

Validatie runderbloed en de Precision Xceed

en over het gebruik van andere ‘cowside’ tests voor ketose bij runderen



**Onderzoek uitgevoerd in het kader van het uniforme coschap aan de
Faculteit der Diergeneeskunde van de Universiteit van Utrecht.**

Willem Jan Gorissen 0461067

oktober-december 2008

**begeleiders: dr. Ruurd Jorritsma en drs. Saskia van der Drift
departement gezondheidszorg landbouwhuisdieren**

Abstract

The goal of this study was to validate a new cowside test for measuring β -hydroxybutyrate in bovine heparin plasma, the Precision Xceed. Therefore, blood samples from 24 lactating cows were tested and compared with a laboratory test. The values from the cowside test correlated well with the values from the laboratory ($R = 0.98$). Sensitivity en specificity were 100 en 94.4 %, using a subclinical ketosis threshold of $\geq 1200\mu\text{mol BHBA/L}$. A parallely conducted pilot with 4 plasma samples indicated that within 24 hours and with different temperatures, the concentration of BHBA was hardly altered.

Also paired data from an urine nitroprussid test and the BHBA concentration in the same urine were analyzed. A given outcome from the nitroprussid test resulted in a rather dispersed concentration of BHBA.

As a topping, options for a cowside diagnosis of (sub)clinical ketosis were investigated in literature. This in particular to determine how to estimate the concentration of BHBA in plasma with a given outcome from a urine nitroprussid test.

Samenvatting

Het doel van deze studie was het valideren van een nieuwe sneltest voor het meten van β -hydroxybutyraat in heparineplasma van runderen, de Precision Xceed. Daarvoor is bloed getest van 24 lacterende koeien en vergeleken met een laboratoriumtest. De meetwaarden van de Precision Xceed correleerden zeer sterk met de meetwaarden van het laboratorium ($R = 0.98$). Sensitiviteit en specificiteit waren 100 en 94.4 %, bij een afkapwaarde voor subklinische ketose van $\geq 1200\mu\text{mol BHBZ/L}$. Een parallel uitgevoerde pilot met 4 plasmamonsters wees uit, dat binnen 24 uur en bij verschillende omgevingstemperaturen, de concentratie BHBZ in de monsters nauwelijks veranderde.

Daarnaast zijn gepaarde gegevens van een urine nitroprussidetest en de BHBZ concentratie in deze urine geanalyseerd. Bij een gegeven uitslag van de sneltest bleek er zeer veel spreiding te zitten in de concentratie BHBZ in hetzelfde monster.

Als aanvulling is nog een literatuurstudie gedaan naar diagnostiek in het algemeen rondom (sub)klinische ketose en in het bijzonder naar de mogelijkheid om vanuit een urine nitroprussidetest een uitspraak te kunnen doen over de concentratie BHBZ in het plasma.

Afkortingen: **BHBZ** = β -hydroxybutyraat, **ACAC** = acetoacetaat, **AC** = aceton

Inhoudsopgave

Abstract	1
Samenvatting	1
Inhoudsopgave	2
Inleiding	3
Literatuuronderzoek	
Incidentie en prevalentie	4
Risicofactoren	4
Pathofysiologie	5
Klinische symptomen	7
Diagnose	7
Sneltesten	
urine en melk	8
verhouding bhbz en acac in bloed en urine	10
Precision Xceed	12
Aanleiding bloedonderzoek	14
Aanleiding urineonderzoek	14
Materiaal en Methode	
Bloedonderzoek	15
Urineonderzoek	15
Resultaten	
bloed Precision Xceed	16
bloed tijd en temperatuur	17
urine	17
literatuuronderzoek BHBZ en ACAC in urine	18
Conclusie	
bloed Precision Xceed	21
bloed tijd en temperatuur	21
urine	21
gebruik nitroprusside test in urine	21
Discussie	
gebruik Precision Xceed	22
bloed tijd en temperatuur	22
urine	22
Literatuur en bronnen	23
Bijlage	27

Inleiding

(sub) klinische ketose, ook wel acetonemie of slepende melkziekte, is een metabole stoornis die zich kenmerkt door een verhoogde concentratie ketonlichamen in de weefsels van het lichaam en de lichaamsvloeistoffen. (Large animal internal medicine)

De verhoogde concentratie ketonlichamen kan veroorzaakt worden door een te lage ruwvoeropname zonder dat het dier verder wat mankeert, door een primair ziekteproces of door opname van ruwvoer met veel boterzuur. (Oetzel 2007)

De aandoening kan zich zowel klinisch als subklinisch manifesteren. Wanneer een koe klinische ketose heeft, kan dit een indicatie zijn, dat er in de rest van de koppel dieren zijn die subklinische ketose hebben. Een Amerikaans onderzoek heeft bevestigd dat subklinische ketose ongeveer € 50,- kost per geval. (Geishauser et al., 2001). Runderen met subklinische ketose hebben een grotere kans op het ontwikkelen van secundaire aandoeningen zoals klinische ketose of een lebmaagdislocatie. (Duffield et al., 1999) Ook heeft de aandoening een negatieve invloed op de vruchtbaarheid. (Walsh et al., 2006)

Het is dus zaak om deze dieren tijdig te behandelen en het allerlieft al voortijdig.

Dieren die subklinische ketose hebben, zijn niet als zodanig te herkennen door de veehouder en dierenarts. Deze personen kunnen hoogstens een vermoeden hebben.

Wanneer dat vermoeden bestaat, wordt het tijd voor aanvullende diagnostiek. In dit verslag wordt ingegaan op de diagnostische mogelijkheden die veehouder en dierenarts ter beschikking staan om koeien te onderzoeken. De al langer gebruikte sneldiagnostica worden vergeleken met een nieuwe sneltest, de Precision Xceed, die door middel van een bloedmeting snel en accuraat de BHBZ concentratie kan bepalen.

Literatuuronderzoek

Incidentie en prevalentie van (sub)klinische ketose

In gepubliceerde onderzoeken komen verschillende resultaten naar voren wat betreft incidentie en prevalentie van (sub)klinische ketose. Het handboek van Merck noemt een incidentie van klinische ketose van 6-15% gedurende de hele lactatie. De resultaten van verschillende onderzoeken worden weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 1. Prevalentie en incidentie van (sub)klinische ketose.

onderzoek	soort ketose	afkapwaarde	prevalentie	incidentie
Hardeng, Edge 2001	klinisch	nvt		7,8 %
Østeras et al., 2007	klinisch	nvt		6,0 %
Duffield et al., 1998	klinisch	nvt		1,5 %
Stengaerde et al., 2008	klinisch	nvt		0,6-5,4 %
Dohoo, Martin 1984	subklinisch	onbekend	12.1 %	
Nielen et al., 1994	subklinisch	1200 µmol bhbz/L	14,0 %	
Oetzel 2004	subklinisch	1400 µmol bhbz/L	15,0 %*	
Geishauser et al., 1997	subklinisch	1200 µmol bhbz/L	16,1 %	
Sakha et al., 2007	subklinisch	1200 µmol bhbz/L	14,4 %	

* = gemiddelde uit een aantal publicaties van 1994-2004

De eerste twee maanden van de lactatie lopen runderen het grootste risico op het ontwikkelen van (sub)klinische ketose, waarbij de piek nog binnen de eerste maand valt. Dohoo en Martin (1984) en Geishauser et al. (2007) vonden de hoogste prevalentie in de eerste zes weken van de lactatie, met een piek in respectievelijk de vierde en de tweede week van de lactatie. Rukkwamsuk et al. (2008) maten bovenstaande piek ook in de vierde week van de lactatie.

Risicofactoren

Er zijn verschillende risicofactoren aan te wijzen die een rol kunnen spelen bij het ontstaan van (sub)klinische ketose, zoals het begin van een nieuwe lactatie, een hogere pariteit, een hoge conditiescore voor afkalven, voeding en het optreden van andere aandoeningen in de risicoperiode. Zoals hierboven al besproken, komt de meeste (sub)klinische ketose voor in de eerste twee maanden van de lactatie.

Bij een toenemende pariteit neemt ook de kans op het ontwikkelen van (sub)klinische ketose toe, met een piek bij dieren die vier keer gekalfd hebben. Dieren die relatief vet afkalven of conditie verliezen in de droogstand, hebben ook een groter risico. Volgens het handboek van Merck hebben dieren met een conditiescore > 3.75 (op schaal van 1-5) duidelijk meer kans hebben op het ontwikkelen van (sub)klinische ketose. Verder hebben ook de samenstelling en de hoeveelheid van het rantsoen invloed op het ontstaan van (sub)klinische ketose. Hoe meer conditie melkkoeien krijgen tijdens de droogstand, hoe hoger de kans op het ontstaan van (sub)klinische ketose in de lactatie (Correa et al., 1990).

Dieren met kreupelheid, een lebmaagdislocatie, melkziekte, mastitis of retentio secundinarum hebben een grotere kans op het ontwikkelen van (sub)klinische ketose dan dieren die hier geen last van hebben (Gröhn et al., 1989).

Pathofysiologie

Wanneer de opname van energie door het rund lager is dan de hoeveelheid energie die gebruikt wordt voor de productie van melk, is het dier in een negatieve energiebalans. Dit is onder andere te verklaren door het feit dat na het afkalven de lactatiepiek niet samenvalt met de hoogste voeropnamecapaciteit. Deze twee momenten liggen enkele weken uit elkaar. (Hayirli 2006) Hierdoor verkeren koeien aan het begin van de lactatie in een negatieve energiebalans

Op hormonaal niveau wordt de negatieve energiebalans gekenmerkt een lage insuline-glucagon ratio, waardoor processen als gluconeogenese en lipolyse in verhoogde mate plaats vinden. De voorraad glucose en glycogeen is al vrij snel uitgeput, waardoor het rund vet en eiwit gaat mobiliseren. Het mobiliseren van lichaamsreserves heeft een genetische en een omgevingscomponent. De afbraak van lichaamsreserves is voor een deel rasafhankelijk, waarbij Holstein Frisians het hoogste scoren wat betreft vetmobilisatie ten opzichte van andere runderrassen. Verder is het mogelijk door veranderingen in voeding of zootechniek de mobilisatie van vet- of spierweefsel te beïnvloeden. (Friggens et al., 2007) Bij de afbraak van spieren komen glucogene aminozuren vrij, die via gluconeogenese in de lever omgezet worden in glucose. Bij de afbraak van vetweefsel komen vrije vetzuren en glycerol vrij. Deze vetzuren worden door de lever aan het bloed onttrokken en worden als very low density lipoproteïns (VLDL) weer aan het bloed afgegeven. Voor dit proces zijn apolipoproteïnen nodig, die in dieren met een negatieve energiebalans minder beschikbaar zijn. De lever gaat de vetzuren stapelen in de vorm van triacylglycerol en produceert de ketonlichamen aceton, acetoacetaat (ACAC) en bèta-hydroxybutyraat (BHBZ). De lever oxideert de vrije vetzuren tot onder andere acetyl-CoA. In de citroenzuurcyclus kan acetyl-CoA gebruikt worden, wanneer dit samen met oxaloacetaat tot citraat is gevormd. Oxaloacetaat kan ook worden gebruikt in de gluconeogenese. Hierdoor kan een gebrek aan oxaloacetaat ontstaan en worden uit acetyl-CoA ketonlichamen gevormd. (Hayirli 2006)

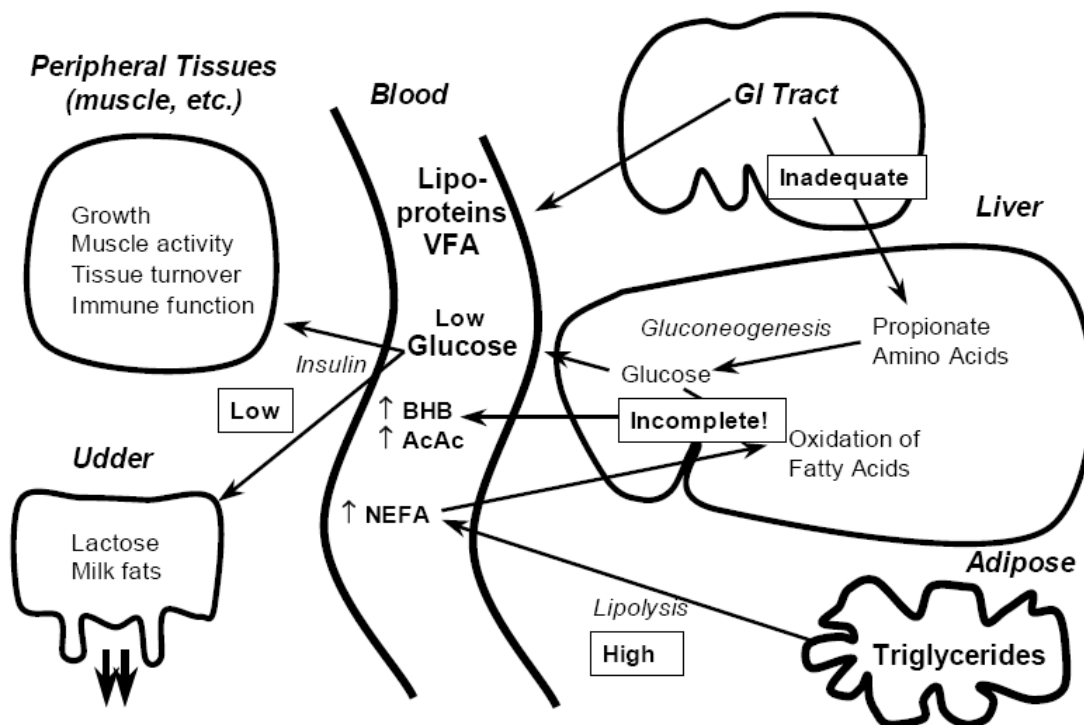


Fig. 1 energiehuishouding in een koe met een negatieve energiebalans. (Oetzel 2007)

De ketonlichamen dienen als aanvulling in de energievoorziening, maar zijn in grote concentraties schadelijk voor het dier. Schadelijk zijn vooral aceton en acetoacetaat, die in hoge concentraties nerveuze acetonemie kunnen veroorzaken. De ketonlichamen kunnen benut worden door verschillende weefsels en organen, behalve de lever zelf en de erythrocyten. Zo zijn het hart, skeletspieren en de hersenen gebruikers van ketonlichamen. Het hart gebruikt zelfs liever ketonlichamen dan andere energiebronnen. De hersenen gaan pas ketonlichamen gebruiken nadat de concentratie hiervan in het plasma gestegen is. De transporters in de bloed-hersens-barrière worden dan ook actiever, zodat de concentratie in de hersenen toeneemt. (Benyon, Manninen 2004). De uier van lacterende runderen verbruikt ook een substantieel deel van de circulerende ketonlichamen. Door het meten van arterioveneuze verschillen in de uier hebben Guinard et al. (2007) een extractie van BHBZ van ruim 40% gemeten. Daarnaast kunnen de ketonlichamen uitgescheiden worden met de melk, urine of via de ademhaling. Via de ademhaling wordt voornamelijk aceton uitgescheiden. (Innere Medizin und Chirurgie des Rindes) De verschillende diagnostische testen die op de markt zijn, maken gebruik van de uitscheiding via urine en melk.

Naast de verhoogde productie van ketonlichamen in de lever, is het ook mogelijk dat verhoogde concentraties van BHBZ in het bloed veroorzaakt worden door productie in de penswand. Het epitheel van de penswand kan uit butyraat BHBZ produceren, de zogenaamde ruminale ketogenese. (Innere Medizin und Chirurgie des Rindes)

Dit verklaart ook het feit dat vlak na het voeren van een rantsoen waarbij in de pens veel boterzuur wordt geproduceerd, de concentratie BHBZ in het bloed kan stijgen. (Oetzel 2003)

Klinische symptomen

Van klinische ketose spreekt men, wanneer de koe zichtbaar ziek is, door een verhoogde concentratie ketonlichamen in het bloed. Dieren met subklinische ketose hebben ook een verhoogde concentratie ketonlichamen, maar zijn niet zichtbaar ziek. Verschijnselen van klinische ketose zijn een afgenomen voeropname, verminderde melkproductie en de pensmotiliteit kan toe- of afgenomen zijn. Eventueel kan een acetonlucht geroken worden in de uitademingslucht. In een verregaand stadium kan het dier ook atactisch gaan lopen, overmatig likken, loeien, ogenschijnlijk blind zijn of agressief worden. Dit wordt dan nerveuze acetonemie genoemd. Dieren met (sub)klinische ketose hebben doorgaans geen koorts. Het optreden van klinische ketose heeft sterk negatieve financiële consequenties voor een veehouder vanwege gederfde melkinkomsten, extra arbeid, eventuele medicatie, eventueel secundair optredende aandoeningen en wellicht vroegtijdige afvoer. (Innere Medizin und Chirurgie des Rindes) De daling in melkproductie is in verschillende onderzoeken gekwantificeerd. Dohoo en Martin (1984) vonden een daling van 1-1.4 kg melk per dag bij dieren met subklinische ketose. Fourichon et al. (1999) stellen dat in de maand voor het stellen van de diagnose 'klinische ketose' al een verlies van 1.3 tot 2 kg melk per dag kan optreden. Na het stellen van de diagnose stijgt dat verlies tot 2,5 -3,5 kg en daalt vervolgens tot er geen verschil meer bestaat in vergelijking met een metabool niet afwijkende koe.

Diagnose

De diagnose kan gesteld worden door klinische symptomen, de aanwezigheid van risicofactoren, het doen van klinisch onderzoek en eventueel aanvullend onderzoek.

Er is een meetbare grootte, in dit geval de plasmaconcentratie BHBZ, die als maat wordt genomen voor de ernst van de aandoening en om de aandoening per definitie vast te stellen. Het contrast tussen de gemeten plasmaconcentratie BHBZ en de gezondheid en prestaties van de koe is echter niet zo duidelijk, dat er alleen met een bloedmeting een diagnose kan worden gesteld. Er worden verschillende definities of grenswaarden aangegeven in de literatuur voor het vaststellen van subklinische ketose. Duffield et al. (1999) vonden dat runderen met een BHBZ plasmaconcentratie van boven de 1400 $\mu\text{mol/liter}$ een driemaal hogere kans hadden op het ontwikkelen van klinische ketose of een lebmaagdislocatie dan dieren met een lagere plasmaconcentratie. Ook het aantal benodigde inseminaties per dracht nam toe, zodra dieren een concentratie van 1400 $\mu\text{mol BHBZ/liter}$ of hoger hebben (Walsh et al. 2006). Ook Oetzel (2003, 2004) houdt bovenstaande waarde aan in zijn publicaties over het monitoren van metabole stoornissen bij melkvee. Geishauser et al. (1997) en Jorritsma et al. (1998) beschouwden runderen als subklinisch ketotisch wanneer de plasmaconcentratie BHBZ 1200 $\mu\text{mol/liter}$ of hoger is.

Klinische ketose kan optreden vanaf een concentratie van 3000 μmol BHBZ/liter Oetzel(2004), maar omdat er veel individuele variatie in de plasmaconcentratie van BHBZ is tussen koeien met klinische ketose, zijn er ook dieren die bij bovenstaande concentratie BHBZ geen klinische verschijnselen vertonen.(Oetzel 2007)
Overigens is bij klinische ketose de plasmaconcentratie BHBZ niet van belang, omdat de patiënt zichtbaar ziek is.

De normaalwaarden die door Nederlandse laboratoria worden gehanteerd, liggen redelijk dicht bij elkaar. Zo houden het UVDL en GD Deventer een maximale waarde van respectievelijk 850 en 900 μmol BHBZ/L aan als normaalwaarde in bloed. (GD Deventer en Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium). Deze waarden liggen nog ruim onder de bovengenoemde grenswaarden voor subklinische ketose.

Sneltesten urine en melk

Sneltesten voor ketose gaan uit van het detecteren van bhbz in melk of het detecteren van acetoacetaat en in mindere mate ook aceton in urine en melk met behulp van natrium-nitroprusside. Dit is de zogenaamde Rothera test, genoemd naar de onderzoeker die de kleurreactie in 1908 beschreef. Nitroprusside geeft alleen een kleurreactie met stoffen die een ketogroep bevatten; aceton en acetoacetaat. (Rothera, 1908)

De teststrips die bhbz detecteren, bevatten bhbz-dehydrogenase, dat BHBZ omzet in ACAC. Bij deze omzetting wordt NADH gevormd, dat de stof nitrotetrazolium reduceert tot formazan. Deze omzetting wordt gekatalyseerd door het enzym diaphorase. De kleuromslag van blauw naar paars, kan gebruikt worden om de hoeveelheid BHBZ in te schatten. (Veterinaria AG)

Zoals al eerder gezegd maken de sneltests gebruik van het feit dat de ketonlichamen door het rund worden uitgescheiden via o.a. de melk en de urine. Deze testen zijn van semikwantitatieve aard en de testeigenschappen zijn dan ook niet ideaal in vergelijking met de plasmaconcentratie BHBZ. Zo is de interpretatie van de onderzoeker voor wat betreft de waarde die aan een bepaald monster op basis van de kleurreactie wordt toegekend, mogelijk enigszins subjectief. Uit onderzoek is gebleken dat concentraties van de verschillende ketonlichamen in melk en urine zeker geen directe afspiegeling zijn van de concentraties in het bloed. Onderstaande tabel geeft de verhoudingen aan zoals die zijn gevonden in een tweetal onderzoeken. Verderop in dit verslag is te zien, dat dit ook voor de testeigenschappen van de verschillende sneltests gevolgen heeft.

Tabel 2. Concentraties BHBZ en ACAC in melk en urine in verhouding tot de plasmaconcentratie. (Schultz 1971, Andersson 1984)

	bèta-hydroxybutyraat	acetoacetaat
urine	400%	400%
melk	12,5%	40-45%

De nu gebruikte sneltesten zijn te onderscheiden in drie typen

1. urine nitroprusside tests
2. melk nitroprusside tests
3. melk bhbz tests

1) De urine nitroprusside tests kenmerken zich door een overwegend hoge sensitiviteit, gecombineerd met een relatief lage specificiteit ten opzichte van de overige twee testtypen. Een relatief groot deel van de geteste dieren zal ten onrechte als positief worden geklassificeerd.

Tabel 3. Testeigenschappen van urine nitroprusside tests.

Naam test	Onderzoeker	Cut-off $\mu\text{mol bhbz/liter}$	Se	Sp
Acetest	Nielen et al. 1994	1400	100 %	59 %
Keto Test	Osborne et al. 2002	1400	97 %	60 %
Ketostix > 5 $\mu\text{mol/l}$	Carrier et al. 2003	1400	90 %	85 %
Ketostix > 15 $\mu\text{mol/l}$	Carrier et al. 2003	1400	79 %	96 %
Ketostix > 40 $\mu\text{mol/l}$	Carrier et al. 2003	1400	50 %	99%

2) De melk nitroprusside tests kenmerken zich door een relatief lage sensitiviteit in combinatie met een hoge specificiteit.

Tabel 4. Testeigenschappen van melk nitroprusside tests.

Naam test	Onderzoeker	Cut-off $\mu\text{mol bhbz/liter}$	Se	Sp
Utrecht	Nielen et al. 1994	1400	89 %	96 %
Powder	Geishauser et al. 1998	1200	43 %	100 %
KetoCheck	Geishauser et al. 1998	1200	28 %	100 %
	Carrier et al. 2003	1400	42 %	99 %

3) De testkarakteristieken voor de BHBZ melk tests hangen sterk af van de afkapwaarde waarbij een dier als subklinisch ketotisch wordt beschouwd op de teststrip. De weergegeven sensitiviteit en specificiteit zijn gemiddelen uit een aantal onderzoeken. In alle onderzoeken is een waarde van 1400 $\mu\text{mol bhbz/liter}$ gebruikt om een dier als subklinisch ketotisch te classificeren.

Tabel 5. Testeigenschappen van melk BHBZ teststrips. De testeigenschappen zijn gepoolde data van een viertal onderzoeken.

Naam test	Cut-off $\mu\text{mol bhbz/liter}$	Se gem.	Sp gem.
Milk bhbz ($> 50 \mu\text{mol/l}$)	1400	89 %	77 %
Milk bhbz ($> 100 \mu\text{mol/l}$)	1400	83 %	82 %
Milk bhbz ($> 200 \mu\text{mol/l}$)	1400	54 %	94 %

Testeigenschappen samengesteld uit:

Geishauser T, Leslie K, Ten Hag J, Bashiri A. Evaluation of eight cow-side ketone tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 2000;83(2):296–9; Oetzel GR, unpublished data from clinical herd investigations at the University of Wisconsin–Madison, 2004;

Duffield TH, LeBlanc S, Bagg R, Leslie K, Ten Hag J, Dick P. Effect of a monensin controlled release capsule on metabolic parameters in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 2003;86(4):1171–6

Jorritsma, R., S. J. C. Baldee, Y. H. Schukken, T. Wensing, and G. H. Wentink. 1998. Evaluation of a milk test for detection of subclinical ketosis. *Vet. Q.* 20:108–110

Literatuuronderzoek naar verhouding tussen BHBZ en ACAC in bloed en urine.

Dat er een verband bestaat tussen de concentraties van BHBZ en ACAC in zowel bloedplasma en urine, komt duidelijk naar voren uit een groot aantal onderzoeken. Itoh (1998) mat een correlatiecoëfficiënt van 0.85 en 0.92 tussen de bloedplasmaconcentraties van beide stoffen bij respectievelijk gezonde en ketotische runderen. Onderzoek van Beem (2000) mat een correlatiecoëfficiënt van 0.83 tussen concentraties van BHBZ en ACAC in urine. Rukkwamsuk (2008) heeft de uitslag van een urine nitroprussidetest, dat ACAC detecteert, vergeleken met de BHBZ concentratie in plasma. De correlatiecoëfficiënt tussen deze twee stoffen, in verschillende media, bleek groot. ($r = 0.82$)

Ook zijn er onderzoeken gedaan naar hoe BHBZ en ACAC zich verhouden in onder andere bloedplasma en urine. In een aantal daarvan is ook aceton meegenomen in de berekende verhouding. Het valt op dat in het merendeel van de onderzoeken de verhouding verschuift op het moment dat de totale concentratie ketonlichamen in het plasma stijgt.

De algemene tendens is, dat de BHBZ : ACAC ratio daalt wanneer de totale concentratie ketonlichamen in het plasma stijgt.

Dit is een typisch verschijnsel bij herkauwers, omdat dit bij niet-herkauwers niet plaatsvindt. (Heitmann et al., 1987, Fletcher 2000)

Dat de verhouding lager ligt wanneer aceton in de berekening wordt meegenomen, zie de tabel, is logisch.

Menahan et al. (1967) hebben onderzoek gedaan bij Saanen geiten. Bij een lage totale concentratie van ketonlichamen in zowel bloed als urine, is het aandeel van BHBZ veruit het hoogst. De ketonlichamen BHBZ en ACAC + AC verhouden zich dan als 7:1.

Bij een toenemende totale concentratie, neemt de fractie ACAC + AC toe, zodat de verhouding naar 2,5:1 of zelfs 1:1 verschuift. Dit treedt op wanneer de totale concentratie ketonlichamen in het bloed tussen de 5 en 10 mg/dL is. De fractie ACAC + AC bestaat voor 70% uit acetoacetaat.

Schape en runderen laten zich goed vergelijken voor wat betreft de productie in ketonlichamen (Heitmann et al., 1987). In onderstaande tabellen staan de verhoudingen die gepubliceerd zijn in verschillende onderzoeken.

Alleen Menahan et al. hebben tegelijkertijd onderzoek gedaan naar ketonlichamen in bloed en urine. In dat onderzoek zijn de gevonden verhoudingen voor bloed en urine ongeveer gelijk. Dit suggereert dat de andere onderzoeken die met bloedplasma zijn gedaan, ook bruikbaar zijn om voorspellingen over de urine te doen voor wat betreft BHBZ en ACAC. In onderstaande tabel staan verhoudingen tussen BHBZ en ACAC zoals die in een aantal onderzoeken naar voren zijn gekomen.

Tabel 6. Verhoudingen BHBZ:ACAC en BHBZ:ACAC + AC in bloed van gezonde en ketotische runderen.

bron	Bhbz:acac normaal	Bhbz:acac ketose	Bhbz:acac+ac normaal	Bhbz:acac+ac ketose
Menahan et al.			7:1	2,5:1
Baird et al.	18:1	4,6:1		
Fletcher			7:1	
Lyle et al.	31:1			
Enjalbert et al.	6,6:1	7,3:1	2,2:1	2,9:1
Church			7:1	1:1
Sejrsen et al.	18:1			
Itoh et al.	29:1	5:1		
Filar et al.	12,5:1	4,2:1		

Tabel 7. Verhoudingen BHBZ:ACAC in urine van gezonde en ketotische runderen.

bron	Bhbz:acac norm	Bhbz:acac ket	Bhbz:acac+ac norm	Bhbz:acac+ac ket
Menahan et al.			7:1	2,5:1
Rosenberger	1,2:1	1,8:1		

Precision Xceed

Een vrij nieuwe methode om runderen met (sub)klinische ketose op te sporen, is het bepalen van BHBZ in volbloed naast de koe met behulp van een zogenaamde ketometer. Om de ketosestatus van een mens of rund te bepalen, blijft het meten van BHBZ in het bloed de gouden standaard. Dit ketonlichaam is in de hoogste concentratie aanwezig bij koeien met (sub) klinische ketose en draagt dus het meest bij aan de totale plasmaconcentratie van ketonlichamen. (Enjalbert et al., 2001)

Daarnaast is dit ketonlichaam ook het meest stabiel in een bloedmonster, waardoor de gemeten waarde min of meer een betrouwbare afspiegeling is van de plasmaconcentratie. Wel is het zo dat er ook rantsoenafhankelijke stijgingen plaats kunnen vinden na een verhoogde boterzuurproductie in de pens (Oetzel 2003)

Abbott Laboratories heeft een sneltest ontwikkeld, die naast glucose ook BHBZ kan meten, de Precision Xceed of Xtra. De Precision Xceed geeft de hoeveelheid BHBZ aan als afgeleide van de stroomsterkte die door het apparaat loopt wanneer een meting gedaan wordt, amperometrie geheten. De bijbehorende teststrip bevat het enzym BHBZ-dehydrogenase, dat BHBZ oxideert tot ACAC. (zie fig.) Bij dat proces komen elektronen vrij, die door NAD^+ worden opgenomen en waarbij NADH wordt gevormd. NADH wordt vervolgens geoxideerd, waarbij weer elektronen worden afgestaan aan andere stof. Deze elektronenstroom wordt door de Precision Xceed gemeten en weergegeven als een hoeveelheid op de display (Wallace et al., 2001)

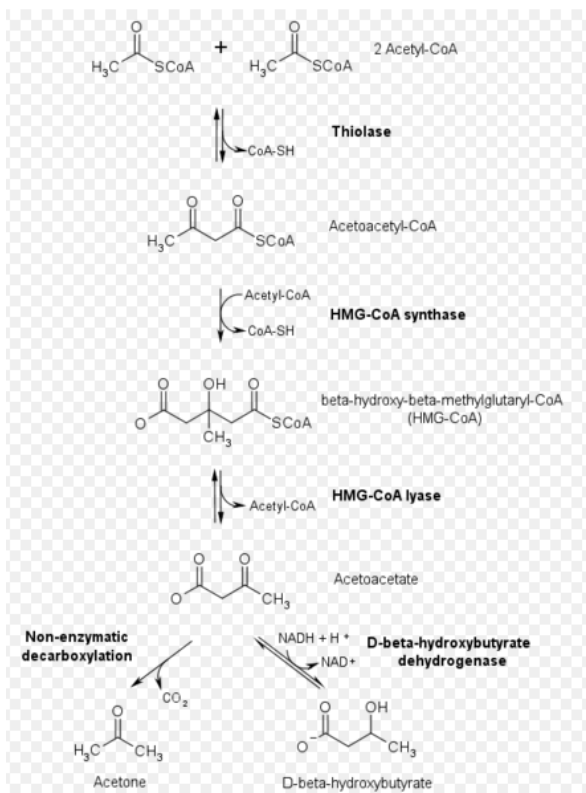


Fig. 2. Vorming van ketonlichamen

Humaan gebruik

Diabetici kunnen als gevolg van een metabole stoornis ook ketonlichamen vormen in toxische concentraties. Voor het meten van concentraties BHBZ in humaan bloed voldoet de Precision Xceed, gezien een correlatie coëfficiënt van 0.92 tussen de gemeten plasmaconcentratie BHBZ van de Precision Xceed en die gemeten door een referentielaboratorium. In de bijbehorende scatterplot kruist de regressielijn de oorsprong nagenoeg (Rewers et al., 2006). Ook het onderzoek van Guerci et al. (2003) laat een correlatie van 0.94 zien. Dit geeft aan dat met een van beide metingen, ook het resultaat van de andere meting vrij nauwkeurig voorspeld kan worden.

Veterinair gebruik

In 2006 berichtten Deense onderzoekers over het gebruik van de Precision Xceed. Zij vonden een correlatiecoëfficiënt van 0.98 tussen de meetwaarden van de Precision Xtra en de gouden standaard, een meting van BHBZ in een laboratorium. Jeppesen et al. (2006), Heuwieser et al. (2007) en Kupczynski et al. (2007) kwamen een jaar later met vergelijkbare testgegevens van de Precision Xceed. Zij maten een correlatiecoëfficiënt van respectievelijk 0.95 en 0.92 tussen de concentratie van BHBZ in serum en die in volbloed gemeten door de sneltest. Bij een grenswaarde van 1400 μmol BHBZ/liter waren sensitiviteit en specificiteit respectievelijk 1.0 en 0.91, 1.0 en 1.0. Een zeer recent onderzoek van Oetzel (2008) toont een correlatiecoëfficiënt van 0.91 aan. Sensitiviteit en specificiteit zijn respectievelijk 0.90 en 0.93 bij een grenswaarde van 1400 μmol BHBZ/liter. Bovenstaande testresultaten geven aan dat de Precision Xceed als diagnosticum zeer waardevol kan zijn bij het opsporen van runderen met (sub)klinische ketose.

Echter, bovenstaande onderzoeken zijn uitgevoerd met volbloed monsters, direct naast de koe. Factoren die van invloed hadden kunnen zijn op de gemeten concentratie BHBZ kunnen nauwelijks een rol hebben gespeeld.

Kosten

De prijs van de sneltest zelf is met € 25, - niet erg hoog, maar de teststrips zijn in vergelijking met de huidige melk en urine sneltesten wel duur, ongeveer € 3, - per teststrip. De urine nitroprusside strips kosten ongeveer € 0,20, de melk BHBZ strips ongeveer € 2,50.

De test zelf wordt in ongeveer 10 seconden, bloedafname niet meegerekend, uitgevoerd en doet qua snelheid dus niet onder voor andere sneltesten.

Aanleiding tot bloedonderzoek

Het is de vraag of de Precision Xceed ook bruikbare testresultaten heeft, wanneer in plaats van volbloed, bloed wordt gebruikt met een anticoagulans of juist een stollingsbevorderende stof.

Wanneer de bepaling niet direct plaats kan vinden, kan het nodig zijn om bloed in een verzamelbuis op te vangen en later de concentratie BHBZ te bepalen. Dit kan bijvoorbeeld het geval zijn wanneer een groepspraktijk de beschikking heeft over maar een enkele sneltest of wanneer een snelle steekproef genomen wordt bij een aantal dieren achter elkaar om de BHBZ status van verse koeien in beeld te brengen. Uit bovenstaande scenario's volgt logischerwijs dat ook de factor 'tijd' en 'temperatuur' van invloed kunnen zijn op de meetuitslag.

De productinformatie van Abbott Laboratories geeft aan dat alleen de anticoagulantia heparine en oxalaat kunnen worden gebruikt. De test dient dan wel zo snel mogelijk te worden uitgevoerd.

In dit onderzoek wordt de gebruiksmogelijkheid van de Precision Xceed nogmaals getest bij gebruik van monsters in lithium-heparine en stollings-activator. Daarnaast wordt ook onderzocht of tijd en temperatuur van invloed zijn op de testresultaten van de Precision Xceed.

Aanleiding tot urineonderzoek

Zoals al vermeld is in tabel 2, komen de concentraties van BHBZ en ACAC in plasma niet overeen met de concentratie in urine en melk. Daarnaast is de reactiezone van de Labstix voorzien van nitroprusside, wat betekent dat het voornamelijk ACAC detecteert. (Penders 2006, Tantiwong et al., 2005 en Free et al., 1958) Dit geldt overigens voor alle courante sneltesten voor ketonen in urine, waarvan de reactiezone nitroprusside bevat. (Sub)klinische ketose wordt gedefinieerd door de concentratie BHBZ in plasma.

Uit bovenstaande volgt, dat bij gebruik van Labstix, of een andere nitroprusside sneltest, er zeker 2 conversiefactoren gebruikt moeten worden om tot een goede schatting te komen van de BHBZ concentratie in plasma.

In dit onderzoek wordt onderzocht of er een relatie is tussen de concentraties van BHBZ en ACAC in urine. Tevens is door literatuuronderzoek gekeken of er door gebruik van de urine nitroprusside test een uitspraak kan worden gedaan over de BHBZ concentratie in plasma.

Materiaal en methode

Selectie en monsternamen experiment bloed BHBZ

Er zijn 24 koeien van verschillende pariteiten geselecteerd die tot maximaal 65 dagen in lactatie waren. Vervolgens hebben we deze dieren bloed afgenomen uit de v. jugularis met het vacutainer systeem. Van elk rund hebben we een heparinebuis (BD vacutainer lithium-heparine) en van 10 dieren ook serumbuis (BD vacutainer SST) afgenomen en vervolgens eerst een monster uit de serumbuis en vervolgens een uit de heparinebuis getest met de Precision Xceed (Abbott Laboratories, Abbott park, IL.) (t serum < 2 min. t plasma < 15 min.) Dit is gedaan door de teststrip in de bloedbuis te steken. De teststrips zijn per 10 verpakt en voorzien van een bijbehorende ijkstrip. De Precision Xceed is voor gebruik van elke nieuwe set teststrips geijkt. Vervolgens zijn de bloedbuizen afgecentrifugeerd bij 2800G gedurende 10 minuten. Daarna zijn serum en plasma gepipetteerd in micronicbuisjes en daarna ingevroren bij -20°C. Aan het eind van de testperiode zijn alle monsters tegelijk geanalyseerd in het laboratorium van GD Deventer met de Randox testkit (RB1007) voor BHBZ door middel van fotospectrometrie. Om de invloed van tijd en temperatuur op de BHBZ concentratie in heparineplasma te bepalen, is een klein experiment uitgevoerd met een viertal monsters. De heparinemonsters zijn gedurende 24 uur vijf keer gemeten met de Precision Xceed. Twee monsters zijn in de koelkast (T = 4-7°C) bewaard, twee andere bij kamertemperatuur. Tevens heb ik van 10 testdieren gelijktijdig een nitroprusside test in de urine uitgevoerd om te gebruiken bij de analyse van de Labstix.

Analyse testresultaten experiment bloed BHBZ

Voor analyse van de testresultaten is voor het berekenen van een correlatiecoëfficiënt tussen verschillende testresultaten en het maken van scatterplots gebruik gemaakt van het programma SPSS 15.0 voor Windows.

Het berekenen van de testeigenschappen van de Precision Xceed is gedaan voor twee afkapwaarden voor het definiëren van sck, namelijk 1200 en 1400 µmol BHBZ/liter plasma. Handmatig zijn sensitiviteit (Se), specificiteit (Sp), positief voorspellende waarde (Pv +) en negatief voorspellende waarde (Pv -) berekend.

Experiment urine nitroprusside test.

Eerder uitgevoerde urinebepalingen van een Franse veterinaire student zijn verder bewerkt. Deze student heeft van 15 runderen apart urine opgevangen en vervolgens verdunningen gemaakt van 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 en 1/40 door er water aan toe voegen. Daarna zijn de onverdunde urine en de verschillende verdunningen getest met Labstix. Tenslotte is van de onverdunde urine de concentratie BHBZ bepaald in een laboratorium. Hoe de verschillende waarden van BHBZ in de verdunningsreeks tot uiting kwamen in de uitslag van de Labstix is weergegeven in een box en whiskerplot.

Resultaten gebruik van de Precision Xceed

De gemeten plasmaconcentraties BHBZ met de Precision Xceed zijn hoog gecorreleerd ($R= 0.98$, $P < 0.01$) met de gemeten BHBZ plasmaconcentraties in de laboratoriumtest. In serum is de correlatiecoëfficiënt 0.988 ($P < 0.01$)

De sensitiviteit, specificiteit en positief voorspellende waarde voor het detecteren van subklinische ketose in heparineplasma met de Precision Xceed ($1200 \mu\text{mol BHBZ/L}$) zijn respectievelijk 100 , 94.4 en 86% . Voor een afkapwaarde van $1400 \mu\text{mol BHBZ/L}$ zijn deze waarden allen 100% .

De regressielijn in de scatterplot (fig. 3) gaat nagenoeg door de oorsprong ($I = -0.05$, wat aangeeft dat de door de Precision Xceed gemeten plasmaconcentratie BHBZ dicht bij de werkelijke plasmaconcentratie ligt. De plasma en serumconcentraties BHBZ gemeten in de laboratoriumtest zijn eveneens zeer hoog gecorreleerd ($R= 0.999$, $P < 0.01$).

De testresultaten en berekeningen zijn aan de bijlage toegevoegd.

relatie tussen BHBZ in heparineplasma in Precision Xceed en laboratoriumbepaling

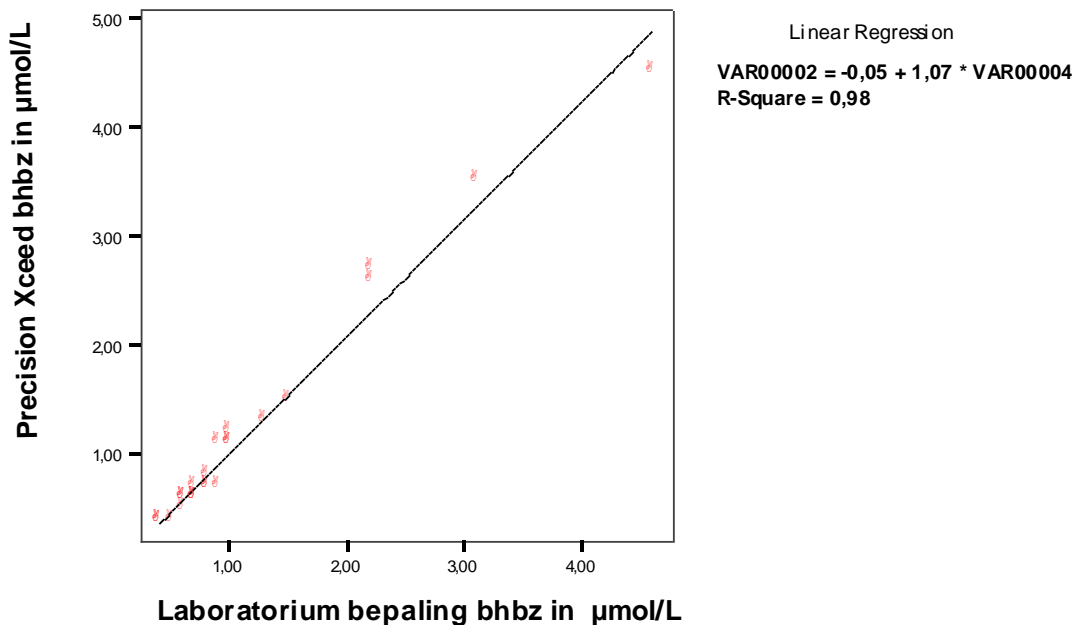


Fig. 3. Relatie tussen BHBZ in heparineplasma gemeten door de Precision Xceed en door een laboratoriumbepaling.

Resultaten bloed BHBZ tijd en temperatuur

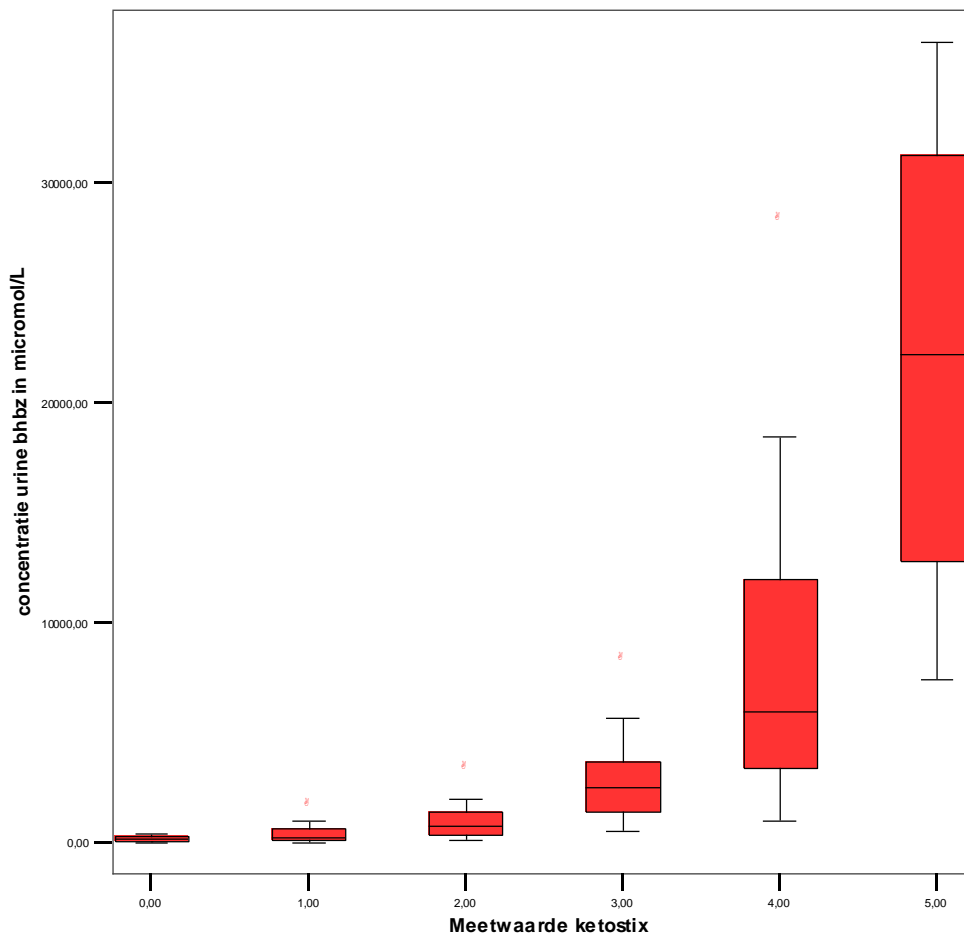
Alle vier de monsters vertonen binnen de eerste drie uur een stijging in concentratie van 0,1 – 0,2 mmol BHBZ/L, waarna deze concentratie constant blijft tot 24 uur na de eerste meting. Dit geldt zowel voor de monsters die in de koelkast bewaard zijn, als voor de monsters die bij kamertemperatuur bewaard zijn.

Tabel 8. Meetwaarden tijd en temperatuur experiment.

koe #	plasma bhbz	serum bhbz	T0	T3	T6	T12	T24	labstix	dil	p	omgeving
2	0,6 mmol/L	0,6 mmol/L	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	-	4	3	koelkast
75	0,7 mmol/L	0,9 mmol/L	0,7	0,9	0,9	0,9	0,9	-	20	2	kamer
84	0,5 mmol/L	0,6 mmol/L	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	-	9	1	kamer
45	0,8 mmol/L	0,8 mmol/L	0,8	0,9	0,9	0,9	0,9	-	9	2	koelkast

Resultaten urine nitroprusside test en BHBZ

Fig. 4 Urine nitroprusside test en BHBZ concentratie in urine.



De waarden 0, 1, 2, 3, 4, 5 op de horizontale as komen overeen met respectievelijk 0, 5, 15, 40, 80 en 160 mg ACAC/dL. Dit is ook de verdeling op de verpakking van de Labstix.

In de verhouding BHBZ:ACAC heeft ACAC het grootste aandeel, zoals weergegeven in onderstaande tabel. De overzichtstabel met de verdunningsreeks staat in de bijlage.

Tabel 9. Verhouding van BHBZ:ACAC in urine

ID	Pure	BHBA (mmol/l)	verhouding BHBZ:ACAC
19 16/04	4	3,2	1:2.4
19/23/04	5	7,4	1:2.1
19 29/04	4	12,0	1.5:1
19/14/05	5	26,2	1.7:1
19 21/05	5	36,4	2.3:1
19 28/05	4	2,6	1:3.0
52 09/04	4	7,5	1:1.0
52/16/04	4	16,6	2.1:1
52 23/04	4	9,9	1.3:1
52 29/04	4	18,5	2.4:1
10 23/04	4	1,0	1:7.8
16 21/05	4	28,3	3.6:1
16 28/05	4	3,4	1:2.3
Scholten 11/06	4	5,9	1:1.3
Bronze 04/06	4	4,3	1:1.8

Literatuuronderzoek verhouding BHBZ en ACAC in urine

In onderstaande tabel is de concentratie ACAC weergegeven wanneer een koe subklinische ketose heeft (BHBZ plasma > 1400 µmol/l), voor de verschillende verhoudingen BHBZ:ACAC + AC die Menahan et al. beschreven hebben.

Bij de berekening zijn de aannames gedaan dat de urineconcentratie van BHBZ en ACAC vier maal hoger zijn dan de plasmaconcentratie (Schultz 1971) en dat de fractie ACAC plus AC voor 70 % uit ACAC bestaat (Menahan et al., 1971).

Tabel 10. Uitslag nitroprusside teststrip wanneer een rund subklinische ketose heeft

bhbz : acac+ac	conc. bhbz	conc. acac + ac	conc. acac.	conc. acac
7:1	5600 µmol/l	800 µmol/l	560 µmol/l	5,7 mg/dl
2,5:1	5600 µmol/l	2240 µmol/l	1568 µmol/l	16 mg/dl
1:1	5600 µmol/l	5600 µmol/l	3920 µmol/l	40 mg/dl

In onderstaande tabellen wordt weergegeven hoe de uitslag van een nitroprusside urine test vertaald zou kunnen worden naar een BHBZ plasmaconcentratie. Dezelfde aannames als hierboven worden gedaan. Ook wordt ervan uit gegaan, dat nitroprusside nauwelijks reageert met aceton, zodat de uitkomst van de test een weergave is van de concentratie acetoacetaat in de urine.

Tabel 11. Verhouding urine BHBZ:ACAC + AC = 2,5:1 (Menahan et al., 1971)

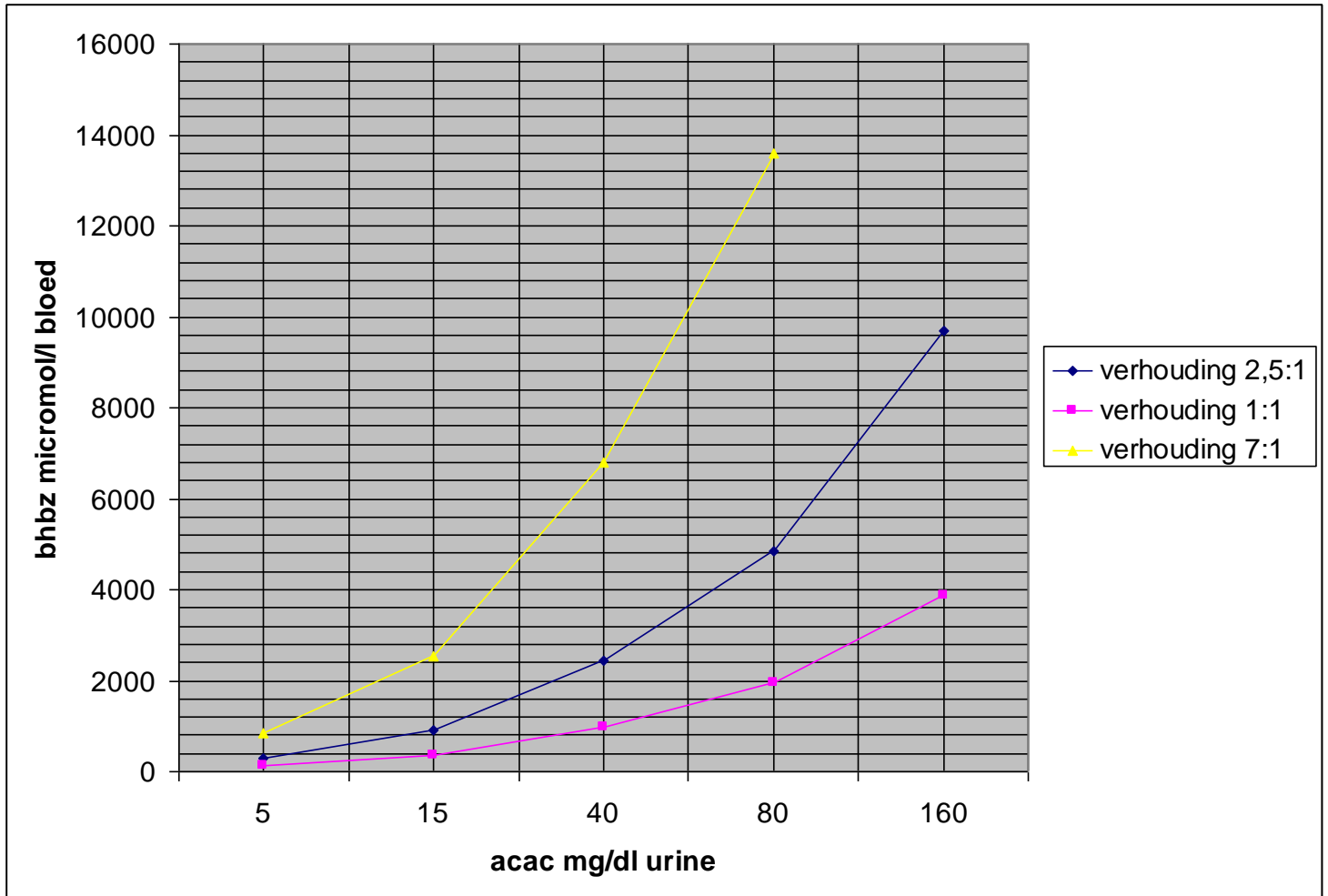
Meetwaarde strip	conc. acac.urine	conc bhbz urine	conc. bhbz plasma
5 mg/dl	485 $\mu\text{mol/l}$	1213 $\mu\text{mol/l}$	303 $\mu\text{mol/l}$
15 mg/dl	1455 $\mu\text{mol/l}$	3638 $\mu\text{mol/l}$	909 $\mu\text{mol/l}$
40 mg/dl	3880 $\mu\text{mol/l}$	9700 $\mu\text{mol/l}$	2425 $\mu\text{mol/l}$
80 mg/dl	7760 $\mu\text{mol/l}$	19400 $\mu\text{mol/l}$	4850 $\mu\text{mol/l}$
160 mg/dl	15520 $\mu\text{mol/l}$	38800 $\mu\text{mol/l}$	9700 $\mu\text{mol/l}$

Tabel 12. Verhouding urine BHBZ:ACAC + AC = 1:1 (Menahan et al., 1971)

Meetwaarde strip	conc. acac. urine	conc bhbz urine	conc. bhbz plasma
5 mg/dl	485 $\mu\text{mol/l}$	485 $\mu\text{mol/l}$	121 $\mu\text{mol/l}$
15 mg/dl	1455 $\mu\text{mol/l}$	1455 $\mu\text{mol/l}$	364 $\mu\text{mol/l}$
40 mg/dl	3880 $\mu\text{mol/l}$	3880 $\mu\text{mol/l}$	970 $\mu\text{mol/l}$
80 mg/dl	7760 $\mu\text{mol/l}$	7760 $\mu\text{mol/l}$	1940 $\mu\text{mol/l}$
160 mg/dl	15520 $\mu\text{mol/l}$	15520 $\mu\text{mol/l}$	3880 $\mu\text{mol/l}$

De gegevens uit tabellen 98 en 99 worden in onderstaande grafiek weergegeven.

Fig. 5 Verschillende verhoudingen BHBZ:ACAC + AC en de bijbehorende plasmaconcentratie BHBZ.



Tabel 13. Eigen meetwaarden labstix en Precision Xceed

koe	precision xceed	dil	labstix
7927	3,5 mmol/l	14	80
8491	1,1 mmol/l	35	-
667	2,6 mmol/l	27	40
5160	4,5 mmol/l	14	160 (40)
660	2,7 mmol/l	46	40

De dieren in bovenstaande tabel heb ik zelf getest met de Precision Xceed en Labstix en kunnen vergeleken worden met de grafiek.

Conclusie gebruik van de Precision Xceed

De Precision Xceed geeft betrouwbare meetresultaten in lithium-heparine bloedmonsters en in bloedmonsters met een stollingsactivator. De testeigenschappen zijn zeer goed in vergelijking met de andere sneltesten voor het detecteren van (sub)klinische ketose. Voor gebruik bij runderen hoeft de Precision Xceed niet apart geijkt te worden.

Conclusie invloed van tijd en temperatuur op BHBZ in een plasmamonster

De concentratie van BHBZ in een heparinemonster wordt nauwelijks beïnvloed binnen de eerste 24 uur. Tevens heeft de temperatuur, waarbij het monster bewaard wordt, geen invloed op de concentratie.

Conclusie urine nitroprusside test in vergelijking met BHBZ in urine

Er is veel spreiding in de waarnemingen door de Labstix in vergelijking met de BHBZ meting in de urine.

Conclusie praktijktoepassing urine nitroprussidetest volgend uit literatuurstudie

Duffield et al. (1998) stellen dat men van subklinische ketose mag spreken wanneer de totale concentratie ketonlichamen in het bloed hoger is dan 9 mg/dL. Uitgaande van het artikel van Menahan et al. (1971), zitten dieren met subklinische ketose tussen de blauwe en roze lijn.

In een praktijksituatie zullen niet zomaar dieren getest worden met een urine nitroprussidetest, maar dieren die men al verdenkt van het hebben van (sub)klinische ketose. In de grafiek zitten deze dieren dus ongeveer tussen de blauwe en roze lijn, maar kunnen daar klaarblijkelijk ook nog boven zitten, gegeven bijvoorbeeld koe 660 in bovenstaande tabel. Omdat de verhouding BHBZ:ACAC in de patiënt niet snel te bepalen is, zal er dus een schatting gemaakt moeten worden van de BHBZ concentratie in plasma. Daarnaast kan ook de vochtbalans van een patiënt nog van invloed zijn op de conversiefactor urine BHBZ => bloed BHBZ (400%) en zou ook dit meegenomen moeten worden in de schatting. Dit kan door bijvoorbeeld een refractometer te gebruiken.

Verdunnen van urine om (sub)klinische ketose vast te stellen is gegeven het bovenstaande niet nodig. Dieren met 160 mg/dL (+++++) kunnen verdund worden om een schatting te maken van de BHBZ plasmaconcentratie.

Discussie gebruik van Precision Xceed

De gevonden testeigenschappen zijn ongeveer in overeenstemming met de resultaten van andere onderzoeken, ondanks dat er in dit onderzoek van een klein aantal dieren (n=24) monsters vergeleken zijn. Er is in de monsters nauwelijks hemolyse opgetreden, getuige de hemolyse-index van ten hoogste 0,03 mmol/L.

Hoewel we het gebruik van de Precision Xceed hebben getest in serumbuis, zal deze buis in de praktijk niet bruikbaar zijn, omdat zulk bloed direct getest moet worden. Er kan dan net zo goed een volbloedmonster direct uit de koe gebruikt worden.

Discussie tijd en temperatuur BHBZ heparinemonster

Ook Jones (2004) heeft een soortgelijk resultaat gevonden bij een onderzoek met humaan bloed en de Precision Xceed. Zij vonden dat de Precision Xceed nog betrouwbare metingen geeft bij ongekoelde heparinemonsters binnen 24 uur en bij gekoelde monsters tot 3 dagen. Stokol en Nydam (2004) hebben metingen gedaan met EDTA monsters en gestolde monsters en maten ook geen verandering in de BHBZ concentratie bij verschillende temperaturen en meettijden.

Een opmerking bij dit experiment is, dat de concentratie BHBZ in deze monsters aan de lage kant is, aangezien de concentratie bij runderen veel hoger kan zijn. In een praktijksituatie zullen de meeste monsters een hogere concentratie bhbz hebben, omdat een voorselectie wordt toegepast. Graag zou ik dan ook onderstaand experiment herhalen met bloedmonsters van runderen met klinische ketose, om een betere vergelijking met de praktijksituatie te hebben.

Daarnaast zou ik graag ook nog de invloed van hogere temperaturen onderzoeken op de BHBZ concentratie in het heparinemonster, omdat hogere bewaartemperaturen ook in een praktijksituatie nog al eens voorkomen.

Discussie urine nitroprussidetest en BHBZ

Door vooral de verschillen in de gevonden verhoudingen BHBZ : ACAC en die in de literatuur, vraag ik me af hoe lang en op welke manier de urinemonsters zijn bewaard, voordat analyse plaatsvond. In dit experiment met urine van 15 dieren, zijn er 8 monsters waarin de verhouding BHBZ : ACAC zodanig is, dat ACAC het grootste aandeel heeft. Er is een duidelijk verschil met de literatuur, waarin in bovengenoemde verhouding BHBZ het grootste aandeel heeft. Het zou zo kunnen zijn dat er in het urinemonster BHBZ is omgezet in ACAC, waardoor de gemeten waarden niet meer representatief zijn voor het oorspronkelijke urinemonster.

Literatuur en bronnen

Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A

Andersson L. (1984) Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonaemia and clinical signs. *Zentralbl Veterinarmed A*. Oct;31(9):683-93

Baird G.D., K.G. Hibbit and G.D. Hunter.G (1968) Biochemical aspects of bovine ketosis. *Biochem. J.* 107, 683

Beem A.E. (2000) Use of urine pH to predict incidence of ketosis in transition dairy cows. A thesis submitted to the graduate faculty of the Louisiana State University.

Church D.C. *The ruminant animal: Digestive physiology en nutrition.* Prentice Hall 1988 p. 499

Correa MT, Curtis CR, Erb HN, Scarlett JM, Smith RD (1990) An ecological analysis of risk factors for postpartum disorders of Holstein-Friesian cows from thirty-two New York farms. *J Dairy Sci.* 73(6):1515-24

Dohoo I.R. and S.W. Martin. (1984) Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease. *Can j comp med*; 48: 1-5

Duffield T.F., D. Sandals, K.E. Leslie, K. Lissemore, B.W. McBride, J.H. Lumsden, P. Dick and R. Bragg. (1998) Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81:2866–2873

Duffield, T.F., K.E. Leslie, D. Sandals, K. Lissemore, B.W. McBride, J.H. Lumsden, P. Dick, and R. Bragg. (1999). Effect of a monensin controlled-release capsule on cow health and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 82:2377

Enjalbert F., M.C. Nicot, C. Bayourthe and R. Moncoulon. (2001) Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *J. Dairy Sci.* 84:583–589

Filar, J. (1979) Ueber den Gehalt an β -Hydroxybutyrat, Azetazetat and Azeton im Blut von gesunden und an Ketose erkrankten Kuehen. *Wien. Tierarztl. Monatschr.* 66:377–380

Fletcher D. (2000) The role of dietary cation-anion difference (dcad) on the blood buffering capacity and the susceptibility of dairy cattle to induced ketoacidosis. McGill University Montreal, Québec

Fourichon C., H. Seegers, N. Bareille, F. Beaudeau. (1999) Effects of disease on milk production in the dairy cow: a review. *Preventive Veterinary Medicine* 41 1-35
Free H.M., R.R. Smeby, M.H. Cook and A.H. Free. (1958) A Comparative Study of Qualitative Tests for Ketones in Urine and Serum. *Clinical Chemistry* vol. 4 (4) p. 323-330.

Friggens N. C., P. Berg, P. Theilgaard, I. R. Korsgaard, K. L. Ingvarlsen, P. Løvendahl, and J. Jensen. (2007) Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: evidence of genetically driven body energy change. *J. Dairy Sci.* 90:5291–5305

GD Deventer, Arnsbergstraat 7, Postbus 9, 7400 AA Deventer, Netherlands

Geishauser T., K. Leslie, D. Kelton, and T. Duffield. (1997) Evaluation of five cowside tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 81:438–443

Geishauser, T., K. Leslie, D. Kelton, and T. F. Duffield. (2001). Monitoring for subclinical ketosis in dairy herds. *Compend. Contin. Educ. Prac. Vet.* 23:S65–S71.

Gröhn YT, Erb HN, McCulloch CE, Saloniemi HS. (1989) Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: association among host characteristics, disease, and production. *J Dairy Sci.* 72(7):1876-85

Guerci B., M. Benichou, M. Floriot, P. Bohme, S. Fougnot, P. Franck, P. Drouin. (2003) Accuracy of an electrochemical sensor for measuring capillary blood ketones by fingerstick samples during metabolic deterioration after continuous subcutaneous insulin infusion interruption in type 1 diabetic patients. *Diabetes care* Vol. 26, nr. 4, p.1137-1141

Guinard-Flament J., E. Delamaire, P. Lambertson, and J. L. Peyraud. (2007) Adaptations of mammary uptake and nutrient use to once-daily milking and feed restriction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:5062–5072

Hardeng F. and V. L. Edge.(2001) Mastitis, ketosis, and milk fever in 31 organic and 93 conventional Norwegian dairy herds. *J. Dairy Sci.* 84:2673–2679

Hayirli A. (2006) The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Veterinary research communications*, 30:749–774

Heitmann RN, Dawes DJ, Sensenig SC. (1987) Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant. *J Nutr.* 117(6):1174-80

Heuwieser W., U. Falkenberg, M. Iwersen, R. Voigtsberger, W. Padberg. (2007) Evaluation and use of an automated human B-hydroxybutyrate (BHBA) test for cowside detection of subclinical ketosis in dairy cattle. *Proceedings of the AABP conference 2007* p. 253-254

Innere Medizin und Chirurgie des Rindes. Dirksen G., Gruender H.D. und Stoeber M. 4e editie. Parey Buchverlag 2002. p. 649

Itoh N, Koiwa M, Hatsugaya A, Yokota H, Taniyama H, Okada H, Kudo K. (1998) Comparative analysis of blood chemical values in primary ketosis and abomasal displacement in cows. *Zentralbl Veterinarmed A*;45(5):293-8.

Jeppesen R., J.M.D. Enemark, C. Enewoldsen. (2006) Ketone body measurement in dairy cows. *Proceedings world buiatrics congresss 2006*

Jones G.R.D. (2004) Laboratory use of the Abbott Medisense meter for beta-hydroxybutyrate measurement. *Chemical Pathology, St Vincent's Hospital, Darlinghurst*

Jorritsma, R., S. J. C. Baldee, Y. H. Schukken, T. Wensing, and G. H. Wentink. (1998) Evaluation of a milk test for detection of subclinical ketosis. *Vet. Q.* 20:108–110

Kupczyński R., A. Cupok (2007) Sensitivity and specificity of various tests determining beta-hydroxybutyrate acid in diagnosis of ketosis in cows. *Ejpau* 10(3), #15.

Large animal internal medicine, fourth edition 2009, Mosby Publishing. p. 1364

Lyle R.R., G. de Boer, S.E. Mills, R.W. Russell, D.C. Beitz and J.W. Young. (1984) Glucose kinetics, plasma metabolites, and endocrine responses during experimental ketosis in steers. *J Dairy Sci* 67:2255-2264

Manninen A.H. (2004) Metabolic effects of the very-low-carbohydrate diets: misunderstood “villains” of human metabolism. *Journal of the International Society of Sports Nutrition.* 1(2):7-11 p. 6-11

Menahan L.A., Holtmann W.B., Schultz L.H. and Hoekstra W.G. (1967) Relationship between beta-hydroxybutyrate and acetoacetate plus acetone contents of blood and urine of the ruminant. *J Dairy Sci.* 50(9):1409-16

Merck veterinary manual. 9th edition Merck Publishing Group 2005

Metabolism and Nutrition, J.O. Roach, S. Benyon. Second edition Mosby publishing 2003.

Nielen Mirjam, Maarten G.A. Aarts, Ad G.M. Jonkers, Theo Wensing, Ynte H. Schukken. (1994) Evaluation of two cowside tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Can Vet J*; 35: 229-232

Oetzel G.R. (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Vet Clin Food Anim* 20 651–674

Oetzel G.R. (2007) Herd-Level Ketosis – Diagnosis and risk factors. American Association of Bovine Practitioners. 40th Annual Conference, September 19, 2007 – Vancouver, BC, Canada

Oetzel G.R. (2008) Evaluation of a Hand-Held Meter for cowside evaluation of blood beta-Hydroxybutyrate and glucose concentrations in dairy cows. Research abstract accepted by the American Association of Bovine Practitioners for oral presentation at the 2008 Annual Meeting, Sept. 25 - 27, 2008, Charlotte, North Carolina, USA.

Østeras O., H. Solbu, A. O. Refsdal, T. Roalkvam, O. Filseth, and A. Minsaas (2007) Results and evaluation of thirty years of health recordings in the Norwegian dairy cattle population. *J. Dairy Sci.* 90:4483–4497

Penders J. (2006) Applications of flow cytometry, reflectance test strip reading and specific proteins in modern urinalysis. Promotieonderzoek verricht aan het Department of Clinical Biology, Microbiology and Immunology Ghent University Hospital

Rewers A., K. McFann and H.P. Chase. (2006) Bedside monitoring of blood hydroxybutyrate levels in the management of diabetic ketoacidosis in children. *Diabetes technology & therapeutics* vol. 8 number 6

Rosenberger G. *Krankheiten des Rindes*. 2e editie Parey Buchverlag 1978 p. 1053

Rothera A.C.H. (1908) Note on the sodium nitro-prusside reaction for acetone. *J Physiol.* 1908 Dec15;37(5-6):491-4

Rukkwamsuk T., J. Suksiri, N. Chutiyawat, N. Kaewsakhorn and S. Rungruang. (2008) Relationship between the sodium nitroprusside test for ketone bodies in urine and serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Kasetsart J.(Nat. Sci.)* 42 : 457 – 462

Sakha M., M. Ameri, H. Sharifi and I. Taheri. (2007) Bovine subclinical ketosis in dairy herds in Iran. *Veterinary Research Communications*, 31 673–679

Schultz L. H. (1971) Management and nutritional aspects of ketosis *J. Dairy Sci.* 54: 692-673

Sejrsen K., T. Hvelplund, M.O. Nielsen. *Ruminant Physiology*. Wageningen Academic Publishers 2006 p.202

Stengårde L., M.Tråvén, U.Emanuelson, K.Holtenius, J. Hultgren and R.Niskanen. (2008) Metabolic profiles in five high-producing Swedish dairy herds with a history of abomasal displacement and ketosis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 50:31

Stokol T., D. Nydam (2004) Effect of anticoagulant, storage temperature and time on non-esterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Veterinary Clinical Pathology* Vol. 33 / No. 3 / 2004

Tantiwong P, Puavilai G, Ongphiphadhanakul B, Bunnag P, Ngarmukos C. (2005) Capillary blood beta-hydroxybutyrate measurement by reagent strip in diagnosing diabetic ketoacidosis. Clin Lab Sci.18(3):139-44.

Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium, Yalelaan 104, 3584 CM Utrecht, Netherlands

Veterinaria AG, Grubenstrasse 40, 8045 Zürich, Schweiz

Wallace T.M., N. M. Meston, S. G. Gardner and D. R. Matthews. (2001) The hospital and home use of a 30-second hand-held blood ketone meter: guidelines for clinical practice. Diabetic Medicine vol.18 p. 640-645

Walsh R.B., J. S. Walton, D. F. Kelton, S. J. LeBlanc, K. E. Leslie, and T. F. Duffield. (2006) The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows. J. Dairy Sci. 90:2788–2796

Bijlage

Tabel 14. Testresultaten van de Precision Xceed.

#	koenummer	locatie	datum	monstername	plaats monstername	Precision X	afgedraaid	plasma	serum	dil	pariteit	ketostix	serum px
1	7805 (71)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	1,2 mmol/l	14:15	1,0 mmol/l	1,1 mmol/l	33	1		
2	7828 (15)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	0,6 mmol/l	14:15	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	37	1		
3	7676 (63)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	1,3 mmol/l	14:15	1,3 mmol/l	1,3 mmol/l	24	3		
4	7833 (50)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	0,7 mmol/l	14:15	0,7 mmol/l	0,7 mmol/l	19	1		
5	7832 (89)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	0,4 mmol/l	14:15	0,4 mmol/l	0,4 mmol/l	23	1		
6	7821 (5)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	0,6 mmol/l	14:15	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	17	1		
7	1439 (36)	tolakker	5-nov	10:45	v. jugularis	0,4 mmol/l	14:15	0,4 mmol/l	0,4 mmol/l	19	1		
8	7682 (12)	tolakker	5-nov	11:15	v. jugularis	1,1 mmol/l	14:15	0,9 mmol/l	0,9 mmol/l	112	2		
9	7377 (22)	tolakker	5-nov	11:15	v. jugularis	1,1 mmol/l	14:15	1,0 mmol/l	1,0 mmol/l	100	4		
10	7927 (spelt)	kliniek	7-nov	7:50	v. jugularis	3,5 mmol/l	8:30	3,1 mmol/l	3,1 mmol/l	14	7	+++	
11	8491 (hofs)	kliniek	7-nov	7:50	v. jugularis	1,1 mmol/l	8:30	1,0 mmol/l	1,0 mmol/l	35	1	-	
12	0667 (hofs)	kliniek	7-nov	7:50	v. jugularis	2,6 mmol/l	8:30	2,2 mmol/l	2,2 mmol/l	27	1	++	
13	5160 (bogaard)	kliniek	10-nov	17:15	v. jugularis	4,5 mmol/l	17:20	4,6 mmol/l	4,5 mmol/l	14	3	++++ (++)	
14	0660 (hofs)	kliniek	15-nov	10:30	v. jugularis	2,7 mmol/l	17:40	2,2 mmol/l	2,1 mmol/l	46	1	++	2,3 mmol/l
15	2	tolakker	19-nov	11:00	v. jugularis	0,6 mmol/l	14:15	0,7 mmol/l	0,7 mmol/l	4	3	-	0,6 mmol/l
16	75	tolakker	19-nov	11:05	v. jugularis	0,7 mmol/l	14:15	0,8 mmol/l	0,8 mmol/l	20	2	-	0,9 mmol/l
17	84	tolakker	19-nov	11:10	v. jugularis	0,5 mmol/l	14:15	0,6 mmol/l	0,6 mmol/l	9	1	-	0,6 mmol/l
18	45	tolakker	19-nov	11:15	v. jugularis	0,8 mmol/l	14:15	0,8 mmol/l	0,9 mmol/l	9	2	-	0,8 mmol/l
19	3532 (bozelie)	kliniek	21-nov	7:50	v. jugularis	0,6 mmol/l	8:20	0,7 mmol/l	0,7 mmol/l	28	1	-	0,6 mmol/l
20	0298 (leeuwen)	kliniek	21-nov	7:50	v. jugularis	0,7 mmol/l	8:20	0,9 mmol/l	0,9 mmol/l	11	1	-	0,7 mmol/l
21	73	tolakker	26-nov	11:45	v. jugularis	0,4 mmol/l	14:50	0,5 mmol/l	0,5 mmol/l	12	2	-	0,4 mmol/l
22	3520 (vermooij)	kliniek	28-nov	8:00	v. jugularis	1,5 mmol/l	8:30	1,5 mmol/l	1,5 mmol/l	5	1	-	1,5 mmol/l
23	3262 (leeuwen)	kliniek	28-nov	8:00	v. jugularis	0,7 mmol/l	8:30	0,8 mmol/l	0,8 mmol/l	9	1	-	0,7 mmol/l
24	9721 (leeuwen)	kliniek	28-nov	8:00	v. jugularis	0,6 mmol/l	8:30	0,7 mmol/l	0,7 mmol/l	3	1	-	0,6 mmol/l

Tabel 15. Correlatie tussen meetwaarden van de Precision Xceed en GD Deventer in heparine plasma.

		Px plasma	GD plasma
Px plasma	Pearson Correlation	1	,988(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	24	24
GD plasma	Pearson Correlation	,988(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	24	24

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Tabel 16. Correlatie tussen meetwaarden van de Precision Xceed en GD Deventer in serum.

		Px serum	GD serum
Px serum	Pearson Correlation	1	,988(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	11	11
GD serum	Pearson Correlation	,988(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	11	11

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Testkarakteristieken Precision Xceed bij afkapwaarde BHBZ $\geq 1200\mu\text{mol/L}$

	GD positief	GD negatief
Precision Xceed positief	6	1
Precision Xceed negatief	0	17

Se.: $6/6 * 100 = 100 \%$

Sp.: $17/18 * 100 = 94,4 \%$

Pv +: $6/7 * 100 = 86 \%$

Pv -: $17/17 * 100 = 100 \%$

Prevalentie: 25 %

Testkarakteristieken Precision Xceed bij afkapwaarde BHBZ $\geq 1400 \mu\text{mol/L}$

	GD positief	GD negatief
Precision Xceed positief	5	0
Precision Xceed negatief	0	19

Se.: $5/5 * 100 = 100 \%$

Sp.: $19/19 * 100 = 100 \%$

Pv +: $5/5 * 100 = 100 \%$

Pv -: $19/19 * 100 = 100 \%$

Prevalentie: 21 %

Conversiefactoren

mg/dL => $\mu\text{mol/L}$, vermenigvuldigen met conversiefactor (Radostits)

stof	eenheid	conversiefactor	eenheid
bhbz	mg/dL	96	$\mu\text{mol/L}$
acac	mg/dL	98	$\mu\text{mol/L}$
ac	mg/dL	172	$\mu\text{mol/L}$

Tabel 16. Gegevens van de urine van 15 koeien, waarin BHBZ is gemeten en nitroprussidetesten zijn gedaan met pure urine en urine in een verdunningsreeks. De data zijn verzameld door een Franse student diergeneeskunde.

N°	ID	Dipstick	Pattern	1/40	1/20	1/10	1/5	1/2	Pure	Score	BHBA (mmol/l)
1	19 16/04	+++	3.1	1	1	2	3	4	4	15	3,2
2	19/23/04	++++	4.1	1	2	2	4	4	5	18	7,4
3	19 29/04	+++	3.1	1	1	2	3	4	4	15	12,0
4	19/14/05	++++	4.2	1	2	3	4	4	5	19	26,2
5	19 21/05	+++(+) add	4.3	1	2	3	4	5	5	20	36,4
6	19 28/05	+++	3.2	1	1	2	2	3	4	13	2,6
15	52 09/04	+++ +++(+)	3.1	1	1	2	3	4	4	15	7,5
8	52/16/04	sub	3.3	0	1	1	2	3	4	11	16,6
9	52 23/04	+++	3.3	0	1	1	2	3	4	11	9,9
10	52 29/04	+++	3.1	1	1	2	3	4	4	15	18,5
11	10 23/04	+++	3.2	1	1	2	2	3	4	13	1,0
12	16 21/05	+++	3.4	1	2	3	3	4	4	17	28,3
13	16 28/05	+++	3.5	1	1	2	3	3	4	14	3,4
14	Scholten 11/06	+++	3.3	0	1	1	2	3	4	11	5,9
7	Bronze 04/06	+++	3.2	1	1	2	2	3	4	13	4,3

Toelichting bij de tabel: de waardering onder de verdunningsreeksen zoals daar zijn 0, 1, 2, 3, 4 en 5 staan voor 0, 5, 15, 40, 80, 160 mg ACAC/dL. Ook kan dit vertaald worden naar negatief, -, +, ++, +++ en +++++. Dit is de schaal die het meest gebruikt wordt bij het aflezen van urine nitroprusside strips.