



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Utvärdering av snabbtest för ketonkroppsdetektion hos mjölkkor

Carin Olsson

Uppsala

2012

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:4*

Utvärdering av snabbtest för ketonkroppsdetektion hos mjölkkor

Carin Olsson

*Handledare: Camilla Björkman, Institutionen för kliniska vetenskaper
Biträdande handledare: Kjell Holtenius, Institutionen för husdjurens utfodring och vård*

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå AXX, 30hp*

Nyckelord: utvärdering, ketonkroppar, snabbtest, mjölkkor, blod, mjölk, urin

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2012:4*

SAMMANFATTNING

För att en mjölkko ska vara vid god hälsa och producera optimalt är det viktigt att hennes energimetabolism är i god balans. Förhöjda nivåer av ketonkroppar (β -hydroxybutyrat, acetoacetat och aceton) är en indikation på att störningar i energibalansen föreligger och har i flera studier kopplats samman med ökad risk för sjukdomar och sänkt mjölkproduktion. I veterinär ambulatorisk verksamhet används olika snabbtester för att enkelt påvisa förhöjda nivåer av ketonkroppar i mjölk, urin och blod.

Syftet med denna studie var att utvärdera fyra snabbtesters tillförlitlighet för ketonkroppsdetektion hos mjölkkor, under svenska förhållanden, i jämförelse med en verifierad laboratoriemetod.

Från 51 mjölkkor i olika laktationsstadier samlades blod-, mjölk- och urinprov. Förekomsten av ketonkroppar undersöktes med fyra olika snabbtester: Precision Xceed (helblod), PortaBHB milk ketone test (mjölk), Acetontest (mjölk) samt Ketostix (urin). Som referensmetod användes en laboratorieanalys för detektion av β -hydroxybutyrat i plasma. För samtliga snabbtest beräknades sensitiviteten och specificiteten att korrekt identifiera mjölkkor med koncentrationer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l i jämförelse med referensmetoden. Mellan testresultat från Precision Xceed och referensmetoden beräknades även korrelationen.

I denna studie hade både Precision Xceed och Ketostix hög sensitivitet (100 %) och specificitet (93 %) jämfört med referensmetoden. Precision Xceed tenderade dock att övervärdera de faktiska koncentrationerna av β -hydroxybutyrat vid högre nivåer. PortaBHB milk ketone test uppvisade relativt hög sensitivitet (88 %) men lägre specificitet (53 %). Acetontest uppvisade hög specificitet (100 %), men mycket låg sensitivitet (13 %).

Resultaten visar att Precision Xceed, Ketostix och PortaBHB milk ketone test kan användas både som diagnostiskt test för sjuka djur och som screeningtest för friska djur, under svenska förhållanden. Acetontest har dock begränsad användning som diagnostiskt test och bör inte användas som screeningtest.

ABSTRACT

For a dairy cow to be healthy and produce optimally, it is important that her energy metabolism is well balanced. An elevated concentration of ketone bodies (β -hydroxybutyrate, acetoacetate and acetone) is an indicator of disruptions in the energy balance and has been repeatedly associated with increased risk of disease and reduced milk production. In veterinary ambulatory practices, different cow side tests are used for easy and rapid detection of elevated concentrations of ketone bodies in milk, urine and blood.

The objective of this study was to evaluate the accuracy of four cow side tests in their ability to detect ketone bodies in dairy cows, in comparison to a reference laboratory method.

Blood, milk and urine samples were collected from 51 dairy cows in different weeks of lactation. Ketone bodies were detected by four cow side tests: Precision Xceed (whole blood), PortaBHB milk ketone test (milk), Acetontest (milk) and Ketostix (urine). For reference, the concentrations of β -hydroxybutyrate in plasma were analyzed by a laboratory method. As a comparison with the reference method, sensitivity and specificity were calculated to correctly identify cows with concentrations of β -hydroxybutyrate $\geq 1,4$ mmol/l for all cow side tests. The correlation between the test results from Precision Xceed and the reference laboratory method was also calculated.

In this study, both Precision Xceed and Ketostix showed high sensitivity (100 %) and specificity (93 %) compared to the reference method. However, Precision Xceed, tended to overestimate the actual concentrations of β -hydroxybutyrate at higher levels. PortaBHB milk ketone test showed relatively high sensitivity (88 %) but lower specificity (53 %). Acetontest showed high specificity (100 %) but very low sensitivity (13 %).

The results show that Precision Xceed, Ketostix and PortaBHB milk ketone test can be used both as diagnostic tests for sick animals as well as screening tests for healthy animals kept under Swedish conditions. Acetontest has limited use as a diagnostic test and should not be used as a screening test.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	i
ABSTRACT	ii
BAKGRUND.....	1
SYFTE	1
LITTERATURSTUDIE	2
Mjölkcons energimetabolism	2
Ketonkroppar	3
Ketos (acetonemi)	6
Detektion av ketonkroppar	7
Snabbtester för ketonkroppsdetektion	8
MATERIAL OCH METODER	10
Djurmaterial	10
Provtagning och provhantering.....	10
Analysmetoder.....	10
Databearbetning och statistisk analys	12
RESULTAT	13
Provtagna djur	13
Resultat enligt referensmetoden.....	14
Resultat enligt snabbtesterna	15
Jämförelse mellan referensmetoden och Precision Xceed.....	17
Sensitivitet, specificitet och kappavärden	18
Diskussion.....	19
Snabbtesternas tillförlitlighet.....	19
Allmänt om ketonkroppsdetektion hos mjölkcor.....	21
SLUTSATS.....	21

TACK	22
LITTERATURFÖTECKNING.....	23
Elektroniska dokument	25

BAKGRUND

För att en mjölkko ska kunna producera optimalt och samtidigt hålla sig frisk krävs att hennes energimetabolism är i god balans. En viss nivå av cirkulerande ketonkroppar är ett normalt inslag i mjölkkons ämnesomsättning och de utgör en viktig energikälla i många vävnader (Herdt, 1988). Vid störningar i energibalansen kan nivåerna av ketonkroppar i olika kroppsvätskor bli förhöjda (Andersson, 1988). Förhöjda nivåer av ketonkroppar har satts i samband med ökad risk för sjukdom (Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2005; Geishauser *et al.*, 1997) och sänkt mjölkproduktion (Duffield *et al.*, 2009) och är en bra markör på mjölkkons metabola hälsa. Genom att mäta nivåerna av ketonkroppar både hos individuella djur och på besättningsnivå kan man få värdefull information om kornas energibalans och eventuella behov av behandling eller ändringar i utfodringen.

Det finns många analysmetoder framtagna för att påvisa ketonkroppar, både laboriemetoder och enklare snabbtester (Bruss, 2008). Flera av analysmetoderna är ursprungligen framtagna för användning inom humanmedicinen, men har funnit en plats även på den veterinära sidan. Hos fältveterinärer har olika snabbtester blivit populära, troligen tack vare enkelheten i att utföra analyserna och att de snabbt ger svar för en billig peng. Olika snabbtesters tillförlitlighet har undersökt i flera studier och det har visat sig att tillförlitligheten hos dem varierar (Oetzel, 2004). Samtliga tester har både för- och nackdelar och det finns felkällor som kan komplicera tolkningen av testresultatet. Det är viktigt att utövaren känner till testernas olika egenskaper för att kunna välja rätt test vid rätt tillfälle samt för att kunna tolka provsvaren korrekt.

I denna studie ingår fyra snabbtester för detektion av ketonkroppar som idag finns att tillgå på den svenska marknaden. Två av testerna är framtagna för användning på mjölkprover från ko (PortaBHB™ milk ketone test och Acetontest) och övriga är framtagna för analys av humana urin- respektive helblodsprover (Precision Xceed® respektive Ketostix®).

SYFTE

Studiens syfte är att utvärdera tillförlitligheten hos fyra olika snabbtester för ketonkroppsdetektion, i jämförelse med en laborieanalys, på mjölkkor i svenska besättningar.

LITTERATURSTUDIE

Mjölkkons energimetabolism

Energikällor

Liksom övriga idisslare fermenterar mjölkkon huvuddelen av fodrets kolhydrater i våmmen och inget eller endast lite glukos tas upp i tarmen, vilket gör att hon är konstant beroende av glukoneogenes för att tillgodose sitt glukosbehov (Herdt, 1988). Om intaget av kolhydrater från foder inte räcker för att täcka energibehovet måste glukos antingen syntetiseras från andra substrat eller alternativa energikällor användas (Herdt, 2000).

Kolhydrater utgör cirka 70 % av mjölkkons foderintag och är således den huvudsakliga energikällan (Pond *et al.*, 2005). Genom mikrobiell nedbrytning i våmmen omvandlas huvuddelen av foderkolhydraterna till flyktiga fettsyror (volatile fatty acids; VFAs), vilka kan absorberas genom våmmens epitel (Cheeke & Dierenfeld, 2010). Till gruppen VFA räknas framförallt acetat, propionat och butyrat, varav acetat bildas i störst proportion. Acetat är det viktigaste energisubstratet för många vävnader samt den främsta byggstenen för *de novo* syntes av mjölkfett i juvret (VandeHaar, 2005). Både acetat och butyrat kan gå in i citronsyrcykeln och generera energi, men de kan inte användas för glukoneogenes (Cheeke & Dierenfeld, 2010). Propionat kan däremot omvandlas till glukos och anses vara den viktigaste glukosprecursoren hos idisslare (Radostits *et al.*, 2007). Efter att ha absorberats från våmmen förs propionat till levern, där den största delen av glukoneogenesen sker (Herdt, 2000).

Förutom propionat kan glykogen aminosyror, glycerol och laktat användas som substrat i glukoneogenesen (Herdt, 1988). Aminosyror blir tillgängliga dels genom nedbrytning av muskelmassa, kroppens proteinreserv, samt till mindre del genom nedbrytning av foderprotein. Glycerol frigörs vid nedbrytning av fettvävnad. Laktat intas antingen via fodret eller bildas genom metabolism av propionat, glukos och vissa aminosyror. Fettsyror har ett högt energiinnehåll, men med undantag av propionat de kan inte metaboliseras till glukos (Cheeke & Dierenfeld, 2010). Totalt bildas över 90 % av den glukos kon behöver genom glukoneogenes (VandeHaar, 2005).

Många vävnader, till exempel skelettmuskulatur, lever och hjärta, kan tillgodogöra sig energi genom att metabolisera fettsyror (VandeHaar, 2005). Andelen fett i foder avsett för nötkreatur är som regel låg, men tack vare fettsyrors höga energiinnehåll ger de ett tillskott till kons energiförsörjning (Emery, 1988). När extra näring behövs kan fettsyror mobiliseras från fettvävnad och användas som alternativ energikälla. Fettvävnad utgör kroppens energireserv, där fettsyror och glycerol lagras in i form av triglycerider (Herdt, 2000). Nedbrytning av fettvävnad leder till att glycerol och fria fettsyror (non esterified fatty acids; NEFAs) frisätts (Herdt, 1988). NEFA kan passera ut från adipocyter till blodet och användas som energikälla av perifer vävnad, eller tas upp i levern. I levern kan NEFA antingen oxideras fullständigt och gå in i citronsyrcykeln, oxideras ofullständigt och bilda ketonkroppar eller lagras in som triglycerider. Ketonkroppar i låga koncentrationer är ett normalt inslag i idisslarens metabolism och tjänar som viktiga energikällor i många vävnader (Herdt, 1988). Triglycerider packas till lipoproteiner och transporteras till annan vävnad för att där

metaboliseras (Herdt, 1988) eller lagras in i levern (Herdt, 2000). Fettlever uppstår om triglycerider lagras in i högre utsträckning än de transporteras bort från levern (Herdt, 2000).

Negativ energibalans i tidig laktation

Under laktationens inledning ökar mjölkornas näringsbehov avsevärt (Herdt, 1988) samtidigt som foderintaget oftast minskar (Ingvarsen *et al.*, 2000). Om energiintaget via foder inte motsvarar kroppens energibehov hamnar kon i negativ energibalans (NEB), ett mycket vanligt tillstånd hos mjölkkor under laktationens första veckor (Herdt, 1988). Det ökade näringsbehovet beror på att mjölkproduktionen inleds och att juvret kräver mycket näring för mjölksyntes. Glukos behövs för juvrets produktion av laktos, mjölkens viktigaste kolhydrat, och för produktion av mjölkfett krävs att fettsyror finns tillgängliga för upptag i juvret. Anledningarna till att korna äter sämre är inte helt klarlagda, men tros bland annat bero på signaler från metaboliter, hormoner, cytokiner och neuropeptider (Ingvarsen *et al.*, 2000). Mjölkproduktionen når maxnivå mellan vecka fem till sju i laktationen, men maximalt foderintag inträffar inte förrän mellan vecka åtta och tjugotvå. I tidig laktation är de hormonella signalerna för mjölksyntes mycket starka och mjölkproduktionen fortgår därför trots nedsatt energiintag (Radostits *et al.*, 2007).

Att förse juvret med näringsämnen och energi under NEB är en stor metabol utmaning som involverar alla kroppens organ och vävnader (Bell, 1995). De största förändringar som sker är att glukoneogenesen i levern och frisättningen av fettsyror från fettvävnad ökar samt att perifer vävnads utnyttjande av glukos minskar. Som alternativ energikälla i perifera vävnader kan till exempel ketonkroppar användas (Herdt, 2000). Genom att mjölkkons ämnesomsättning anpassar sig till NEB kan hög mjölkproduktion underhållas trots att foderintaget är begränsat. Under den första månadens laktation kan en tredjedel av energin som behövs för mjölksyntes tas från kroppsreserver (VandeHaar, 2005).

Trots att så gott som alla mjölkkor hamnar i NEB under laktationens inledning bibehåller de flesta god hälsa och mjölkproduktion (Herdt, 2000). Om systemen som reglerar energibalansen sätts ur spel och den negativa energibalansen blir för djup löper kon dock högre risk att utveckla ämnesomsättningsrelaterade sjukdomar (Rukkwamsuk *et al.*, 1999). En indikation på störd ämnesomsättning är förhöjda nivåer av ketonkroppar (Andersson, 1988).

Ketonkroppar

Vilka är ketonkropparna?

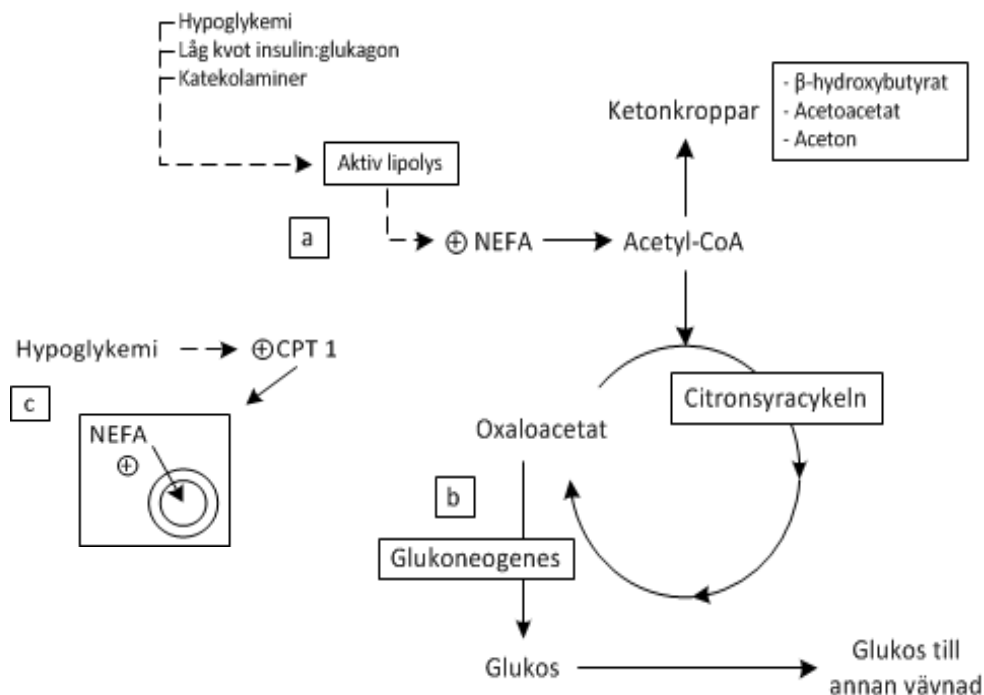
Ketonkropparna utgörs av β -hydroxybutyrat, acetoacetat och aceton (Herdt, 1988). β -hydroxybutyrat är den dominerande ketonkroppen i blod (Enjalbert *et al.*, 2001). Ketonkroppar utsöndras i både urin och mjölk (Schultz, 1968). Urinkoncentrationerna av ketonkroppar kan vara upp till fyra gånger högre än i blod, men de varierar. Koncentrationerna av acetoacetat och β -hydroxybutyrat i mjölk är betydligt lägre än i blod (Enjalbert *et al.*, 2001). Aceton kan även utsöndras via utandningsluften och ge upphov till en karaktäristisk lukt (Bruss, 2008).

β -hydroxybutyrat är en stabil förening i helblod, plasma och serum både in vivo och in vitro (Työppönen & Kauppinen, 1980; Custer *et al.*, 1983), medan acetoacetat spontant sönderfaller till aceton och koldioxid (Bruss, 2008). Aceton är till skillnad från övriga ketonkroppar relativt flyktigt.

Ketogenes

Produktionen av ketonkroppar, ketogenesen, sker i levern och till viss del i våmepitelet. När NEFA bryts ner bildas acetyl-CoA, som antingen kan gå in i citronsyracykeln eller oxideras ofullständigt till ketonkroppar i levern (Nelson & Cox, 2008b). Acetoacetat bildas från acetyl-CoA i levercellens mitokondrier och kan sedan passera ut i cytosolen och enzymatiskt omvandlas till β -hydroxybutyrat (Herdt, 1988). Aceton bildas långsamt och spontant från acetoacetat och finns endast i låga koncentrationer hos friska idisslare. β -hydroxybutyrat bildas även i våmepitelet från smörsyra som intas via foder (Herdt, 1988) och nivåerna i blodet stiger därför efter utfodring (Eicher *et al.*, 1999).

En viktig reglerande faktor för ketogenesen är graden av lipolys (Radostits *et al.*, 2007). Vid aktiv lipolys ökar ketogenesen på grund av den mer omfattande mobiliseringen av NEFA. Nedbrytning av fettvävnad stimuleras av hypoglykemi och en låg kvot insulin:glukagon; biokemiska förändringar som ofta ses hos kor i NEB (Herdt, 2000). Även förhöjda nivåer av katekolaminer, som till exempel ses vid olika stresstillstånd, stimulerar fettnedbrytning (Figur 1a).



Figur 1: Reglering av ketogenesen. a) Aktiv lipolys stimulerar ketogenesen genom att mer NEFA mobiliseras. b) Ökat behov av glukoneogenes stimulerar ketogenesen genom att citronsyracykeln saktas ner och acetyl-CoA istället metaboliseras till ketonkroppar i större utsträckning. c) Hypoglykemi stimulerar ketogenesen genom att aktivera enzymet carnitine palmityl transferas I (CPT 1) som behövs för att NEFA ska ta sig in i mitokondrien. Modifierad från Nelson & Cox (2008) och Herdt (2000).

Behovet av glukoneogenes har också betydelse för ketogenesen (Nelson & Cox, 2008a; Herdt, 1988). I citronsyracykeln oxideras acetyl-CoA enzymatiskt i flera steg till CO₂ och energi frigörs. Intermediärerna i cykeln kan även utnyttjas i andra processer, till exempel kan oxaloacetat användas som substrat i glukoneogenesen. När behovet av glukoneogenes är stort, till exempel hos mjölkor i tidig laktation som behöver mycket glukos för mjölksyntesen, används oxaloacetat framförallt i glukoneogenesen och som följd saktas citronsyracykeln ner. När inte acetyl-CoA används i citronsyracykeln, metaboliseras föreningen i högre grad till ketonkroppar och nivåerna i blodet ökar (Figur 1b).

Blodkoncentrationen av glukos är också en viktig reglerade faktor för ketogenesen (Herdt, 1988). När koncentrationen av glukos är hög hämmas enzymet carnitine palmityl transferas I (CPT 1), som behövs för att NEFA ska transporteras in i mitokondrien där ketogenesen äger rum. Följden blir att ketogenesen minskar. Vid låga koncentrationer av glukos i blodet aktiveras istället samma enzym och NEFA kan transporteras in i mitokondrien, vilket möjliggör en ökning av ketogenesen (Figur 1c).

Ketonkropparnas roll i energimetabolismen

Ketonkroppar spelar en viktig roll i mjölkkons energimetabolism, främst genom att utgöra en betydande energikälla i perifer vävnad när glukosnivåerna är låga (Herdt, 1988; Robertson & Williamson, 1980). Från levern transporteras acetoacetat och β -hydroxybutyrat till bland annat skelettmuskler, hjärta och njure, där de omvandlas till acetyl-CoA som kan gå in i citronsyracykeln och generera energi (Nelson & Cox, 2008b). Genom att vävnader utnyttjar ketonkroppar som alternativ energikälla sparas glukos till jurets mjölkproduktion (Herdt, 1988; Robertson & Williamson, 1980).

Eftersom ketonkroppar inte kan omvandlas till glukos bidrar de inte till jurets produktion av laktos (Herdt, 1988). Däremot är β -hydroxybutyrat ett viktigt substrat för jurets *de novo* syntes av mjölkfett. Ketonkroppar fyller dessutom en viktig funktion som signalsubstans i energimetabolismen (Robertson & Williamson, 1980).

Hyperketonemi – indikation på störd ämnesomsättning

Hos mjölkor i NEB under tidig laktation är produktionen av ketonkroppar stimulerad på grund av aktiv lipolys, högt behov av glukoneogenes och låga blodkoncentrationer av glukos och en viss förhöjning av ketonkroppsnivåerna anses därför normalt (Herdt, 2000). Om störningar i energimetabolismen uppstår kan den negativa energibalansen bli djup och ketonkroppsnivåerna öka ytterligare. I flera studier har ett samband påvisats mellan hyperketonemi och ökad risk för ämnesomsättningsrelaterade sjukdomar, nedsatt fruktsamhet och nedsatt mjölkproduktion (Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2005). Det är inte ketonkropparna *per se* som skapar problem, utan den underliggande störningen i ämnesomsättningen (Foster, 1988). De förhöjda nivåerna av ketonkroppar är däremot en bra markör på att en störning i energimetabolismen föreligger.

Hyperketonemi ses ofta vid flera sjukdomstillstånd som involverar ämnesomsättningen, till exempel ketos (Radostits *et al.*, 2007). Löpmagsförskjutning, mastit, metrit och andra sjukdomar som sänker foderintaget kan också leda till hyperketonemi.

Ketos (acetonemi)

En sjukdom som är starkt förknippad med förhöjda nivåer av ketonkroppar är ketos. Termen ketos är helt enkelt ett annat uttryck för hyperketonemi (Bruss, 2008). Acetonemi är en äldre benämning på sjukdomen som egentligen är felaktig, eftersom det i första hand inte är acetonnivåerna i blodet som är förhöjda utan koncentrationen av acetoacetat och β -hydroxybutyrat (Holtenius, 1997). Kontrollåret 2009/2010 diagnostiserades 1,1 fall av ketos/acetonemi per 100 laktationer i svenska mjölkobesättningar anslutna till Kokontrollen (Svensk mjölk, 2011). Klinisk ketos kan delas in i två olika typer, typ I och typ II (Holtenius & Holtenius, 1996). Ketos kan även förekomma i en subklinisk variant, som enbart definieras av förhöjda nivåer av ketonkroppar (Andersson, 1988).

Klinisk ketos typ I – spontan ketos

Ketos typ I drabbar mjölkkor 3-6 veckor postpartum som inte kan producera tillräckligt med glukos för att möta mjölkproduktionens behov (Holtenius & Holtenius, 1996). Bristen på glukoprecursorer leder till att glukoneogenesen avtar och energi fås istället från fettsyror och ketonkroppar. Tillståndet karaktäriseras av förhöjda nivåer av ketonkroppar i kombination med låga nivåer av glukos och insulin. Ketos typ I benämns även primär/spontan ketos och uppträder som regel inte i kombination med andra sjukdomar. De främsta symtomen är inappetens, minskad mjölkproduktion och avmagring (Radostits *et al.*, 2007). Korna kan även visa centralnervösa symtom i form av cirkelgång, ataxi och överdrivet tuggande och slickande.

Klinisk ketos typ II – sekundär ketos

Ketos typ II uppträder oftast tidigare i laktationen än typ I (Holtenius & Holtenius, 1996). Tillståndet kännetecknas av att korna har förhöjda nivåer av glukos och insulin samt tecken på insulinresistens. På grund av hyperglykemi kan NEFA som levereras till levern inte tas upp effektivt i mitokondrierna för att metaboliseras till ketonkroppar (Herdt, 2000). Istället lagras NEFA i större utsträckning in som triglycerider, vilket ökar risken för fettlever. Insulinresistensen leder till att fettvävnaden inte svarar normalt på insulin, vilken ytterligare banar väg för omfattande frisättning av NEFA. Överutfodring under sintiden är en viktig predisponerande faktor för ketos typ II (Holtenius & Holtenius, 1996). Ketos typ II benämns även sekundär ketos eftersom den som regel uppträder tillsammans med annan sjukdom, såsom löpmagsförskjutning, mastit och metrit (Radostits *et al.*, 2007). Symtomen beror på den primära sjukdomen.

Subklinisk ketos

Subklinisk ketos definieras av förhöjda nivåer av ketonkroppar utan kliniska symtom på ketos (Andersson, 1988). Diagnosen kan bara ställas genom att mäta koncentrationen av ketonkroppar i olika kroppsvätskor. Enligt Dohoo & Martin (1984) är subklinisk ketos vanligast de två första månaderna efter kalvning.

Förhöjda nivåer av ketonkroppar är, som tidigare nämnts, en indikation på att energimetabolismen satts ur spel. Det finns flera studier som visar på ett samband mellan subklinisk ketos och ökad risk för hälsostörningar, såsom löpmagsförskjutning och klinisk ketos (Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2005; Geishauser *et al.*, 1997). Subklinisk ketos är även kopplat till lägre mjölkavkastning (Duffield *et al.*, 2009). Genom att identifiera individer med subklinisk ketos kan man på ett tidigt stadium sätta in åtgärder för att bevara deras framtida hälsa och minska ekonomiska förluster på grund av sänkt produktion.

Gränsvärden

En viss nivå av cirkulerande ketonkroppar anses vara en normal del av mjölkkons ämnesomsättning och därför används olika gränsvärden för att definiera en förhöjning av ketonkroppsniåerna. Gränsvärdet för subklinisk ketos har undersökts i flera studier och baseras på den nivå som ger ökad risk för hälsostörningar (Duffield *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2005). Ofta anges ett gränsvärde för β -hydroxybutyrat i blod $\geq 1,2$ mmol/l eller $\geq 1,4$ mmol/l under de första veckornas laktation. Det finns även gränsvärden föreslagna för övriga ketonkroppar samt för analyser av mjölk och urin (Oetzel, 2004). Kor med kliniska symtom på ketos har ofta koncentrationer av β -hydroxybutyrat i blod $> 2,5$ mmol/l (Radostits *et al.*, 2007), men det är stor variation mellan olika kor (Andersson, 1984).

Detektion av ketonkroppar

Syften

Detektion av ketonkroppar används både som diagnostiskt test för kliniskt sjuka individer och som screeningtest för subklinisk ketos på friska individer. Oetzel (2004) presenterade ett schema för hur analys av ketonkroppar kan användas på besättningsnivå för kontroll av energiomsättningen hos kor i tidig laktation. Inom humanmedicinen är analys av ketonkroppar ett viktigt redskap i diagnostiken av diabetisk ketoacidosis, en allvarlig komplikation till diabetes mellitus (Wibell, 2002). Flera analysmetoder som används för ketonkroppsdetektion i veterinär verksamhet är ursprungligen framtagna för humant bruk.

Analysmetoder

Ketonkroppar kan analyseras både med kvalitativa och kvantitativa metoder (Bruss, 2008). Med en kvalitativ metod påvisas vilket eller vilka ämnen ett prov innehåller och med en kvantitativ metod undersöks även hur hög koncentrationen av ämnet i provet är.

Kvalitativ och semikvantitativ analys av ketonkroppar

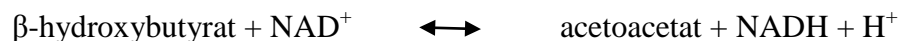
Den vanligaste metoden för att kvalitativt analysera ketonkroppar är ett nitroprussidtest, även kallat Rothera test (Bruss, 2008). Testet, som har använts i veterinär klinisk verksamhet i årtionden och nyttjas i stor utsträckning även i dag, bygger på en reaktion mellan nitroprussid och aceton/acetoacetat som ger upphov till ett färgomslag. Testets känslighet för acetoacetat är betydligt högre än för aceton, och det saknar helt förmåga att detektera β -hydroxybutyrat. Testet finns kommersiellt tillgängligt i form av testremсор, tabletter och pulver för användning på olika kroppsvätskor. Det används ofta som en semikvantitativ analys där

graden av färgomslag representerar olika koncentrationer av ketonkroppar i provet.

Det finns även en semikvantitativ analysmetod för β -hydroxybutyrat utarbetad (Bruss, 2008). Analysen bygger på samma enzymatiska metod som för kvantitativ analysen av β -hydroxybutyrat (se nästa stycke), men ger upphov till ett färgomslag som kan ses med blotta ögat.

Kvantitativ analys av ketonkroppar

För att kvantitativt analysera acetoacetat och β -hydroxybutyrat i prover används en enzymatisk metod (Bruss, 2008). Analysen bygger på följande reaktion, katalyserad av enzymet β -hydroxybutyratdehydrogenas:



Efter tillsats av NAD^+ eller NADH , beroende på om β -hydroxybutyrat eller acetoacetat ska analyseras, mäts ändringen i koncentrationen av NADH med hjälp av spektrofotometri eller en fluorimetrisk metod. Tack vare sin höga tillförlitlighet är det troligen den mest använda metoden för kvantitativ analys av ketonkroppar och den har framgångsrikt anpassats till flera automatiska analysystem. Vid analys av β -hydroxybutyrat ställs inga särskilda krav på provhanteringen, eftersom det är en stabil ketonkropp (Oetzel, 2004; Työppönen & Kauppinen, 1980). Analys av acetoacetat kompliceras av dess spontana sönderfaller till aceton och koldioxid proverna kräver därför särskild hantering (Bruss, 2008).

För kvantitativ analys av aceton finns en metod utarbetad som bygger på mikrodiffusion (Bruss, 2008). Mätningar av aceton försvåras av att aceton är flyktigt och proverna måste hanteras på särskilt sätt för att ge rättvisande resultat.

Snabbtester för ketonkroppsdetektion

Ketonkroppar går enkelt att detektera med olika snabbtester och är en analys som relativt ofta utförs i veterinär ambulatorisk verksamhet. Snabbtester finns framtagna för detektion av ketonkroppar i mjölk, urin och helblod. Traditionella snabbtest bygger på kvalitativa eller semikvantitativa analysmetoder och detekterar acetoacetat och aceton i mjölk eller urin (Bruss, 2008). Det finns även snabbtester framtagna som semikvantitativt analyserar β -hydroxybutyrat i mjölk. På senare år har en snabbtest för humant bruk tagits fram som kvantitativt analyserar β -hydroxybutyrat i helblod. Denna snabbtest har visat sig användbar även i veterinär verksamhet (Iwersen *et al.*, 2009). Det finns för- och nackdelar med samtliga snabbtester och deras tillförlitlighet, framförallt när det gäller att detektera subklinisk ketos, har jämförts i flera studier (Oetzel, 2004).

För- och nackdelar med olika snabbtest

Allmänt

Några fördelar med snabbtester är att de oftast är enkla att använda och ger svar direkt till en låg kostnad och det är troligen därför de vunnit popularitet hos fältveterinärerna. En nackdel är att tillförlitligheten generellt sett är lägre än för motsvarande laboratorieanalyser (Oetzel, 2004). Eftersom flera tester bygger på färgomslag kan testerna tolkas olika beroende på vem som läser av dem.

Snabbtester för mjölkanalys

Att använda mjölk för analys är det överlägset mest praktiska tack vare den enkla provtagningen. Snabbtester för detektion av ketonkroppar i mjölk är också de som utvärderats flitigast i olika studier (Geishauser *et al.*, 1998; Geishauser *et al.*, 2000; Carrier *et al.*, 2004; Oetzel, 2004). Mjölktesterna som ingått i dessa studier har varit av olika typer (pulver, stickor, tabletter) och av olika fabrikat. Nitroprussidtester, som används för detektion av aceton och acetoacetat, har uppvisat en generellt låg sensitivitet och hög specificitet. Enligt Oetzel (2004) är testerna, på grund av sin låga sensitivitet, inte användbara för detektion av subklinisk ketos på besättningsnivå och har begränsad användning för att ställa diagnos på individuella djur. Mjölktest för detektion av β -hydroxybutyrat har däremot uppvisat högre tillförlitlighet när det gäller att diagnostisera såväl klinisk som subklinisk ketos (Geishauser *et al.*, 1998; Carrier *et al.*, 2004; Oetzel, 2004). Tillförlitligheten beror dock på vilket gränsvärde som används för att skilja friska djur från sjuka. Geishauser *et al.* (2000) konstaterade att höga celltal kan ge upphov till falskt positiva testresultat vid detektion av ketonkroppar i mjölk. Eftersom acetoacetat är instabilt i prover är det viktigt att mjölkprov analyseras direkt efter provtagning, om denna ketonkropp ska detekteras (Bruss, 2008).

Snabbtest för urinanalys

Urintester för ketonkroppsdetektion är inte utvärderade i lika stor omfattning som mjölktester, vilket kan bero på att urinprover är betydligt mer tidskrävande att samla än mjölkprover (Duffield, 2000). Urintester har ansetts ha låg specificitet och hög sensitivitet (Nielen *et al.*, 1994), men Carrier *et al.* (2004) fann i en studie att urinstickan Ketostix (Bayer) hade både hög sensitivitet och specificitet när det gällde att detektera subklinisk ketos hos amerikanska mjölkkor. Liksom för mjölktester beror urintesters egenskaper på vilket gränsvärde som väljs för att skilja sjuka från friska individer. Carrier *et al.* (2004) noterade i sin utvärdering att korrekt avläsningstid är viktigt för att få ett rättvisande testresultat, eftersom färgen på stickan blir gradvis mörkare med tiden. Om färgen läses av senare än vad som anges på bruksanvisningen (15 sekunder) kan testresultatet alltså bli falskt positivt. En annan felkälla är att andra ämnen, till exempel läkemedel, också kan reagera med nitroprussid och ge liknande färgomslag (Bruss, 2008). Även alkaliskt pH kan leda till färgomslag och är en känd felkälla.

Snabbtest för helblodsanalys

Abbott Diabetes Care har under 2000-talet lanserat flera versioner av en mätare för ketonkroppsdetektion i helblod, främst för användning av diabetespatienter. En modell som även börjat användas för att mäta nivåer av ketonkroppar hos nötkreatur kallas Precision Xceed. Mätaren har utvärderats för användning på nötkreatur och uppvisat både högre specificitet och sensitivitet än snabbtester för mjölk- och urinanalys (Iwersen *et al.*, 2009). Dess nackdel är att den inte går att använda på mjölk eller urin (Iwersen *et al.*, 2009).

MATERIAL OCH METODER

Djurmaterial

I studien ingick 51 mjölkkor inhysta på en mjölkgård i Värmland, på Lövsta; nationellt forskningscentrum för lantbrukets djur, på Jälla naturbruksgymnasium eller på IMEs undervisningsklinik. Korna på IMEs undervisningsklinik var dels kor som köpts in för att användas i undervisningen, dels inremitterade patienter.

I första hand provtogs nykalvade kor då dessa oftare har högre nivåer av cirkulerande ketonkroppar än kor i senare laktation. Kon räknades som nykalvad om hon kalvat inom de senaste två månaderna. Uppgifter om djurens hälsostatus lämnades av djurägaren. Samtliga djur provtogs under augusti-november 2011. Försöket var godkänt av Djurförsöksetiska nämnden (C101/11).

Provtagning och provhantering

Blodprov togs med vacutainer från svansvenen (*vena coccygea*) eller jugularvenen (*vena jugularis*) och samlades i blodprovsrör med och utan heparintillsats. Heparinrören förvarades på is tills de centrifugerades vid 1000 x g i 10 minuter. Samtliga heparinrör centrifugerades inom fem timmar från provtagningstillfället och plasman sparades i -20° C. Från en juverdel togs mjölkprov i plastmugg och mjölken utseende kontrollerades visuellt med avseende på flockor och färgförändringar. Spontankastad urin samlas i en plastmugg, i vissa fall efter retning av dyngvippan. Snabbtesterna på helblod, mjölk och urin utfördes i direkt anslutning till provtagningen.

Analysmetoder

Proverna analyserades med en laboriemetod, Ranbut D-3-Hydroxybutyrate kit, samt fyra olika snabbtester: Precision Xceed, PortaBHB milk ketone test, Acetontest samt Ketostix. Se Tabell 1 för översiktlig information om snabbtesterna som utvärderades i studien. Samtliga analyser utfördes enligt tillverkarens bruksanvisningar.

Tabell 1: Översiktlig information om de snabbtester som utvärderats i studien

Snabbtest	Substrat	Detektion av	Typ	Analysmetod
Precision Xceed	Helblod	β -hydroxybutyrat	Mätare + stickor	Kvantitativ
PortaBHB*	Mjölk	β -hydroxybutyrat	Teststicka	Semikvantitativ
Acetontest	Mjölk	acetoacetat	Pulver	Semikvantitativ
Ketostix	Urin	acetoacetat	Teststicka	Semikvantitativ

* *Porta BHB = Porta BHB milk ketone test*

Laboratorieanalys

Som referensmetod i denna studie analyserades nivåerna av β -hydroxybutyrat i plasma med Ranbut D-3-Hydroxybutyrate kit (Skafta Medilab, Göteborg). Detta testkit bygger på att β -hydroxybutyrat och NAD i närvaro av enzymet D-3-hydroxybutyratdehydrogenas bildar acetoacetat och NADH. Förändringen i

absorbansen av NADH mäts direkt med spektrofotometri och representerar koncentrationen av β -hydroxybutyrat i provet. Analyserna utfördes vid Institutionen för husdjurens utfodring och vård, SLU, och metoden är enligt tillverkaren validerad för att identifiera mjölkkor med ketos.

Snabbtest helblod – Precision Xceed

Mätsystemet, som används för analys av β -hydroxybutyrat i helblod, består av en bärbar mätare (Precision Xceed, Abbott Diabetes Care, Solna) och elektrokemiska teststickor förpackade enskilt i folie (Precision Xtra®, Abbott Diabetes Care, Solna). Vid analystillfället togs en teststicka ur sin folieförpackning och fördes in i mätarens testport. Helblod överfördes till teststickan från blodprovsvröret utan heparintillsats med hjälp av en plastpipett. Blodet dras automatiskt till teststickans reaktionszon, där en elektrokemisk reaktion sker mellan kemikalier i teststickan och β -hydroxybutyrat i provet. En svag ström genereras vars storlek beror på mängden β -hydroxybutyrat i provet. Efter 10 sekunder kan testresultatet avläsas på displayen (mmol/l). Mängden blod som behövs är 10 μ l. Mätaren kalibrerades varje gång en ny ask med teststickor öppnades.

Snabbtest mjölk - PortaBHB milk ketone test

PortaBHB milk ketone test (Swevet, Sjöbo) används för detektion av β -hydroxybutyrat i mjölk. Snabbtesten består av en teststicka som vid analystillfället doppades direkt i mjölkprovet. I teststickans ena ände finns en testpad med ett enzym som omvandlar β -hydroxybutyrat till acetoacetat, samtidigt som vätejoner bildas. Vätejoner reducerar ett färgämne nitrotetrazolium blått till formazan, vilket ger ett violett färgomslag. Graden av färgomslag beror på mängden β -hydroxybutyrat i mjölken. Testen lästes av efter 1 minut genom att färgomslaget matchades mot medföljande färgskala. Skalan består av fyra färgblock som representerar nominella värden på β -hydroxybutyrat-förekomst: negativ (< 99 μ mol/l), tveksam (100-199 μ mol/l), positiv (200-499 μ mol/l) samt starkt positiv (> 500 μ mol/l). För den vidare databehandlingen fick negativt test siffran 0, tveksamt test 1, positivt test 2 och starkt positivt 3.

Snabbtest mjölk - Acetontest

Acetontest (Swevet, Sjöbo) är ett snabbtest i pulverform för detektion av acetoacetat i mjölk. Vid analystillfället lades en nypa pulver på ett vitt papper och därefter tillfördes några droppar mjölk. Testen innehåller nitroprussid som reagerar med acetoacetat i mjölken och ger ett violett färgomslag. Graden av färgomslag beror på mängden acetoacetat i mjölken. Testen lästes av efter 1 minut och resultatet tolkades som negativt, svagt violett eller starkt violett. Ingen färgskala följer med testen. För den vidare databehandlingen fick negativt testresultat siffran 0, svagt violett 1 och starkt violett 2.

Snabbtest urin - Ketostix

Ketostix (Bayer, Solna) används för detektion av acetoacetat i urin. En teststicka doppades direkt i urinen och lästes av efter 15 sekunder. Testremsan innehåller nitroprussid, som reagerar med acetoacetat och ger upphov till ett gulrosa till rödbrunt färgomslag. Vilken färg som bildas beror på koncentrationen av acetoacetat i provet. Testen lästes av genom att färgomslaget matchades mot medföljande färgskala. Liksom för teststickan för mjölk består färgskalan av olika

färgblick. Blocken representerar negativ, spår (0,5 mmol/l), liten (1,5 mmol/l), måttlig (4 mmol/l) och stor (8-16 mmol/l) förekomst av acetoacetat. För den vidare databehandlingen fick negativt testresultat siffran 0, spår 1, liten 2, måttlig 3 och stor 4.

Databearbetning och statistisk analys

För databehandling och en del av de statistiska analyserna användes Microsoft Excel (© 1989–1997 Microsoft 190 Corporation), övriga analyser utfördes i Stata 10 (Stata Statistical Software, Stata Corp. LP, College Station, TX, USA). Koncentrationen av β -hydroxybutyrat i plasma uppmätta på laboratoriet användes som referensmetod i studien.

Överensstämmelsen (test agreement) mellan referensmetoden och Precision Xceed analyserades enligt Bland & Altman (1986). Skillnaden mellan de två testerna beräknades för varje provpar och plottades sedan kring sitt medelvärde. För vidare analys av överensstämmelsen mellan referensmetoden och Precision Xceed beräknades Concordance correlation coefficient, som beskriver sambandet mellan två tester genom att mäta deras variation från en 45° linje genom origo (Lin, 1989).

Sensitivitet och specificitet

För samtliga snabbtester beräknades sensitiviteten och specificiteten för detektion av kor med förhöjda nivåer av ketonkroppar. För definition av förhöjda nivåer av ketonkroppar användes gränsvärdet $\geq 1,4$ mmol/l β -hydroxybutyrat i plasma.

Sensitivitet beräknades som andelen kor med plasmakoncentrationer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l i referensmetoden diagnostiserade med ett positivt snabbtestresultat (Oetzel, 2004). Specificitet beräknades som andelen kor med plasmakoncentration β -hydroxybutyrat $< 1,4$ mmol/l diagnostiserade med ett negativt snabbtestresultat. Olika gränsvärden för att definiera ett positivt snabbtestresultat undersöktes.

Nedanstående faktaruta syftar till att förklara begreppen sensitivitet och specificitet:

Sensitivitet: Andelen ”sjuka” djur som identifieras av testen.

Specificitet: Andelen ”friska” djur som friförklaras av testen.

Kappaanalys

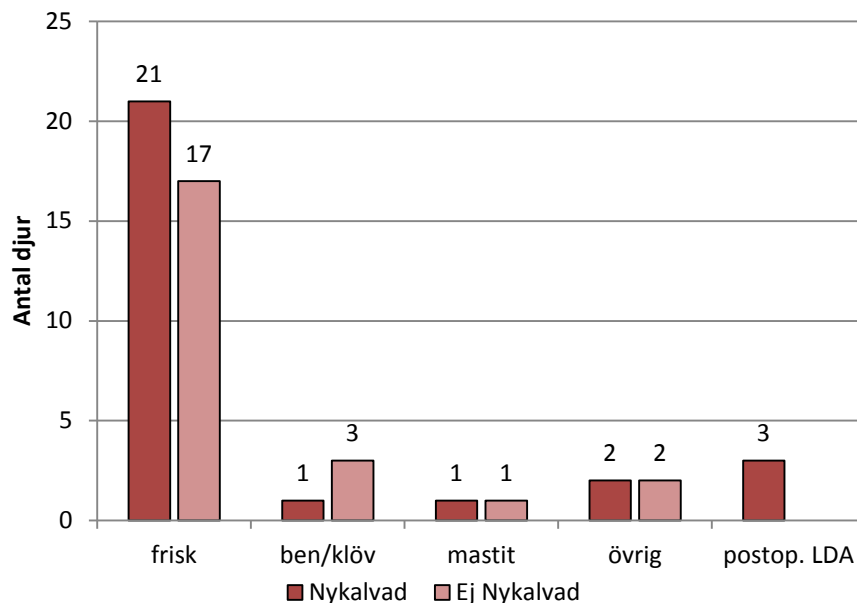
Överensstämmelsen mellan kategoriska data från snabbtesterna och referensmetoden beräknades med hjälp av kappastatistik (Cohen, 1960). Kappavärdet är ett mått på den grad av överensstämmelse mellan jämförda tester som inte beror på slumpen och kan variera mellan noll och ett. Kappavärden på 0,21-0,40 tolkas som att det är dålig överensstämmelse, 0,41-0,60 som måttlig, 0,61-0,80 som substantiell och 0,81-1,0 som nästan perfekt överensstämmelse mellan testerna (Dohoo *et al.*, 2009).

RESULTAT

Provtagna djur

I studien ingick 51 mjölkkor med laktationsnummer ett till sju, varav 53 % (n=27) av korna var inhysta på Lövsta forskningscentrum, 10 % (n=5) på Jälla naturbruksgymnasium och 10 % (n=5) på en mjölkgård i Värmland. Tolv procent (n=6) utgjordes av IMEs undervisningskor och 16 % (n=8) av inremitterade patienter till IMEs undervisningsklinik. Av de 51 korna som ingick i studien hade 55 % (n=28) kalvat senast två månader innan provtagningstillfället och räknades som nykalvade. Fyrtiofem procent (n=23) hade kalvat mer än två månader innan provtagningstillfället och räknades därför inte som nykalvade.

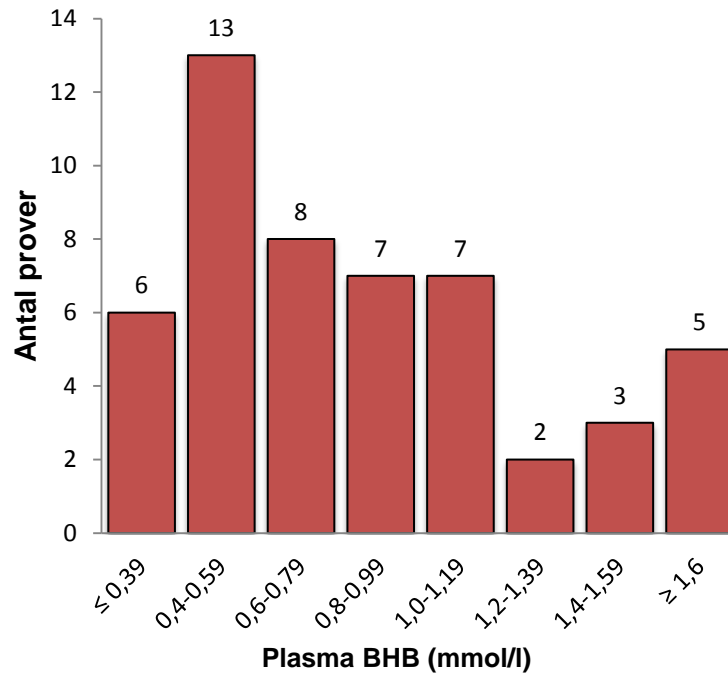
Av de nykalvade korna hade 25 % (n=7) kända sjukdomar. Hos de icke nykalvade korna var motsvarande siffra 26 % (n=6). Fördelningen mellan friska kor och kor med kända sjukdomar framgår av Figur 2. I gruppen Övriga sjukdomar hos de nykalvade korna fanns en ko som aborterat för tio dagar sedan och en ko med aktinos. Övriga sjukdomar hos icke nykalvade kor innehöll en ko med skavsår på carpus samt en ko med en böld kranialt om juvret. Kor som hade haft löpmagsförskjutning provtogs noll till två dagar efter operation. Korna räknades som friska om de enligt uppgift från djurägaren inte visat tecken på sjukdom senaste månaden före provtagningen.



Figur 2: Fördelning mellan friska djur och djur med kända sjukdomar bland nykalvade respektive icke nykalvade kor. Övrig = övriga sjukdomar. Postop. LDA = kor som opererats för vänstersidig löpmagsförskjutning noll till två dagar innan provtagningen.

Resultat enligt referensmetoden

Enligt laboriemetoden som användes som referensmetod i denna studie varierade koncentrationerna av β -hydroxybutyrat i plasma mellan 0,2–2,9 mmol/l hos de 51 provtagna djuren (Figur 3). Medelvärdet var 0,9 mmol/l β -hydroxybutyrat. Sexton procent (n=8) av proverna innehöll nivåer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l.

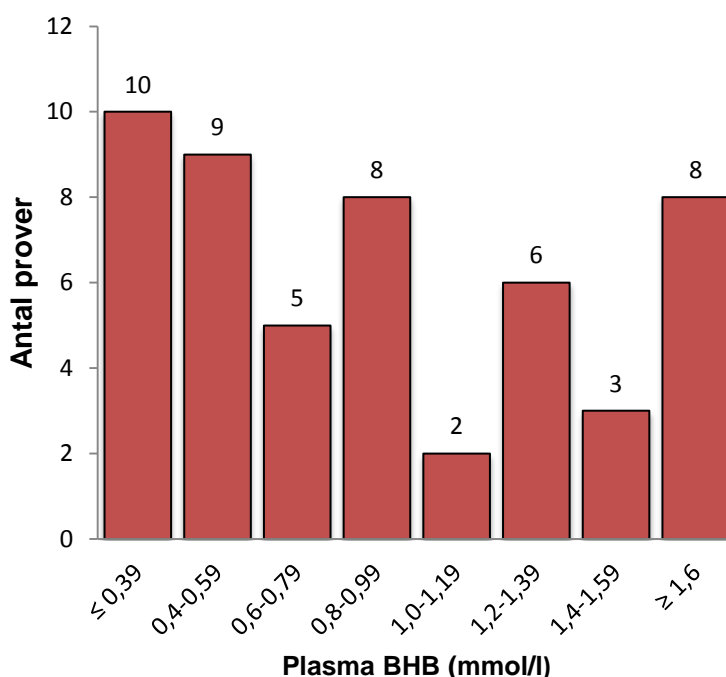


Figur 3: Fördelning av koncentrationerna av β -hydroxybutyrat (BHB) i proverna från de 51 mjölkorna som ingick i studien enligt referensmetoden.

Resultat enligt snabbtesterna

Kvantitativ analys - helblod

Helblod från samtliga 51 kor analyserades med avseende på β -hydroxybutyrat med snabbtesten Precision Xceed. Koncentrationerna av β -hydroxybutyrat varierade mellan 0,2–4,3 mmol/l (Figur 4). Medelvärdet var 1,0 mmol/l β -hydroxybutyrat och 22 % (n=11) av proverna innehöll koncentrationer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l.



Figur 4: Fördelning av koncentrationerna av β -hydroxybutyrat (BHB) i proverna från de 51 mjölkarna som ingick i studien enligt snabbtesten för helblod.

Semikvantitativ analys – mjölk och urin

Från samtliga 51 kor analyserades mjölkprov med två olika snabbtest, PortaBHB milk ketone test och Acetontest. I PortaBHB milk ketone test bedömdes 24 av proverna som negativa (0) och 27 prover som tveksamt positiva (1) med avseende på förekomst av β -hydroxybutyrat. Inget prov bedömdes som positivt (2) eller starkt positivt (3). I Acetontest bedömdes 50 prover som negativa (0) och ett prov som svagt positivt (1) med avseende på förekomst av acetoacetat. Inget prov bedömdes som starkt positivt (3). Urin samlades från 49 kor och dessa prover analyserades med snabbtestet Ketostix. Analysen resulterade i att 32 urinprover bedömdes som negativa (0) och sex prover bedömdes innehålla spår av acetoacetat (1). Tre prover bedömdes ha liten förekomst (2), fyra prover måttlig förekomst (3) och fyra prover stor förekomst (4) av acetoacetat.

Antal djur som gett upphov till olika utfall på respektive snabbtest visas i Tabell 2. Där framgår även vilken lägsta och högsta plasmakoncentration av β -hydroxybutyrat som gett upphov till de olika utfallen.

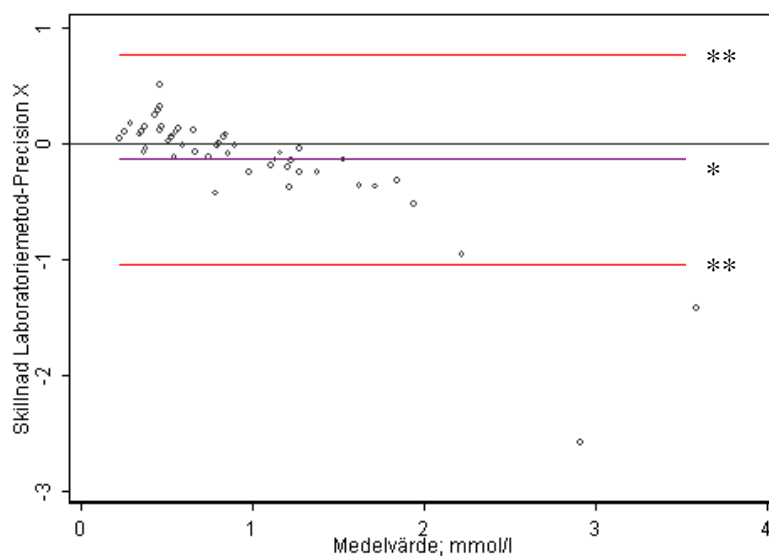
Tabell 2: Testresultat från de semikvantitativa snabbtesterna. Lägsta respektive högsta plasmakoncentration av β -hydroxybutyrat (BHB) i plasma som gett upphov till de olika utfallen finns angivet

Snabbtest	Bedömning	Koncentration BHB (mmol/l)	
		min	max
PortaBHB *			
n = 24	0	0,24	1,68
n = 27	1	0,37	2,88
Acetontest			
n = 50	0	0,24	1,74
n = 1	1	2,88	2,88
Ketostix			
n = 32	0	0,24	1,06
n = 6	1	0,33	1,25
n = 3	2	1,12	1,53
n = 4	3	1,02	1,68
n = 4	4	1,44	2,88

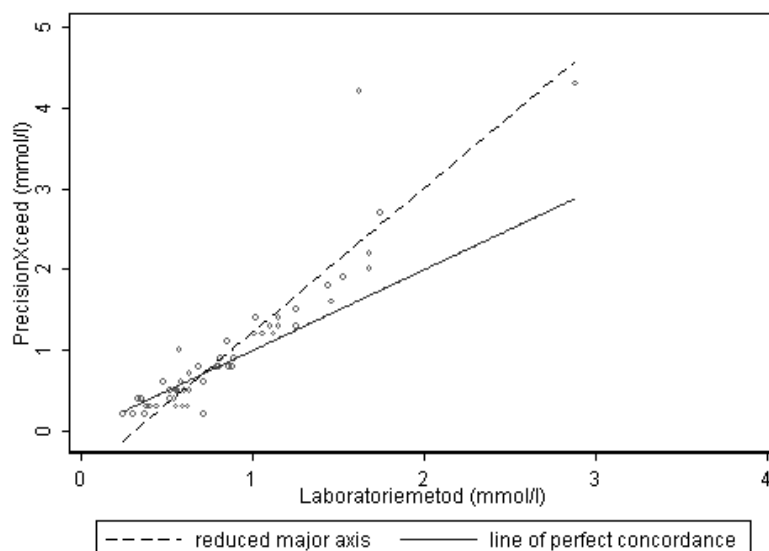
*Eftersom analys med PortaBHB (PortaBHB milk ketone test) inte gav upphov till några utfall bedömda som (2) eller (3) finns de inte med i tabellen

Jämförelse mellan referensmetoden och Precision Xceed

När koncentrationerna av β -hydroxybutyrat uppmätta med Precision Xceed och referensmetoden jämfördes med Bland & Altman (1986) statistiska metod för limits of agreement var medelavvikelsen mellan de båda testerna 0,13 mmol/l och 95 % limits of agreement -1,04 och 0,78 mmol/l (Figur 5). Concordance correlation coefficient beräknades till 0,77 (Figur 6).



Figur 5: Bland Altman-diagram. Skillnaden i koncentrationen β -hydroxybutyrat uppmätt med referensmetoden och Precision Xceed (vertikal axel) plottad mot medelvärdet av testparen (horisontell axel). Den horisontella linjen märkt * motsvarar medelavvikelsen mellan de båda metoderna (0,13 mmol/l) och de horisontella linjerna märkta ** motsvarar 95 % limits of agreement (-1,04 och 0,78).



Figur 6: Concordance correlation-diagram. Koncentrationerna av β -hydroxybutyrat enligt laboratoriemetoden och Precision Xceed är plottade på den horisontella respektive vertikala axeln. Den streckade linjen visar Concordance correlation coefficient (0,77).

Sensitivitet, specificitet och kappavärden

Sensitivitet och specificitet för detektion av mjölkkor med förhöjda nivåer av ketonkroppar undersöktes för samtliga snabbtest. För definition av förhöjda nivåer av ketonkroppar användes gränsvärdet $\geq 1,4$ mmol/l β -hydroxybutyrat i plasma uppmätt med referensmetoden. För samtliga snabbtest beräknades även kappavärdet. I Tabell 3 visas sensitivitet, specificitet och kappavärde för undersökta gränsvärden.

Tabell 3: Samtliga snabbtesters sensitivitet, specificitet och kappavärde för olika gränsvärden.

Snabbtest	Utfall	Gränsvärde	Sens (%)*	Spec (%)*	Kappavärde
Precision Xceed		1,4 mmol/l	100	93	0,93
PortaBHB**	1	100 μ mol/l	88	53	0,21
Acetontest	1	svagt violett	13	100	0,19
Ketostix	1	0,5 mmol/l	100	78	0,54
Ketostix	2	1,5 mmol/l	100	93	0,81
Ketostix	3	4,0 mmol/l	88	98	0,85
Ketostix	4	8-16 mmol/l	50	100	0,63

*) Relaterat till plasma β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l enligt referensmetod

***) PortaBHB = PortaBHB milk ketone test

Både Ketostix (gränsvärde 1,5 mmol/l) och Precision Xceed uppvisade en sensitivitet på 100 % och specificitet på 93 % och hade således bäst testegenskaper i denna studie. Acetontest uppvisade den lägsta sensitiviteten (13 %), men specificiteten var hög (100 %). För PortaBHB milk ketone test var sensitiviteten 88 % och specificiteten 53 %.

Kappavärdena för Acetontest och PortaBHB milk ketone test var låga (0,19 respektive 0,21), vilket tyder på en låg grad av överensstämmelse med referensmetoden. För Precision Xceed och två av Ketostix gränsvärden, utfall 2 och 3, var kappavärdet $\geq 0,81$, vilket tolkas som att överensstämmelsen med referensmetoden var hög. För Ketostix övriga gränsvärden, utfall 1 och 4, tyder kappavärdena (0,54 respektive 0,63) på måttlig respektive substantiell överensstämmelse med referensmetoden.

DISKUSSION

Snabbtesternas tillförlitlighet

Precision Xceed

I denna studie uppvisade Precision Xceed både hög sensitivitet (100 %) och hög specificitet (93 %) i jämförelse med referensmetoden när gränsvärdet $\geq 1,4$ mmol/l användes. Mätaren övervärderade nivåerna med i genomsnitt 0,13 mmol/l och korrelationskoefficienten mellan mätarens och referensmetodens uppmätta värden var 0,77. Iwersen *et al.* (2009) utvärderade en föregångare till mätaren som visade sig ha både en sensitivitet och specificitet på 100 % jämfört med serumkoncentrationer av β -hydroxybutyrat samt en korrelationskoefficient på 0,95. Studien genomfördes i USA och innehöll prover från 196 djur. Mätarens tillförlitlighet enligt Iwersen *et al.* (2009) var mycket god. Sensitiviteten och specificiteten var hög även enligt denna studie men korrelationen mellan mätaren och referensmetoden var sämre, framförallt vid högre plasmakoncentrationer av β -hydroxybutyrat. Om mätaren visar koncentrationer $\geq 1,4$ mmol/l ska dessa tolkas med tillförsikt, eftersom mätaren enligt min studie tenderar att överdriva koncentrationerna ju högre de blir. I denna studie ingick dock endast åtta kor med koncentrationer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l och ingen ko diagnostiserad med klinisk ketos. En studie av fler kor med höga nivåer av β -hydroxybutyrat behövs för att med större säkerhet kunna uttala sig om korrelationen mellan mätaren och referenstesten vid höga koncentrationer av ketonkroppar.

Mätaren är enkel att använda och ger svar på endast 10 sekunder. Eftersom testen är kvantitativ och resultatet presenteras som ett numeriskt värde är det lättare att tolka testresultatet än från en semikvantitativ analysmetod som bygger på färgomslag. Något som kan komplicera utförandet av analysen är att mätaren kräver helblod för analys istället för mjölk eller urin som de övriga snabbtesterna.

Denna studie visar att mätaren med god tillförlitlighet kan användas för att skilja individer med subklinisk ketos från individer utan subklinisk ketos, men att den vid koncentrationer av β -hydroxybutyrat $\geq 1,4$ mmol/l tenderar att övervärdera nivåerna.

PortaBHB milk ketone test

I denna studie uppvisade PortaBHB milk ketone test en sensitivitet på 88 % och en specificitet på 53 % när 100 μ mol/l ("tveksam förekomst") användes som gränsvärde i jämförelse med referensmetoden. Detta var det enda gränsvärde som sensitivitet och specificitet kunde beräknas för, eftersom inga andra utfall erhöles i denna studie. Oetzel (2004) har i en studie sammanställt data från utvärderingar av liknade snabbtester och kommit fram till en genomsnittlig sensitivitet och specificitet på 83 % respektive 82 %.

En känd felkälla för PortaBHB milk ketone test är att höga celltal i mjölken kan ge upphov till falskt positiva testresultat. I denna studie hade två kor klinisk mastit i en juverdel. En av dessa kor fick ett falskt positivt testresultat. Ytterligare tre falskt positiva testresultat erhöles från tre undervisningskor som var nära sinläggning. En tanke är att höga celltal hos dessa kor gav upphov till det noterade färgomslaget på snabbtesten. Om man kan undvika att ta prov från juverdelar med höga celltal kan testets specificitet förmodligen höjas. Att hälften av

undervisningskorna fick positiva testresultat kan också bero på att de var bland de första korna att provtas och att en viss ovisshet rådde kring hur färgomslaget skulle tolkas.

Att detektera ketonkroppar i mjölk har stora praktiska fördelar jämfört med analys av andra kroppsvätskor och PortaBHB milk ketone test är den minst arbetskrävande snabbtesten av de som utvärderats i denna studie. Tillförlitligheten är enligt resultaten från studien inte optimal då många falskt positiva detekterats på grund av den låga specificiteten. Om endast nykalvade kor hade ingått i undersökningen hade specificiteten eventuellt varit högre eftersom kor med höga celltal på grund av sinläggning inte hade inkluderats.

Enligt denna studie är PortaBHB milk ketone test tillförlitligt för detektion av ketonkroppar hos mjölkkor, men man ska vara medveten om vad som kan störa analysen.

Acetontest

I denna studie var bara en ko positiv i Acetontest, vilket gav testet en sensitivitet på 13 % och en specificitet på 100 % i jämförelse med referensmetoden. Inga ”starkt positiva” testresultat erhöles. Testet gav således upphov till en stor andel falskt negativa resultat. Snabbtester för mjölk som bygger på samma analysmetod har i tidigare studier uppvisat liknande egenskaper (Geishauser *et al.*, 1998; Geishauser *et al.*, 2000; Carrier *et al.*, 2004). Testets låga kappavärde tyder också på låg överensstämmelse med referensmetoden. I enlighet med vad Oetzel (2004) konstaterade har testet på grund av sin låga sensitivitet begränsad användning, framförallt som screeningtest på besättningsnivå.

Anledningen till att tester av det här slaget har låg sensitivitet kan vara att nivåerna acetoacetat är betydligt lägre i mjölk än i blod (Enjalbert *et al.*, 2001) och inte ger färgomslag förrän kraftigare förhöjningar av ketonkroppsnivåerna inträffat.

På grund av den låga sensitiviteten som testet uppvisade i den här studien är den mindre användbar för detektion av ketonkroppar hos mjölkkor. Det kan dock vara användbart som diagnostiskt test på individuella djur, eftersom ett positivt resultat med stor sannolikhet är sant och indikerar relativt höga nivåer av ketonkroppar.

Ketostix

Ketostix uppvisade i denna studie en sensitivitet på 100 % och en specificitet på 93 % när gränsvärdet 1,5 mmol/l (”liten förekomst”) användes, vilket innebär att tillförlitligheten i jämförelse med referenstestet är god. Även kappavärdet för detta gränsvärde tyder på god överensstämmelse med referensmetoden. Vid högre gränsvärde minskade sensitiviteten och specificiteten ökade. Dessa resultat överensstämmer med vad Carrier *et al.* (2004) kom fram till i sin studie av en liknande teststicka och samma gränsvärde, med skillnaden att sensitiviteten där var något lägre (78 %).

Liksom Carrier *et al.* (2004) noterade i sin studie och vad som även framgår av bruksanvisningen är korrekt avläsningstid viktigt för att testet inte ska bli falskt positivt. Avläsningstiden är enligt tillverkaren 15 sekunder, men det går enligt

Carrier *et al.* (2004) bra att korta ner den till 5 sekunder för att minska risken för falskt positiva och samtidigt behålla testets goda tillförlitlighet.

Testets användning begränsas av att kor inte urinerar på beställning, men om tid och tålmod finnes att invänta provsubstrat är det enligt min studie ett mycket bra snabbtest för ketonkroppsdetektion.

Allmänt om ketonkroppsdetektion hos mjölkkor

Förhöjda nivåer av ketonkroppar har i flera studier sett ha ett samband med ökad risk för sjukdom och sänkt mjölkproduktion och är därför en bra parameter att mäta för kontroll av mjölkkons metabola hälsa. De är dessutom lätta att detektera i olika kroppsvätskor med olika typer av snabbtest. Det är viktigt att komma ihåg att det inte är ketonkropparna *per se* som ger problem, utan den underliggande störningen i ämnesomsättningen.

Andra parametrar och metoder

Förhöjda nivåerna av NEFA i blod har liksom förhöjda nivåerna av ketonkroppar ett samband med ökad risk för sjukdomar och lägre mjölkproduktion (LeBlanc, 2010). Tyvärr finns det i dagsläget, till min kännedom, inga snabbtester framtagna för detektion av NEFA vilket begränsar analysens användning. Stengärde (2010) visade i sin avhandling att det även finns fler blodparametrar som speglar kons ämnesomsättning och risk för att utveckla sjukdom.

Information om kons metabola hälsa kan givetvis fås med hjälp av andra metoder än att mäta parametrar i blod. Enligt LeBlanc (2010) är uppgifter om kliniska sjukdomar i besättningen, mätningar av foderintag och mjölkproduktion samt uppskattning av body condition score exempel på andra metoder som finns att tillgå vid bedömning av hälsoläget på besättningsnivå. Vid bedömning av individuella djur är det givetvis viktigast att samla information från till exempel anamnes och klinisk undersökning och att analys av ketonkroppar ses som en kompletterande undersökning.

SLUTSATS

Enligt denna utvärdering av olika snabbtester för ketonkroppsdetektion visade Precision Xceed och Ketostix upp bäst testegenskaper i jämförelse med referensmetoden. Precision Xceed tenderade dock att övervärdera de faktiska koncentrationerna av β -hydroxybutyrat vid högre nivåer. PortaBHB milk ketone test uppvisade relativt hög sensitivitet men lägre specificitet. Den lägre specificiteten kan bero på att testet även reagerar på höga celler i mjölken. Acetontest uppvisade hög specificitet, men mycket låg sensitivitet. Ketostix, Precision Xceed och PortaBHB milk ketone test kan användas både som diagnostiskt test för sjuka djur och screeningtest för friska djur, under svenska förhållanden. Acetontest har dock begränsad användning som diagnostiskt test bör inte användas som screeningtest.

TACK

Först och främst vill jag rikta ett stort tack till min handledare Camilla Björkman för hjälp och support under hela arbetets gång. Tack!

Jag vill även tacka min biträdande handledare Kjell Holtenius för värdefulla synpunkter på arbetet, Håkan Wallin för hjälp med laboratorieanalyserna, Kerstin Mover Berglund för assistans på IME samt personal på Lövsta, Jälla och Hillringsbergs gård, Värmland, för hjälp med provtagning och insamling av uppgifter om djuren.

Uppsala, januari 2012

Carin Olsson

LITTERATURFÖRTECKNING

- Andersson, L. (1984) Concentrations of blood and milk ketone bodies, blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to the degree of hyperketonemia and clinical signs. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe A.* 31(9):683-93.
- Andersson, L. (1988) Subclinical ketosis in dairy cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 4(2):233-251.
- Bell, A. W. (1995) Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of Animal Science.* 73(9):2804-2819
- Bergman, E. N. (1971) Hyperketonemia-ketogenesis and ketone body metabolism. *Journal of Dairy Science.* 54(6):936-948.
- Bland, J. M. & Altman, D. G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet.* 1(8476):307-310.
- Bruss, M. L. (1997) Lipids and ketones. In: Kaneko, J. J, Harvey, J. W. & Bruss M. L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals.* 5th ed. 83-116. San Diego: Academic Press.
- Carrier, J., Stewart, S., Godden, S., Fetrow, J. & Rapnicki, P. (2004) Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *Journal of Dairy Science.* 87(11):3725-3735.
- Cheeke, P. R. & Dierenfeld, E. S. (2010) Carbohydrate digestion and absorption. In: *Comparative animal nutrition and metabolism.* 95-103. Cambridge: CAB International.
- Cohen, J. (1960) A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement.* 20(1):37-46.
- Custer, E. M., Myers, J. L., Poffenbarger, P. L. & Schoen, I. (1983) The storage stability of 3-hydroxybutyrate in serum, plasma and whole blood. *American Journal of Clinical Pathology.* 80(3):375-380.
- Dohoo, I. R., Wayne, M. & Stryhn, H. (2009) *Veterinary epidemiologic research.* 2nd ed. Charlottetown: AVC Inc.
- Duffield, T. F., Kelton, D. F., Leslie K. E., Lissemore K. D. & Lumsden J. H. (1997) Use of test day milk fat and milk protein to detect subclinical ketosis in dairy cattle in Ontario. *Canadian Veterinary Journal.* 38(11):713-718.
- Duffield, T. F. (2000) Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 16(2):231-253.
- 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.
- Eicher, R., Liesegang, A., Bouchard, E. & Tremblay, A. (1999) Effect of cow-specific factors and feeding frequency of concentrate on diurnal variations of blood metabolites in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research.* 60(12):1493-1499.
- Emery, R. S. (1988) Milk fat depression and the influence of diet on milk composition. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 4(2):289-305.
- Enjalbert, F., Nicot, M. C., Bayourthe, C. & Moncoulon, R. (2001) Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science.* 84(3):583-589.

- Foster, L. A. (1988) Clinical ketosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 4(2):253-226.
- Geishauser, T., Leslie K., Duffield, T. & Edge, W. (1997) Evaluation of aspartate aminotransferase activity and β -hydroxybutyrate concentrations in blood as test for prediction of left displaced abomasums in dairy cows. *American Journal of Veterinary Research*. 58(11):1216-1220.
- Geishauser, T., Leslie K., Kelton, D. & Duffield, T. (1998) Evaluation of five cow-side tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 81(2):438-443.
- Geishauser, T., Leslie K., Tenhag, J. & Bashiri, A. (2000) Evaluation of eight cow-side tests in milk for detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 83(2):296-299.
- Herd, T. H. (1988) Fuel Homeostasis in the ruminant. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 4(2):213-231.
- Herd, T. H. (2000) Ruminant adaption to negative energy balance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 16(2):215-230.
- Holtenius, P. & Holtenius, K. (1996) New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: A Review. *Journal of Veterinary Medicine A*. 43(10):579-587.
- Holtenius, P. (1997) Störningar i energiomsättningen hos mjölkkor. *Svensk Veterinärtidning*. 49(6):277-283.
- Ingvarsen, K. L & Andersen, B (2000) Intergration of metabolism and intake regulation: A review focusing on periparturient animals. *Journal of Dairy Science*. 83(7):1573-1597.
- Iwerson, M., Falkenberg, U., Voigtsberger, R., Forderung, D & Heuweiser, W. (2009) Evaluation of an electronic cow-side test to detect subclinical ketosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 92(6):2618-2614.
- LeBlanc, S. (2010) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development*. 56:S29-35.
- LeBlanc, S. J., Leslie, K. E. & Duffield, T. F. (2005) Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 88(1):159-170.
- Lin, L. I. (1989) A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*. 45(1):255-268.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008a) The citric acid cycle. In: *Principles of Biochemistry*. 5th ed. 615-646. New York: Freeman.
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. (2008b) Fatty acid catabolism. In: *Principles of Biochemistry*. 5th ed. 647-672. New York: Freeman.
- Nielen, M., Aarts, M. G., Jonkers, A. G., Wensing, T. & Schukken, Y. T. (1994) Evaluation of two cow-side tests for the detection of subclinical ketosis in dairy cows. *Canadian Veterinary Journal*. 35(4):229-232
- Oetzel, G. R. (2004) Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 20(3):651-674.
- Pond, W. G., Church, D. C., Pond, K. R. & Schoknecht, P. A. (2005) Carbohydrates. In: *Basic animal nutrition and feeding*. 5th ed. 73-90. Hoboken: Wiley.
- Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, K. W. & Constable, P.D. (2007) Metabolic diseases. In: *Veterinary medicine: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10th ed. 1613-1690. Edinburgh: Saunders Elsevier.

- Rukkwamsuk, T., Kruip, T. A., & Wensing, T. (1999) Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *The Veterinary Quarterly*. 21(3):71-77.
- Schultz, L. H. (1968) Ketosis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 51(7):1133-1140.
- Stengärde, L. (2010) Displaced abomasum and ketosis in dairy cows. Diss. Uppsala: Sveriges lantbruksuniversitet.
- Työppönen, J. & Kauppinen, K. (1980) The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions. *Acta Veterinaria Scandinavia*. 21(1):55-61.
- VandeHaar, M. J. (2005) Dairy Cattle. In: Pond, W. G., Church, D. C., Pond, K. R. & Schoknecht, P. A. *Basic animal nutrition and feeding*. 5th ed. 413-428. Hoboken: Wiley.
- Wibell, L. (2002) Hyperglykemi och ketoacidosis. In: Agardh, C., Berne, C., & Östman, J. *Diabetes*. 158-169. Stockholm: Liber.

Elektroniska dokument

- Svensk Mjök (2011) Husdjursstatistik. [online]. Tillgänglig:
<http://www.svenskmjolk.se/Global/Dokument/Dokumentarkiv/Statistik/Husdjursstatistik%202011%20-%20webb.pdf> [2011-10-27]