

## Eesti Maaülikool

# Piima metaboliitidel põhineva rasva ainevahetushaiguste ennetamise süsteemi väljatöötamine ja juurutamine Eesti jõudluskontrolli süsteemis

Projekti juht: Meelis Ots  
Projekti täitjad: Hanno Jaakson  
Hedi Harzia  
Airi Ilves  
Ivi Jõudu  
Olav Kärt

Tartus, 2011

## PROJEKTI LÕPPARUANNE<sup>5</sup>

**1. PROJEKTI NIMETUS: Piima metaboliitidel põhineva rasva ainevahetushaiguste ennetamise süsteemi väljatöötamine ja juurutamine Eesti jõudluskontrolli süsteemis**

**2. PROJEKTI NIMETUS INGLISE KEELES: Developing and implementing of the prevention system for lipid-related metabolic disorders, based on milk metabolites**

**3. PROJEKTI KESTUS**

**Algus:** 2008

**Lõpp:** 2010

### **4. PROJEKTI LÕPPARUANDE LÜHIKOKKUVÕTE:**

Projekti eesmärgiks oli piima metaboliitidel (atsetoon - AC ja  $\beta$ -hüdroksüvõihappe - BHB) põhineva rasvadega seotud ainevahetushaiguste ennetamise süsteemi väljatöötamine ja juurutamine Eesti Jõudluskontrolli süsteemis, karja tervise seire ja saadud tulemustele vastava söötmisalase nõuande väljatöötamine.

Algselt selgitati ketokehade võimalikke piimast määramise meetodeid. Selle eesmärgiks oli leida sobivad referentsmeetodid Jõudluskontrolli Keskuse piimaanalüüside labori tarvis. Leiti, et piima AC-sisalduse referentsmeetodiks sobib gaaskromatograafiline meetod ja BHB määramiseks fluoromeetiline meetod.

Et kontrollida jõudluskontrolli raames kogutud piimaproovidest ketokehade määramise täpsust, selgitasime hommikusest ja õhtusest lüpsist ning värskelt ja jõudluskontrolli raames kogutud piimaproovide ketokehade sisalduste kõikumiste erinevusi. Leidsime, et piima AC-sisalduste kõikumine on minimaalne ( $R^2 > 0,96$ ), BHB-sisalduse varieeruvus aga suur ( $R^2 = 0,25$ ) ning seda eeskätt toona kasutatud määramismetoodika tõttu.

Loomkatsetes uuriti insuliiniresistentsuse kui keharasvade mobilisatsiooni mõjutava ning ketoosi ja maksa rasvumise väljakujunemises olulist rolli mängiva ainevahetusliku regulatsioonimehhanismi esinemist eesti holsteini ja eesti punast tõugu lehmadel. Leidsime, et eesti holsteini tõugu lehmadel on võrreldes punase tõuga selgemalt väljendunud insuliiniresistentsus, mis avaldus nõrgemas glükoosi infusiooniga esile kutsutud insuliinivastuses ja maksa triglütseriidide resünteesisivõime languses. Samas väljendus mõlemal tõul insuliini lipolüüsi inhibeeriv toime.

Tuginedes kirjandusele ja omadele uuringutele pakkusime välja neli piima AC klassi: 1) AC-sisaldus  $< 0,40$  mmol/l, füsioloogiline (normaalne) tase; 2) AC-sisaldus  $0,40-1,00$  mmol/l, subkliiniline ketoos; 3) AC-sisaldus  $1,01-2,00$  mmol/l AC, kliinilise ketoosi kahtlus; AC-sisaldus  $>2,01$  mmol/l AC, kliiniline ketoos. Piimas BHB-sisalduse piirväärtuseks subkliinilise ketoosi korral on  $0,2$  mmol/l ja kliinilise ketoosi korral  $0,5$  mmol/l.

Ketoosil eristatakse kliinilise ja subkliinilise vormi kõrval ka erinevaid tüüpe. Eristatakse I ja II tüüpi ning alimenter ketoosi. Ketoosi eri tüüpidel on erinev etioloogia ja sellest tulenevalt ka erinev ennetamise strateegia. Samas võivad ketoosi eri tüübid farmis kattuda ja esineda kombineeritult. I tüüpi ketoosi seostatakse energia prekursorite vähesusega söödaratsioonis ja seda aitab ära hoida lehmade nõuetekohane poegimisjärgne söötmine ning selle korraldus. II tüüpi ketoos tekib harilikult mõne eelneva haiguse, näiteks rasvunud maksa, vatsa atsidoosi, libediku paigalt nihkumise, jäsme haiguse tagajärjel. Selle ennetamine on keerulisem, sest jälgida tuleb nii kinnisperioodi eelset, kinnisperioodi ja poegimisjärgset söötmist ning selle korraldust. Alimenter ketoosi põhjustab märg võihaperikas rohusilo ja selle vältimine seisneb riknenud silo hävitamises, eemaldamises või n-õ lahjendamises.

Karja ainevahetusliku seisundi (ketoosi esinemise) seire toimus projekti kolmandal aastal. Et Jõudluskontrolli Keskuse piimalaboril puudusid toona piima ketokehade määramiseks nii tehnilised võimalused kui ka rahalised vahendid nende soetamiseks, siis viidi projekti käigus kavandatud seire läbi neljas meiega koostööd tegevas erineva suurusega vabapidamisega farmis. Selleks analüüsiti viie kuu vältel laktatsiooni algusfaasis lehmade jõudluskontrolli proovide piima AC-sisaldust, kasutades kiirtesti *Aceton-test*. Arvestasime, et farmis (karjas) on tekkinud subkliinilise ja/või kliinilise ketoosi oht siis, kui kümnel protsendil uuritud loomadest on piima AC-sisaldus suurem kui  $0,4$  mmol/l. Sellist 10% künnise ületamist pidasime ohu signaaliks, mis sunniks selgitama võimaliku probleemi olemust. Kui ketokehade sisaldus suureneb enam kui 20% uuritud loomadest tuleb muuta

söötiskorraldust. Seire käigus selgus, et kahes farmis ületati kahel kuul järjest 10% piir. Probleemi analüüsid selgus, et mõlemal juhul oli tegemist ebakvaliteetse võihapperikka silo söötmisega. Olukord paranes, kui silo vahetati.

Ketoosi diagnoosimiseks on maailmas välja töötatud mitmeid võimalusi. Eesti jõudluskontrolli süsteemis kasutatakse praegu selleks piima rasva- ja valgusisalduse suhet, mis paraku aga ei peegelda tegelikku ainevahetuslikku olukorda (ketoosi esinemist) farmis. Võrreldes projekti käigus uuritud piimaproovide AC-sisaldust ja rasva-valgu suhet leidseime, et kui piimast määrata rutiinselt ketokehi, siis on ketoosi kahtluse avastamine 4,4 korda täpsem kui piima rasva- ja valgusisalduse suhte alusel.

**Kokkuvõtteks.** Projekti käigus leidsime, et karja (söötisrühvi) keskmisena saame laktatsiooni algusfaasis lehmade ainevahetuslikust seisundist parema ülevaate piima ketokehade alusel kui seni kasutatud piima rasva- ja valgusisalduse suhtest alusel. Paraku ei ole veel juurutatud piimast ketokehade määramisel põhinevat ketoosi ennetamise süsteemi Eesti jõudluskontrolli süsteemis. Küll on aga piimatootjad selle vastu suurt huvi üles näidanud. On teada, et Jõudluskontrolli Keskuse piimalabor soetab 2011. aasta esimesel poolel uue piimaanalüsaatori, ja me loodame, et sellega ostetakse kaasa ka ketokehade määramiseks vajalik riist- ja tarkvara, mis annab meile võimaluse rakendada tänased teadmised praktikasse.

## 5. LÜHIKOKKUVÕTE INGLISE KEELES :

The main objectives of the project are the following: development and implementation of a prevention system, based on the determination of milk metabolites (acetone - AC and  $\beta$ -hydroxybutyrate - BHB), for lipid-related metabolic disorders, cattle health monitoring; and the development of feeding recommendations based on the outcome of the project.

First we clarified milk ketone body measurement methods. The purpose was to find reliable reference methods for the Animal Recording Centre milk laboratory. We found that the best method to measure milk AC content was the gas chromatographic method, and to the best method to measure milk BHB was the fluorometric method.

We analysed differences in ketone bodies between morning and evening milkings, and from self-collected milk and milk samples collected by the Animal Recording Centre (which were routinely treated with the preservative Bronopol and heated). We found that variation of milk AC was minimal ( $R^2 > 0.96$ ), but the variation of BHB was greater ( $R^2=0.25$ ) because of the less reliable chemical measurement method that was then used.

In animal experiments we investigated the relationships between insulin resistance and body fat mobilisation, and the consequent likelihood of cows developing ketosis and fatty liver syndrome. This was studied on two breeds of local cows; Estonian Red and Estonian Holstein. In our study a less pronounced glucose-induced increase in blood insulin concentration was accompanied by higher blood glucose concentrations in Estonian Holstein compared to Estonian Red cows. In response to glucose-induced insulin secretion, lipolysis in adipose tissue and ketogenesis in the liver were reduced during the Glucose Tolerance Test in both breeds. Blood triglyceride concentration in Estonian Holsteins during the Glucose Tolerance Test decreased, while in the Estonian Reds the triglyceride level remained largely unchanged.

Based on the literature, and on our investigations, we suggest the four following acetone classes: class 1:  $< 0.40$  mmol/l acetone (normal physiological range); class 2:  $0.40-1.00$  mmol/l acetone (subclinical ketosis); class 3:  $1.01-2.00$  mmol/l acetone (suspicion of clinical ketosis); class 4:  $> 2.01$  mmol/l acetone (clinical ketosis). Based on the literature we also suggest additional threshold values for milk BHB: subclinical ketosis,  $0.2$  mmol/l and clinical ketosis,  $0.5$  mmol/l.

Ketosis can be subclinical or clinical, although there are in addition different types of ketosis; type I, type II and alimentary ketosis. Each have different aetiologies, and therefore different prevention strategies. There may be a combination of ketosis types within herds, and even within single animals. Type I ketosis is a result of a lack of energy precursors in the ration, and prevention involves accurate postpartum feeding and management. Type II ketosis is a secondary condition following a different disease, such as fatty liver disease, rumen acidosis, displaced abomasum and leg disorders. Prevention for this type is more complicated, and feeding and management during the dry period and pre-dry period, as well as the postpartum period, should be considered. Alimentary ketosis is caused by low DM, butyric acid-rich grass silage. Prevention is by destroying the silage, diluting with better quality silage, or feeding it to less vulnerable cows.

The monitoring of herds' metabolic status, in particular the incidence of ketosis, was carried out in the third year of the project. Because of economic and technical reasons at the Milk Recording Centre milk laboratory we had no possibility to measure ketone bodies routinely. Therefore, in our laboratory, we estimated the metabolic rate of postpartum cows over five months using the *Acetone* on-farm test, in four cubicle housing farms of different sizes. Herd subclinical and/or clinical ketosis was determined at a milk acetone concentration of greater than  $0.4$  mmol/l in more than 10% of cows. This threshold figure was the alarm signal alerting the producer to take corrective measures. If the figure was higher than 20% the feeding and management strategies must be changed. When the

four different farms were tested monthly we found that two of the farms had higher acetone concentrations in milk than the normal range for two consecutive months. The problem was identified as poor quality silage, high in butyric acid.

There are different possibilities to diagnose ketosis. Today, in the Estonian animal recording system, the milk fat:protein ratio is used to detect subclinical ketosis in cows; but unfortunately this does not reflect the true metabolic status (occurrence of ketosis) on the farm. Comparing collected milk acetone and milk fat and protein ratio data, we conclude that if the milk acetone content is measured, subclinical ketosis can be detected 4.4 times more effectively than if the milk fat and protein ratio is used.

**Summary.** During the project we found that, in an average herd (feeding group), we can get a better picture of the metabolic status of post-partum cows according to milk ketone bodies than according to the presently-used milk fat:protein ratio method. Unfortunately, for reasons beyond our control, we have not had the possibility to put our findings into practice in the Estonian animal recording system. Indeed, the dairy farmers have expressed great interest in these findings. We are aware that the Estonian Milk Recording laboratory will purchase a new milk analyser in the first half of 2011, and we hope that this purchase will include a programme and calibration for ketone bodies. This will allow us to put into practice the knowledge that we have gained during this project.

## 6. TEEMA RAAMES ILMUNUD PUBLIKATSIOONID:

Samarütel, J.; Waldmann, A.; Ling, K.; Jaakson, H.; Kaart, T.; Leesmäe, A.; Kärt, O. 2008. Relationships between luteal activity, fertility, blood metabolites and body condition score in multiparous Estonian Holstein dairy cows under different management. *Journal of Dairy Research*, 75(04):485-490.

Ots, Meelis; Henno, Merike; Ling, Katri; Arney, David; Kärt, Olav (2009). Milk fatty acid composition and fat-feeding strategies in Estonia. In: *Proceedings of the Feed for Health: 1st International Workshop [COST Action FA0802 Joint Meeting WG 1, 2, 3, 4 2nd Management Committee]: Feed for Health: 1st International Workshop*, 16-17 March 2009, Milan, Italy, 28.

Hanno Jaakson, Katri Ling, Jaak Samarütel, Aire Ilves, Tanel Kaart and Olav Kärt (2009). Effect of body condition score at parturition on blood glucose and insulin responses during the glucose tolerance test in Estonian Holstein and Estonian Red cows. In: *Proceedings of the 11th International Symposium on Ruminant Physiology*, 6-9 September, 2009, Clermont-Ferrand, France, 542-543.

Jaakson, Hanno; Ling, Katri; Samarütel, Jaak; Ilves, Aire; Kaart, Tanel; Kärt, Olav (2010). Field trial on glucose-induced insulin and metabolite responses in Estonian Holstein and Estonian Red dairy cows in two herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(4), 1 - 7.

Samarütel, Jaak; Jaakson, Hanno; Ling, Katri; Waldmann, Andres; Kaart, Tanel; Ilves, Aire; Kärt, Olav (2010). A Study on Glucose-induced Insulin Response and Time of Onset of Luteal Activity in Dairy Cows. Geert Opsomer (Toim.). Book of Proceedings. *14th International Conference on Production Diseases in Farm Animals* (28 - 29). Ghent: University Press

Ling, Katri; Kaart, Tanel; Vallas, Mirjam; Samarütel, Jaak; Ots, Meelis; Jaakson, Hanno; Henno, Merike; Kärt, Olav (2010). Negative Energy Balance of Primiparous Dairy Cows Reared on Different Farms. Geert Opsomer (Toim.). Book of Proceedings. *14th International Conference on Production Diseases in Farm Animals* (143 - 144). Ghent: University Press

Meelis Ots, Tiia Ariko, Hedi Harzia, Jaak Samarütel, Merike Henno, Olav Kärt. 2010. Mis võimalusi pakub lähitulevik lehmade tervise ja söötmise hindamisel. *Piimafoorum 2010*, lk. 35-37.

<b>Projekti juht (Meelis Ots):</b>	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev: 22.02.2011</b>
<b>Taotleja esindaja kinnitus aruande õigsuse kohta (Toomas Tiirats):</b>	<b>Allkiri:</b>	<b>Kuupäev: 22.02.2011</b>

Projekti lõpparuande täitmise juhend on kättesaadav Põllumajandusministeeriumi koduleheküljel

<http://www.agri.ee>

Üheks sagedasemaks probleemiks suure tootlikkusega piimakarjades võib pidada ketoosi esinemist. Viimase näol on tegemist energia ainevahetushaigusega, mis väljendub vere, piima ja uriini suurenenud ketokehade sisalduses. Olenevalt ketokehade kontsentratsioonist kehavedelikes eristatakse ketoosi kliinilist ja subkliinilist (varjatud) vormi. Esimesel juhul saame looma haiguses kergesti veenduda, siis subkliinilist ketoosi on väliste tegurite järgi raske diagnoosida, kuivõrd selgepiirilised haigustunnused puuduvad. Samas on teada, et see toob endaga kaasa nii piimatoodangu kui ka reproduktsioonijõudluse languse, vähendades nii piimatootmise kasumlikkust.

Ketoosi diagnoosimiseks on maailmas välja töötatud mitmeid võimalusi. Eesti jõudluskontrolli süsteemis kasutatakse praegu selleks piima rasva- ja valgusisalduse suhet, mis paraku aga ei peegelda tegelikku ainevahetuslikku olukorda (ketoosi esinemist) farmis. Seetõttu pidasime Eestis ketoosi varaseks avastamiseks kasutusele võtta lisaks piima rasva ja valgusisalduse suhtele ka meetodid, mis baseeruvad ketokehade rutiinsel määramisel piimast.

Projekti eesmärgiks oli piima metaboliitidel (atsetoon ja  $\beta$ -hüdroksüvõihappe) põhineva rasvade seotud ainevahetushaiguste ennetamise süsteemi väljatöötamine ja juurutamine Eesti Jõudluskontrolli süsteemis, karja tervise monitooring ja saadud tulemustele vastava söötmisalase nõuande väljatöötamine.

Projekti põhitulemused on kokku võetud raamatus *Uurimistulemusi ja seisukohti piimalehmade söötmisel* (toimetaja O. Kärt, Tartu, 2011) peatükis 8<sup>1</sup>. Lisaks leiab lehmade söötmise ja söömust mõjutavate toitumuslike tegurite kohta teavet peatükkidest 1.3 ja 2. Põhjalikum ülevaade rasvade ainevahetusest ja insuliini-resistentsusest on toodud peatükis 3. Projekti põhitulemused kantakse ette EMÜ Veterinaarmeditsiini ja loomakasvatusteaduste instituudi poolt 17.-18. Märtsil 2011 korraldataval konverentsil *Terve loom ja tervislik toit 2011*.

Et nimetatud raamatus ei käsitleta ketokehade (atsetoon,  $\beta$ -hüdroksüvõihape) võimalikke määramismeetodeid piimast, siis on need toodud alljärgnevalt. Meetodikate väljatöötamise eesmärgiks oli leida sobivad referentsmeetodid Jõudluskontrolli Keskuse piimaanalüüside labori tarvis.

**Piimaproovide eeltöötlus.** Ketokehade määramiseks sobis paremini piimaproovide eeltöötlus triklooräädikhappega. Toimiti järgnevalt: kõigepealt pipeteeriti tsentrifuugi klaasi 10 mL uuritavat piima, 100  $\mu$ L 1% värskelt valmistatud isopropanooli lahust ja 500  $\mu$ L 3M/l värskelt valmistatud triklooräädikhappe lahust. Seejärel loksutati proovi 1 minut ja tsentrifuugiti (3000g) 20 minutit. Tsentrifugimise tagajärjel proov kihistus: valk jäi põhja ja rasv peale, keskele jäi veefaas. Viimasest võeti ettevaatlikult süstlaga 2mL (1mL atsetooni ja 1mL BHB määramiseks) lahust, mis pipeteeriti eraldi epiidisse. Eeltöödeldud piimaproovid säilitati analüüsimiseni sügavkülmikus -20°C juures.

**Atsetooni määramine piimaproovidest.** Külmutatud eeltöödeldud piimaproov sulatati ja neutraliseeriti kolonni ja süstla säästmise eesmärgil (pH 6,5...7,0) 3M kaaliumfosfaadi lahusega. Tekkinud sade tsentrifuugiti. Analüüsimiseks kasutati veefaasi, millest 1,5 $\mu$ L süstiti gaaskromatograafi Varian 3900. Kromatograafis kasutati joajagamist 1/10 ja kandegaasiks heeliumit, kiirusega 0,8m/s. Kromatograaf oli varustatud kolonniga DB-FFAP (pikkus 30m, diameeter 0,53  $\mu$ m), mida köeti järgnevalt: 3 minutit 45°C (selle ajaga tulevad kolonnist välja detektorisse nii atsetoon kui ka isopropanool), siis tõstetakse kolonni temperatuuri kiirusega

---

<sup>1</sup> Kuivõrd raamat on aruande esitamise ajal veel trükikojas, siis on see aruandele lisatud CD kettal.

30°C minutis 220°C juurde ning hoitakse saavutatud temperatuuri 2 minutit. Kolonni kütmine oli vajalik selleks, et eelmises proovis olevad ained ei segaks järgmise proovi atsetooni määramist. Leiti, et atsetooni määramiseks võib kasutada ka teisi vett taluvaid kolonne, näiteks täidiskolonni 4% Carbowax 20M, matrix 80/120 Carbopack B-DA.

Atsetooni kogus piimaproovidest leiti kasutades järgnevat valemit:

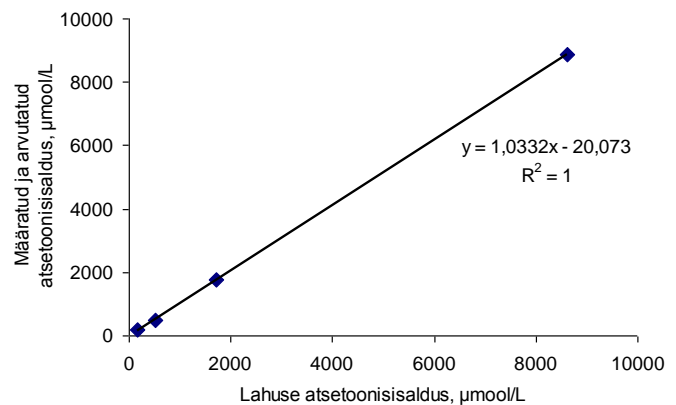
$$AC_p = \frac{AC_{st} \times IP_{pst} \times AC_{pp}}{AC_{pst} \times IP_{pp}}, \text{ kus}$$

AC<sub>p</sub> on atsetooni sisaldus uuritavas proovis (µmool/L); AC<sub>st</sub> on atsetooni sisaldus standardis (µmooli/L); IP<sub>pst</sub> on isopropanooli piigi suurus standardis; AC<sub>pp</sub> on atsetooni piigi suurus uuritavas proovis; AC<sub>pst</sub> on atsetooni piigi suurus standardis ja IP<sub>pp</sub> pn isopropanooli piigi suurus uuritavas proovis.

Igal atsetooni määramise päeval oli vaja koostada vastav kalibreering (tabel 1 ja joonis 1). Kalibreerimiseks võeti 10mL destilleeritud vett, millele lisati 0,1mL 1% isopropanooli lahust ja kindel kogus atsetooni. Lahuste koostamisel tuli jälgida, et laboratooriumis ei kasutataks enne ja kalibreeringu tegemise ajal atsetooni.

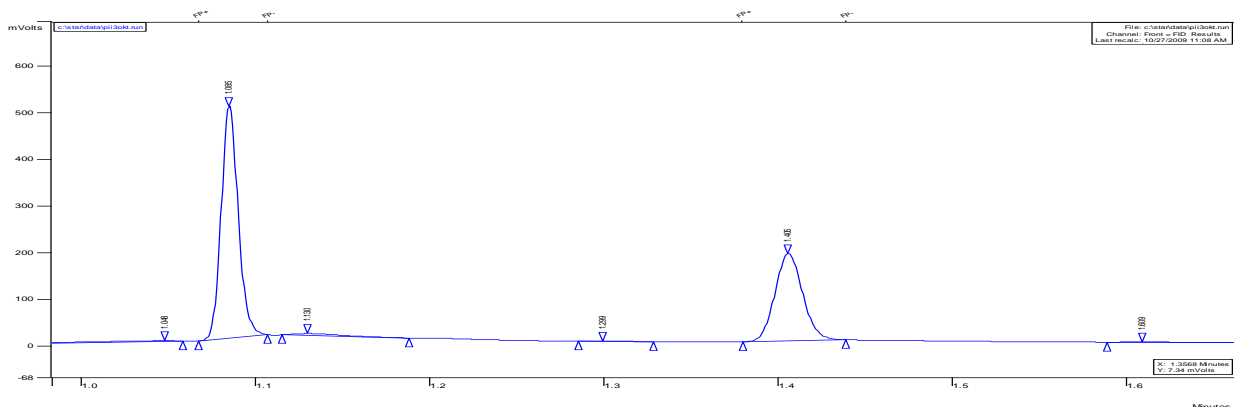
**Tabel 1.** Atsetooni kalibreeringu andmed.

Kalibreerimislahuse atsetooni-sisaldus, µmool/L	Kromatograafia määratud ja arvutatud kalibreerimislahuse atsetoonisisaldus, µmool/L
172	178
517	497
1724	1757
8621	8888



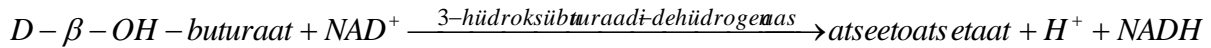
**Joonis 1.** Atsetooni kalibreering.

Joonisel 2 on näitena toodud kromatograafilise meetodiga leitud piima atsetoonisisaldus, mis antud juhul oli 3332 µmool/L.



**Joonis 2.** Piima kromatogramm. Esimene piik näitab atsetooni, teine isopropanooli.

***β-hüdroksüvõihape (BHB) määramine piimast.*** BHB määramiseks piimast kasutasime projektis ensümaatilist meetodit, kus BHB määratakse BHB dehüdrogenaasi (nt Ranbut) abil, mille toimel BHB-st tekib NAD (koensüüm - nikotiinamiid adeniin dinukleotiid) juuresolekul atsetoatsetaat ja NADH (NADi redutseeritud vorm), millest viimase kogus määratakse spektrofotomeetriliselt lainepikkusel 340 nm.



Antud meetodika on laialt levinud, usaldatav ja täpne BHB sisalduse määramiseks verest. Piimast antud BHB spektromeetiline määramismetodika aga nii täpseks ei osutunud, sest piim ei ole piisavalt läbipaistev proovimaatriks spektromeetriliseks määramiseks. Saavutamaks proovi läbipaistvust, mis on spektromeetriliseks määramiseks mõõdapääsmatu, kasutasime piimaproovide eeltötlust triklooräädikhappega, mis aga tõi paratamatult kaasa proovis BHB kontsentratsiooni languse ning mõõtetäpsuse/korratavuse vähenemise. Taani Põllumajandusteaduste Instituudis on väljatöötatud ja juurutatud BHB fluoromeetrilise määramise meetodika, mis võimaldab BHBd määrata ilma proovi eeltötluseta ka mitteläbipaistvatest proovidest nagu näiteks piim.

***BHB fluoromeetrilise määramise meetodika piimast.*** Piimast BHB määramiseks esimeses etapis toimub BHB ensümaatiline oksüdatsioon:  $BHB + NAD^+ \leftrightarrow \text{atsetoatsetaat} + NADH + H^+$ , millele järgneb tekkinud NADH oksüdatsioon resatsuriiniga:  $NADH + H^+ + \text{resatsuriin} \leftrightarrow \text{resorufiin} + NAD^+$ . Protsess on küll pöörduv kuid nõrgalt aluselises keskkonnas nihutatud paremale. Tekkiv resorufiin määratakse fluromeetriselt emissioonil 575 nm juures peale ergastust 544 nm juures. Samades tingimustes toimuda võiv kõrvalreaktsioon, laktaadi oksüdatsioon püruvaadiks, mille käigus tekib samuti  $NADH + H^+$ , surutakse maha oksaamhappe lisamisega substraadile.

Eespool kirjeldatud fluoromeetiline meetodika BHB määramiseks on näidanud end väga usaldusväärseks ning tulemused on heas kooskõlas ensümaatilise spektromeetrilise meetodiga kui BHB määramine on toimunud verest või uriinist. Kui võrrelda vere plasmast ja piimast tehtud spektromeetriselisi BHB mõõtmisi, siis tänu piima mitte nii homogeensele maatriksile on mõõtetäpsus piima korral väiksem ja seda eeskätt väiksemate BHB kontsentratsioonide piirkonnas. Piimast BHB fluromeetrilise määramise ilmne eelis on see, et piim ei vaja täiendavat eeltötlust läbipaistvuse saavutamiseks. Eeltötluse vältimine on oluline seetõttu, et piimas on BHB sisaldus väiksem kui veres ning seega ei ole vajadust täiendavate reagentide lisamiseks, mis tooksid kaasa proovi täiendava lahjendamise ning seeläbi mõõtetäpsuse kaasneva vähenemise. Kirjeldatud fluoromeetiline BHB määramise meetodika on sobilik rakendada piimale ilma täiendava eeltötluseta. Kahjuks ei olnud võimalik antud meetodikat meie laboris katsetada/rakendada kuna puudus selleks vajalik aparatuur (fluoromeeter).