al inicio del ensayo 3,17 ± 1,04 preparto.

Se utilizaron dos DTM (Ej. DTM 1 y DTM 2), ambas mezclas estaban compuestas por un 50% de ensilaje de sorgo planta entera y 50% de concentrados. El concentrado de la DTM 1 la DTM 2 estaba compuesto por 38,7% de grano de maíz o glicerol respectivamente (ver Cuadro N°3). La mezcla de los componentes de la DTM se realizó en un mixer vertical.

El pastoreo fue vespertino y tuvo una asignación por vaca de 60 kg MS/vaca/día (medido al ras del suelo) y las DTM se suministraron luego del ordeñe de la mañana (6:00 am), a razón de 13 kg de MS/vaca/día, en comederos individuales. Todos los animales tuvieron acceso ad libitum al agua. El muestreo de los animales que consumieron la DTM 1 o la DTM 2 fue aleatorio.

Cuadro N°3: Ingredientes de los concentrados que componen la dieta totalmente mezclada (DTM) ofrecida (kg MS).

Ingredientes	Concentrado A	Concentrado B
Maíz grano	38,7	0
Glicerol	0	38,70*
Trigo	12,9	12,9
Expeler de Soja	25,9	25,9
Cáscara Soja	19,4	19,4
Sal Común	0,6	0,6
$CaCO_3$	0,6	0,6
Ca_2pPO_4	0,1	0,6
MgO_2	0,2	0,2
Na_2CO_3	0,9	0,9
Insalmix 50®**	0,3	0,3

* Por su densidad y pureza corresponde a 40,31 ml/100g
**Insalmix 50®: vitamínico mineral aniónico (Optem®; Insalcor, Uruguay).

7.2- MUESTREO Y DETERMINACIONES

La colección de muestras de sangre se realizó a los 9 días pos- parto, luego del ordeñe de la mañana, por punción de la vena coccígea directo a tubos BD Vacutainer®, sin anticoagulante.

Se utilizó sangre de la misma toma de muestra para comparar ambos métodos de evaluación de los metabolitos de interés (glucosa, β-hidroxibutirato). Se completaron en total 42 muestras para ser comparadas por ambas técnicas.

Para la medición con el dispositivo electrónico (OptiumXceed®, Abbott Diabetes Care, USA), se tomó una gota de sangre sin ningún aditivo en el sitio de punción al momento de la extracción, obteniendo el resultado en 8-9 segundos. Se utilizaron las correspondientes tiras electrónicas reactivas para evaluar glucosa y para BHB provistas por el mismo proveedor. Para cada partida de tiras se calibró el dispositivo, por separado, para el uso de las nuevas tiras.

Las muestras para laboratorio fueron centrifugadas (3000 rpm durante 15 minutos) en las 2 horas siguientes a su extracción. El suero extraído fue colocado en micro tubos y se almacenó a -20 °C hasta su posterior análisis en el Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal (LEMA, Facultad de Veterinaria, Montevideo). A partir de las muestras de suero se determinó las concentraciones de glucosa y BHB por espectrofotometría empleando kits comerciales (acá es recomendable poner los datos del kit: marca, ciudad y país de fabricación), Cuadro 4.

Cuadro N°4: Distintos Reactivos y métodos utilizados con el espectrofotómetro Vitalab Selectra II (Wiener Laboratorios SAIC) para BHB y Glucosa.

Reactivo	Fabricante	Controles	Método	Límite de detección	Linealidad
BHB D_3	Randox Laboratories Limited, UK	Pool interno del laboratorio	Cinético enzimático 340 nm	0,1 mmol/L	Hasta 5,75Mml/L
Glicemia enzimática AA	Wiener Lab, Argentina	Standatrol Wiener lab	GOD , PAD	0,54 mg/dl	500mg/dl

7.3- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar estudio observacional, los datos se procesaron con el paquete estadístico INFOSTAT (Di Rienzo y col., 2008).

Las medias e intervalos de confianza binomiales 95% (IC95) de las características de la prueba (sensibilidad, especificidad, y valores predictivos positivos y negativos) fue calculado para el test electrónico tomando como "gold standard" el resultado de espectrofotometría.

8- RESULTADOS

La comparación de los resultados demuestran que existe una asociación lineal ($p<0,001$) entre las concentraciones de los metabolitos obtenidos por ambas técnicas. Los resultados de las concentraciones de glucosa (Cuadro N°5) revelan diferencias entre las dos técnicas, con una correlación de 0,6 para el intervalo de confianza del 95%.

Cuadro N°5: Resultados descriptivos de ambas técnicas para los valores de Glucosa en sangre por OptiumXceed® y por espectrofotometría en laboratorio (Mmol/L).

Coeficiente de correlación (r)	0,60	
Parámetro (mmol/L)	**OPTIUM (n=42)**	**ESPECTROFOTOMETRÍA (n=42)**
Desvío estándar	0,52	0,34
Promedio	3,20	2,63
Coeficiente de variación	0,16	0,13
Máximo	4,66	3,44
Mínimo	2,3	1,9

La correlación en el caso del BHB Coeficiente de la correlación de Pearson: 0,82 (Cuadro 6).

Cuadro N°6: Resultados descriptivos de ambas técnicas para los valores de β-hidroxibutirato en sangre por espectrofotometría en laboratorio y β-hidroxibutirato OptiumXceed® evaluada *in-situ* (Mmol/L).

Coeficiente de correlación (r)	0,82	
Parámetro (mmol/L)	**OPTIUM® (n=42)**	**ESPECTROFOTOMETRÍA (n=42)**
Desvío estándar	0,24	0,23
Promedio	0,58	0,56
Coeficiente de variación	0,41	0,41
Máximo	1,3	1,36
Mínimo	0,2	0,21

9- DISCUSIÓN

Los resultados de glucosa y BHB en sangre de vacas lecheras medida *in-situ* con el dispositivo electrónico OptiumXceed®, tienen similitud con los valores encontrados en el laboratorio mediante espectrofotometría, lo que confirma la hipótesis planteada en ésta tesis.

La asociación entre ambas técnicas asegura una mayor precisión en el dato que se puede obtener a campo, por una técnica *in-situ*, demostrando que puede ser de gran utilidad para corregir posibles disbalances nutricionales o de manejo.

Los metabolitos más usados para monitorear el estado energético en vacas lecheras son colesterol, triglicéridos, AGNE, BHB, glucosa entre otros. La evaluación de los mismos se realiza mediante análisis de sangre, permitiendo obtener la información necesaria del rodeo (Meikle y col., 2013). Aunque de indudable valor diagnóstico con el resultado de estos metabolitos, el tiempo entre el muestreo y el resultado, condiciona la implementación de medidas correctivas en tiempo y forma.

El uso de equipos electrónicos como el OptiumXceed® pueden ser una buena alternativa para evaluar β-hidroxibutirato como forma de control del estado energético de los animales a nivel de rodeo e individual. Una forma rápida de control durante el período de transición a nivel colectivo, debe asociarse a la evaluación de lotes de animales en situación similar de fecha de parto previsto, categoría y manejo, tal como se recomienda para los perfiles metabólicos. Esto no sustituye el uso de los perfiles metabólicos completos, pero aporta información

Es importante comparar los costos de ambas técnicas, y sirve como referencia saber que aproximadamente el dispositivo cuesta $ 720 (setiembre/2014) y que permite más de 6000 determinaciones, por lo que en el costo de cada test el valor del equipo tiene un costo insignificante. El valor de las tiras para glicemia, tiene un costo $22/muestra y en el caso de las tiras de β-hidroxibutirato $35/muestra, costos determinados en julio 2017. En lo que respecta al análisis de laboratorio, para la glicemia tiene un costo de $60 cada 100 determinaciones más un costo por el servicio del 7%. En el caso de BHB tiene un costo de $2145 para la misma cantidad de muestras que para glicemia con un mismo costo servicio que equivale a $22,8 por muestra. Calculando el costo de la valoración in situ de glucosa y BHB, costaría $2404 para las 42 muestras; mientras que los costos de laboratorio para ambas valoraciones suman un total de $ 3483.

En orina también es posible realizar las determinaciones, y lo más usado son las tiras reactivas ("bioquímica seca"), que al igual que el OptiumXceed®, son un método rápido. El inconveniente de las tiras reactivas es que conllevan una interpretación subjetiva de colores que al paso de los minutos cambian dando errores de lectura ya que hay destrucción y lisis de leucocitos, eritrocitos y cilindros, con aumento de pH por formación de amoníaco, aumento del número de bacterias y oxidación de bilirrubina y urobilinógeno (Salabarría, 2015). Otro inconveniente relativo es la extracción de orina con respecto a la sangre, que a pesar de no ser difícil puede ocurrir que haya que esperar que el animal forme orina en caso que haya orinado antes de la colecta.

Las tiras tienen un costo de $1050 por 100 tiras. Las tiras más comunes evalúan 10 parámetros (ej.: Multistix®, Bayer: leucocitos, nitritos, urobilinógenos, proteínas, pH, sangre, densidad, cetonas, bilirrubina, glucosa). Como ventaja, permiten valorar otros parámetros como primer paso para buscar el diagnóstico de múltiples cambios fisiológicos y patológicos a partir del resultado obtenido. Generalmente se recomienda verificar estos resultados con pruebas de laboratorio con otro tipo de estudios para dar un diagnóstico clínico.

Geishauser y col. (2001) estimaron en Canadá que el costo de la cetosis subclínica es de U$S 78 por caso, y que el 41% de las vacas desarrollan el evento en las primeras nueve semanas de lactación. A nivel nacional hay estudios en marcha pero aún no hay datos publicados. Los costos de éste disturbo metabólico se podrían mitigar mediante el monitoreo *in-situ* como con el dispositivo OptiumXceed®.

La medición de BHB mediante el suero es útil en el estudio individual, pero también como evaluación del rodeo (Duffield, 2000), previniendo el riesgo de enfermedad gracias a un diagnóstico a tiempo. La técnica de evaluación *in-situ* como la empleada en ésta tesis es una técnica de fácil acceso y simple, en la

cual se puede conocer la situación de los animales y permite intervenir para la prevención de las enfermedades antes que el manejo de las mismas. Un dato importante a destacar es que la muestra de sangre no debe ser extraída de la vena mamaria, en especial para la determinación de BHB, ya que los niveles de este metabolito difieren de los valores hallados en suero de la sangre central o periférica (Kronfeld y col., 1968).

Una vez que se mide la glucosa y BHB, los valores darán pautas de cómo tratar al animal o al rodeo, ya sea a base a dietas o en caso de un riesgo mayor, instaurar tratamientos médicos. También si es un solo animal el comprometido o si se debe tratar al rodeo en general. Muchas veces el responsable del predio no se percata del riesgo en que está el animal o el rodeo, particularmente cuando los valores son subclínicos en los que la apariencia muestra que están en buen estado cuando en realidad existe la posibilidad de un quiebre de salud colectiva además de las pérdidas de producción (Thinderup y col., 2001; LeBlanc, 2010; Vinatea, 2013).

En lo que respecta a la glucosa, los resultados de esta tesis son similares a lo reportado por Macmillan y col. (2017) respecto de una menor precisión. En ésta tesis, la dispersión de resultados de glucosa obtenida *in-situ* fue mayor que la de los resultados del espectrofotómetro, además de obtener valores absolutos mayores. Una posible explicación de los niveles de glucosa mayor detectados y de dicha dispersión sea que en la técnica *in-situ* la muestra se procesó en forma inmediata, mientras que la muestra enviada al laboratorio para espectrofotometría implica preparar la sangre para su envío al laboratorio. Dicha preparación insumió dos horas posteriores a la colecta en promedio (centrifugar, separar el suero sanguíneo, acondicionar las alícuotas en microtubos y congelar a -20 ° C para su envío al laboratorio). Es posible que durante las 2 horas ocurran mermas por consumo de glucosa disponible por parte de los elementos celulares de la sangre. El equipo de valoración *in-situ* utiliza una gota de sangre entera y da el resultado en menos de un minuto. Se puede suponer que la dispersión de valores y los niveles menores de glucosa en los resultados por espectrofotometría puede deberse a que el metabolismo celular consume parte de la glucosa disponible hasta el retiro de las células sanguíneas por centrifugación, algo que en la determinación *in-situ* no hubo oportunidad por su rapidez.

Macmillan y col. (2017) usaron más cantidad de muestras (441 para BHB y 308 para glucos) pero aun así, las correlaciones también fueron similares a las de ésta tesis (Macmillan y col., 2017: glucosa y BHB: 0,56 y 0,92; en esta tesis: 0,6 y 0,82 para glucosa y β-hidroxibutirato, respectivamente).

Aunque ya se vieron escasas diferencias usando un mayor número de muestras (Macmillan y col., 2017), la cantidad de muestras evaluadas en ésta

tesis podría ser algo que debilita la correlación entre las técnicas. Sería necesario repetir más estudios utilizando más cantidad de animales, además de evaluar su correlación con el estatus clínico de los animales. . Si bien la correlación para glucosa no es muy alta (Coeficiente de la correlación de Pearson: 0,6), posiblemente sea suficiente como dato de campo para orientar en forma rápida posibles correcciones en el manejo de las dietas o de las horas de administración del alimento.

Estas mediciones ayudan a diagnosticar muchos problemas metabólicos antes que se desencadenen en problemas de salud, producción y reproducción, e inclusive la muerte. Los resultados de BHB (coeficiente de correlación Pearson=0,82)en éste estudio demuestran que no hay diferencias significativos entre los dos métodos utilizados, coincidiendo con lo reportado por Iwersen y col. (2009) y Macmillan y col. (2017).

10- CONCLUSIONES

Se concluye que la evaluación *in-situ* mediante el dispositivo electrónico para β-hidroxibutirato en humanos OptiumXceed® se correlaciona satisfactoriamente con los resultados obtenidos a nivel de laboratorio con técnicas consideradas estándar (espectrofotometría) para la determinación de BHB en bovinos. La asociación entre ambas técnicas se verificó mediante la correlación obtenida, lo que confirma la utilidad de la técnica evaluada.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Adler JH, Robert J, Steel D. (1957). The relation between reactions to the Ross test on milk and urine and the degree of Ketonemia in dairy cows. Cornell Vet. 47:101-111.

2. Andersson L. (1988). Subclinical ketosis in dairy cows. Metabolic diseases of ruminant lives stock.Vet Clin North Am. Food Anim Pract, 4(2):233-51.

3. Aguilar Caivinagua A. (2012). Perfil metabólico energético en ganado lechero. Tesis Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 94 pp. Disponible en: http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/441/1/TESIS.pdf. Fecha de consulta: 10 de octubre 2015.

4. Almeyda J. (2018). Manejo y alimentación de vacas productoras de leche en sistemas intensivos. Parte 1. Disponible en:http://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2018/01/MANEJO-Y-ALIMENTACI%C3%93N-DE-VACAS-PRODUCTORAS-DE-LECHE-EN-SISTEMAS-INTENSIVOS-PARTE-I-.pdf. Fecha de consulta: 9 de mayo de 2018.

5.Álvarez. (2001).Bioquímica nutricional y metabólica del bovino en el trópico. En: Alvarez Calvo JL. Interpretación de los metabolitos energéticos. Medellín, Universidad de Antioquia, Pág.30-35.

6. Bell AW, Slepetis R, Erhardt R. (1995). Growth and accretion of energy and protein in the gravid uterus during late pregnancy in Holstein cows. J Dairy Sci79:1954-1961.

7. Baumann DE (2000).Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeorhesis revisited. En: Cronjé P, Rumiant Physiology. Digestion, metabolism, growth and reproduction, pág. 311-328.

8. Calsamiglia S (2000). Nuevos avances en el manejo y alimentación de la vaca durante el preparto. XVI Curso de Especialización FEDNA. Pág. 45-66.Disponible en: https://dialnet.unirioja.es. Fecha de consulta: 7 de setiembre de 2015.

9.Carvahlo R (2013). Manejo reproductivo de la vaca lechera moderna. XLI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay, p 125-127.Disponible en: http://centromedicoveterinariopaysandu.com/wp-content/uploads/2016/02/Dr-Rodrigo-Carvalho-Bicalho.3.pdf. Fecha de consulta: 10 de marzo 2018.

10. Cardo L (2017). Como abordar el balance energético negativo en vacas lecheras. Disponible en: https://issuu.com/biomin/docs/mag_scisol_17_r_es_0315. Fecha de consulta: 28-11-2017.

11. Campos R, Carreño E, Gonzales F. (2004). Perfil metabólico de vacas nativas Colombianas. Disponible en: https://www.ufrgs.br/lacvet/site/wp-content/uploads/2013/05/campos_ganado-criollo.pdf.Fecha de consulta 10 de octubre 2015.

12. Cavestany D, La Manna A, Mendoza A. (2006). Efecto de diferentes dietas durante el periodo de transición sobre la producción y calidad de leche y el inicio de la actividad ovárica de vacas lecheras en pastoreo. Jornada técnica de lechería. INIA. Serie Actividades de Difusión N°455, pp.9-16.

13. Contreras P A (1990).Algunas enfermedades asociadas al desbalance mineral y energético en bovinos. En: Contreras PA. Diagnósticos diferenciales de las principales enfermedades de las especies de producción. Chile, Ed. Quezada M., pp. 186-199.

14. Correa HJ, Carulla J. (2009). Relación entre nutrición y salud en hatos lecheros. Rev. Med. Vet. Zoot, 56:273-291.

15. Chilliard Y. (1999). Metabolic adaptations and nutrient partitioning in the lactating animal. En: Martinet J, Houdebine L.M, Head H.H (Eds.) Biology of Lactation. Paris, INRA; Pág. 503–552.

16. Cuervo A. (2009). Mecanismo de control de la gluconeogénesis en la vaca en transición. Revisión de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Animal. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/688/1/80843172_2009.pdf. Fecha de consulta: 09/05/2018.

17. Daros R, Hötzel B, Branb A, LeBlanc J, von Keyserlingk MAG (2017). Prevalence and risk for transition period diseases in grazing dairy cows in Brasil. Prev Vet Med 145: 16-22.

18. DIEA (2017). Anuario Agropecuario 2017. Ministerio de Ganadería, Agricultura y pesca. Disponible en:http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/diea-anuario2017web01a.pdf.Fecha de consulta: 20 de abril de 2018.

19. Duffield T, Kelton DF, Leslie KE, Lissemore KD, LumsdenJH (1997). Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. Can Vet J; 38:713-718.

20. Duffield T. (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. Vet Clin of North Am. Food Anim Pract. 16 (2): 231– 253.

21. Edmondson JL, Weaver T, Farver T, Webster G (1989). A body condition scoring chart for Holstein Dairy cows. J Dairy Sci 72:68-78.

22. Galvani FJ. (1998). Alimentación de los Bovinos con sub-productos de la industria del biodiesel. Facultad de Veterinaria UBA, Argentina. Disponible en:http:www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/98-trabajo_final_galvani.pd. Fecha de consulta: 7 de setiembre de 2015.

23. Geishauser T, Leslie K, Kelton, Duffield T. (2001). Monitoring Subclinical Ketosis in Dairy herds. Compend. Cont. Educ. Pract. Vet. 23(8):S65-S71.

24. Goff J, Horst L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J Dairy Sci 80(7):1260-8.

25. Grant RJ, Albrightt JL. (1995). Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. J Anim Sci 73(9):2791-803.

26. Grigera J, Bargo F. (2005).Evaluación del estado corporal en vacas lecheras. Disponible en:http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_condicion_corporal/09-cc_lecheras.pdf. Fecha de consulta: 9 de mayo de 2018.

27. Gröhn Y, Hollis N, McCulloch C, Saloniemi H. (1989). Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. J Dairy Sci 72(7):1876-85.

28. Gröhn Y, Hollis N, McCulloch Ch, Saloniemi H.(1990).Epidemiology of reproductive disorders in dairy cattle: associations among host characteristics, disease and production. Prev. Vet. Med 8(1):25-39.

29. Grummer R. (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism of feeding the transition dairy cow. J Anim. Sci. 73:2820-2833.

30. Grummer RR, Mashek DG,Hayirli A. (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. Vet Clin North Am Food Anim Pract 20(3):447-470.

31. Hayirli A, Grummer R, Nordheim E, Crump A. (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holstein. J Dairy Sci 85: 3430-3443.

32. Ingvartsen K, Andersen J. (2000). Integration of metabolism and intake regulation: review focusing on periparturient animals. J Dairy Sci 83: 1573-1597.

33. Ingvartsen K, Moyes K. (2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle. Animal, 7:(S1):112-122.

34. Iwersen M, Falkenberg U, Voigtsberg R, Forderung D, Heuwser W. (2009). Evaluation of on electronic cow-side test to detect subclinical ketosis in dairy cows. J Dairy Sci 92:2618-2624.

35. Kahn CM. (2007). Manual Merck de Veterinaria, 6a ed. Barcelona, Océano 2v.

36. Kronfeld D S, Raggi F , Ramberg ,C.F (1968). Mammary blood flow and ketone metabolism in normal, fasted, and ketotic cows. Am. J. Physiol. 215:218-227.

37. Krogh K, Thinderup M (2001, citado por Ingvartsen K, Moyes K, 2013). Nutrition, immune function and health of dairy cattle 7:s1, pp 112–122.

38. Llanos E, Astigarraga L, Jaques R, Picasso V. (2013). Eficiencia energética en sistemas lecheros Uruguay. Agrociencia (Uruguay). 17(2):99-109.

39. Lama J (2013). Monitoreo de cetosis. Cooprinforma 119: 4-8p. Disponible en: http://cooprinsem.cl/home/pdf/cooprinforma/cooprinforma119.pdf. Fecha de consulta: 9 de mayo de 2018.

40. LeBlanc S, Lissemare K, Kelton D, Duffield T, Leslie K (2006). Mayor advances in disease prevention in dairy cattle. J Dairy Sci89 (4):1267-79.

41. LeBlanc S (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. J Rep Dev 56 (Suppl):S29-S35.

42. Laborde M, Barriola J, Bermúdez J, Bonilla M (1981). Mastitis subclínica. Etiología y distribución de la infección en los cuartos mamarios de vacas ordeñadas manual y mecanizadamente. Veterinaria (Montevideo) Uruguay, 76:75- 80.

43. Macmillan K, Lopéz Helguera I, Behrouzi A, Gobikrushanth, Hoff B, Colazo M (2017). Accuracy of a cow-side test for de diagnosis of hyperketonemia and hypoglycemia in lactating dairy cows. Res Vet Sci. 115: 327-331.

44.Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Ruprechter G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilibroste P (2013). Revisión: Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. Agrociencia Uruguay 17:1, 1141-152.

45. Morales López H, (2011).Mastitis Bovina Enfoque Biotecnológico, Colombia, Laverland, 217p.

46. Mulligan F, Doherty M. (2008). Production disease of transition Cow. Vet. J. 176(1):3-9.

47. Nielsen N, Friggens N, Chagunda G, Ingvartsen L. (2005). Predicting risk ok ketosis in dairy cows using in-line measurements of b-hidroxibutirate: a biological model.J Dairy Sci88: 2441-2453.

48. Overton T. R, Waldron M. R (2004). Nutritional management of transition dairy cow: Strategies to optimize metabolic health. J Dairy Sci: 87(E. Suppl): 105- 119.

49. Payne JM (1970, citado por Wittwer, 2000). The future of presymtomatic diagnosis. Proc. Roy. Soc. Med. 65:150-158.

50. Rajala PJ, Gröhn T. (1998). Effects of dystocia, retained placenta, and metritis on milk yield in dairy cows. J Dairy Sci 81:3172–3181.

51. Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2008. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar

52. Roberts CJ, Reid IM, Rowlands, Patterson A. (1981). A fat mobilization syndrome in dairy cows in early lactation. Vet Rec 108:7-9.

53. Salabarría J (2015). Examen de orina con tiras reactivas. 28 p. Disponible en: www.sld.cu/galerias/pdf/uvs/patologiaclinica/ex%clmen_de_orina_con_tiras_reactivas.pdf. Fecha de consulta: 10 de agosto 2015.

54. Vinatea J. (2013).El costo de la cetosis subclínica en la explotación de vacuno lechero. Albéitar 162:14-15. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/metabolicas/metabolicas_bovinos/51-cetosis_lecheras.pdf.Fecha de consulta: 10 de mayo 2018.

55. Wildman E, Jones G, Wagner P (1982). A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. J Dairy Sci 65 (3): 495 – 501.

56. Wittwer F (1980). Archivo Medicina Veterinaria. Consideraciones sobre el empleo de perfiles metabólicos en el ganado lechero. 12: 180- 185. Fecha de consulta: 10 de mayo de 2018. Disponible en:https://books.google.com.uy/books?id=nLPhh10mGKgC&pg=PA180&dq=Archivos+de+medicina+veterinaria+1980+Payne&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwii2KLU6fvaAhVBj5AKHa5tCR0Q6AEIJTAA

57. Wittwer F (2000). Diagnóstico dos desequilibrios metabólicos de energía emrebanhos bovinos. En: Gonzalez FHD, Bacellos J, Patiño HO, Ribeiro LA. Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre, UFRGS,p 9-22. Disponible en:http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/perfil%20nutricional%20ruminantes.pdf . Fecha de consulta: 11 de agosto 2015.