

Validación de la medición de β -hidroxibutirato (BHB) en leche mediante FTIR en sistemas lecheros pastoriles en Uruguay
Validation of a milk β -hydroxybutyrate (BHB) measurement by FTIR in grazing dairy systems in Uruguay

Cartaya Andrea, Cayssials Valerie, Hirigoyen Darío. *acartaya@inia.org.uy*, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA Uruguay).

Este es el primer estudio que validó la técnica de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR, por su sigla en inglés) como herramienta para el diagnóstico de cetosis subclínica (CS) e identificó el umbral crítico para el diagnóstico en condiciones de alimentación principalmente pastoriles de Uruguay. La CS es un importante trastorno metabólico, fuertemente relacionado con el balance energético negativo en vacas lecheras en lactancia temprana, caracterizado por altas concentraciones de cuerpos cetónicos en sangre, definidos como $\text{BHB} \geq 1,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (Duffield et al., 2009). Se asocia con disminución de producción de leche, mal desempeño reproductivo y mayor riesgo de cetosis clínica. La FTIR se utiliza en laboratorios lácteos, es un procedimiento rápido, sensible y sencillo que permite la medición simultánea de varios componentes de la leche. Con su aplicación es posible medir las concentraciones de BHB en muestras de control lechero (LBHB; de Roos et al., 2007), pero debe calibrarse con un gold standard en suero. Los objetivos de este estudio fueron validar LBHB mediante FTIR, identificar el umbral crítico para el diagnóstico de CS en muestras de control lechero provenientes de sistemas pastoriles de nuestro país. Se usó un equipo MilkoScan FT+ (Foss Electric), con verificación de la calibración FTIR LBHB con material de referencia secundario (Cecalait, Francia). Luego, se midieron 176 muestras de leche obtenidas del control lechero del tambo experimental de “La Estanzuela” del INIA (Uruguay). Inmediatamente después de la recolección de leche, se muestreó sangre de la vena coccígea de cada animal, el plasma se almacenó a -20°C hasta el análisis de la concentración de BHB (sBHB) mediante un método colorimétrico enzimático (Facultad de Veterinaria, UdelaR). Para el diagnóstico de CS se consideró un umbral de $\text{sBHB} \geq 1,2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. El análisis estadístico fue realizado con RStudio. Se analizó la correlación de Spearman entre sBHB y LBHB. Se calcularon las características operativas de FTIR y los intervalos de confianza del 95%. La validación LBHB mediante FTIR se evaluó para demostrar que el método analítico es apto para el propósito previsto. Los parámetros evaluados fueron: linealidad ($R^2=0,913$); sensibilidad (pendiente=0,9634); repetibilidad ($r=0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); veracidad (p-valor=0,110); reproducibilidad ($R=0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$); rango de trabajo (0,05-0,29 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e incertidumbre ($U=0,022 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). Los resultados obtenidos estuvieron en el mismo rango que los indicados en el boletín IDF 504/2020, excepto el valor de incertidumbre. Este parámetro no ha sido reportado en la bibliografía e indicó un 14% de dispersión para las predicciones de LBHB. La correlación entre LBHB y sBHB fue positiva ($r=0,69$, $p<0,0001$), menor ($r=0,89$) que la correlación reportada por Denis-Robichaud et al. (2014). Se validaron las mediciones de BHB en leche mediante FTIR y el punto de corte óptimo para predecir la SK determinada fue $0,185 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Aunque el monitoreo de CS con muestras de control lechero tuvo una precisión moderada, es un método no invasivo, de fácil muestreo y de menor costo que la determinación en sangre, lo que lo convierte en una herramienta valiosa que necesita una mayor evaluación de la frecuencia de muestreo.

Palabras clave: cetosis-subclínica; umbral-crítico; exactitud

This is the first study that validated the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) technique as a tool for the diagnosis of subclinical ketosis (SC) and identified the critical threshold for diagnosis

under primarily pastoral feeding conditions, from Uruguay. SC is an important metabolic disorder, strongly related to negative energy balance in early lactation dairy cows, characterized by high concentrations of ketone bodies in blood, defined as BHB ≥ 1.2 mmol•L⁻¹ (Duffield et al., 2009). It is associated with decreased milk production, poor reproductive performance and increased risk of clinical ketosis. FTIR is used in dairy laboratories, it is a fast, sensitive and simple procedure that allows the simultaneous measurement of several milk components. With its application it is possible to measure BHB concentrations in milk control samples (IBHB; de Roos et al., 2007), but it must be calibrated with a serum gold standard. The objectives of this study were to validate IBHB using FTIR, identify the critical threshold for the diagnosis of CS in dairy control samples from pastoral systems of our country. A MilkoScan FT+ equipment (Foss Electric) was used, with FTIR IBHB calibration verification with secondary reference material (Cecalait, France). Then, 176 milk samples obtained from the dairy control of the experimental dairy farm “La Estanzuela” of INIA (Uruguay) were measured. Immediately after milk collection, blood was sampled from the coccygeal vein of each animal, the plasma was stored at -20 °C until analysis of BHB (sBHB) concentration using an enzymatic colorimetric method (Faculty of Veterinary Medicine, UdelaR). For the diagnosis of CS, a threshold of sBHB ≥ 1.2 mmol•L⁻¹ was considered. Statistical analysis was performed with RStudio. Spearman's correlation between sBHB and IBHB was analyzed. FTIR operating characteristics and 95% confidence intervals were calculated. The mBHB by FTIR validation was assessed based on the validity concept, proving that an analytical method is acceptable for its intended purpose. Performance parameters evaluated were linearity ($R^2=0.913$); sensitivity (slope=0,9634); repeatability ($r=0.01$ mmol•L⁻¹); trueness (p-value=0.110); reproducibility ($R=0,01$ mmol•L⁻¹); working range (0.05-0.29 mmol•L⁻¹) and uncertainty ($U=0.022$ mmol•L⁻¹). Reached results were in the same range as those indicated in the IDF bulletin 504/2020, except the uncertainty value. This parameter has not been reported in the bibliography, and it indicated a 14% of dispersion for the mBHB predictions. The correlation between mBHB and bBHB was positive ($r= 0.69$, $p<0.0001$), it was lower ($r= 0.89$) than correlation reported by Denis-Robichaud *et al.* (2014). Milk BHB measurement by FTIR were validated and the optimal cut off to predict SK determined was 0.185 mmol•L⁻¹. Although SK monitoring with DHI samples had moderate accuracy, it is a non-invasive method, easy sampling and lower cost than blood measurement, making it a valuable tool that needs further evaluation on the sampling frequency.

Keywords: subclinical-ketosis; critical-threshold; accuracy

de Roos, A. P. W., Van Den Bijgaart, H. J. C. M., Hørlyk, J., & De Jong, G. (2007). Screening for subclinical ketosis in dairy cattle by Fourier transform infrared spectrometry. *Journal of dairy science*, 90(4), 1761-1766.

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.

Duffield, T. F., Lissemore, K. D., McBride, B. W., & Leslie, K. E. (2009). Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of dairy science*, 92(2), 571-580.