



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

Ensayos para la determinación de Haptoglobina y Proteína C reactiva en muestras de saliva y jugo cárnico y estudios proteómicos preliminares en saliva porcina.

Memoria presentada por la licenciada Ana María Gutiérrez Montes para
optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Agradecimientos.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a:

Los directores de esta Tesis, el Profesor y Doctor D. José Joaquín Cerón Madrigal y la Profesora y Doctora Dña. Silvia Martínez Subiela, del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, por su dedicación, su confianza y apoyo, y especialmente por su paciencia. Sin ellos no hubiera sido posible realizar este trabajo.

A D. Peter David Eckersall, Profesor y Doctor de la Universidad de Glasgow, por su colaboración para el desarrollo de la experiencia 2 de esta Tesis y por su motivación para continuar trabajando en el campo de las proteínas de fase aguda.

A D. José Yelamos y su equipo de investigación, de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Virgen de la Arrixaca, por enseñarme pacientemente a trabajar en cultivos celulares durante mi estancia en su laboratorio.

A D. Manfred Geimener y Dña. Ingrid Miller, del Departamento de Ciencia Biomédica de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, por transmitirme sus conocimientos sobre proteómica, por hacer lo posible para obtener los resultados a tiempo y apoyarme en todo momento.

A D. Juan Cabezas Herrera, investigador del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Virgen de la Arrixaca, por su colaboración en este trabajo y su incesante ayuda en el campo de la inmunología.

A mis compañeros de investigación Dña. Maria Dolores Parra Muñoz, Dña. Laura Soler Vasco y D. Pablo Fuentes Pardo, por su ayuda directa en la realización de este trabajo y por su apoyo personal constante.

A mis compañeros Profesores y Doctores, D. Juan Sotillo Mesanza, D. Luis Bernal Gambín, D. Fernando Tecles Vicente, D. Ignacio Ayala de la Peña, por haberme apoyado y prestado su colaboración cuando fue necesario.

Al resto de compañeros de Departamento, tanto Profesores, Alumnos internos como Becarios, por crear un ambiente de trabajo tranquilo y eficiente, y por su apoyo

desinteresado.

A mis padres D. Cándido Gutiérrez Panizo y Dña. Ana María Montes Cepeda, por haberme guiado en el mundo de la investigación y haberme mostrado sus propias experiencias profesionales y personales para que me sirvieran como ejemplo de lucha. Por su confianza, su paciencia incondicional y por su cariño.

A mi hermano, Cándido, por su apoyo y confianza. Por recordarme siempre la suerte que he tenido por poder realizar este trabajo. Por mostrarme lo duro pero a la vez divertido que es el mundo de la investigación y la enseñanza.

A mis tíos, Cari y Pepe, por su apoyo desinteresado y por no desistir en ayudarme con los misterios informáticos que me han permitido optimizar el tiempo.

A Jorge, por su comprensión y paciencia, por acompañarme todos y cada uno de los fines de semana y vacaciones que he pasado trabajando en esta Tesis, por venir a Murcia a compartir su vida conmigo y darme todo su cariño y apoyo.

A mi compañera veterinaria y amiga Marta, por su motivación y confianza. Por estar siempre a mi lado.

A mis amigas, Ana Elena, Sole, Kika, Gloria y María, por preocuparse siempre de mi futuro profesional y darme ánimos para continuar con mi trabajo.

A mis amigos, Luis, Felipe y Mar, por estar siempre cerca apoyándome e intentando distraerme cuando me sentía saturada y estresada.

A todos y cada una de las personas que en cierto modo, directo o indirecto, me han ayudado en la realización de esta Tesis.

GRACIAS A TODOS

Índice.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ○ Introducción | 7 |
| ○ Revisión bibliográfica | 13 |
| Sección 1: Proteínas de fase aguda | 15 |
| 1.1. Principios de la reacción de fase aguda | 15 |
| 1.2. Generalidades sobre las proteínas de fase aguda | 16 |
| 1.3. Características principales de las PFA objeto del estudio | 18 |
| Sección 2: El jugo cárnico y la saliva en medicina veterinaria | 24 |
| 2.1. El jugo cárnico como muestra analítica alternativa en el ganado porcino | 24 |
| 2.2. La saliva como muestra analítica alternativa en el ganado porcino | 26 |
| Sección 3: Inmunofluorometría en tiempo retardado (TR-IFMA) | 29 |
| 3.1. Orígenes de la TR-IFMA | 29 |
| 3.2. Principios básicos de la TR-IFMA | 30 |
| 3.3. Tipos de inmunoensayos basados en TR-IFMA | 33 |
| 3.4. Ventajas de la TR-IFMA como técnica analítica | 34 |
| 3.5. Aplicaciones prácticas de la TR-IFMA en medicina veterinaria | 36 |
| Sección 4: Proteómica | 37 |
| 4.1. Introducción a la proteómica | 37 |
| 4.2. Electroforesis en 1 y 2 dimensiones | 38 |
| 4.3. Espectrofotometría de masas | 41 |
| ○ Material y métodos común | 45 |
| Sección 1: Equipos y reactivos utilizados en el desarrollo de los inmunoensayos | 47 |
| 1.1. Equipos | 47 |
| 1.2. Reactivos comunes utilizados en los inmunoensayos | 49 |
| Sección 2: Descripción general de los inmunoensayos a tiempo retardado desarrollados | 50 |
| Sección 3: Marcaje de anticuerpos de captura y de detección | 50 |
| 3.1. Biotinación de anticuerpos de captura | 50 |
| 3.2. Marcaje de anticuerpos de detección con europio | 52 |
| Sección 4: Toma de muestras biológicas | 55 |
| 4.1. Toma de muestra sanguínea | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2. Toma de muestra salivar | 56 |
| 4.3. Toma de muestra cárnica..... | 56 |
| o Experiencia 1: Ensayo para la determinación de Haptoglobina porcina en muestras de saliva y jugo cárnico | 59 |
| Sección 1: Introducción..... | 61 |
| Sección 2: Material y métodos | 62 |
| 2.1. Producción de anticuerpos monoclonales | 62 |
| 2.2. Marcaje de anticuerpos..... | 75 |
| 2.3. Desarrollo y optimización del inmunoensayo..... | 75 |
| 2.4. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en saliva porcina | 79 |
| 2.5. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en jugo cárnico porcino..... | 80 |
| 2.6. Estabilidad de la Hp en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación | 81 |
| 2.7. Estudio estadístico..... | 81 |
| Sección 3: Resultados..... | 82 |
| 3.1. Producción de anticuerpos monoclonales | 82 |
| 3.2. Desarrollo y optimización del inmunoensayo..... | 84 |
| 3.3. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en saliva porcina | 89 |
| 3.4. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en jugo cárnico porcino | 91 |
| 3.5. Estabilidad de la Hp en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación..... | 93 |
| Sección 4: Discusión | 95 |
| o Experiencia 2: Ensayo para la determinación de proteína C reactiva porcina en muestras de saliva y jugo cárnico | 99 |
| Sección 1: Introducción..... | 101 |
| Sección 2: Material y métodos | 102 |
| 2.1. Marcaje de anticuerpos..... | 102 |

| | |
|---|------------|
| 2.2. Optimización de las diluciones de saliva y jugo cárnico a emplear en el ensayo | 102 |
| 2.3. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en saliva porcina..... | 103 |
| 2.4. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en jugo cárnico porcino | 104 |
| 2.5. Estabilidad de la CRP en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación..... | 105 |
| 2.6. Estudio estadístico | 105 |
| Sección 3: Resultados | 106 |
| 3.1. Optimización de las diluciones de saliva y jugo cárnico a emplear en el ensayo..... | 106 |
| 3.2. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en saliva porcina..... | 107 |
| 3.3. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en jugo cárnico porcino..... | 109 |
| 3.4. Estabilidad de la CRP en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación..... | 111 |
| Sección 4: Discusión..... | 112 |
| | |
| o Experiencia 3: Aplicación de los TR-IFMAs desarrollados en condiciones de campo | 117 |
| Sección 1: Introducción | 119 |
| Sección 2: Material y métodos..... | 120 |
| 2.1. Animales y muestras utilizadas..... | 120 |
| 2.2. Concentración salivar de Hp y CRP porcina y serología de los animales estudiados..... | 121 |
| 2.3. Estudio estadístico realizado..... | 122 |
| Sección 3: Resultados | 122 |
| Sección 4: Discusión..... | 125 |
| | |
| o Experiencia 4: Identificación de proteínas en saliva de cerdos mediante proteómica | 127 |
| Sección 1: Introducción | 129 |

| | |
|--|------------|
| Sección 2: Material y métodos | 130 |
| 2.1. Muestras | 130 |
| 2.2. Estudio electroforético | 130 |
| 2.3. Identificación proteica | 137 |
| Sección 3: Resultados..... | 140 |
| 3.1. Concentración salivar de proteínas de fase aguda..... | 140 |
| 3.2. Estudio electroforético | 140 |
| 3.3. Identificación proteica..... | 144 |
| Sección 4: Discusión | 147 |
| | |
| ○ Conclusiones | 151 |
| ○ Resumen | 155 |
| ○ Summary | 159 |
| ○ Bibliografía | 197 |

Introducción y objetivos.



El mantenimiento de un adecuado nivel de bienestar y salud animal es una parte básica de la política Europea denominada “de la granja a la mesa” y está considerada como un objetivo prioritario en el desarrollo de nuevos sistemas de producción de alimentos de origen animal. Del mismo modo, una de las principales preocupaciones para los reguladores, consumidores y productores, hoy en día, es el establecimiento de unos altos estándares sanitarios y la reducción del sufrimiento de los animales durante toda la cadena de producción, incluyendo el manejo, alojamiento, transporte, procesado y tareas afines (Sánchez- Córdón et al, 2007). Por lo tanto, parece esencial la utilización de marcadores objetivos para monitorizar el estado sanitario y el bienestar animal. En este contexto toma gran valor el desarrollo de nuevos biomarcadores, como la determinación de proteínas de fase aguda (PFA), que permitan mejorar la identificación de animales con enfermedades, tanto de forma clínica como subclínica, así como la detección de animales sometidos a condiciones de estrés (Eckersall, 2000).

Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas que modifican sus concentraciones tras un estímulo inflamatorio-infeccioso como un daño tisular, infección vírica o bacteriana, o crecimientos tumorales (Kushner et al, 1993). El análisis de PFA en producción porcina está siendo un área de gran interés para la valoración del estado inmunológico de los animales ante situaciones estrés, así como para la identificación de infecciones y la determinación del estatus sanitario de las granjas (Millet et al, 2005 y Heo et al, 2005). Debido a que cada proteína de fase aguda se comporta de manera distinta ante un daño tisular o estado inflamatorio, se recomienda utilizar dos o más proteínas, como por ejemplo una proteína de fase aguda que rápidamente cambie su concentración plasmática, como la proteína C reactiva (CRP), unida a otra que modifique sus valores más progresivamente, como la haptoglobina (Hp). De este modo, se obtendrá mayor información sobre la evolución temporal del proceso patológico (Cerón et al, 2005) y se incrementará la capacidad diagnóstica de las PFA para diferenciar entre animales sanos y enfermos (Gruys et al, 2005).

El suero es la muestra analítica utilizada, de forma más común, para realizar análisis bioquímicos y serológicos. Sin embargo, a nivel de matadero, debido a la elevada velocidad de la cadena de faenado y al corto periodo de tiempo disponible para la recogida de muestras sanguíneas antes de que se produzca su coagulación, se han investigado metodologías alternativas como es el muestreo de jugo cárnico (Nielsen et

al., 1998). El jugo cárnico ya está siendo utilizado en algunos países, como Austria, Dinamarca o Francia, para la detección y monitorización de ciertas enfermedades de gran relevancia en el ganado porcino como la enfermedad de *Aujesky* (Le Potier et al, 1998), la triquinosis (Kapel et al, 1998) y el *Síndrome respiratorio y reproductivo porcino* (Montensen et al, 2001) o la salmonelosis (Köfer et al, 2006). Por otra parte, en condiciones de campo la toma de muestras de sangre implica el uso de técnicas invasivas y estresantes para el animal, la utilización de equipamiento especializado, y la necesidad de experiencia profesional por parte del personal. La toma de muestras de saliva es un método no invasivo, causa mínimo discomfort al animal (Guzik et al., 2006) y se adapta plenamente a la política de la Comisión Europea sobre el bienestar animal (Comisión of the European Communities, Brussels, 23.1.2006. SEC 65). Además, presenta la ventaja de ser más simple de manejar que la sangre debido a que no coagula y es una alternativa más económica ya que no requiere entrenamiento del personal ni aparataje especializado (Wong, 2006).

Los ensayos comerciales que existen hasta ahora para la determinación de Hp y CRP en el ganado porcino no permiten la cuantificación de los niveles de PFA en saliva (Llamas et al, 2003). Además, según estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, tampoco permiten la medición de las PFA en jugo cárnico debido, principalmente, a interferencias ocasionadas por el color de la muestra y la hemólisis. En cambio, la utilización de la inmunofluorimetría a tiempo resuelto (TR-IFMA) permite desarrollar inmunoensayos altamente sensibles mediante el marcaje con quelatos de lantánidos que emiten una fluorescencia elevada capaz de ser cuantificable. Esta alta sensibilidad hace que sea una herramienta eficaz para el análisis de compuestos que se encuentran en pequeñas concentraciones en diferentes fluidos orgánicos (Lövgren et al, 1996). Estas ventajas técnicas nos han permitido emitir la hipótesis que la TR-IFMA podría ser aplicada para la medición de PFA en saliva y jugo cárnico porcino.

Por otro lado, la identificación de proteínas en saliva puede ser la base para la detectar nuevos biomarcadores de enfermedad y desarrollar ensayos diagnósticos específicos para la cuantificación de dichos marcadores (Wong, 2006). En medicina humana se han utilizado con éxito estudios proteómicos basados en gel-electroforesis en dos dimensiones seguido de espectrofotometría de masas para el desarrollo de perfiles proteicos en saliva (Vitorino et al, 2004) y la identificación de nuevos marcadores de

cáncer entre otros (Xiao et al, 2005), pero hasta ahora no existen estudios de proteómica en saliva en el ganado porcino.

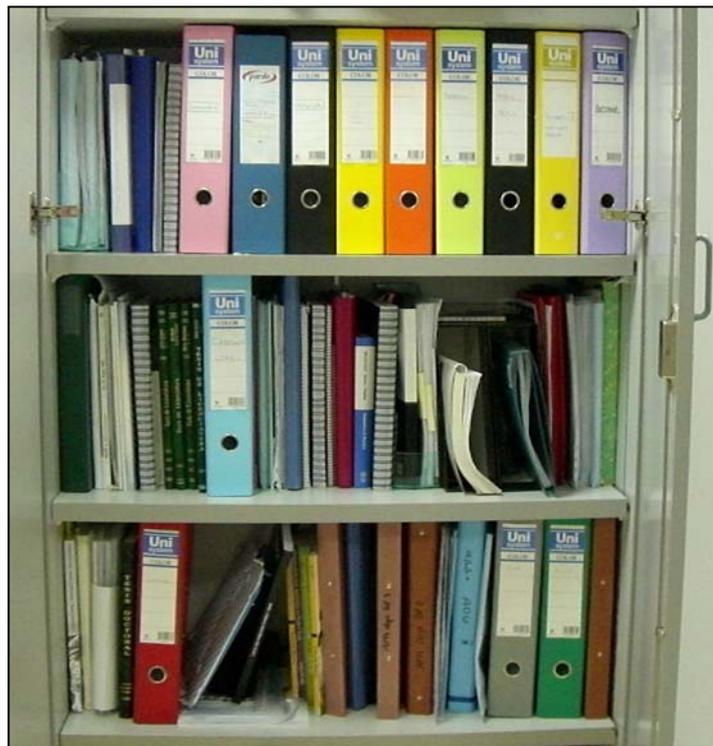
Los objetivos de este trabajo se han estructurado en cuatro experiencias distintas que son:

1. Desarrollar y validar un ensayo sensible, específico y rápido para la determinación de la haptoglobina porcina en muestras saliva y jugo cárnico y establecer la estabilidad de la Hp en dichos fluidos bajo condiciones de almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación. Con el fin de aumentar la rapidez y sensibilidad del ensayo se producirá un anticuerpo monoclonal específico frente a Hp porcina.
2. Adaptar y validar un ensayo sensible y específico para la determinación de CRP porcina en sangre entera para su utilización en muestras de jugo cárnico y saliva y establecer la estabilidad de la CRP en dichos fluidos bajo condiciones de almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.
3. Realizar una evaluación clínica de los ensayos desarrollados en condiciones de campo. Para ello se cuantificó las concentraciones de Hp y CRP en muestras de suero, saliva y jugo cárnico procedente de animales sanos y animales con síndrome respiratorio y reproductivo porcino de distintas edades, y se comparó los resultados para establecer la utilidad de la determinación de PFA en saliva y jugo cárnico como alternativa al suero sanguíneo.
4. Realizar un estudio proteómico en saliva porcina con el fin de obtener el perfil proteico salivar en el ganado porcino y posibilitar la identificación de nuevas proteínas que puedan ser utilizadas en el futuro en el ganado porcino como biomarcadores de enfermedad.

Si los resultados obtenidos son satisfactorios, la presente Tesis Doctoral aportará nuevos métodos para la determinación de las proteínas de fase aguda más importantes en la especie porcina, que permitirán el uso de muestras de saliva y jugo cárnico como alternativa al suero sanguíneo, ampliando el rango de aplicación y el número de estudios en los que las PFA podrán ser cuantificadas como marcadores de estado sanitario.

Además mediante el uso de la proteómica se pretende aportar información sobre la composición proteica de la saliva, con el fin posibilitar la detección de nuevos biomarcadores de enfermedad en el ganado porcino, que serán de gran interés para el futuro.

Revisión Bibliográfica.



SECCIÓN 1. PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.

1.1 Principios de la reacción de fase aguda.

La reacción de fase aguda (Fig. 1) es un mecanismo de defensa rápido e inespecífico, relacionado con el sistema inmunitario, que se desarrolla como respuesta a una alteración de la homeostasis. Esta reacción puede ser ocasionada por infección, daño tisular, crecimiento neoplásico o desordenes inmunológicos (Heinrich, 1990). Durante el transcurso de la reacción de fase aguda se suceden una gran variedad de cambios metabólicos y sistémicos con el fin de neutralizar al agente inflamatorio y ayudar a la reparación del tejido dañado.

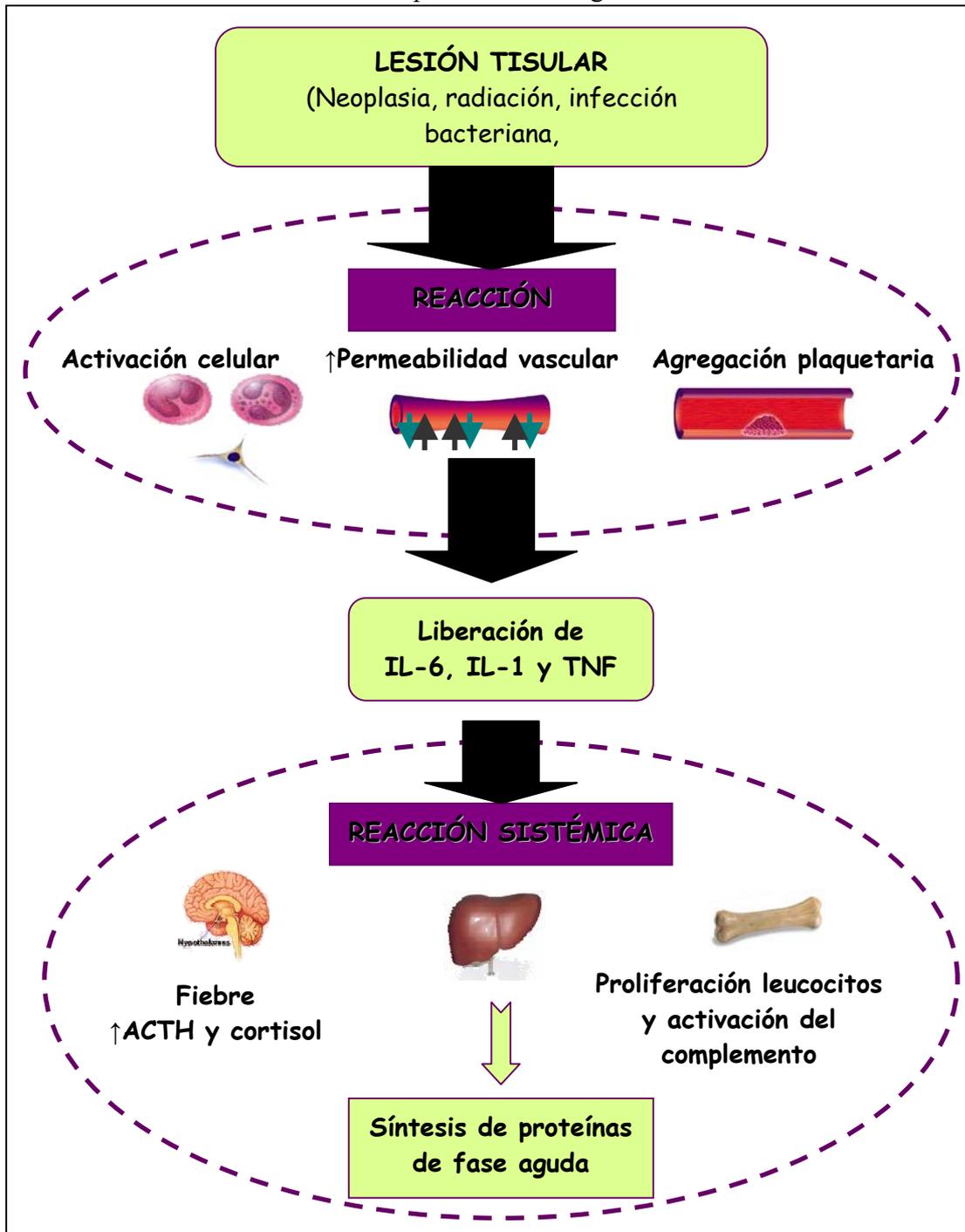
Como fase inicial de la respuesta de fase aguda, se produce una respuesta local en la zona lesionada que tiene como consecuencias inmediatas (Heinrich, 1990):

- Aumento de la permeabilidad vascular.
- Activación de leucocitos que liberan mediadores inflamatorios para provocar la llegada de granulocitos y monocitos a la zona lesionada.
- Agregación plaquetaria para hacer frente al daño vascular ocasionado.
- Activación de células endoteliales y fibroblastos.

Como consecuencia de esta respuesta local, las células activadas provocan la liberación de factores de comunicación celular denominados “citoquinas”. Las principales citoquinas son la IL-1, IL-6 y TNF que actúan en receptores específicos de diferentes células provocando una reacción sistémica (Ebersole et al, 2000) que se puede resumir en:

- Fiebre.
- Neutrofilia.
- Aumento de las concentraciones de ACTH y cortisol.
- Disminución del hierro y zinc.
- Cambio en el metabolismo lipídico, aumento de la gluconeogénesis e incremento del catabolismo proteico muscular y transferencia de aminoácidos al hígado.
- Activación de la cascada del complemento y de la coagulación.
- Inducción de la síntesis de las denominadas “proteínas de fase aguda”.

Figura 1. Esquema de las reacciones que acontecen en el organismo durante la respuesta de fase aguda.



1.2. Generalidades sobre las proteínas de fase aguda.

Las proteínas de fase aguda (PFA) son uno de los mayores componentes de la respuesta de fase aguda y han sido definidas como aquellas proteínas cuyas concentraciones plasmáticas se modifican en al menos un 25% tras un estímulo

inflamatorio (Kushner et al, 1993). La síntesis de PFA se lleva a cabo principalmente en el hígado en respuesta al estímulo originado por las citoquinas inflamatorias liberadas.

También se ha descrito una producción extrahepática de proteínas de fase aguda en la glándula mamaria y los enterocitos (Murata et al, 2003). Como consecuencia de la liberación de citoquinas, los hepatocitos modifican su ruta metabólica hacia gluconeogénesis y absorción de aminoácidos e incrementan la síntesis de factores de la coagulación, factores del complemento y de proteínas de fase aguda (Dhainaut et al, 2001).

Algunos autores como Ebersole y Cappelli (2000) dividen las PFA en función de la principal citoquina que induce su síntesis. Así describen dos grupos:

- PFA tipo 1: sintetizada por el mediador IL-1 (junto a TNF- α), donde encontramos SAA, CRP, Complemento C₃ y α_1 - glicoproteína ácida.
- PFA tipo 2: inducidas por IL-6 e inhibidas por IL-1. En este grupo se incluyen Hp, fibrinógeno, α_1 - antiqumiotripsina, α_1 - antitripsina y α_2 - macroglobulina.

Normalmente se utiliza la clasificación que divide las PFA en positivas y negativas (Petersen et al, 2004). Las PFA positivas son aquellas cuyos niveles se ven incrementados (proteína C reactiva, haptoglobina, amiloide A sérico y α_1 -glicoproteína ácida) mientras que las PFA negativas presentan un descenso en sus niveles tras el estímulo inflamatorio (albúmina y transferrina). Además en función de la magnitud del incremento las PFA positivas se subdividen en tres grupos (Eckersall, 2000):

1. Proteínas de fase aguda mayores: engloba las proteínas cuyos niveles iniciales en animales sanos son menores a 0.01mg/ml y cuyas concentraciones incrementan más de 100 veces su valor inicial durante la respuesta de fase aguda.
2. Proteínas de fase aguda moderadas: son aquellas proteínas plasmáticas cuyos niveles se ven incrementados 2 o 3 veces durante el transcurso de la respuesta de fase aguda.
3. Proteínas de fase aguda menores: se encuentran aquellas proteínas cuyos niveles se ven incrementados únicamente sobre el 50% de su valor inicial.

Esta clasificación es válida para las PFA en todas las especies animales, incluido

el ser humano, pero hay que tener en cuenta que existen diferencias interespecíficas como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Diferencias interespecíficas de las principales PFA positivas.

| Proteína: | Especie: | Humana | Canina | Porcina | Vacuno |
|---------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Haptoglobina (Hp) | | Moderada | Moderada | Moderada | Mayor |
| Proteína C reactiva (CRP) | | Mayor | Mayor | Mayor | Moderada |
| Ceruloplasmina (Cp) | | Moderada | Moderada | Moderada | Moderada |
| α_1 -glicoproteína ácida (AGP) | | Moderada | Moderada | Moderada | Moderada |
| Amiloide A sérico (SAA) | | Mayor | Mayor | Mayor | Mayor |

1.3. Características principales de las PFA objeto del estudio.

1.3.1 Haptoglobina.

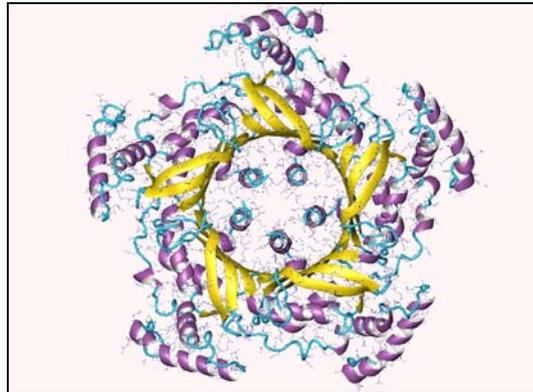
El nombre de haptoglobina fue debido a su capacidad de unión a la hemoglobina. Fue descrita inicialmente como sustancia proteínica cuya función se basaba en incrementar la estabilidad de la actividad peroxidasa de la hemoglobina a pH bajo (Polonovski et al, 1939). Gutteridge sugirió en 1987 que la haptoglobina jugaba un papel importante como antioxidante previniendo la formación de radicales oxígeno.

1.3.1.1. Estructura y función de la haptoglobina porcina.

La haptoglobina (Hp) es una α_2 -glicoproteína sérica que posee un peso molecular aproximado de 120 kDa (Petersen et al, 2004). Es una molécula divalente $(\alpha\beta)_2$ (Fig. 2) formada por cuatro subunidades unidas entre sí por puentes disulfuro (Benesch et al, 1976). Las 2 cadenas α poseen un peso molecular de 14 kDa cada una, mientras que el peso molecular de las cadenas β es de 42 kDa aproximadamente (Yang et al, 1999).

Existe una forma monomérica y otra polimérica que están presentes en muchas especies animales. En el caso del ganado porcino solo encontramos la forma monomérica (Katnik et al, 1998).

Figura 2. Estructura de Haptoglobina. Imagen adaptada del original de: Molecule analysis and Molecule display (MOLMOL). Imagen propiedad de BRUKER y del Prof. Wüthrich del Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.



Las principales funciones de la Hp han sido descritas por diversos autores en medicina humana y se pueden resumir en la tabla 2. Debido a la homología entre la Hp 1-1 humana y la Hp porcina se podría presuponer que realizan la misma función en ambas especies.

Tabla 2. Principales funciones de la Haptoglobina según diversos autores.

| Función | Autores |
|--|------------------------|
| Unión a la hemoglobina (Hb) | (Putnam, 1975) |
| Bacteriostática | (Eaton et al, 1982) |
| Antioxidante | (Gutteridge, 1987) |
| Inmunomoduladora | (Murata et al, 1993) |
| Antagonista natural para el ligando-receptor activador del sistema inmune. | (Dobryszczyka, 1997) |
| Previene la pérdida de hierro | (Ebersole et al, 2000) |
| Implicada en: metabolismo de la Hb en el hígado, inhibición de la filtración glomerular de la Hb y en la reducción del daño oxidativo renal durante hemólisis. | (Lim, 2001) |
| Papel importante en la defensa pulmonar. | (Yang et al, 2003) |

El lugar principal de síntesis de la haptoglobina es el hígado. Se han reconocido también otros lugares de biosíntesis en medicina humana como el tejido adiposo y el pulmón (Dobryszczyka, 1997) además de en la piel, bazo y riñón (Ebersole et al, 2000). La Hp se metaboliza uniéndose a la hemoglobina y formando el complejo hemoglobina-haptoglobina que es captado por el sistema retículo endotelial hepático y metabolizado por las células de Kupfer.

1.3.1.2. Estudios de la haptoglobina en el ganado porcino.

La Hp se considera proteína de fase aguda positiva en el cerdo debido a que sus niveles se ven incrementados cuando ocurre una reacción de fase aguda. Así en una inflamación experimental, los niveles de Hp en suero aumentan a las 48 horas del inicio del estímulo inflamatorio y vuelve a los niveles basales a los 8 días (Eckersall, 1995).

En recién nacidos los niveles de Hp encontrados son bajos. Las concentraciones normales presentes en animales adultos se alcanzan a las 2-3 semanas de vida (Petersen et al, 2004). Se han encontrado diferencias significativas entre las condiciones del animal, así en el verraco adulto entero los niveles son significativamente menores que en el verraco castrado y en la cerda (Petersen et al, 2004). Además existen otros factores que influyen los valores de Hp en el ganado porcino como son la raza (Clapperton et al, 2005), las condiciones de manejo y alojamiento de los animales (Heo et al, 2005) y los transportes prolongados (Piñeiro et al, 2007a). En la tabla 3 se muestran algunos estudios en donde se han fijado los valores séricos de Hp en cerdos sanos.

Tabla 3. Niveles normales de Hp en el ganado porcino según diversos autores.

| Autor y año | Edad | Método de detección | Rango de valor (mg/ml) |
|----------------------------|---------------|------------------------|------------------------|
| Magnusson et al (1999) | 5-10 semanas | Colorimétrico | 0.08-0.10 |
| Petersen et al (2002) | 10-25 semanas | ELISA | 0.18-1.18* |
| Knura-Deszczk et al (2002) | 15 semanas | Inmuno-nefelométrico | 0.05-0.43* |
| Hulten et al (2003) | 9 semanas | Colorimétrico | 0.01-0.86 |
| Segalés et al (2004) | 15 semanas | Inmuno-difusión radial | 0.33-1.79 |
| Piñeiro et al (2007b) | 16-20 semanas | Inmuno-difusión radial | 0.01-1.75 |

* utilizando anticuerpos anti-Hp humana con reacción cruzada frente a Hp porcina.

En el ganado porcino la Hp ha sido caracterizada como marcador del estado de salud de los animales (Hall et al, 1992; Petersen et al, 2002), como indicador de la ganancia de peso en cerdos de engorde (Eurell et al, 1992) y para la monitorización de tratamientos (Hulten et al, 2003). También se ha utilizado como indicador de estatus inmunitario en estudios de nutrición porcina y de condiciones de alojamiento (Le Floc'h et al, 2006; Millet et al, 2005, Hiss et Sauerwein, 2003) y en estudios recientes se ha

empleado como marcador del estrés asociado al transporte de los animales (Piñeiro et al, 2007). En la tabla 4 se citan algunos de los estudios experimentales realizados donde se ha empleado la Hp como biomarcador en enfermedades infecciosas.

Tabla 4. Lista de ciertas infecciones experimentales donde se produce un incremento en los niveles de Hp porcina.

| Estudio | Autor y año |
|---|----------------------------|
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | Hall et al, 1992 |
| <i>Bordetella bronchiseptica</i> y <i>Pasteurella multocida</i> | Francisco et al, 1996 |
| Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino | Asai et al, 1999 |
| <i>Mycoplasma hyorhinis</i> | Magnusson et al, 1999 |
| <i>Toxoplasma gondii</i> | Jungersen et al, 1999 |
| <i>Streptococcus suis</i> | Knura-Deszczka et al, 2002 |
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | Lauritzen et al, 2003 |
| <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> | Jacobson et al, 2004 |
| <i>Escherichia Coli</i> | Zhu et al, 2004 |
| Micotoxina <i>Fusarium</i> | Díaz-Llano et al, 2006 |
| Aujeszky y Peste porcina Africana | Carpintero et al, 2007 |

1.3.2. Proteína C-reactiva.

La proteína C-reactiva (CRP) fue descrita por primera vez en 1930 por Tillet y Frances como componente del suero de pacientes con un tipo específico de enfermedad aguda provocada por *Streptococcus Pneumoniae*. El nombre procede de la fracción del pneumococo frente a la que reaccionaban los pacientes (polisacárido C) en dicho estudio. Inicialmente la CRP fue considerada como indicador específico de la infección por dicho neumococo.

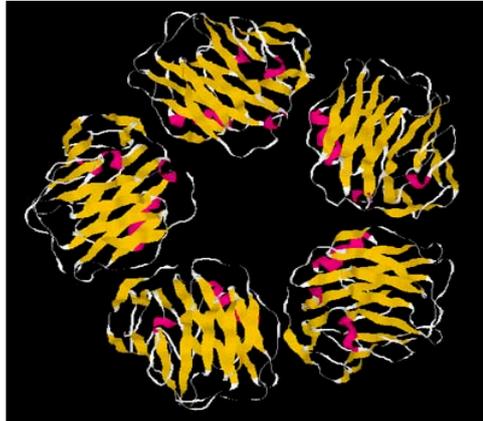
1.3.2.1. Estructura y función de la Proteína C-reactiva porcina.

La familia de las pentaxinas a la que pertenece se han conservado mucho en la evolución, de esta forma existen proteínas homólogas en todos los vertebrados (Pepys y Hirschfield, 2003).

La CRP porcina esta formada por 5 subunidades polipeptídicas (Fig. 3) unidas no covalentemente de 23.4 kDa cada una (Toussaint et al, en 1995), teniendo un peso

molecular ligeramente superior al de la CRP humana que presenta subunidades de 21.5kDa. Cada subunidad, también denominada protómero, está compuesta por dos capas de láminas β y una hélice α simple.

Figura 3. Estructura de Proteína C Reactiva. Imagen adaptada del original de Paul Ridker. Imagen propiedad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Harvard.



Fue la primera proteína, de las denominadas como PFA utilizada para diagnosticar o excluir un proceso inflamatorio en el organismo. Es capaz de unirse a las células dañadas y de fomentar la eliminación de residuos y la fagocitosis de células apoptóticas (Gershov et al, 2000).

Las principales funciones de la CRP han sido descritas por diversos autores en medicina humana y se pueden resumir en la tabla 5. Debido a que existe gran relación inmunológica entre la CRP humana y porcina, las funciones de dichas proteínas podrían ser semejantes.

Tabla 5. Principales funciones de la Proteína C reactiva según diversos autores.

| Función | Autor/es |
|---|--|
| Promover la limpieza de células apoptóticas. | (Cheville, 1988) |
| Induce la agregación-precipitación de las células o partículas a las que se fija (lipoproteínas plasmáticas, membranas de células dañadas, microorganismos) | (Young y Williams en 1978; Cheville en 1988) |
| Sostiene la producción de TNF- α . | (Gershov et al, 2000). |
| Fomenta la expresión de factores tisulares en células mononucleares. | (Dhainaut et al, 2001). |
| Disminuye la acumulación de neutrófilos en los procesos inflamatorios. | (Petersen et al, 2004). |

La CRP se sintetiza en los hepatocitos (Marnell et al, 1995) aunque en medicina humana se ha detectado expresión extrahepática en macrófagos alveolares (Dong et al, 1996) y en células musculares superficiales y macrófagos en arterias ateroscleróticas (Yasojima et al, 2001). Tras su síntesis es secretada al torrente sanguíneo.

1.3.2.2. Estudios de la Proteína C-reactiva en el ganado porcino.

La CRP se clasifica dentro del grupo de las proteínas de fase aguda mayores en el ganado porcino, presentando un pico de concentración significativamente elevado (38 veces mayor que la concentración inicial) a las 24 horas después de la reacción de fase aguda. A las 48 horas su concentración es unas 10 veces la concentración inicial para posteriormente ir disminuyendo hasta volver, a los 6 días post reacción, a los niveles iniciales (Eckersall, 1995). Además se considera como la proteína de mayor reacción en el ganado porcino ante un proceso inflamatorio agudo.

Aunque aún no se han determinado los valores de referencia para animales sanos, en la tabla 6 se muestra una serie de rangos de valores para animales utilizados como control en diferentes estudios. Los valores de CRP se ven influenciados por diversos factores como la edad, raza, sexo y condiciones de manejo y ambientales, tal y como se ha descrito para los niveles de la Hp porcina.

Tabla 6. Niveles de referencia de CRP en cerdos según diferentes autores.

| Autor y año | Edad | Método de detección | Rango de valor ($\mu\text{g/ml}$) |
|---------------------------|------------------|----------------------|-------------------------------------|
| Burger et al (1992) | 6-7 semanas | ELISA | 2.9-15.1* |
| Heegaard et al (1998) | 13 semanas | ELISA | 11-77 |
| Rychlik et al (2001) | 5 semanas | Inmunoturbidimétrico | 33.3 |
| Chen et al (2003) | 24-28 semanas | ELISA | 82,27-87,52 |
| Jayachandran et al (2004) | 24 semanas | Inmunoturbidimétrico | 0,17-0,47* |
| Sorensen et al (2006) | 5 semanas | ELISA | 0.55-12.33 |
| Parra et al (2006) | 10 semanas | ELISA | 0-25 |

* Utilizando anticuerpos anti-CRP humana con reactividad cruzada frente a CRP porcina.

Los estudios relacionados con la CRP realizados en ganado porcino son muy

variados. Ha sido descrita como parámetro para controlar el grado de estrés en el cerdo (Burger et al, 1998) y también como un buen indicador temprano de episodios de síndrome de Mamitis Mastitis y Agalaxia (MMA) (Kostro, 2003). Además la medición de las concentraciones de CRP puede ser utilizada para valorar el estado de salud de una piara de cerdos (Hisin-Hisin Chen et al, 2002), incluso ha sido utilizada para detectar lesiones subclínicas a nivel de matadero (Pallares et al, 2008).

Esta proteína es considerada como biomarcador inflamatorio y se ha investigado en muchas ocasiones como se puede apreciar en la tabla 7.

Tabla 7. Lista de ciertas infecciones donde se produce un incremento en los niveles de CRP porcina.

| Estudio | Autor y año |
|---|-----------------------|
| <i>Salmonella choleraesuis.</i> | Akunda et al, 2001 |
| Peritonitis por inóculo fecal. | Clary et al, 2002 |
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae.</i> | Lauritzen et al, 2005 |

SECCIÓN 2. EL JUGO CÁRNICO Y LA SALIVA EN MEDICINA VETERINARIA.

2.1. El jugo cárnico como muestra analítica alternativa en el ganado porcino.

El jugo cárnico es el fluido, mezcla de suero, linfa y líquido intracelular liberado que se obtiene tras la congelación y descongelación de muestras cárnicas. Aunque no han sido especificadas las características bioquímicas de sus componentes, los ensayos experimentales indican que podría ser considerado como una dilución del suero sanguíneo (Nielsen et al, 1998).

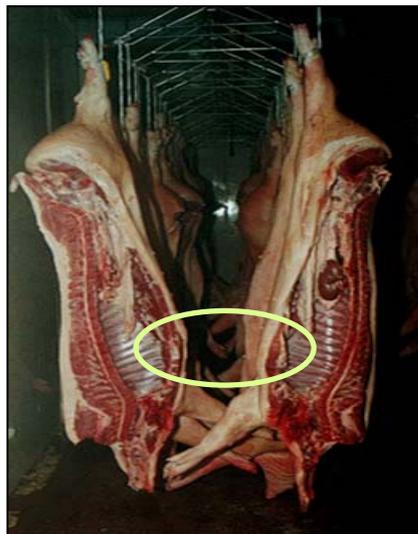
En el ganado porcino fue utilizado por primera vez como muestra analítica para la detección de anticuerpos frente a *Salmonella* en matadero (Nielsen et al, 1998). Desde entonces ha sido utilizado por varios autores como alternativa al uso de suero sanguíneo debido a la simplicidad en la recogida de muestras en el matadero.

La recogida de muestras implica únicamente tomar una porción cárnica de 1x3x3 cm de los pilares del diafragma (Fig. 4) por lo que el tiempo necesario para la obtención de la misma es mínimo. Además la toma de muestras se realiza antes de que las canales

sean depositados en la cámara de frío por lo que aún permanecen suspendidas e identificadas y no se enlentece la cadena de faenado del matadero.

El diafragma es el músculo de elección para la producción de jugo cárnico debido a su bajo valor comercial. Además, es el músculo que mayor volumen de jugo cárnico produce, así como el que mejores correlaciones ha presentado tras comparar serología sérica y en jugo cárnico (Nielsen et al, 1998 y Le Potier et al, 1998).

Figura 4. Localización de los pilares del diafragma en una canal suspendida en la cadena de faenado el matadero.



Para tomar muestras de suero en el matadero es fundamental la rapidez pues la sangre coagula en muy poco tiempo. Además es complicado para una sola persona tomar la muestra y anotar la identificación del animal al mismo tiempo, más complejo aún si se intenta realizar sin enlentece la cadena de faenado del matadero y si se va a muestrear un gran número de animales. Por lo tanto la posibilidad de utilizar el jugo cárnico como muestra alternativa al suero sanguíneo presenta numerosas ventajas ya que no afecta a la velocidad de la línea de faenado, no necesita personal especializado y permite muestrear, a una sola persona, un mayor número de animales.

En los últimos años se ha incrementado el número de enfermedades detectadas mediante la medición de anticuerpos en jugo cárnico porcino como es el caso de *Aujeszky* (Le Potier et al, 1998), *Trichinella* (Kapel et al, 1998), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Wallegren et al, 2000), *Síndrome respiratorio y reproductivo porcino* (Mortensen et al, 2001), *Yersinia* (Wolffs et al, 2004) y *Sarcoptes scabiei* (Vercruyssen et al, 2006). Incluso

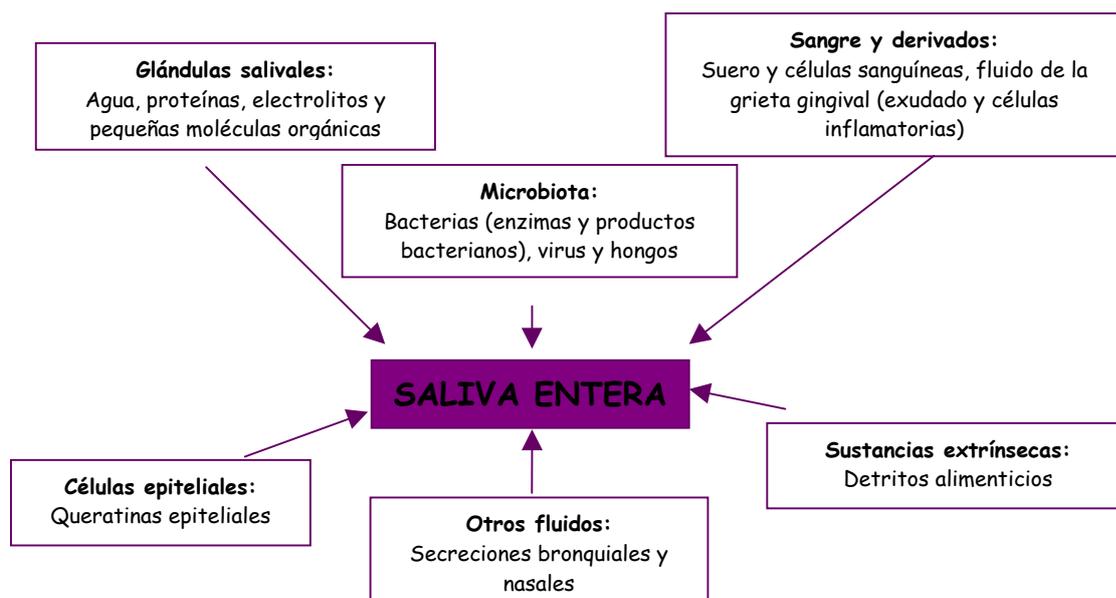
ya es utilizado como muestra de elección en protocolos de monitorización de Salmonelosis en matadero en diferentes países como Dinamarca y Austria.

En el campo de las proteínas de fase aguda solo existe una publicación que mide las proteínas de fase aguda en el jugo cárnico. En este estudio encontraron concentraciones de Hp porcina de 6 a 10 veces menores en jugo cárnico que en suero (Hiss et al, 2003).

2.2. La saliva como muestra analítica alternativa en el ganado porcino.

La saliva es una mezcla compleja de secreciones procedente de las tres principales glándulas salivales (parótida, submandibular y sublingual) y de numerosas glándulas salivares menores. La saliva se puede considerar como *glándula-específica* cuando se recoge directamente desde una glándula concreta, o como *saliva entera* cuando se es recogida en la cavidad oral (Kaufman et al, 2002). Los principales componentes de la saliva son: agua, electrolitos, proteínas y lípidos. Además la saliva entera incluye algunos constituyentes de origen no salivar como son fluido de la hendidura gingival, sangre, leucocitos, células epiteliales descamadas, bacterias, placa dental, virus y detritos alimenticios entre otros (Dawes, 1987) (Fig. 5).

Figura 5. Esquema de los principales constituyentes de la saliva entera y su procedencia.



Tradicionalmente los analitos en medicina veterinaria se han determinado en muestras séricas, debido, principalmente, a que los métodos comerciales están diseñados para ser empleados en suero. La saliva puede ser considerada como una alternativa al suero como fluido biológico capaz de ser analizado con fines diagnósticos (Kaufman et al, 2002), con la ventaja de emplear un método de recogida no invasivo y no estresante por lo que respeta el bienestar animal, concepto de gran relevancia para las autoridades sanitarias de la Comunidad Europea (Terrestrial Animal Health Code, 2007). Otras ventajas que ofrece la saliva, es que su obtención es más simple y requiere materiales más baratos en comparación con el suero y además es más fácil de manipular y procesar (Wong, 2006).

Las limitaciones más destacadas que presenta la utilización de la saliva como muestra analítica se resumen a continuación:

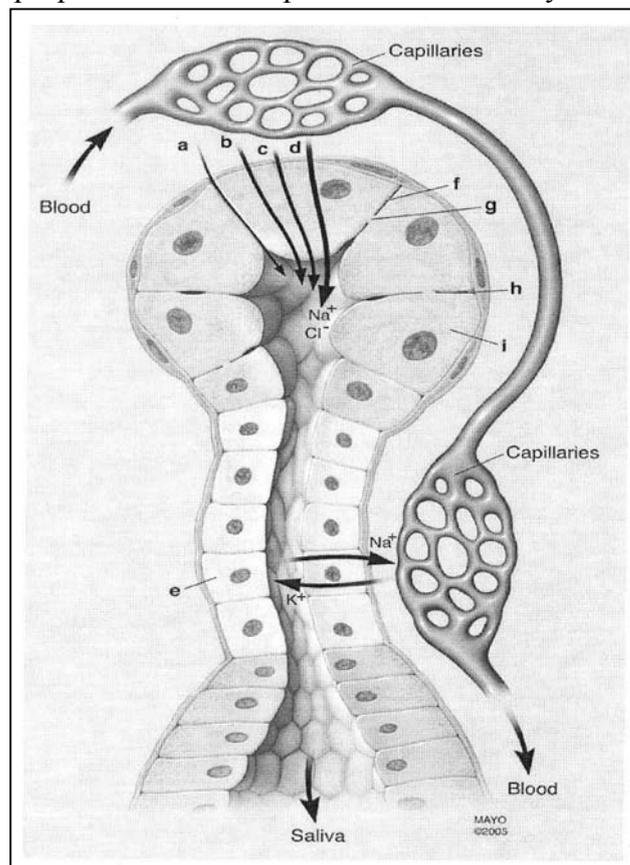
- Falta de estudios sobre correlación saliva y suero. La transferencia de sustancias desde el suero hasta la saliva esta ligada a las características fisicoquímicas de la molécula en cuestión y del mecanismo de por el cual difunden hacia la saliva (Fig. 6). La mayor parte de las moléculas alcanzan la saliva por difusión pasiva por lo que habría que tener en cuenta la lipofilidad de la molécula. Así los niveles de ciertas sustancias en saliva no son siempre una referencia real de los niveles existentes en suero, por lo que debe ser estudiada la correlación entre los niveles encontrados en saliva y en suero.

- Necesidad de estandarización del método de recogida. Es importante estandarizar las condiciones de recogida para poder interpretar los resultados con fiabilidad (Nieuw Amerongen et al, 2007). Las consideraciones generales a tener en cuenta para la obtención de una muestra de saliva son:
 - Utilización o no de métodos de estimulación para la recogida.
 - Si el animal esta bajo medicación que pueda alterar la secreción normal de saliva.
 - El estado de hidratación del animal.

- Estabilidad de la sustancia a determinar en saliva. Se debe estudiar y comprobar que el analito no se degrada o descompone, bien espontáneamente o por la acción de los enzimas presentes en la saliva.

- Restos de detritus o comida. Se recomienda eliminar por centrifugación los restos de detritus, especialmente en casos donde se sospeche que puedan interferir o que puedan unirse al analito (Dawes, 1987).
- Baja concentración de analitos que presenta. Se requiere de técnicas altamente sensibles para la determinación de analitos en saliva (Wong et al, 2006). Se ha demostrado que las técnicas generales para la determinación de las PFA en suero no son suficientemente sensibles para cuantificar las concentraciones existentes en saliva (Llamas et al, 2003).

Figura 6. Mecanismo de transporte de las proteínas e iones desde el suero a los conductos de la glándula salivar. Imagen adaptada del original de Haeckel and Hanecke. Imagen propiedad de la Compañía Walter de Gruyter GmbH &Co.



a: transporte activo. b: difusión pasiva de compuestos liposolubles.
c: filtración simple. d: filtración activa de agua e iones Na. e: bomba sodio-potasio. f: membrana celular. g: poro de la membrana celular.
h: espacio intracelular. i: célula acinar.

La saliva como muestra diagnóstica en el ganado porcino ha sido utilizada anteriormente para cuantificar analitos tales como el cortisol (Ruis et al, 1997), ciertas hormonas como sulfato de estrona (Ohtaki et al, 1997) e inmunoglobulina A (Van der

Stede et al, 2001) y G (Devillers et al, 2004). En el campo de las PFA en el ganado porcino solo existe un trabajo publicado hasta ahora que permite la cuantificación de la haptoglobina porcina utilizando un ensayo basado en una técnica ELISA que presenta unos tiempos de incubación muy prolongados (Hiss et al, 2003).

SECCIÓN 3. INMUNOFLUOROMETRIA EN TIEMPO RETARDADO (TR-IFMA).

3.1. Orígenes de la TR-IFMA.

La inmunofluorescencia se comenzó a emplear para marcar anticuerpos con compuestos fluorescentes y así poder visualizar antígenos (Coons et al, 1974). Los primeros fluoroinmuno-ensayos (FIA) cuantitativos se desarrollaron durante los años 70 pero presentaban un problema limitante debido al background.

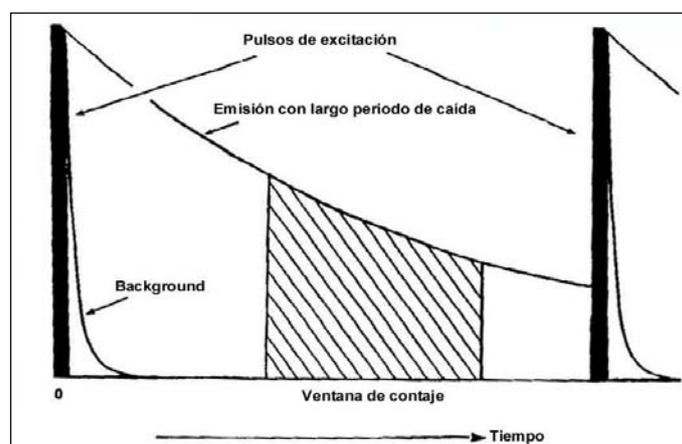
Durante la evolución de los inmunoensayos cuantitativos las sustancias radioactivas de gran sensibilidad tuvieron un enorme impacto. Los radioisótopos se utilizaron por primera vez para determinar el tiempo que la insulina permanecía en plasma en pacientes diabéticos, mediante la inyección endovenosa de insulina marcada radiactivamente (Yalow et al, 1960). El radioinmunoensayo (RIA) combina la especificidad de la unión antígeno anticuerpo con la sensibilidad de los radioisótopos. Debido a la actitud pública negativa y otras desventajas tales como corta vida media de los radioisótopos, producción costosa y riesgos en la manipulación, adquisición y en los residuos generados, se han ido creando otros métodos alternativos.

La introducción de marcadores fluorescentes en los inmuno-ensayos, fue una de las primeras alternativas al RIA. El problema que se encontraba era la menor detectabilidad con respecto a los radioisótopos, debido a la presencia de un background (ruido de fondo) por la fluorescencia propia de moléculas endógenas de la muestra. Hasta que este problema no fue solucionado el FIA no pudo reemplazar al RIA. Una de las alternativas más satisfactorias para solventar los errores de los FIA debidos al background ha sido el desarrollo del fluoroinmuno-ensayo a tiempo retardado (TR-IFMA) cuyas bases se describirán en el apartado siguiente.

3.2. Principios básicos de la TR-IFMA.

La TR-IFMA se basa en la diferencia temporal entre el background y la señal fluorescente a medir (Fig. 7). En este sistema, la señal se distingue del “background” residual por resolución temporal, es decir, la fluorescencia no es medida inmediatamente después de la excitación del compuesto fluorescente, sino que se deja pasar un cierto tiempo (400 microsegundos en el caso de compuestos marcados con europio) que permite excluir el “background” de corta duración (Hemmilä y Harju, 1995).

Figura 7. Fundamento de la fluorometría en tiempo retardado. La ventana de conteo queda retrasada con respecto al pulso de excitación evitando así el background.



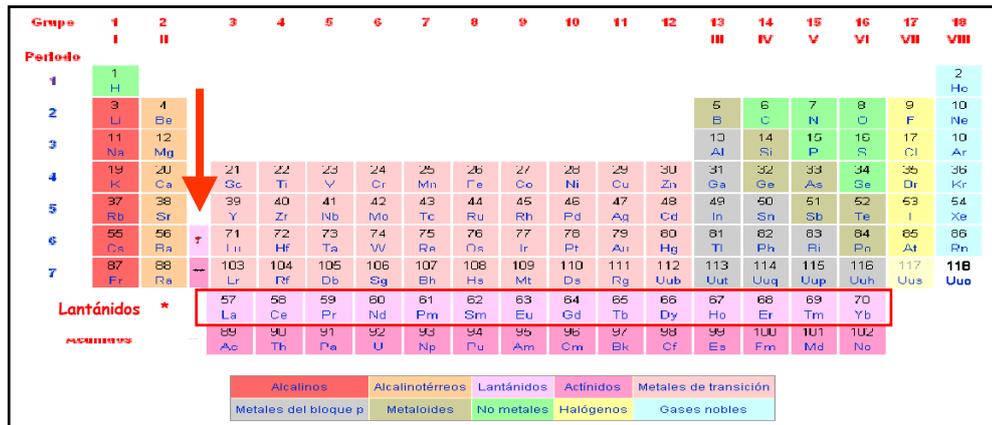
Esta diferencia temporal se lleva a cabo gracias al uso de quelatos de lantánido, que presentan una vida media de la señal específica fluorescente mucho más amplia que la no-específica señal del background.

3.2.1. Papel de los quelatos de lantánido en TR-IFMA.

Los lantánidos son elementos químicos situados en el periodo 6 de la tabla periódica (Fig. 8). Estos elementos se denominan “tierras raras” por encontrarse en forma de óxidos y poseen una configuración electrónica $4f^n$.

Los lantánidos presentan la propiedad de exhibir una fluorescencia característica de cada ion, especialmente cuando son asociados a quelatos. Los quelatos son moléculas orgánicas, con dos grupos de unión metálicos, capaces de absorber luz de excitación y transferirla como energía al ión (Dickson et al, 1995).

Figura 8. Tabla periódica de los elementos. Flecha y cuadro coloreado: posición del grupo de los lantánidos.



Las principales funciones de los quelatos son la protección del lantánido frente al agua ya que la fluorescencia de los lantánidos se apaga en medio acuoso, y la absorción y transferencia de alta cantidad de energía al lantánido, para que se produzca su excitación y la consecuente emisión fluorescente característica.

Los lantánidos utilizados en TR-IFMA son principalmente los de europio (III) (Eu^{3+}), terbio (III) (Tb^{3+}), samario (III) (Sm^{3+}) y diprosio (III) (Dy^{3+}) debido a que presentan una emisión de larga duración, por encima de los 50microsegundos. Las propiedades principales de los quelatos de lantánidos, especialmente el quelato de europio, son las siguientes:

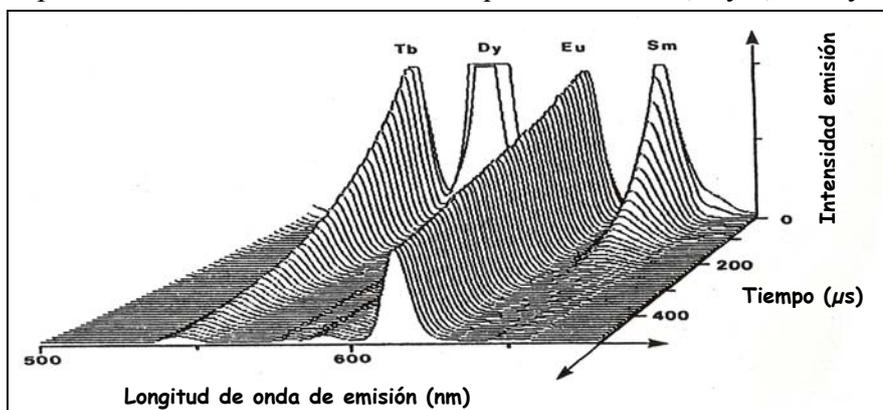
- Tiempos (τ) largos de fluorescencia. La fluorescencia debida al background decae en 10 ns mientras que la fluorescencia del quelato de europio se mide a partir de los 400 μs y decae a los 730 μs , por lo que permite evitar la señal no específica del background.
- Amplia diferencia entre la longitud de onda de emisión y excitación (amplio cambio de Stoke's). La longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{excitación}}$) y emisión ($\lambda_{\text{emisión}}$) de los lantánidos presentan una amplia diferencia (tabla 8), por ello, se hace posible medir la fluorescencia a una longitud de onda donde la influencia del background es mínima.

Tabla 8. Propiedades fluorescentes del Eu^{3+} y Sm^{3+} utilizando la solución intensificadora DELFIA.

| Ión | $\lambda_{\text{excitación}}$ | $\lambda_{\text{emisión}}$ |
|------------------|-------------------------------|----------------------------|
| Eu^{3+} | 340nm | 613nm |
| Sm^{3+} | 340nm | 643nm |

- Marcado y estrecho pico de emisión. Las bandas de emisión de los quelatos de lantánidos son muy estrechas, por lo que las fluorescencias de diferentes lantánidos pueden distinguirse fácilmente unas de otras (Fig. 9).

Figura 9. Comparación del perfil de intensidad de emisión, longitud de onda de emisión y comportamiento de decadencia de los quelatos de Tb³⁺, Dy³⁺, Eu³⁺ y Sm³⁺.

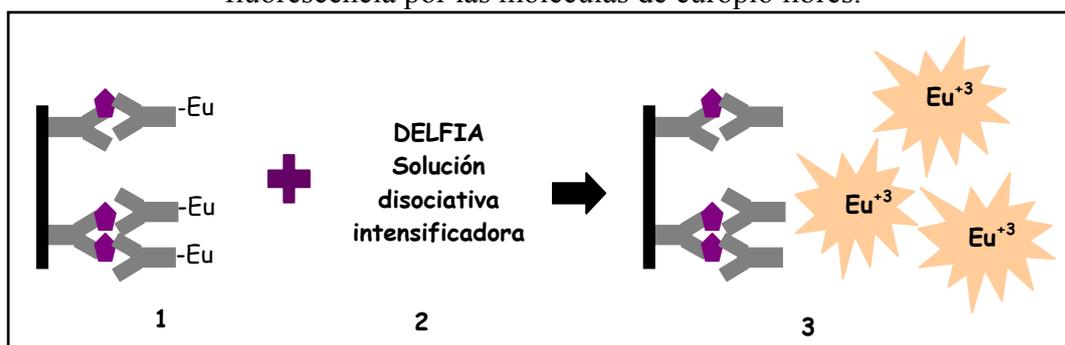


Esta última propiedad unida a la capacidad del TR-IFMA para combinar espectros y tiempos de resolución, y a la larga vida media de la señal fluorescente, amplía el rango de opciones funcionales de esta tecnología.

3.2.2. Principios de la tecnología DELFIA.

La tecnología DELFIA se basa en el principio de solución intensificadora disociativa patentada por Wallac como DELFIA[®] y la fluorimetría a tiempo resuelto. Esta tecnología consiste en que reactivos específicos, como anticuerpos o antígenos, son marcados con quelatos de lantánido que al estar asociados no emiten fluorescencia. La solución disociativa intensificadora de la fluorescencia es la encargada de romper la unión del lantánido y el quelato permitiendo la emisión de la fluorescencia característica (Fig. 10).

Figura 10. Principio fundamental de la tecnología DELFIA. **1:** AC marcados con quelato de europio, no se emite fluorescencia. **2:** adición de solución DELFIA. **3:** emisión de fluorescencia por las moléculas de europio libres.



La solución intensificadora DELFIA produce una intensidad fluorescente alta para el Eu^{3+} y el Sm^{3+} y está compuesta por:

- Tampón acidificante: encargado de disociar los iones de lantánido del quelato.
- B-NTA: ligando quelante fluorogénico, capaz de absorber la excitación del quelante y transferirla en energía absorbida al ión lantánido.
- TOPO: reemplaza las moléculas del agua del interior de la esfera del quelato, intensificando la fluorescencia y prolongando el tiempo de decaimiento de la fluorescencia.
- Triton X-100: solubiliza los componentes proporcionando condiciones óptimas para la fluorescencia.

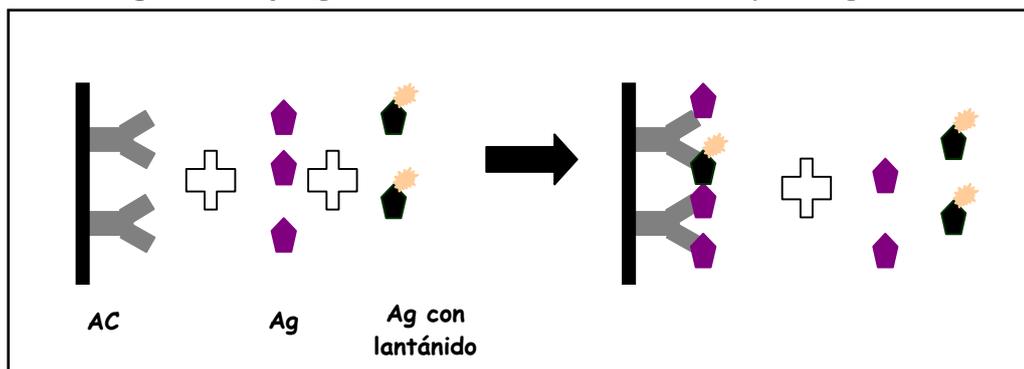
3.3. Tipos de inmunoensayos basados en TR-IFMA.

En los últimos años se han desarrollado una gran variedad de formatos y diseños de inmunoensayos que se pueden dividir en dos categorías principales, los inmunoensayos competitivos y los no-competitivos (Davies, 2005).

3.3.1. Inmunoensayo competitivo.

Se basa en la competencia de dos antígenos por los sitios de unión específicos del anticuerpo de captura (AC) (Fig. 11). El primer antígeno (Ag) se encuentra en concentración desconocida y proviene de la muestra a analizar mientras que el segundo antígeno (Ag con lantánido), que se encuentra marcado con una sustancia fluorescente y contra el que debe competir el antígeno de la muestra, se añade a una concentración conocida. Cuanto más antígeno haya en la muestra, menos antígeno marcado se unirá al anticuerpo específico, por lo que la cantidad de fluorescencia será inversamente proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Figura 11. Ejemplo de formato de un inmunoensayo competitivo.

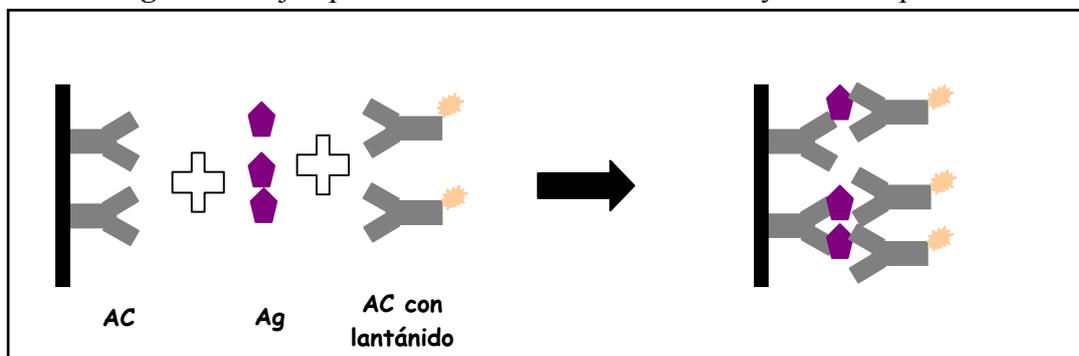


El mayor problema de los ensayos competitivos radica en la dificultad de distinguir pequeñas concentraciones de antígeno del background, debido a que en ambas circunstancias la cantidad de intensidad medida es muy grande.

3.3.2. Inmunoensayo no-competitivo.

Este tipo de ensayos no-competitivos se conocen ampliamente como ensayos tipo sándwich. Se basa en el marcaje de anticuerpos de detección. El antígeno de la muestra a analizar (Ag) se fija a dos anticuerpos específicos diferentes, anticuerpo de captura (AC) y anticuerpo marcado (AC con lantánido) (Fig. 12). En este caso la medida de la intensidad fluorescente es directamente proporcional a la concentración de analito.

Figura 12. Ejemplo de formato de un inmunoensayo no-competitivo.



3.4. Ventajas de la TR-IFMA como técnica analítica.

Las ventajas que ofrece la fluorimetría a tiempo resuelto frente a métodos tradicionales ha sido descrito anteriormente por diversos autores (Adlercreutz et al, 1998 y Lövgren et al, 2000). Entre dichas ventajas se incluye:

1. Alta sensibilidad. Es la característica más relevante de esta metodología en comparación con otras técnicas como el radioinmunoensayo o el enzimoimmunoensayo. Su gran sensibilidad hace que sea una herramienta eficaz en la determinación de compuestos que se encuentran en pequeñas concentraciones en diferentes fluidos orgánicos tales como orina, saliva o líquido cefalorraquídeo; incluso puede ser empleada en el seguimiento de sustancias secretadas por cultivos celulares (Kropf et al, 1991). En la Tabla 9 se compara la sensibilidad de las técnicas ELISA y fluorimetría en tiempo retardado en la determinación de distintos compuestos biológicos (Peruski et al, 2002).

Tabla 9. Comparación de la sensibilidad de las técnicas ELISA y TR-IFMA en la determinación de distintos compuestos biológicos. UFC= unidades formadoras de colonias.

| Ensayo | Sensibilidad TRF | Sensibilidad ELISA |
|--|--|--|
| <i>Francisella tularensis</i> | 8 pg/ml 48 UFC/ml | 16 ng/ml $9,4 \times 10^4$ UFC/ml |
| Enterotoxina B (<i>Staphylococcus aureus</i>) | 10 pg/ml $2,2 \times 10^8$ moléculas/ml | 30,5 pg/ml $6,6 \times 10^8$ moléculas/ml |
| Toxina botulínica A | 200 pg/ml $2,4 \times 10^8$ moléculas /ml | 4 ng/ml $4,8 \times 10^9$ moléculas/ml |

2. Estabilidad de reactivos. Los reactivos tienen una vida media larga, lo que supone una ventaja de la fluorimetría sobre el radioinmunoanálisis, cuyos reactivos presentan una vida limitada.

3. Carencia de efectos nocivos por radiación. El radioinmunoensayo constituye un peligro potencial debido a la radiación y requiere laboratorios especiales, por lo que hay ciertas limitaciones para su utilización; sin embargo, la fluorimetría está exenta de estos problemas.

4. Posibilidad de automatización. En los ensayos automatizados desarrollados recientemente, el usuario sólo necesita identificar y colocar la muestra para comenzar el proceso de medida, por lo que no es necesario personal especializado para su uso.

5. Inexistencia de interferencias con la muestra. Los quelatos de lantánidos producidos en los últimos años, han permitido el análisis de muestras de sangre con el consiguiente ahorro de tiempo a la hora de procesar las muestras, pues así se evita la necesidad de usar suero sanguíneo que precisa de una centrifugación previa de la sangre. Estos quelatos tampoco se ven afectados por las interferencias causadas por hemólisis, lo que constituye un gran avance pues los métodos de análisis tradicional suelen presentar interferencias significativas y variaciones en su concentración en muestras hemolíticas.

6. Determinación simultánea de varios analitos. Los quelatos de lantánidos presentan picos de fluorescencia a longitudes de onda bien diferenciadas, por lo que se pueden marcar sustancias con distintos lantánidos y cuantificarlos al mismo tiempo empleando las longitudes de onda específicas de cada uno. Normalmente se emplean combinaciones

de dos lantánidos, fundamentalmente europio y samario (Aggerbeck et al, 1996; Barnard et al, 1998; Matsumoto et al, 1999 y Kimura et al, 2000). Con este tipo de ensayos se permite ahorrar tiempo, reactivos y trabajo, reducir costes globales y cuantificar varios analitos en muestras de pequeño volumen, como en neonatos o en animales de pequeño tamaño.

7. Amplio rango de ensayo. Debido al bajo background se pueden producir ensayos con un amplio rango de concentraciones que puede ir desde microgramos a miligramos (Tarkkinen et al, 2002).

3.5. Aplicaciones prácticas de la TR-IFMA en medicina veterinaria.

Los ensayos inmunométricos son utilizados para la determinación de una gran variedad de analitos, antígenos o anticuerpos. Entre los numerosos compuestos que han sido determinados mediante la TR-IFMA en medicina veterinaria, cabe destacar:

1. Hormonas, tales como: androstenona porcina (Tuomola et al, 1997), cortisol bovino (Erkens et al, 1998), relaxina porcina (Ogine et al, 1999), hormona folículo estimulante (FSH), hormona luteneizante (LH) e inhibina A en ganado vacuno (Kaneko et al, 2002), insulina en caballo, vaca y cerdo (Lovendahl et al, 2002), hormona del crecimiento en rumiantes (Lovendahl et al, 2003) y cortisol y tirosina libre canina (Parra et al, 2004).

2. Proteínas de fase aguda: Hp bovina (McNair et al, 1997), CRP canina (Parra et al, 2007), Hp canina (Parra et al, 2005) y CRP porcina (Martínez-Subiela et al, 2007).

3. Marcadores de infarto de miocardio: como la creatina quinasa en el ganado porcino (Tuomola et al, 2002).

4. Anticuerpos. Anti Ig-G de conejo, caballo, cabra, oveja, ratón, rata y cerdo (Bacigalupo et al, 1992) y anti Ig-A e Ig-G de ratón (Hale et al, 2001).

5. Otros compuestos, como el zeranol (Launay et al, 2004) que ha sido ampliamente utilizado en numerosos países para aumentar la tasa de crecimiento y el índice de

conversión del ganado de producción de carne.

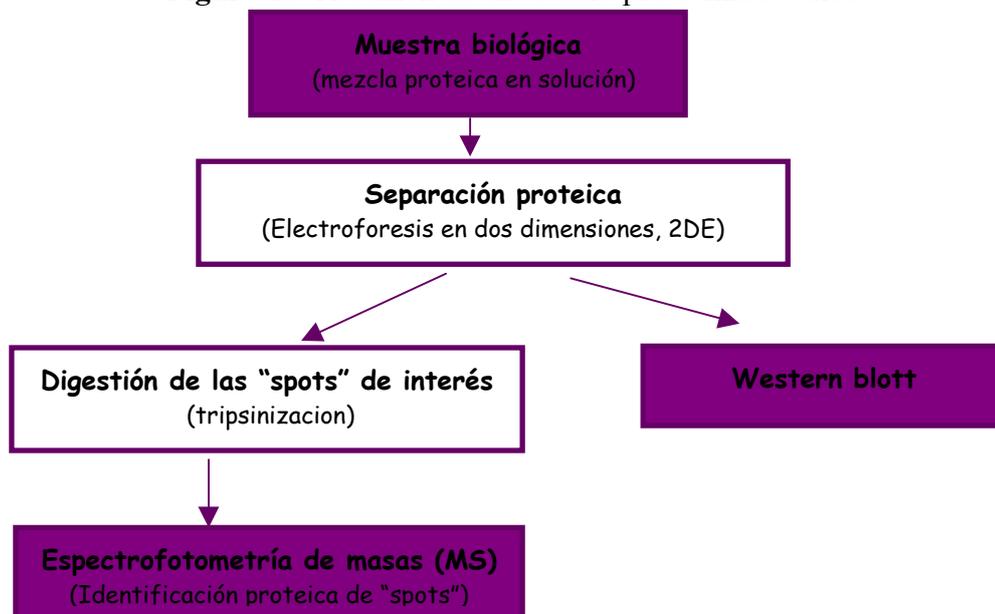
SECCIÓN 4. PROTEOMICA.

4.1. Introducción a la proteómica.

La proteómica se encarga del estudio de las proteínas expresadas por un genoma en un tejido determinado en un tiempo concreto (Sironi et al, 2001). El proteoma, a diferencia del genoma, es dinámico y está influenciado por varios factores como diferencias en el corte y empalme del ARN mensajero y modificaciones posttranscripcionales de los productos génicos, que hacen el análisis proteómico más complejo (Johnson et al, 2008). De este modo, el proteoma puede ser diferente en función de las condiciones medioambientales, de manejo y del estado fisiológico de los animales (Roncada et al, 2007).

En un estudio proteómico general (Fig. 13) se utilizan, en primer lugar, técnicas de electroforesis en dos dimensiones para realizar la separación proteica en función de su punto isoeléctrico y peso molecular y posteriormente se emplea la espectrofotometría de masas para identificar las proteínas previamente separadas en base a su composición peptídica (Vitorino et al, 2004).

Figura 13. Resumen de un estudio proteómico básico.



Con los estudios proteómicos se pretende conseguir información para identificar posibles biomarcadores específicos de enfermedad, de modo que al verse modificados en

condiciones anormales sirvan como marcador de uso diagnóstico o pronóstico (Miller et al, 2004).

Hasta ahora han sido caracterizados y analizados los mapas proteómicos séricos de algunas especies animales como el ganado bovino (Wait et al, 2002), el perro (Preblmayer, 2002), la rata (Gianazza et al, 2002), el cerdo (Miller et al, 2008), el caballo (Miller et al, 2004) y la gallina (Huang et al, 2006).

4.2. Electroforesis en 1 y 2 dimensiones.

La electroforesis es un método de separación bioquímica basado en la capacidad de las moléculas con carga en migrar hacia el electrodo con carga contraria bajo la influencia de un campo eléctrico en una solución acuosa (Westermeyer, 1993). Debido a la diferencia de masa y carga de las partículas, la velocidad de migración de las mismas es diferente y por lo tanto pueden ser separadas en fracciones únicas.

4.2.1. Electroforesis en una dimensión.

Existen tres métodos de separación electroforética de moléculas en una dimensión:

- Electroforesis o electroforesis zonal: Se basa en la separación de moléculas en función de su carga en un sistema de pH constante.
- Isotacoforesis (ITP): se basa en la migración de las moléculas a velocidad constante pero con un sistema de fuerzas discontinuo. No suele utilizarse más que para orientar las moléculas antes de una electroforesis.
- Isoelectroenfoco (IEF): separa las moléculas en función del pH en el cual la carga neta es cero (punto isoelectrico o pI). Se consigue utilizando un gradiente de pH en el soporte donde se realiza la electroforesis.

El método más comúnmente utilizado en el laboratorio es la electroforesis zonal y podemos encontrar dos tipos diferentes de electroforesis:

1. Electroforesis en solución libre. Por lo general se utiliza cuando se desea realizar una electroforesis capilar, principalmente para HPLC (High performance liquid chromatography). En la electroforesis capilar, la muestra es dispersada en un medio y suspendida en un tubo capilar con diámetros de 50 a 100µm y una longitud de 20 a 30cm.

Ambas terminaciones del capilar son sumergidas en tampón donde los electrodos están integrados. El tamaño pequeño del aparato facilita disipar calor cuando son aplicados grandes campos eléctricos.

Mediante esta técnica electroforética las moléculas en suspensión son separadas en función de su carga/tamaño y posteriormente son detectadas al determinar su absorbancia a 280 o 260nm. Los resultados son procesados por el software del HPLC (Hjerten, 1983).

2. Electroforesis en soportes compactos. Este tipo de electroforesis se basa en hacer que la muestra se desplace en un soporte sólido o matriz. Se han utilizado muchos materiales como matriz, como son el papel, acetato de celulosa o el gel. Hoy en día el más utilizado es el gel debido principalmente a su gran estabilidad y a la posibilidad de ajustar el tamaño del poro. Con este tipo de electroforesis las moléculas en suspensión son separadas en función de su peso molecular y tamaño (Westermeier, 1993).

Los geles de agarosa presentan un tamaño de poro grande por lo que se usa para realizar inmunolectroforesis o electroforesis de afinidad. Sin embargo los geles más utilizados son los geles de poliacrilamida que presentan un tamaño de poro menor y permiten la separación de proteínas más pequeñas.

La producción de geles de poliacrilamida se basa en la polimerización de monómeros de acrilamida entrecruzados por compuestos bifuncionales de enlace como N,N'-metileno-bisacrilamida que finalmente forman una matriz porosa. La reacción comienza con la adición de persulfato amónico, como catalizador, y TEMED, que proporciona los grupos amino terciarios necesarios para liberar los radicales. La reacción debe llevarse a cabo en casetes cerrados para asegurar un medio sin oxígeno.

La eficiencia de la polimerización se ve influenciada por la calidad de los reactivos, la concentración de monómeros de acrilamida, la temperatura y el pH. De modo que a mayor concentración de monómeros y mayor temperatura, más rápida y eficiente será la polimerización. El sistema catalítico formado por el uso de persulfato amónico y TEMED solo funciona a pH neutro o básico (Westermeier, 2008).

El tamaño del poro depende de la concentración de monómeros de acrilamida y de la proporción de bisacrilamida de la solución, de modo que al aumentar la concentración de ambas disminuye el tamaño del poro y por lo tanto podrán difundir únicamente las moléculas más pequeñas de la solución proteica a separar. Generalmente se realizan

electroforesis con concentraciones entre un 5 y un 15% de acrilamida/bisacrilamida.

Las muestras que van a ser separadas electroforéticamente utilizando geles de poliacrilamida pueden aplicarse en condiciones reductoras y no reductoras. Generalmente se utilizan las condiciones reductoras que se obtienen mediante la utilización de mercaptoetanol o ditioneitol (DTT) como agentes reductores que producen la rotura de los puentes disulfuro de la proteína. Además se suele añadir un agente solubilizador como es el sodio dodecil sulfato (SDS) capaz de desnaturalizar la proteína y disolver las uniones por puentes de hidrógeno y desplegar las estructuras secundarias y terciarias de las proteínas. La electroforesis en gel de poliacrilamida utilizando SDS se denomina comúnmente SDS-PAGE y es la más empleada en estudios proteómicos (Westermeier et al, 2008).

4.2.2. Electroforesis en dos dimensiones (2-DE).

La electroforesis en dos dimensiones es una combinación de dos diferentes técnicas electroforéticas donde las moléculas en suspensión son separadas en base al punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (Pm).

La primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF) en tiras o barras de gel de gradiente de pH, de modo que se consigue la separación proteica en función del pI de cada proteína. Posteriormente las tiras de IEF serán cargadas en un gel de poliacrilamida y se realiza una electroforesis SDS-PAGE para obtener la separación de las proteínas en función del peso molecular de las mismas y así la segunda dimensión (Anderson et al, 1977).

El isoelectroenfoque (IEF) se realiza utilizando moléculas anfotéricas, es decir que presentan la característica de comportarse como un ácido o una base en función del pH en el que se encuentren. Estas moléculas presentan un pH determinado para el cual la carga neta de la molécula es cero, ese será su pI. El IEF requiere la utilización de gradientes de pH para que el pI de todas las moléculas a separar este presente. Las proteínas, enzimas y péptidos son moléculas anfotéricas, por lo que son susceptibles de ser utilizadas en IEF.

Para conseguir el gradiente de pH se suelen utilizar geles o tiras de geles de inmobilinas. Una inmobilina es una base o un ácido débil definido por constante de

disociación (pK). Para conseguir unos valores de pH precisos es necesario utilizar al menos dos inmovilinas diferentes, una ácida y una básica, de modo que se obtienen dos soluciones que serán mezcladas para conseguir el gradiente deseado. El gradiente de pH más comúnmente utilizado es de 4 a 10 (Westermeier, 1993).

4.3. Espectrofotometría de masas.

La espectrofotometría de masas (MS) se ha utilizado para la identificación, caracterización y cuantificación de proteínas en estudios proteómicos (Conrad et al, 2008). Es una técnica analítica que mide el cociente masa/carga de los iones (m/z) cuando son sometidos a un campo eléctrico o magnético.

Para realizar una identificación proteica desde un 2-DE gel es necesario cortar las manchas o “spots” obtenidas en dicho gel, que corresponderán a proteínas completas o fragmentos, y realizar una digestión de las mismas con el fin de obtener únicamente péptidos (Westermeier et al, 2008).

Existen dos tipos de digestión proteica, utilizando enzimas proteolíticas o mediante el uso de sustancias químicas. Comúnmente se utiliza la enzima tripsina para realizar la digestión de proteínas debido a que está ampliamente estudiada y digiere las proteínas de una manera muy específica, corta la molécula por las lisinas y argininas (Nyman, 2001). Una vez realizada la digestión peptídica la muestra estará preparada para su estudio espectrofotométrico.

Un espectrofotómetro de masas que consta de tres componentes fundamentales:

1. Ionizador: lugar del espectrofotómetro donde se realiza la ionización en fase gaseosa de las moléculas de la muestra. En proteómica se utilizan principalmente dos técnicas de ionización, el electroespray (ESI) o la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI).

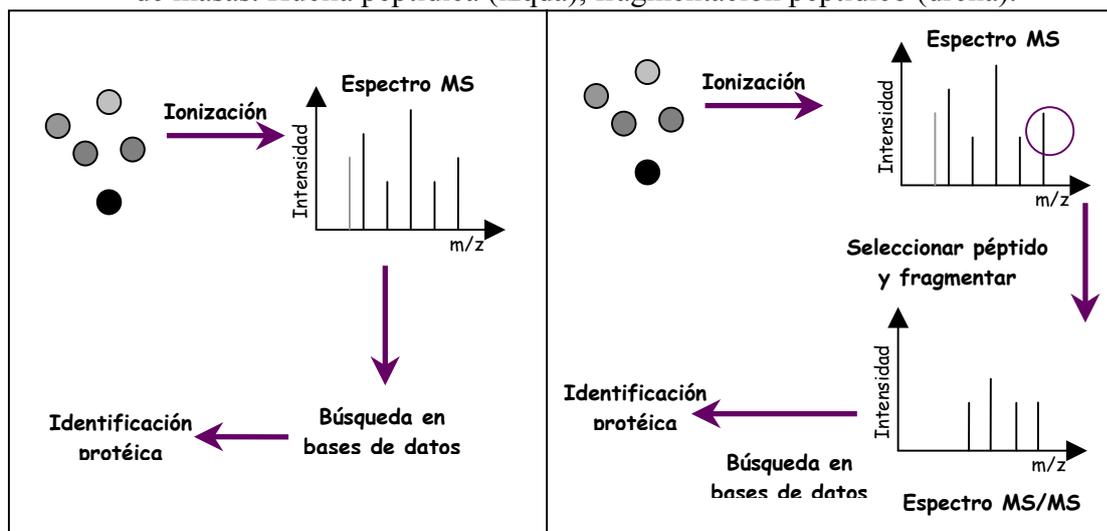
2. Analizador: encargado de separar los iones de acuerdo a su cociente m/z . En función del tipo de separación de iones, los analizadores pueden ser de 4 tipos: de tiempo de vuelo, de cuadrúpolo, de Trampa de Iones y de Sector magnético. El más sencillo es el conocido como tiempo de vuelo (time-of-flight, TOF) que determina el tiempo que permanece el ión volando en la región del analizador. Este tiempo es proporcional a la

raíz cuadrada de su cociente m/z .

3. Detector: recoge la señal producida por cada ión y la envía a un sistema de datos donde la relación m/z es analizada en función de la abundancia relativa de cada ión generándose lo que se denomina un espectro de masas.

Los espectros de masa que se generan para la identificación de proteínas son generalmente de dos tipos: huella peptídica (peptide mass fingerprinting, PMF) o fragmentación peptídica (tandem mass spectrometry, MS/MS). La huella peptídica consiste en obtener un espectro de masas de cada uno de los iones que forman la proteína (espectro MS), mientras que la fragmentación peptídica consiste en fragmentar aquellos péptidos que poseen altas masas y obtener un segundo espectro de masas, en este caso denominado de fragmentación (espectro MS/MS) (Fig. 14).

Figura 14. Métodos más comunes de identificación proteómica mediante espectrofotometría de masas. Huella peptídica (izqda), fragmentación peptídico (drcha).



Generalmente una identificación se comienza con PMF comparando las masas peptídicas obtenidas en el espectro de masas con las masas peptídicas teóricas existentes en las bases de datos (Pappin et al, 1993). PMF es una técnica de identificación de proteínas ideal para aquellos genomas que están altamente caracterizados (Shevchenko et al, 2000). No obstante, en ocasiones no se obtiene una identificación peptídica debido a:

- Insuficiente número de péptidos observados en el espectro de masas sobre la proteína a identificar.

- Muestra contaminada con otras proteínas.
- Excesivas modificaciones post-translacionales en la proteína que puede resultar en masas diferentes a las que se predicen en las bases de datos.
- Muy poca homología entre la proteína a identificar y las presentes en las bases de datos, pues no todas las proteínas existentes en la actualidad aparecen en las bases de datos.

Cuando no se ha podido realizar una identificación proteica mediante PMF se utiliza MS/MS. El espectrofotómetro utilizado debe ser capaz de seleccionar iones con un cociente m/z en particular y fragmentarlos. Generalmente la fragmentación se realiza mediante disociación inducida por colisión en fase gaseosa. Normalmente se usa helio, nitrógeno o argón como moléculas de gas contra las que los iones peptídicos colisionan. Como resultado, los iones peptídicos forman fragmentos más pequeños que serán comparados con la información presente en las bases de datos. Con esta técnica se necesita un menor número de péptidos para obtener una identificación proteica adecuada, siempre que el genoma en el que se esté trabajando sea conocido (Shevchenko et al, 2000).

Cuando ninguna de las técnicas anteriormente descritas consiguen dar una identificación para una proteína determinada, se utiliza la técnica de secuenciación de *novo* que consiste en tratar de obtener la secuencia aminoacídica de la proteína desde los resultados del espectro de fragmentación iónica. Se realizan pruebas oligonucleótidas comparando los resultados de la secuencia obtenida con pequeños trozos de la secuencia de nucleótidos presentes en la base de datos.

Material y métodos común.



SECCIÓN 1. EQUIPOS Y REACTIVOS UTILIZADOS.

1.1. Equipos.

1.- Contador multitécnica VICTOR 1420 (EG&G[®] Wallac Oy, Turku, Finlandia) (Fig. 15). Este aparato permite determinar la fluorescencia a tiempo retardado de diversos lantánidos tales como europio, samario, terbio o disprosio, por lo que fue empleado para medir la fluorescencia del europio de los fluoroinmunoensayos desarrollados para la cuantificación de Hp y CRP porcina.

Figura 15. Contador multitécnica Victor 1420 (EG&G[®] Wallac Oy, Turku, Finlandia).



El fluorímetro contiene una lámpara flash de xenón UV que produce una luz de excitación. Esta luz es dirigida mediante un sistema de lentes y espejos a la muestra contenida en un pocillo, excitando al lantánido de la misma. Esta excitación del lantánido conlleva la emisión de luz que llegará a un fotomultiplicador encargado de realizar la lectura. El aparato dispone también de control de temperatura, agitador y dispensador de reactivos.

2.- Lavador de placas (DELFLIA[®] plawash, EG&G[®] Wallac Oy, Turku, Finlandia) (Fig. 16). Utilizado para eliminar restos de reactivos durante el desarrollo de los fluoroinmunoensayos.

3.- Agitador de placas (TITRAMAX 100, Heidolph-Instruments-GmbH & Co KG, Schwabach, Alemania) (Fig 16). Permitted mejorar y acortar cada una de las incubaciones.

Figura 16. Lavador automático de placas (DELFLIA[®] platewash, EG&G[®] Wallac Oy, Turku, Finlandia) (drcha). Agitador de placas (TITRAMAX 100, Heidolph-Instruments-GmbH & Co KG, Schwabach, Alemania) (izda).



4.- Espectrofotómetro Power Wave[™] XS (Bio-Tek Instruments, Inc., Vermont, Estados Unidos) (Fig.17). Necesario para realizar la medición de la absorbancia (ABS) a diferentes longitudes de onda, fundamentalmente a 280nm en la purificación de proteínas y de anticuerpos.

Figura 17. Espectrofotómetro Power Wave[™] XS (Bio-Tek Instruments, Inc., Estados Unidos).

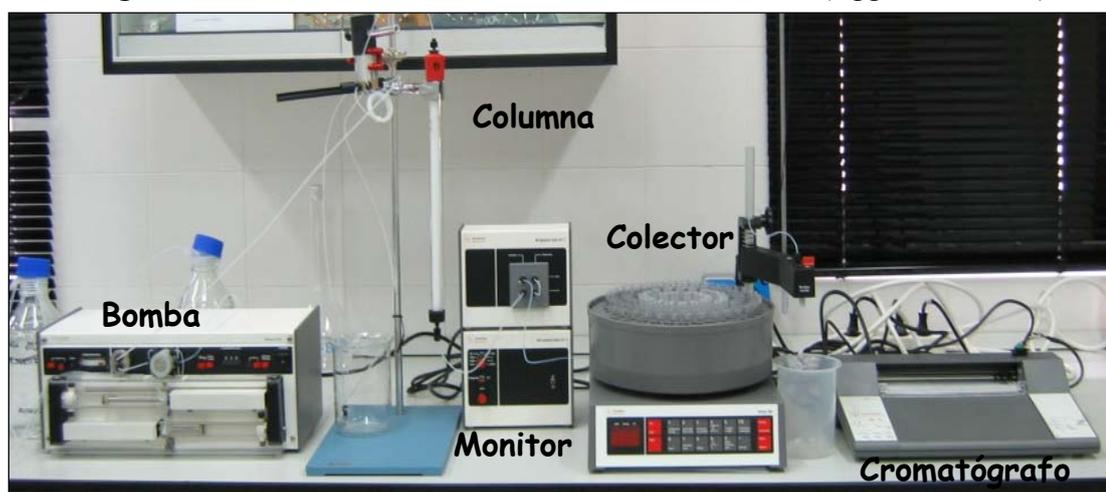


5.- Sistema de filtración en gel FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography de Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) (Fig 18). Se empleo para el marcaje de anticuerpos con europio y la purificación de la haptoglobina porcina.

Consta de un monitor de ultravioleta UV-1 (110/220 v), una bomba (P-500), un colector de fracciones (FRAC-100) y un registrador (REC 111) que realiza los cromatogramas. El sistema lleva acoplada una columna de Superdex 200 100/300 GL (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), que separa las moléculas en función de su

peso molecular. Antes de introducir las muestras en este sistema fueron filtradas para eliminar agredados utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro (MILLEX®-GV; Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda).

Figura 18. Sistema de FPLC de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia).



1.2. Reactivos.

1.- Placas de microtitulación recubiertas de estreptavidina (DELFLIA[®], Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Bélgica) (Fig 19).

Figura 19. Placas de microtitulación recubiertas de estreptavidina empleadas en ambos ensayos (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Bélgica).



2.- Tampón de ensayo (TE) (DELFLIA[®], Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Bélgica). El tampón de ensayo se empleó en la preparación de las diluciones de las muestras y de los anticuerpos requeridos en el ensayo.

3.- Solución de lavado (DELFLIA[®], Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Bélgica).

4.- Solución intensificadora de la fluorescencia (DELFLIA[®], Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Bélgica).

SECCIÓN 2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE LOS INMUNOENSAYOS A TIEMPO RETARDADO DESARROLLADOS.

El tipo de inmunoensayo basado en TR-IFMA desarrollados para la determinación de Hp y CRP porcina en distintos fluidos orgánicos (jugo cárnico y saliva) fue, en ambos casos, un inmunoensayo no-competitivo tipo sándwich que utiliza la tecnología DELFLIA (Fig. 20), y que consta de los siguientes tipos de anticuerpos:

1. Anticuerpos de captura. Como anticuerpos de captura se utilizaron anticuerpos unidos a biotina. La biotina es una proteína de bajo peso molecular (244Da) que presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los restos amino de las proteínas. De este modo es capaz de unirse a la estreptavidina presente en las placas de microtitulación utilizadas, permitiendo fijar el anticuerpo a las placas.

El motivo de emplear el sistema biotina-estreptavidina en lugar de usar anticuerpos sin biotinar fijados directamente sobre la placa es que, en general, de esta forma se reduce la cantidad de anticuerpo necesario para el ensayo.

2. Anticuerpos de detección. Como anticuerpos de detección se utilizaron anticuerpos marcados con un quelato de lantánido, el quelato de europio. Este anticuerpo se unirá de forma específica a la proteína de la muestra y emitirá altas cuentas de fluorescencia permitiendo obtener un rango de ensayo amplio y un background bajo.

SECCIÓN 3. MARCAJE DE ANTICUERPOS DE CAPTURA Y DE DETECCIÓN.

3.1. Biotinación de anticuerpos de captura.

La biotinación de los anticuerpos se realizó utilizando Sulfa-NHS-Biotin (Pierce Biotechnology, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante que recomienda marcar 1mg de anticuerpo con un exceso molar de biotina de 40 para conseguir de 4-6 grupos de biotina por molécula de anticuerpo.

Los pasos realizados para la biotinación fueron los siguientes:

1.- Preparación del anticuerpo: el tampón de la solución de anticuerpo no debe presentar aminos ni restos de glicerol ya que interfieren con la reacción de biotinización, por ello se dializó el anticuerpo frente a NaCl 0.9% utilizando Columnas NAP-10 (Amersham Biosciences; Uppsala, Suecia) (Fig. 20).

Figura 20. Diálisis del anticuerpo utilizando una Columna NAP-10 (Amersham Biosciences; Uppsala, Suecia).



2.- Cálculo del volumen de anticuerpo necesario. El volumen necesario (X) de una solución inicial de anticuerpo de concentración conocida (C) para obtener 1mg de anticuerpo se calculará con la siguiente fórmula:

$$X \mu\text{l de AC} = \frac{1\text{mg de AC} \times 1000\mu\text{l}}{C}$$

3.- Cálculo del volumen de solución de biotina necesario. Se comienza calculando los moles de anticuerpo que tenemos (Y). Como partimos de una solución de anticuerpos IgGs y el peso molecular de las mismas es de 160.000 g/mol, tendrá los siguientes moles:

$$\frac{X \text{ mg de AC} \times 1.000}{160.000} = Y \text{ mmol AC}$$

Para que la solución de biotina esté en exceso molar de 40 veces se tendrá que

Material y métodos común

añadir un número (Z) de milimoles de biotina:

$$\text{ml de AC} \times \frac{\text{mg AC}}{\text{ml}} \times \frac{\text{Ymmol de AC}}{\text{mg de AC}} \times \frac{40\text{mmoles de biotina}}{\text{mmol de AC}} = \mathbf{Z \text{ mmol de Biotina}}$$

Finalmente para convertir los mmol de biotina en unidades de volumen (μl) se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{mmol de biotina} \times \frac{1.000.000\mu\text{l}}{\text{L}} \times \frac{\text{L}}{10\text{mmol}^*} = \mathbf{\mu\text{l de Biotina}}$$

* la solución de biotina proporcionada por el kit es de 10mM y se reconstituye en 224 μl de agua MiliQ

4.- Incubación de reactivos. A la solución de anticuerpo se le añade la cantidad de solución de biotina calculada y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente.

5.- Purificación del anticuerpo biotinado. Tras el periodo de incubación, los anticuerpos fueron dializados utilizando una columna NAP-10 frente a tampón TSA (Tris-HCl pH 7,5 + NaCl 150 mM + NaN_3 0,02%) con el fin de eliminar restos de biotina no unida al anticuerpo.

6.- Cálculo de la concentración de anticuerpos biotinados de la solución final. Se determinó la absorbancia a 280nm de la solución resultante para calcular la concentración obtenida. Para calcular la concentración (C) en mg/ml de anticuerpos presentes en nuestra solución final, partiendo de la absorbancia a 280 nm, hay que dividir el valor de absorbancia obtenida por una constante (ϵ), que para el caso de las inmunoglobulinas IgGs tiene un valor de 1,34.

$$A_{280} = \epsilon \times l \times C$$

$$C = A_{280} / 1,34 = \text{---- mg/mL}$$

7.- Conservación del anticuerpo. Se añadió albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% a la solución de anticuerpos biotinados, para evitar su agregación y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

3.2. Marcaje de anticuerpos de detección con europio.

El marcaje de los anticuerpos con europio se realizó utilizando un quelato de europio liofilizado (Innotrac Diagnostics Oy, Turku, Finlandia).

Para el marcaje se recomienda el uso de 1mg de anticuerpo, y quelato de europio 100 veces en exceso molar, en un volumen final de 1ml, de tal manera que son necesarias los siguientes pasos:

1.- Preparación del anticuerpo. Es esencial tener en cuenta que el tampón en el que está conservado el anticuerpo no contenga grupos amina o azida, por ello generalmente se dializa frente a NaCl 0.9% utilizando columnas NAP-10TM.

2.- Cálculo del volumen de anticuerpo a utilizar: el volumen dependerá de la concentración de anticuerpo de partida (C) y se calculará con la siguiente fórmula:

$$X \mu\text{l de AC} = \frac{1\text{mg de AC} \times 1000\mu\text{l}}{C}$$

3.- Cálculo del volumen de quelato de europio necesario. Como se requiere que este 100 veces en exceso molar es imprescindible conocer los moles de anticuerpo que se va a utilizar (Y). Suponiendo que sean todos IgGs, cuyo peso molecular es de 160.000 g/mol, tendrá los siguientes moles:

$$\frac{X\text{mg de AC} \times 1.000.000}{160.000} = Y \text{ nmol AC}$$

Para que el quelato esté en exceso molar de 100 veces se tendrá que añadir un número (Z) de nanomoles de quelato de europio:

$$100 \times Y \text{ nmol de AC} = Z \text{ nmol de quelato de europio}$$

Finalmente para convertir los nmol de quelato en unidades de volumen (μl) se aplica la siguiente fórmula:

$$\frac{Z\text{nmol}}{* \text{mmol} / \text{Litro quelatodeEu}} = \mu\text{l de quelato de europio}$$

* la solución de quelato de europio de la que disponíamos tenía una concentración de 40nmol

4.- Incubación de reactivos. Antes incubar los reactivos hay que ajustar el pH de la

Material y métodos común

reacción hasta pH 9.8 con tampón carbonato 50mM y se completar hasta un volumen total de 1ml con agua MiliQ. El ml formado se incubó durante toda la noche a 4°C.

5.- Purificación del anticuerpo marcado con europio. La solución de anticuerpos obtenida se filtró con un filtro de 0,22 µm de poro y posteriormente, se purificó utilizando un FPLC con una columna de Superdex 200 y utilizando como tampón de elución Tris salino (TSA).

6.- Cálculo de la concentración de anticuerpo marcado de la solución final. Se determinó la absorbancia a 280nm de la solución final para calcular la concentración (C) obtenida, del mismo modo que se realizó para los anticuerpos biotinados, utilizando la siguiente fórmula:

$$A_{280} = \epsilon \times l \times C$$
$$C = A_{280} / 1,34 = \text{---- mg/mL}$$

7.- Conservación del anticuerpo. Finalmente se añadió albúmina sérica bovina (BSA) al 0,1% a la solución de anticuerpos marcados con europio, para evitar su agregación y se almacenó a -20°C hasta su posterior utilización en el desarrollo de los fluoroinmunoensayos.

8.- Contenido de quelato de europio de los anticuerpos tras el marcaje. Se comparó la fluorescencia emitida por el europio presente en nuestra solución de anticuerpos con la fluorescencia emitida por un estándar de europio de concentración conocida de 1nmol/L. Para ello se diluyó la solución de anticuerpo marcado con europio 1:500, 1:10000 y 1:100000 en solución intensificadora y se incubaron 200µl de cada dilución en un pocillo de placas de microtitulación durante 20 minutos en agitación continua.

Tras el periodo de incubación se midió la fluorescencia emitida en cuentas por segundo (cps) y se realizaron los siguientes cálculos con el fin de comprobar el número de quelatos de europio unidos por molécula de AC:

$$\mu\text{mol/L Eu}^{+3} = \frac{\text{cps x factor de dilución}}{1000 \times \text{cps 1nmol/L Eu standar}}$$

$$\mu\text{mol/L IgG} = \frac{\text{mg/ml AC} \times 1000000}{\text{---}}$$

$$\text{Yield (Eu}^{+3}/\text{IgG)} = \frac{160000 \mu\text{mol/L Eu}^{+3}}{\mu\text{mol/L IgG}}$$

Para un óptimo marcaje de anticuerpos con europio el Yield, que representa el número de quelatos de europio unido por molécula de anticuerpo, debe de ser de entre 2-6 para anticuerpos policlonales y de 6-10 para anticuerpos monoclonales.

SECCIÓN 4. TOMA DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Todos los procedimientos realizados con los animales como el manejo y la toma de muestras, fueron aprobados por el Comité ético de la Universidad de Murcia.

Para la realización del presente trabajo se tomaron muestras de suero, saliva y jugo cárnico de cerdos en distintos estadios sanitarios siguiendo los protocolos que se detallan a continuación.

4.1. Toma de muestra sanguínea.

Las muestras sanguíneas necesarias para la obtención del suero sanguíneo se tomaron de la vena yugular utilizando tubos de vacío de 5-10ml (BC Vacutainer®, Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, USA) y agujas de 1.2 x 25 mm (Precision Glice™, Becton Dickinson Vacutainer Systems, Franklin Lakes, USA).

Una vez recogida la muestra sanguínea, los tubos se dejaron reposar durante una hora a temperatura ambiente para permitir la coagulación (Fig. 21). Posteriormente el suero fue separado por centrifugación a 2000g durante 10 minutos, alicuotado en tubos Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y almacenado a -20°C hasta su posterior análisis.

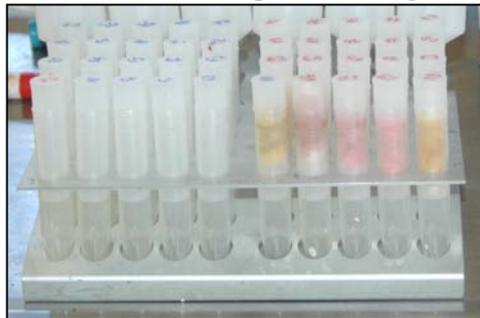
Figura 21. Tubos de vacío empleados para la recogida de sangre.



4.2. Toma de muestra salivar.

Las muestras de saliva se recogieron en tubos comerciales Salivette (Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co. D-51588 Nümbrecht), en los cuales los cilindros de algodón fueron remplazados por esponja, ya que el algodón era demasiado absorbente e impedía la liberación de la saliva durante el centrifugado (Fig. 22).

Figura 22. Tubos Salivette utilizados para la recogida de muestras de saliva.



La esponja se situó en la boca del animal, con la ayuda de una barilla fina de metal flexible (Fig. 23), durante 1-2 minutos. Posteriormente, la esponja fue depositada en el tubo Salivette y centrifugada durante 10 minutos a 3.500 r.p.m. La saliva se obtuvo del fondo del tubo y se almacenó en tubos Eppendorf a -20°C .

Figura 23. Recolección de muestra de saliva de un cerdo.



4.3. Toma de muestra cárnica.

Para la obtención de jugo cárnico, se recogieron porciones de músculo diafragmático de 2 x 2 x 2cm y se depositaron en colectores específicos de extracto cárnico (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) (Fig. 24). Posteriormente, los colectores se congelaron durante toda la noche a -20°C , y fueron descongelados a temperatura

ambiente durante 2 horas. Tras ser centrifugados a 2000g durante 5 minutos, el jugo cárnico fue recogido del fondo de los colectores, alicuotado y almacenado a -20°C hasta su análisis posterior (Fig. 25).

Figura 24. Colector de extracto cárnico con una porción de músculo diafragmático en su interior.

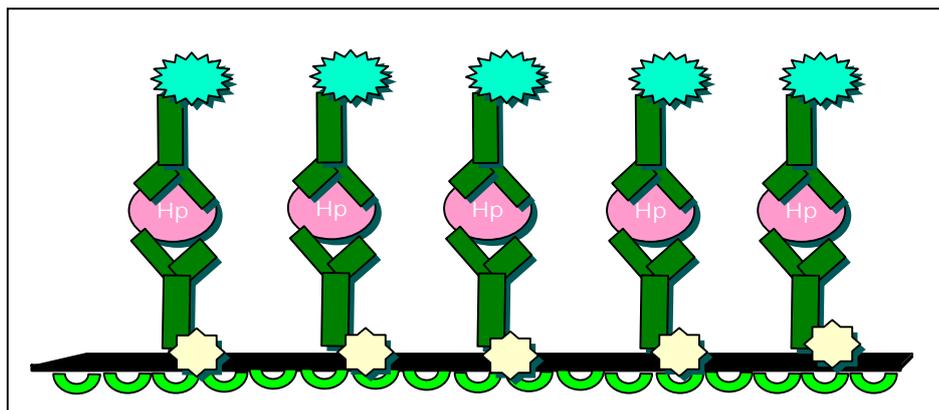


Figura 25. El jugo cárnico en el fondo de un colector de extracto cárnico tras ser congelado y descongelado.



Experiencia 1.

Ensayo para la determinación de Haptoglobina porcina en muestras de saliva y jugo cárnico.



SECCIÓN 1. INTRODUCCIÓN.

La Haptoglobina (Hp) es una proteína de fase aguda mayor en el ganado porcino. Se han encontrado concentraciones de Hp elevadas durante el curso de ciertas enfermedades víricas, como la Peste porcina Clásica y Africana (Sánchez-Cordón et al, 2007), síndrome respiratorio y reproductivo porcino (Díaz et al, 2005) y el síndrome del desmedro porcino (Segalés et al, 2004), así como en infecciones bacterianas producidas por *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica* (Francisco et al, 1996), *Streptococcus suis* (Knura-Deszczk et al, 2002), o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Laurietzen et al, 2003). Además las concentraciones de Hp has sido utilizadas como indicador de la extensión y severidad de las lesiones pulmonares a nivel de inspección post-mortem en el matadero (Pallarés et al, 2008).

Para poder incorporar los ensayos para la cuantificación de PFA en el sistema de inspección de la producción porcina, los ensayos deben ser sensibles y específicos a la par que rápidos, robustos y fáciles de utilizar (Eckersall, 2000).

El único método que permite la determinación de Hp en muestras de saliva y jugo cárnico hasta ahora incluye incubaciones largas (Hiss et al, 2003), por lo que su uso práctico rutinario se ve limitado. Este problema podría ser solventado mediante el empleo de la inmunofluorometría a tiempo resuelto (TR-IFMA) junto con anticuerpos monoclonales. La TR-IFMA permite la obtención de ensayos rápidos y mayor limite de detección (Lövgren et al, 1996) y el uso de anticuerpos monoclonales aseguran una alta especificidad del inmunoensayo permitiendo reducir el número de pasos (Liddell, 2005). Además la metodología TR-IFMA implica un ruido de fondo mínimo y la ausencia de interferencias con la muestra y de uniones inespecíficas, contribuyendo a una alta sensibilidad (Lövgren et al, 1996) que puede permitir la cuantificación de proteínas en muestras biológicas con bajas concentraciones proteicas como es el caso de la saliva y el jugo cárnico.

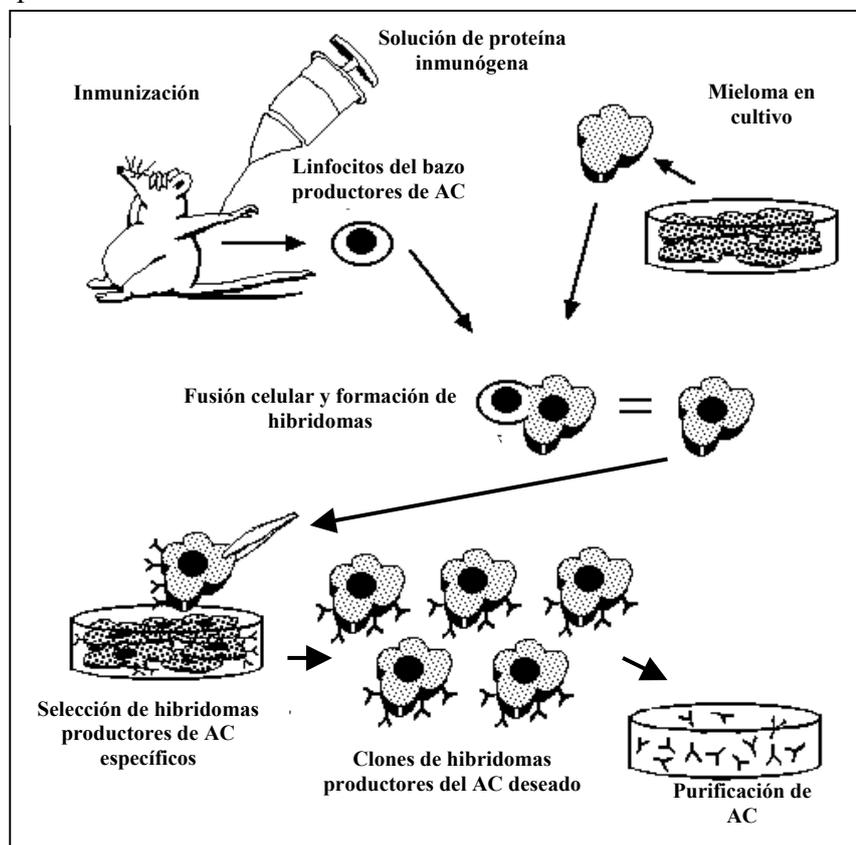
El objetivo de la **Experiencia 1** fue desarrollar un inmunoensayo basado en TR-IFMA para la determinación de Hp porcina en saliva y jugo cárnico utilizando un anticuerpo monoclonal específico producido para tal fin, e investigar si dicho inmunoensayo permitia la diferenciación entre animales sanos y enfermos.

SECCIÓN 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Producción de anticuerpos monoclonales.

La producción de anticuerpos monoclonales (mAb) tuvo lugar en el Laboratorio de la Unidad de Cirugía Experimental del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca de Murcia, donde la candidata realizó una estancia de investigación de nueve meses, incluida en su programa de formación predoctoral.

La metodología empleada para la producción de mAb se basa en la fusión celular entre células esplénicas productoras de anticuerpos y células inmortales de mieloma en cultivo (Kolher y Milstein, 1975) y se llevó a cabo utilizando protocolos generales estándar (Wang et al, 2007, Berhane et al, 2006 y Ahn et al, 2003) que se resumen en el siguiente esquema:



2.1.1. Animales.

Se utilizaron ratones Balb-C de 3 meses de edad (Fig. 26) para realizar las inmunizaciones frente a nuestra proteína porcina, y ratones de la raza Swiss para obtener macrófagos peritoneales. En ambos casos los ratones procedieron del animalario de la Universidad de Murcia y todos los procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia, siguiendo en todo momento la normativa

vigente de la Comunidad Europea sobre producción de anticuerpos monoclonales (ECVAM Workshop 23, 1997) y sobre protección y bienestar animal (Comisión de las Comunidades Europeas. SEC (2006) 65).

Figura 26. Ratones Balb-C de 3 meses de edad.



2.1.2. Obtención del inmunógeno.

2.1.2.1. Purificación proteica.

La Hp porcina fue utilizada como inmunógeno para la producción de anticuerpos monoclonales y se purificó desde suero porcino siguiendo el protocolo descrito por Fuentes (2006). En breve, se preparó una mezcla o “pool” sérico de 3ml procedente de cerdos con procesos inflamatorios agudos, como desmedro y prolapso rectal agudo, ya que presentaron concentraciones de Hp elevadas. El suero porcino fue fraccionado con amonio sulfato al 50% (Kent, 1999) para separar y eliminar las globulinas séricas mediante precipitación. Para obtener la solución al 50% se añadieron 0.939g de amonio sulfato (0.313g x 3ml) (Panreac Química, Barcelona, España) al pool sérico preparado, teniendo en cuenta la tabla para saturación con amonio sulfato (tabla 10).

Tabla 10. Tabla para la saturación con amonio sulfato.

| <i>Concentración inicial</i> | <i>Concentración final</i> | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 10% | 20% | 25% | 30% | 35% | 40% | 45% | 50% | 55% | 60% | 65% | 70% | 75% | 80% |
| 0% | 56 | 114 | 144 | 176 | 209 | 243 | 277 | 313 | 351 | 390 | 430 | 472 | 516 | 561 |
| 10% | | 57 | 86 | 118 | 150 | 183 | 216 | 251 | 288 | 326 | 365 | 406 | 449 | 494 |
| 20% | | | 29 | 59 | 91 | 123 | 155 | 189 | 225 | 262 | 300 | 340 | 382 | 424 |
| 25% | | | | 30 | 61 | 93 | 125 | 158 | 193 | 230 | 267 | 307 | 348 | 390 |
| 30% | | | | | 30 | 62 | 94 | 127 | 162 | 198 | 235 | 273 | 314 | 356 |
| 35% | | | | | | 31 | 63 | 94 | 129 | 164 | 200 | 238 | 278 | 319 |
| 40% | | | | | | | 31 | 63 | 97 | 132 | 168 | 205 | 245 | 285 |
| 45% | | | | | | | | 32 | 65 | 99 | 134 | 171 | 210 | 250 |
| 50% | | | | | | | | | 33 | 66 | 101 | 138 | 176 | 214 |
| 55% | | | | | | | | | | 33 | 67 | 103 | 141 | 179 |
| 60% | | | | | | | | | | | 34 | 69 | 105 | 143 |

Los valores se presentan expresados como el número de gramos de sal a añadir por litro de solución para cambiar las concentraciones de amonio sulfato desde una concentración inicial a una concentración final determinada.

El fraccionamiento sérico se consiguió tras 30 minutos de agitación lenta y

continua de la muestra y la centrifugación de la misma (Centrifuga refrigerada Z 300 K (HERMLE[®] Labortechnik GmbH, Wehingen, Alemania) durante 35 minutos a 4000rpm y 4°C. Posteriormente, se descartó el precipitado y el sobrenadante se dializó frente a NaCl 0,9% empleando una columna NAPTM-10 (Amersham Biosciences; Uppsala, Suecia). La solución obtenida tras la diálisis fue concentrada hasta aproximadamente 0,5ml mediante tubos Centricon[®] (Ultracel YM-10, Centrifugal Filter Devices, Millipore Corporation, Billerica, MA, Estados Unidos), para obtener fracciones proteicas de elevada concentración.

A continuación se realizó una filtración en gel, utilizando una columna Superdex 200 HR equilibrada con tampón Tris-HCl y acoplada a un sistema FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) para mejorar la recogida de las fracciones eluidas. Antes de inyectar en la columna la solución, fue filtrada con filtros de 0,22µm (Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Irlanda) para eliminar posibles agregados. El ritmo de elución utilizado fue de 20ml/h. Los picos de elución resultantes quedaron reflejados en el correspondiente cromatograma a un voltaje de 50mV.

2.1.2.2. Cuantificación y valoración de la pureza de la proteína.

La Hp porcina purificada aparece en el segundo pico de elución, tras la filtración en gel, según previos estudios (Fuentes, 2006), de modo que se cuantificó la concentración de Hp de las fracciones que componían dicho pico a una longitud de onda de 750nm. La cuantificación se realizó mediante el método Bradford utilizando el ensayo RC DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratorios, Inc. California, Estados Unidos) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez conocida la concentración de Hp de las fracciones se valoró su pureza realizando una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) (Lameli, 1970).

2.1.3. Preparación de células para la fusión.

2.1.3.1. Obtención de células esplénicas productoras de anticuerpos.

El primer paso para obtener células esplénicas productoras de anticuerpos específicos frente a Hp porcina fue la inmunización de los ratones. La pauta de inmunización consistió en 2 inoculaciones por vía intraperitoneal (Fig. 27), con una

diferencia de 15 días, de 50µg de inmunógeno (Hp purificada) diluidos en 293,3µl de Adyuvante Completo o Incompleto de Freund's (ACF y AIF respectivamente) (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos).

Figura 27. Inmunización intraperitoneal.



La función del adyuvante es prolongar la exposición del inmunógeno mediante una liberación lenta del mismo desde el punto de inoculación y estimular la formación de granulomas ricos en macrófagos y otras células inmunocompetentes. El ACF se utiliza únicamente para la primera inmunización debido a los graves efectos adversos que posee, como formación de granulomas crónicos y necrosis ulcerativa en los tejidos que rodean al área de inoculación. El AIF es menos potente pero a su vez menos tóxico que el anterior (Jackson et al, 1995) por lo que se utiliza para las sucesivas inmunizaciones.

Tras 10 días de la segunda inmunización intraperitoneal se valoró la respuesta inmunológica de los ratones frente a la Hp porcina, para lo cual se extrajo sangre del seno retro-orbitario y se realizó un screening como se describe en el apartado 2.1.7.1.

El ratón que presentó la mayor respuesta inmunológica se depositó en una jaula con un foco de luz infrarroja, para aumentar el flujo sanguíneo periférico, y se le inyectó, en la vena lateral de la cola, 50µg de inmunógeno diluido en PBS estéril en un volumen final de 800µl (Fig. 28).

Figura 28. Inmunización endovenosa de 50µg de inmunógeno.



A los tres días de la inyección endovenosa se obtuvieron las células del bazo del ratón. El procedimiento consistió en sacrificar el ratón de manera humanitaria utilizando

Experiencia 1

una campana de CO₂, obtener el bazo mediante cirugía aséptica en una cabina de flujo laminar vertical con seguridad biológica clase II (Telstar Bio II A, Telstar Life Science Solutions, Terrasa, Barcelona, España) (Fig. 29), y depositarlo sobre un separador celular estéril de 100µm de Nylon (BD Biosciences[®], Bedford, USA) para disgregar las células con la ayuda del émbolo de una jeringa y la adición de 5-6ml de medio de cultivo RPMI (Fig. 30).

Figura 29. Cabina de seguridad biológica clase II (izda). Esquema de flujo laminar vertical con filtros HEPA H-14 de expulsión y de impulsión (drcha).

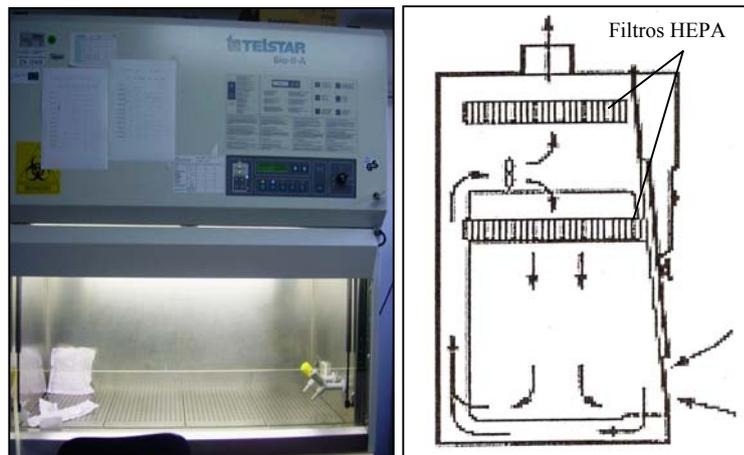


Figura 30. Extracción aséptica del bazo del ratón para la fusión celular (izda). Separador celular utilizado para disgregar las células del bazo (drcha).



La suspensión resultante fue recogida en un tubo Falcon de 50ml y se centrifugó a 1500r.p.m. durante 5 minutos. A continuación el precipitado se resuspendió en 1,5ml de ACK (Cloruro amónico 0,144M en Tris 17 mM pH 7,2) dejándolo actuar 4 minutos a 37°C y atmósfera de CO₂ con el fin de lisar los hematíes y asegurar una mínima contaminación. Posteriormente las células esplénicas disgregadas se lavaron con 30ml de RPMI para reestablecer la osmolaridad y se filtraron utilizando pipetas de vidrio con nylon en el interior para eliminar los posibles agregados celulares. Tras 3 lavados más con RPMI las células esplénicas estaban preparadas para a la fusión celular.

2.1.3.2. Preparación de las células de mieloma y de las placas de cultivo.

Para realizar la fusión celular, se utilizaron células de mieloma de ratón de la línea X63 Ag8.653 no secretora de inmunoglobulinas, desarrollada a partir de ratones Balb-C. Dichas células fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino, glutamina y antibiótico, hasta obtener un crecimiento logarítmico y una viabilidad no inferior al 95%, condiciones óptimas para la fusión celular. Momentos antes de la fusión, las células del mieloma se lavaron 3 veces con medio RPMI.

Las placas de cultivo, donde posteriormente crecerán las células fusionadas, fueron preparadas con un medio rico en interleukinas, secretadas por macrófagos peritoneales, para mejorar el crecimiento celular. Para obtener los macrófagos peritoneales se sacrificaron 4 ratones en una campana de CO₂ y se les inyectó 5-10ml de PBS estéril/ratón vía intraperitoneal. Se masajeó el abdomen de los animales durante 3 minutos para mejorar la disolución de los macrófagos abdominales y se extrajo el líquido intraperitoneal con una pipeta Pasteur. La solución recogida se centrifugó a 1500 rpm 5 minutos y posteriormente se descartó el sobrenadante. El sedimento de macrófagos se disolvió en medio de cultivo (RPMI suplementado con suero fetal bovino, glutamina y antibiótico) hasta un volumen total de 1000ml. Se plaquearon 18000 macrófagos por pocillo en placas estériles de fondo plano de 96 pocillos (Cellstar® Cell Cultura plates, Greiner Bio-One GMBH, Frickenhausen, Alemania) y se mantuvieron en cultivo a 37°C y una atmósfera del 5% de CO₂ hasta el día de la fusión utilizando un incubador con control de temperatura y CO₂ (Thermo / Forma Scientific© Series II CO₂ Water Jacketed Incubator Model 3110, Estados Unidos) (Fig. 31).

Figura 31. Placas y frascos de cultivo en un incubador con control de temperatura y CO₂.



2.1.4. Fusión celular y obtención de hibridomas.

El primer paso para realizar la fusión celular fue calcular la concentración de ambos tipos celulares implicados, pues se fusionan a una relación de 1 célula de mieloma por cada 2.5 células de bazo. El conteo se realizó utilizando una cámara de recuento celular Bürker (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemania).

Posteriormente se mezclaron ambos tipos celulares y se centrifugó la mezcla celular durante 10 minutos a 1500 rpm. Una vez desechado el sobrenadante, las células estaban preparadas para la fusión celular, que se realizó lentamente en varios pasos para asegurar una buena fusión de las membranas con el mínimo daño celular. El protocolo utilizado para la realización de la fusión celular entre células de bazo del ratón inmunizado y células de mieloma de ratón en cultivo se describe en la figura 32.

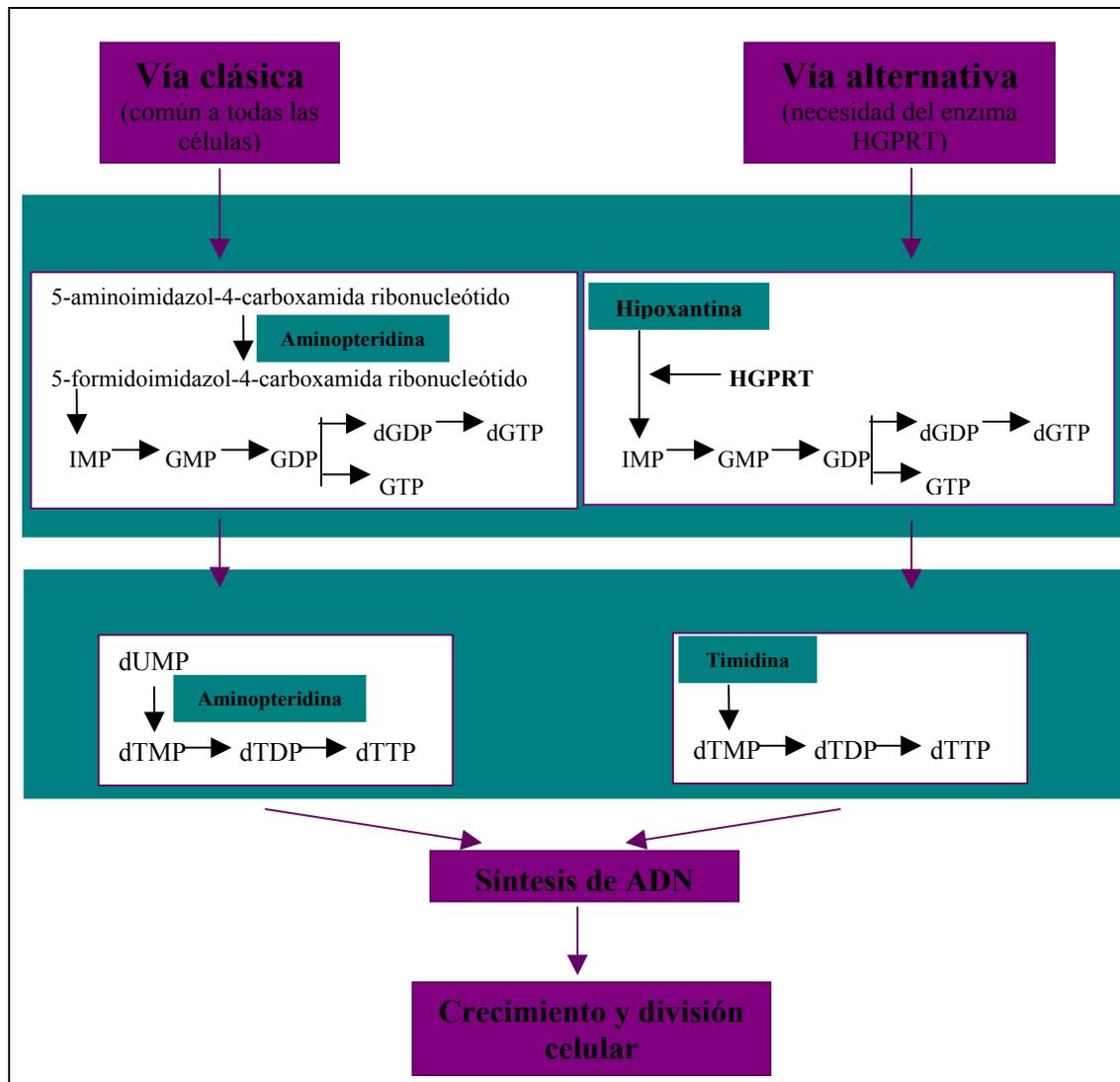
Figura 32. Resumen de los principales pasos para realizar una fusión celular.

1. Añadir 1ml de polietilenglicol (PEG) a 37°C gota a gota durante 1 minuto.
2. Agitar en círculos suavemente durante el segundo minuto.
3. Aspirar y expulsar suavemente la solución para disolver los agregados a lo largo del tercer minuto.
4. Dispensar 10ml de medio RPMI sin aditivos durante 10 minutos gota a gota (0,5ml cada 30 segundos). Posteriormente añadir otros 20ml durante 5 minutos (2ml cada 30 segundos).
5. Centrifugar de la suspensión resultante a 1000 rpm 8 minutos.
6. Añadir 100ml de medio de cultivo RPMI suplementado con: penicilina 50U/ml, estreptomicina 50µg/ml, L-glutamina 4mM, 20% de suero fetal bovino, aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato sódico 1mM y hepes 50mM.
7. Sembrar 100µl de suspensión de células fusionadas en las placas de 96 pocillos, previamente suplementadas con macrófagos, a una concentración de 145.000 células/pocillo. Mantener en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

A las 24 horas de la fusión celular se añadieron 100 µl/pocillo de medio de cultivo selectivo HAT (hipoxantina aminopteridina-timidina). Este medio inutiliza la vía clásica de síntesis de ADN mediante la acción de la aminopteridina y fuerza a las células a utilizar la vía alternativa donde es necesaria la enzima HGPRT (Fig. 33). Esta enzima está presente en las células del bazo y en los hibridomas formados pero no en las células del mieloma, por lo que estas últimas morirán al cabo de 5-10 días. Además las células esplénicas no pueden crecer en condiciones in vitro más de una semana, por lo que

únicamente habrá crecimiento de los hibridomas formados.

Figura 33. Esquema de actuación del medio selectivo HAT sobre los pasos metabólicos importantes para la síntesis de ADN.



2.1.5. Clonación y expansión de hibridomas.

2.1.5.1 Screening.

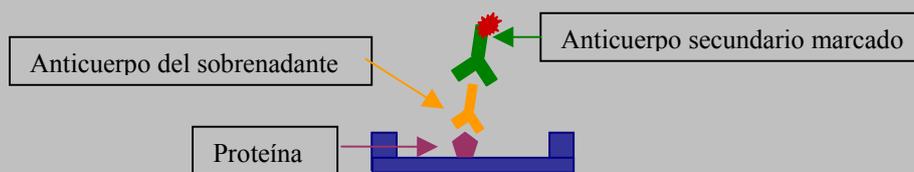
Se valoró el tamaño de los hibridomas mediante visualización con lupa a los 13 días de la fusión celular (Fig. 34) y a aquellos que tenían un número elevado de células, sin llegar a una concurrencia del 100%, se les retiraron 200µl de sobrenadante para valorar la producción de anticuerpo, por parte de estos hibridomas, frente a Hp porcina mediante un ELISA, siguiendo el protocolo descrito en la figura 35. Aquellos hibridomas que presentaron títulos de anticuerpos específicos altos fueron seleccionados para realizar la clonación.

Figura 34. Imagen de un hibridoma visualizado a 10x aumentos (izda). Microscopio óptico de contraste de fases utilizado para visualizar los hibridomas (drcha).



Figura 35. Protocolo del ELISA utilizado para realizar los screenings celulares.

1. Recubrir placas de poliestireno con 50µl/ pocillo de solución de proteína purificada a una concentración de 2,5µg/ml. Incubación a 37°C durante 1h.
2. Bloquear con PBS-5% con leche en polvo. Incubación a 37°C 30 minutos.
3. Añadir 100µl de los sobrenadantes a testar. Para el control positivo adicionar 400ng/µl de anticuerpo control, para el control negativo PBS. Incubación a 37°C 1h.
4. Lavar las placas por triplicado con Buffer de lavado (PBS + 0,1% Tween 20).
5. Añadir 100µl de anticuerpo secundario 1:2500 (anti- mouse IgG). Incubación a temperatura ambiente 1h.
6. Lavar con Buffer de lavado 5 veces y una última con agua MiliQ.
7. Añadir 100µl de solución substrato (citrato sódico 0,1M, ácido cítrico 0,1M, ABTS y H₂O₂).
8. Leer la absorbancia cada 5 minutos a 405nm hasta un total de 25 minutos en un espectrofotómetro (Power Wave™ XS, Bio-Tec Instruments, Inc. Vermont, Estados Unidos).



2.1.5.2. Clonación y congelación celular.

Los hibridomas cuyos sobrenadantes dieron positivo en ELISA y que secretaban altas cantidades de anticuerpos específicos frente a la proteína Hp porcina, se clonaron en placas de 96 pocillos mediante dilución límite (Liddell, 2005). La operación de clonaje consistió en contar las células de cada hibridoma seleccionado y diluirlas de modo que se siembren placas con una concentración de 1, 2 y 5 células/pocillo. Una vez obtenidos clones procedentes de una sola célula, y previo testaje mediante ELISA, se realizaron 2 clonajes más.

En cada clonación se congeló una alícuota celular para tener un depósito de células productoras de mAb en diferentes estadios.

Las células a congelar se centrifugaron a 500g durante 5 min y se resuspendieron en el medio de congelación. El medio de congelación utilizado presentaba gran concentración de suero fetal bovino, para ayudar a la conservación de las células, y 10% de DMSO como agente criopreservador. La suspensión se colocó en criotubos que se introdujeron en un baño de alcohol isopropílico para producir una disminución paulatina de temperatura (1°C/min) y se depositaron en una cámara a -70°C. A las 24-48 horas se transfirieron los criotubos a un tanque con nitrógeno líquido para su conservación por tiempo indefinido a -192°C.

2.1.5.3. Expansión de hibridomas.

Una vez conseguidos clones únicos, procedentes de una única célula, los hibridomas se expandieron a placas de 24 pocillos (BD Falcon™ Cell Culture Plates. BD Biosciences, New Jersey, Estados Unidos). Cuando alcanzaban una concurrencia del 75% se pasaron a placas de 6 pocillos (BD Falcon™ Cell Culture Plates. BD Biosciences, New Jersey, Estados Unidos).

Una vez obtenida una velocidad de crecimiento de los clones celulares adecuada y una concurrencia del 75%, las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 y 75cm² (BD Falcon™ Cell Culture Flasks. BD Biosciences, New Jersey, Estados Unidos). Posteriormente se realiza el proceso denominado *Grow to die* (GTD), que consiste en dejar crecer las células hasta que mueren, tras lo que se centrifugan en un falcon de 50ml (500g 5 min) y el sobrenadante se almacenó en refrigeración hasta su posterior purificación.

2.1.6. Isotipificación y purificación de los anticuerpos monoclonales.

2.1.6.1. Isotipificación del mAb.

La isotipificación se realizó mediante ELISA, recubriendo los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo plano Nunc-Immuno MaxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con 50µl de solución de proteína purificada específica (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgA e IgM) a 5µg/ml diluidos en Tris 0,1 M, pH 8 y utilizando los anticuerpos específicos (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos) descritos en la tabla 11. El protocolo utilizado se detalla en la figura 36.

Tabla 11. Anticuerpos secundarios utilizados para la determinación del isotipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos.

| Nombre | Especificidad | Origen |
|--------------------------------|---------------|--------|
| Anticuerpos secundarios | | |
| Anti- IgG ₁ | Ratón | Cabra |
| Anti- IgG _{2a} | Ratón | Cabra |
| Anti- IgG _{2b} | Ratón | Cabra |
| Anti- IgG ₃ | Ratón | Cabra |
| Anti-Ig A | Ratón | Cabra |
| Anti-Ig M | Ratón | Cabra |
| Anticuerpo revelador | | |
| Anti-IgG | Cabra | Conejo |

Figura 36. Protocolo ELISA para la isotipificación de sobrenadantes de cultivo celular.

- 1.- Incubar la placa durante 1 h a 37°C con las proteínas purificadas específicas.
- 2.- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado (PBS al 0,1% con Tween 20).
- 3.- Adicionar 100 µl de sobrenadante del anticuerpo a isotipar e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- 4.- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado.
- 5.- Recubrir la placa con los anticuerpos secundarios correspondientes e incubar 30 minutos.
- 6.- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado.
- 7.- Añadir el anticuerpo revelador anti-goat IgG peroxidasa.
- 8.- Lavar la placa tres veces con buffer de lavado tras 15 minutos de incubación a temperatura ambiente.
- 9.- Añadir 200µl de solución substrato (ácido cítrico + citrato sódico + 1 pastilla de ABTS (ácido 2,2'azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfónico) + 4 µl de H₂O₂ al

2.1.6.2. Purificación del mAb.

Se empleo una concentración de saturación con amonio sulfato del 60% para preparar los sobrenadantes para su posterior purificación por cromatografía de afinidad (Ito, 2000). Para que las altas concentraciones de sal residuales no interfirieran con los distintos usos del anticuerpo, el precipitado obtenido tras la saturación fue dializado frente a NaCl 0.9% utilizando columnas de diálisis NAPTM-10 (Amersham Bioscences, Alemania).

Posteriormente se realizó la purificación del mAb mediante cromatografía de

afinidad con el fin de eliminar los anticuerpos procedentes del suero fetal bovino (SFB) utilizado como aditivo en el medio de cultivo. La columna de afinidad proteica frente a Hp porcina se fabricó utilizando una matriz de sefarosa (CNBr-activated Sepharose 4B, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Alemania), ya que se une a las proteínas de manera espontánea, rápida y es fácil de manipular (Tseng et al. 2004).

Se utilizaron 6.8mg de Hp y 0.5g de matriz para fabricar la columna de afinidad proteica siguiendo el protocolo del fabricante (Fig. 37).

Figura 37. Protocolo para la fabricación de una columna de afinidad cromatográfica.

- 1.- Hidratar la matriz en HCl 1mM y lavar con 20x volúmenes de la misma solución durante unos 15 minutos.
- 2.- Equilibrar la matriz con tampón de unión (0.2M NaHCO₃ y 0.5M de NaCl, pH 8.3).
- 3.- Disolver la proteína purificada en tampón de unión a una concentración de 2mg/ml.
- 4.- Mezclar la matriz y la solución protéica y dejar incubar durante 2h a temperatura ambiente y agitación continua.
- 5.- Saturar los sitios activos restantes de la matriz con 1M etanolamina pH 8.
- 6.- Lavar con 5 ciclos alternantes de tampón de unión y tampón de lavado (0.1M acetato, 0.5M NaCl, pH 4).
- 7.- Equilibrar la matriz con PBS pH 7.5 y empaquetar la columna.

Tras fabricar la columna de afinidad, se incorporaron 7ml de sobrenadante de cultivo celular precipitado y dializado frente a PBS. Al pasar por la columna de sefarosa, por efecto de la gravedad, los anticuerpos específicos se unieron a la Hp de la matriz. Posteriormente se lavó la columna con 15ml de PBS para eliminar restos de sobrenadante del interior de la columna. Los anticuerpos específicos unidos en la Hp de la matriz, fueron eluidos con 50ml de tampón de elución (PBS pH 11) en fracciones de 1ml.

Los tubos eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) donde se recogieron las fracciones eluidas contenían 50µl de solución tampón (1M Tris- HCl, pH 6.8) para neutralizar el pH. Posteriormente se concentraron las fracciones de anticuerpo, utilizando tubos Centricon[®], hasta obtener alícuotas de 1mg/ml.

2.1.7. Valoración de la pureza y especificidad del mAb.

El mAb purificado mediante columna de afinidad cromatográfica, fue sometido a electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes con el fin de corroborar la ausencia de impurezas. La electroforesis se realizó según el método descrito por Laemmli en 1970 utilizando dithiothreitol (DTT) como agente reductor en vez de mercaptoetanol para evitar la toxicidad del mismo.

Se realizó un western blot para valorar la especificidad del mAb obtenido y así poner de manifiesto la unión específica del anticuerpo a la hapoglobina porcina. Para ello se realizó una electroforesis SDS-PAGE de muestras de suero porcino y se transfirieron las proteínas desde el gel de electroforesis a una membrana de PVDF (Hybond-P PVDF Membrana, GE Healthcare UK Ltd. Amersham Place, Buckinghamshire, Estados Unidos). Las condiciones de transferencia fueron de 100V durante 1h. Una vez transferidas las proteínas se realizó el western blot propiamente dicho sobre las membranas PVDF, siguiendo el protocolo descrito en la figura 38.

Figura 38. Protocolo para la realización del Western Blot encaminado a poner de manifiesto la especificidad del anticuerpo desarrollado.

- 1.- Bloquear la membrana con TTBS (Tris salino con 1% de Tween 20) al 5% de leche en polvo durante toda la noche a 4°C y en agitación.
- 2.- Lavar 4 x 10 min con TTBS.
- 3.- Añadir anticuerpo monoclonal anti-Hp a una dilución 1:2000. Incubar 4h a T^a ambiente y en agitación.
- 4.- Lavar 4 x 10 min con TTBS.
- 5.- Añadir anticuerpos secundarios diluidos 1:2500 (anti-mouse IgG HRP conjugate, Promega Corporation, Madison, Estados Unidos) e incubar 2h a T^a ambiente.
- 6.- Lavar 4 x 10 min con TTBS.

Para poner de manifiesto la fluorescencia del anticuerpo secundario empleado en el último paso del western blot, se utilizó un kit de detección específico (ECL plus western blotting detection reagents, GE Healthcare UK Limited. Amersham Place. Buckinghamshire, Estados Unidos) y las películas radiográficas HiperfilmTM ECL (GE Healthcare UK Limited. Amersham Place. Buckinghamshire, Estados Unidos). Las películas radiográficas se expusieron entre 5 y 10 minutos a la fluorescencia emitida y se revelaron utilizando una reveladora convencional.

2.2. Marcaje de anticuerpos.

2.2.1. Biotinación de anticuerpos de captura.

Con el fin de obtener los anticuerpos de captura específicos para el desarrollo del fluoroinmunoensayo, se biotinaron 2 anticuerpos policlonales anti-Hp porcina: un anticuerpo desarrollado en conejo en nuestro laboratorio siguiendo protocolos estándar (Newcombe et al, 2007) y un anticuerpo policlonal comercial desarrollado en conejo (Immunology Consultants Laboratory, Inc. Newberg, Estados Unidos).

Para realizar la biotinación se utilizó el protocolo descrito en el apartado 3.1 del material y métodos común. En breve, 1mg de cada anticuerpo fue marcado con biotina sulfosuccinimida (Sulfo-NHS-Biotina, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 40 veces en exceso molar en tampón salino fosfato pH 7.5. La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 4 horas y posteriormente se dializó la solución resultante frente a TSA pH 7,7 para eliminar excesos de biotina. Finalmente, se añadió albúmina sérica bovina al 0,1% para prevenir la agregación de anticuerpos durante la conservación a -25°C.

2.2.2. Marcaje de anticuerpos de detección con europio.

Para la obtención de anticuerpos de detección específicos para el fluoroinmunoensayo, se marcaron con europio 2 anticuerpos anti-Hp porcina: el anticuerpo policlonal desarrollado en conejo en nuestro laboratorio, descrito en el punto anterior, y el anticuerpo monoclonal obtenido en ratón como se ha detallado anteriormente en el apartado 2.1.

El marcaje se llevó a cabo según el protocolo estándar descrito en el apartado 3.2 del material y métodos común. En breve, 1 mg de anticuerpo fue incubado durante toda la noche a 4°C con el quelato de europio 100 veces en exceso molar disuelto en tampón carbonato 50 mM (pH 9,8) en un volumen final de 1 ml. El exceso de quelato libre fue eliminado mediante filtración en gel en una columna de Superdex 200, acoplada a un sistema FPLC, empleado el tampón TSA a un ritmo de 20 ml/hora.

2.3. Desarrollo y optimización del inmunoensayo.

Para llevar a cabo el desarrollo y optimización del ensayo se utilizó como estándar una muestra de suero porcino. Posteriormente se validó el ensayo para su utilización de muestras de saliva y jugo cárnico porcino.

Las características del ensayo desarrollado así como los reactivos utilizados se detallan en la sección 2 del material y métodos común.

2.3.1. Selección de la combinación óptima de anticuerpos de captura y revelado.

Se disponía de 2 anticuerpos biotinados (1 policlonal de conejo desarrollado en nuestro laboratorio (Ch) y 1 policlonal de conejo comercial (Co)) y de 2 anticuerpos marcados con europio (1 policlonal de conejo comercial (Co) y 1 monoclonal de ratón desarrollado en nuestro laboratorio (4E₂)). Con vistas a elegir la mejor combinación de anticuerpo biotinado-anticuerpo marcado con europio se llevó a cabo el siguiente ensayo:

a) Se recubrió una placa de estreptavidina con diferentes cantidades de anticuerpo biotinado (100ng y 200ng/ pocillo), tanto del policlonal originado en nuestro laboratorio (Ch), como del policlonal comercial (Co). Dicha placa fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación continua. Esquemáticamente la placa se representaría de la siguiente manera:

| Pocillo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Fila | | | | | | | | | | | | |
| A | 100ng/pocillo de anticuerpo biotinado Ch | | | | | | | | | | | |
| B | 200ng/pocillo de anticuerpo biotinado Ch | | | | | | | | | | | |
| C | 100ng/pocillo de anticuerpo biotinado Co | | | | | | | | | | | |
| D | 200ng/pocillo de anticuerpo biotinado Co | | | | | | | | | | | |
| E | Tampón de ensayo | | | | | | | | | | | |
| F | Tampón de ensayo | | | | | | | | | | | |
| G | Tampón de ensayo | | | | | | | | | | | |
| H | Tampón de ensayo | | | | | | | | | | | |

b) Tras lavar la placa 4 veces con el tampón de lavado correspondiente, se añadió una muestra sérica de concentración de Hp conocida diluida 1:2500, en los primeros ocho pocillos de cada fila y tampón de ensayo en los cuatro últimos para poder conocer el ruido de fondo o background producido por cada combinación de anticuerpo. Tras 1 hora de incubación a temperatura ambiente y en agitación continua, se lavó la placa como se ha descrito anteriormente.

c) Se añadieron los anticuerpos marcados con europio diluidos en tampón de

ensayo, en un volumen total de 200 μ l, según el siguiente esquema:

| Pocillo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------|---------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|--|---------------------|--|------------------|----|----|----|
| Fila | | | | | | | | | | | | |
| A | marcado con europio | 200ng/pocillo anticuerpo Ch | marcado con europio | 300ng/pocillo anticuerpo Ch | marcado con europio | 200ng/pocillo anticuerpo 4E ₂ | marcado con europio | 300ng/pocillo anticuerpo 4E ₂ | Tampón de ensayo | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se lavó y se añadió 200 μ l de solución intensificadora de la fluorescencia. Tras 5 min de agitación a temperatura ambiente se leyó la fluorescencia emitida.

La combinación de anticuerpos óptima fue definida como aquella cuyo background sea lo más bajo posible y cuyas cuentas por segundo (cps) sean elevadas. Por este motivo, para valorar cual de las combinaciones posibles era la más adecuada se calculó el cociente de dividir la señal de fluorescencia medida en cps por el background medido también en cps. La combinación con un cociente más elevado sería la elegida para el fluoroinmunoensayo definitivo.

2.3.2. Optimización de parámetros del TR-IFMA desarrollado.

Una vez seleccionado el anticuerpo de captura (biotinado) y de detección (marcado con europio) a utilizar en el ensayo definitivo, se procedió a la optimización de los siguientes parámetros del ensayo:

a) Concentración de anticuerpos biotinados. Se probaron concentraciones de anticuerpo biotinado en un rango de 50 a 200 ng/pocillo. La concentración de anticuerpo que proporcionó la mejor relación fluorescencia de la señal/ background fue la elegida para el ensayo final.

b) Concentración de anticuerpos marcados con europio. Se analizaron concentraciones de anticuerpo marcado desde 20 a 300 ng/pocillo. Aquella concentración que aportó una mayor fluorescencia de la señal con un background mínimo fue la utilizada en el ensayo definitivo.

c) Curva de estándares. Se utilizó como estándar una muestra sérica con concentración de Hp conocida. Se realizaron numerosas diluciones de la muestra sérica hasta conseguir un rango de ensayo amplio y una curva estándar lo más lineal posible, que evitó el efecto hook producido por altas concentraciones proteicas, y que presentó un background reducido.

d) Numero de pasos. Una vez optimizadas las concentraciones de cada anticuerpo a utilizar en el inmunoensayo, así como establecida la curva estándar, se probaron diferentes combinaciones de pasos con el fin de acortar y simplificar el ensayo, así como para reducir la cantidad de tampón utilizado y abaratar los costes de los reactivos. La combinación más rápida y simple que produjo cuentas de europio elevadas dentro del rango del fluorímetro utilizado, y un background mínimo, fue seleccionada.

e) Tiempos de incubación. Se probaron distintos tiempos de incubación para intentar acortar la duración del ensayo lo máximo posible. Se probaron incubaciones de 45, 30 y 15 minutos. Se seleccionó el tiempo de incubación que dio lugar a elevadas cuentas de europio y un background reducido.

f) Dilución del jugo cárnico porcino y saliva porcina para la cuantificación de Hp. Se estudió cual era la dilución óptima de jugo cárnico y saliva porcina a utilizar para realizar la cuantificación de Hp utilizando el TR-IFMA desarrollado. Se probaron las diluciones 1:200, 1:500, 1:1000 y 1:200 para las muestras de jugo cárnico y 1:2, 1:5, 1:10 y 1:20 para las muestras de saliva. Se tomó como dilución óptima la mayor dilución que, presentando cuentas de fluorescencia en el rango de la curva estándar, se comportó de manera lineal y no se afectaba por la aparición de efecto hook.

2.4. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en saliva porcina.

2.4.1. Validación analítica.

El fluoroinmunoensayo fue validado analíticamente según el protocolo descrito en el apartado 4 del material y métodos común, que incluye:

- Precisión analítica. Se utilizaron tres mezclas o “pools” de saliva con alta, media y baja concentración de Hp respectivamente. Cada pool fue preparado mediante la mezcla de volúmenes iguales de seis muestras de animales con concentraciones de Hp similares. Para valorar la precisión intra-determinación, las concentraciones proteicas de los 3 pools fueron determinadas seis veces en una misma serie analítica. La precisión inter-determinación fue valorada mediante la determinación de las concentraciones de Hp de los 3 pools por duplicado en diferentes series analíticas (5 días diferentes en la misma semana).

- Exactitud analítica. Dos muestras de saliva de elevada concentración de Hp fueron diluidas seriadamente con tampón de ensayo y las concentraciones esperadas y observadas fueron correlacionadas para obtener la exactitud del método de modo indirecto.

- Limite de detección. Se calculó como la mínima concentración de Hp que puede distinguirse de una muestra cero.

- Correlación entre la determinación de las concentraciones de Hp medidas en suero y saliva porcina. Se tomaron pares de muestras suero-saliva de 30 animales y tras cuantificar las concentraciones de Hp en ambos tipos de muestras, los resultados fueron comparados con el fin de obtener la correlación existente entre ambos.

2.4.2. Validación clínica.

Se valoró la capacidad del método desarrollado para detectar y diferenciar entre animales sanos y animales con enfermedad inflamatoria mediante la determinación de las

concentraciones de Hp en saliva. Para realizar dicho estudio, se tomaron muestras de dos grupos de animales:

- **Grupo 1:** 20 animales sin signos clínicos de enfermedad y serológicamente negativos PRRS, enfermedad de Aujeszky, Circovirus porcino tipo 2 y Micoplasma.
- **Grupo 2:** 30 animales con signos clínicos como diarrea, desmedro, múltiples abscesos, así como heridas en orejas, cola o rabo.

2.5. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en jugo cárnico porcino.

2.5.1. Validación analítica.

La validación analítica del fluoroinmunoensayo se realizó siguiendo un protocolo similar al empleado para la saliva, que incluye las determinaciones de:

- Precisión analítica. Tres pools de jugo cárnico, con alta, media y baja concentración de Hp respectivamente, fueron utilizados para realizar los estudios de precisión. Fueron preparados y analizados de igual modo que en el caso de la precisión analítica para las muestras de saliva.

- Exactitud analítica. Se valoró indirectamente mediante la correlación de las concentraciones de Hp esperadas y observadas de dos muestras de jugo cárnico de elevados niveles de Hp diluidas seriadamente.

- Límite de detección. Se calculó como la mínima concentración de Hp que puede distinguirse de una muestra cero.

- Correlación entre la determinación de las concentraciones de Hp en suero y jugo cárnico porcino. Se tomaron pares de muestras sangre-músculo diafragmático de 30 animales con el fin de obtener suero y jugo cárnico. Tras cuantificar las concentraciones de Hp en ambos tipos de muestras, los resultados fueron comparados con el fin de obtener la correlación existente entre ambos.

2.5.2. Validación clínica.

Se evaluó la capacidad del método para detectar y diferenciar animales con procesos inflamatorios de animales sanos mediante la comparación de los valores de Hp en jugo cárnico de dos grupos de animales. Los animales estudiados fueron los mismos que se describen anteriormente en la validación clínica del método en saliva. Así el grupo 1 constó de 20 animales sanos y el grupo 2 de 30 animales con signos clínicos de enfermedad.

2.6. Estabilidad de la Hp en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

Se estudió el efecto del almacenamiento de las muestras a -20°C sobre las concentraciones proteicas de Hp en saliva y jugo cárnico en un periodo de tiempo de 7 meses. Para ello se emplearon 6 pools de muestras, 2 de elevadas concentraciones, 2 de concentraciones medias y 2 de bajas concentraciones de Hp, tanto para saliva como para jugo cárnico. Los pools se alicuotaron y conservaron a -20°C hasta su análisis. Los niveles proteicos, en ambos tipos de muestras, se cuantificaron a los días 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento.

Además para valorar posibles alteraciones en la estabilidad de la proteína Hp debidas a sucesivas congelaciones-descongelaciones de la muestra, se compararon los valores de Hp en diferentes días (7, 15, 30, 60, 120 y 210 días tras el inicio de la prueba) de alícuotas de los mismos 6 pools de muestras almacenadas a -20°C, que eran congeladas y descongeladas cada vez que se analizaban.

2.7. Estudio estadístico.

Para calcular los coeficientes de variación (CV) y los límites de detección, se utilizaron procedimientos estadísticos descriptivos con el programa Microsoft Excel 2000. La linealidad bajo dilución en el estudio de la exactitud del método se investigó mediante análisis de regresión ordinaria.

La comparación entre las cuantificaciones de Hp en pares de muestras saliva-suero y jugo cárnico-suero se realizó utilizando el software del programa estadístico

GraphPad Prism 5 Demo (GraphPad Software, Inc.). Las concentraciones de Hp obtenidas en el estudio de validación clínica fueron estudiadas, para valorar si seguían una distribución normal, utilizando la estadística de Kolmogorov– Smirnov. Como los resultados no mostraron criterios de distribución normal, se utilizó el test Wilconson para muestras no paramétricas para comparar las concentraciones de Hp entre animales sanos y animales enfermos y para realizar el estudio de estabilidad de la proteína en muestras de saliva y jugo cárnico. El nivel de significación estadístico utilizado fue de $p < 0.05$.

SECCIÓN 3. RESULTADOS.

3.1. Producción de anticuerpos monoclonales.

3.1.1. Purificación de Hp porcina.

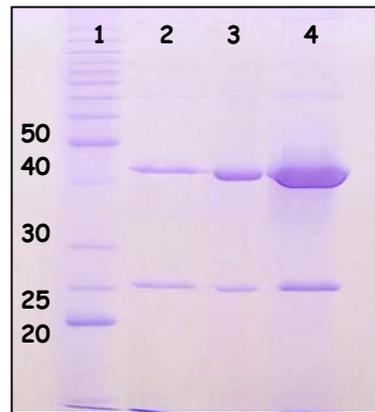
Tras la precipitación de la muestra sérica inicial con amonio sulfato al 50% y la elución de la misma mediante filtración en gel, se obtuvieron tres picos de absorbancia que fueron recogidos mediante un cromatógrafo (Fig. 39).

Figura 39. Cromatograma resultado de la elución de la muestra sérica precipitada y filtrada donde se observan los picos de absorbancia obtenidos.



Para corroborar la presencia de haptoglobina en el pico 2, y valorar la pureza de la proteína, se realizó una electroforesis SDS-PAGE, obteniéndose la imagen que se muestra en la figura 40. Se puede observar que todas las fracciones presentaron gran pureza, pues solo se obtuvieron 2 bandas proteicas de 42 y 24kDa correspondientes a las cadenas β y α de la molécula de haptoglobina respectivamente (Yang et al, 1999 y Lockhart et al, 1972).

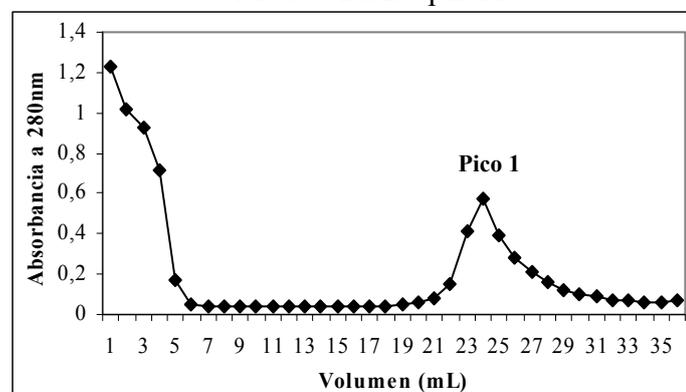
Figura 40. Imagen de la electroforesis realizada. Calle 1: marcadores de peso molecular (kDa) (10–220 kDa unstained protein standard, Bench Mark™ Ladder, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Calle 2, 3 y 4: fracciones 37, 38 y 39 del pico 2 de absorbancia.



3.1.2. Producción y valoración de anticuerpos monoclonales anti-Hp.

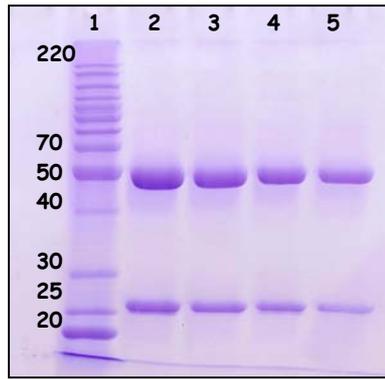
Se obtuvieron 4 anticuerpos monoclonales frente a Hp porcina entre los cuales, el clon denominado 4E₄A₆C₂, fue elegido por presentar la mayor absorbancia a 405nm a los 20 minutos durante el screening realizado, y por lo tanto, la mayor producción de anticuerpo específico. Dicho clon fue isotipificado resultando ser un anticuerpo de isotipo IgG₁ y purificado mediante cromatografía de afinidad, dando una curva cromatográfica típica (Fig. 41).

Figura 41. Perfil típico de purificación del AC anti-Hp porcina por cromatografía de afinidad proteica. Purificación de 7ml de sobrenadante de cultivo precipitado y dializado, eluido con PBS pH 11.



La pureza del anticuerpo obtenido valorada mediante SDS-PAGE fue elevada, pues se obtuvieron dos únicas bandas proteicas de 50 y 25kDa correspondientes a la cadena pesada y ligera de las inmunoglobulinas respectivamente (Lane, 1988) sin ningún tipo de impureza, incluso cuando se utilizaron altas concentraciones de solución proteica (6µg/ml) (Fig. 42).

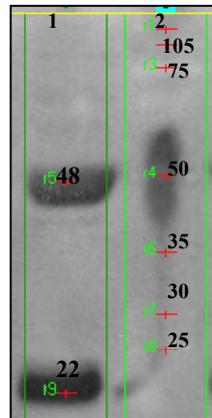
Figura 42. Valoración la pureza de los anticuerpos purificados mediante SDS-PAGE. Calle 1: marcadores de peso molecular (kDa) (10–220 kDa unstained protein standard, Bench MarkTMLadder, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Calle 2-3: 6µg/ml de AC monoclonal purificado. Calle 4-5: 4µg/ml de AC monoclonal purificado.



3.1.3. Especificidad de los anticuerpos mediante western blot.

El análisis del anticuerpo mediante Western blot proporcionó una fuerte señal positiva con un peso molecular correspondiente a la haptoglobina porcina (Yang et al, 1999). En la figura 43 se pueden observar las bandas obtenidas. La primera banda se corresponde con la cadena β de aproximadamente 48 kDa y la segunda con 2 cadenas α de la molécula de Hp, de aproximadamente 22 kDa (Lockhart et al, 1972).

Figura 43. Inmunoblot del anticuerpo monoclonal 4E₄A₆C₂ en suero porcino. Calle 1: 20 μ g de proteína total sérica. Calle 2: marcadores de peso molecular (kDa) (12-125 kDa Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden).



3.2. Desarrollo y optimización del inmunoensayo.

3.2.1. Optimización de la combinación de anticuerpos de captura y de revelado.

En la Tabla 12 se observan las cuentas de fluorescencia aportadas por cada una de las combinaciones de anticuerpos (Ch, Co y 4E₂), así como el cociente cps de la señal/cps del background para cada combinación.

Tabla 12. Cuentas de fluorescencia de las combinaciones de anticuerpos de captura y revelado estudiadas. Cursiva y paréntesis: cociente cps de la señal/cps del background.

| AC de detección AC de Captura | Eu Ch (200ng) | Eu Ch (300ng) | Eu 4E ₂ (200ng) | Eu 4E ₂ (300ng) |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|---|
| Bio Ch (100ng) | 52499 <i>(31.91)</i> | 64705 <i>(31.10)</i> | 104565 <i>(8.72)</i> | 107559 <i>(7.09)</i> |
| Bio Ch (200ng) | 59977 <i>(33.52)</i> | 76984 <i>(36.74)</i> | 108292 <i>(10.38)</i> | 112875 <i>(7.83)</i> |
| Bio Co (100ng) | 332657 <i>(80.89)</i> | 460407 <i>(81.70)</i> | 3042772 <i>(100.42)</i> | 3234405 <i>(69.44)</i> |
| Bio Co (200ng) | 314319 <i>(72.39)</i> | 434743 <i>(83.92)</i> | 2973230 <i>(102.90)</i> | 3202778 <i>(70.45)</i> |

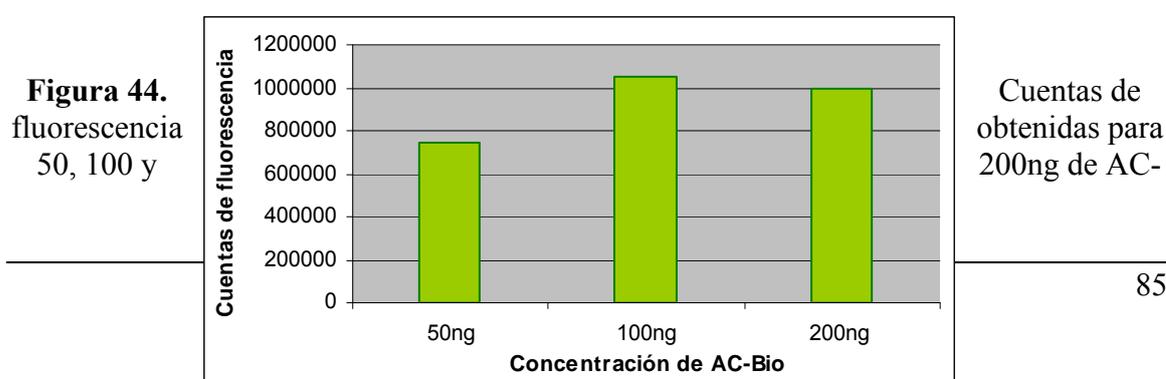
Los resultados mostraron que la mejor combinación de anticuerpos era aquella que utilizaba como anticuerpo de captura el anticuerpo policlonal comercial (Co) biotinado y como anticuerpo de detección el anticuerpo monoclonal desarrollado (4E₂) marcado con europio, debido a que el cociente entre las cps de la señal y el background de esta combinación fue el más elevado.

Además las cuentas de fluorescencia alcanzadas con esta combinación distan mucho de las alcanzadas por otras combinaciones, incluso están por encima de los límites del fluorímetro utilizado (cuentas máximas de fluorescencia que cuantifica el fluorímetro = 1000000), de modo que en el ensayo definitivo se utilizaron menores concentraciones de ambos anticuerpos para obtener cps dentro del rango aceptable.

3.2.2. Optimización de parámetros del TR-IFMA desarrollado.

Los resultados de cada uno de los parámetros optimizados durante el desarrollo del inmunoensayo se detallan a continuación:

a) Concentración del anticuerpo biotinado. Los resultados de los inmunoensayos realizados para optimizar la concentración del anticuerpo biotinado (AC-Bio) aparecen en la figura 44.

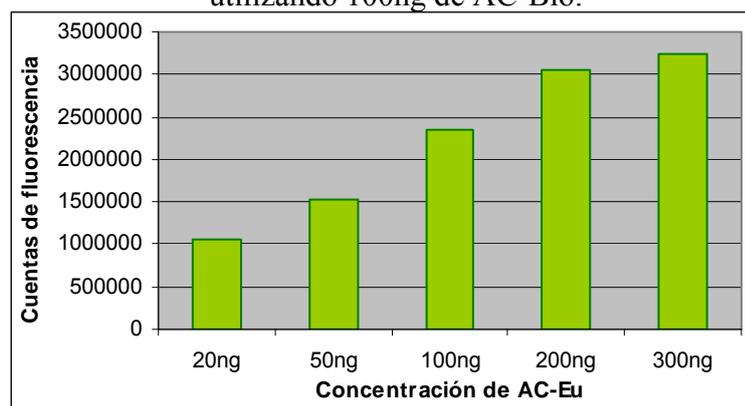


Bio utilizando 20ng de AC-Eu.

Al dividir la señal máxima de fluorescencia de cada una de las concentraciones de anticuerpo utilizado por su correspondiente background se observó que la concentración de 100ng era la que proporcionaba un cociente más elevado. Sin embargo, las cuentas resultantes estaban por encima del límite superior del aparato por lo que se utilizó 50ng de anticuerpo biotinado en el ensayo definitivo.

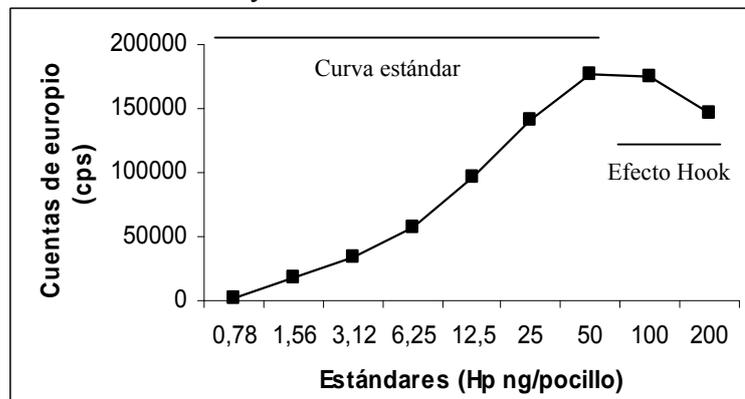
b) La concentración de anticuerpo marcado con europio. La concentración de 300ng produjo las mayores cps, sin embargo las cuentas de fluorescencia estaban por encima de señal máxima cuantificable por el multianalizador. Se utilizó 20ng de anticuerpo marcado con europio (AC-Eu) en el ensayo definitivo ya que fue la única concentración que presentó cuentas dentro del rango cuantificable (Fig. 45).

Figura 45. Cuentas de fluorescencia obtenidas para 20, 50, 100, 200 y 300ng de AC-Eu utilizando 100ng de AC-Bio.



c) Curva de estándares. La curva estándar seleccionada consistió en cinco estándares de concentraciones comprendidas entre 0.78ng/pocillo y 50ng/pocillo preparadas a partir de una muestra sérica con concentración de Hp conocida. En la figura 46 se puede observar como el efecto hook aparece a concentraciones que están por encima del límite superior de la curva estándar por lo que no interferirá en el ensayo.

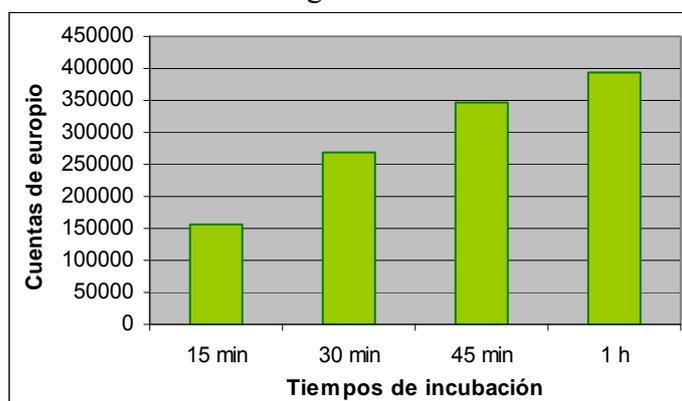
Figura 46. Curva estándar seleccionada para la cuantificación de Hp porcina en jugo de cárnico y saliva mediante TR-IFMA.



d) Numero de pasos. Debido a la alta especificidad del anticuerpo monoclonal desarrollado y a la gran fluorescencia emitida por el europio se consiguió reducir los pasos del inmunoensayo de 3 a 1. De este modo se pipetea el AC-bio, la muestra o estándar y el AC-Eu a la misma vez en el pocillo, seguido de una única incubación.

e) Tiempos de incubación. Se consiguió reducir el tiempo de incubación hasta 15 minutos obteniendo un coeficiente cps señal/cps background elevado y asegurando un límite de detección bajo (Fig. 47). Mayores tiempos de incubación presentaron mayores cps pero no mejoraron el cociente cps señal/cps background.

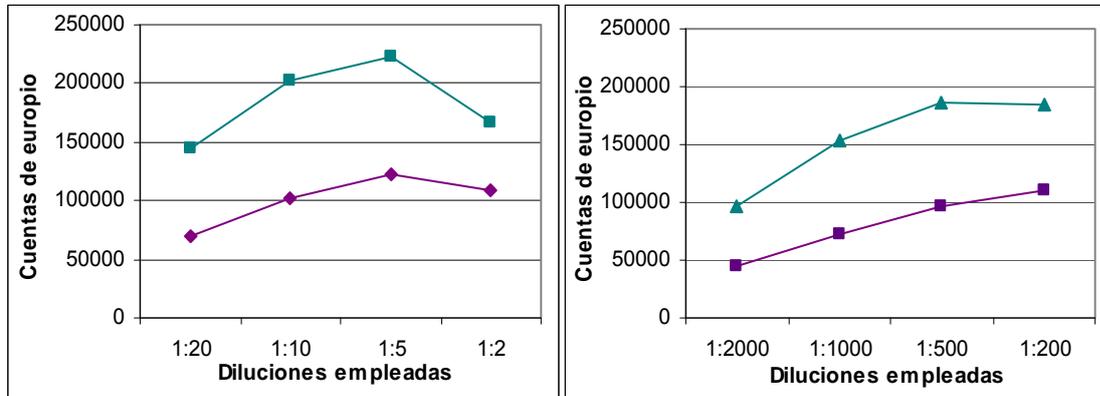
Figura 47. Cuentas de fluorescencia obtenidas para los distintos tiempos de incubación estudiados (15 minutos, 30 minutos, 45 minutos y 1 hora) utilizando 50ng de AC-Bio, 20ng de AC-Eu.



f) Dilución de saliva y jugo cárnico porcino para la cuantificación de Hp. En la figura 48 se muestran los resultados obtenidos. Las diluciones 1:10 y 1:1000 fueron las seleccionadas como óptimas para el caso de la saliva y del jugo cárnico respectivamente

ya que daban cuentas dentro de los valores de la curva estándar de un modo lineal sin verse influidos por el efecto hook.

Figura 48. Estudio de optimización de la dilución de muestras de saliva (izda) y jugo cárnico (drcha) a emplear para realizar las cuantificaciones de Hp con el TR-IFMA desarrollado.



Como resultado de la optimización de parámetros, el fluoroinmunoensayo desarrollado y utilizado para la validación analítica y la aplicación clínica posterior consistió en:

1. Pipetear 50ng de AC-Bio en un volumen total de 75 μ l en pocillos recubiertos con estreptavidina de placas de microtitulación + 50 μ l/pocillo de la dilución adecuada de estándar/muestra + 20ng de AC-Eu en un volumen total de 75 μ l, sin paso intermedio.
2. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación.
3. Lavar 4 veces con solución de lavado.
4. Añadir 200 μ l/pocillo de solución intensificadora y agitar durante 5 minutos.
5. Leer la fluorescencia en el multianalizador Victor 1420 (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Belgium).

3.3. Validación analítica y clínica del TR-IFMA desarrollado para la cuantificación de Hp en saliva porcina.

3.3.1. Precisión analítica.

La precisión intra-determinación del método de cuantificación de Hp para saliva porcina resultó en unos CVs del 1.13% al 2.34%. En cuanto a los CVs obtenidos para la precisión inter-determinación fueron algo mayores, entre el 9.76% y el 13.63, pero nunca superiores al 14% (Tabla 13).

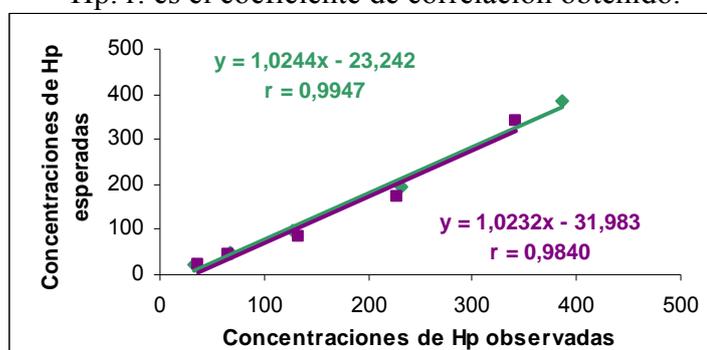
Tabla 13. Precisión intra e inter-determinación obtenida para el ensayo de medición de Hp en saliva. X: media, SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

| Análisis de Hp en saliva | para VALORES: | Intra-determinación | | | Inter-determinación | | |
|--------------------------|---------------|------------------------|------|--------|------------------------|------|--------|
| | | X ($\mu\text{g/ml}$) | SD | CV (%) | X ($\mu\text{g/ml}$) | SD | CV (%) |
| | Bajos | 0.56 | 0.01 | 2.34 | 0.53 | 0.07 | 13.63 |
| | Medios | 2.51 | 0.02 | 1.13 | 2.50 | 0.24 | 9.76 |
| | Altos | 4.27 | 0.06 | 1.61 | 4.42 | 0.43 | 9.84 |
| | Total | 2.45 | 0.03 | 1.69 | 2.48 | 0.25 | 11.07 |

3.3.2. Exactitud analítica.

La dilución de dos muestras de saliva porcina estudiadas mediante análisis de regresión proporcionó las curvas y ecuaciones que se muestran en la figura 49. Los coeficientes de correlación (r) obtenidos fueron de 0.99 y 0.98 indicando la capacidad del método de determinar de forma lineal y proporcional la cantidad de proteína presente en la solución estudiada.

Figura 49. Linealidad bajo dilución de 2 muestras de saliva de altas concentraciones de Hp. r : es el coeficiente de correlación obtenido.



3.3.3.

detección.

Limite de

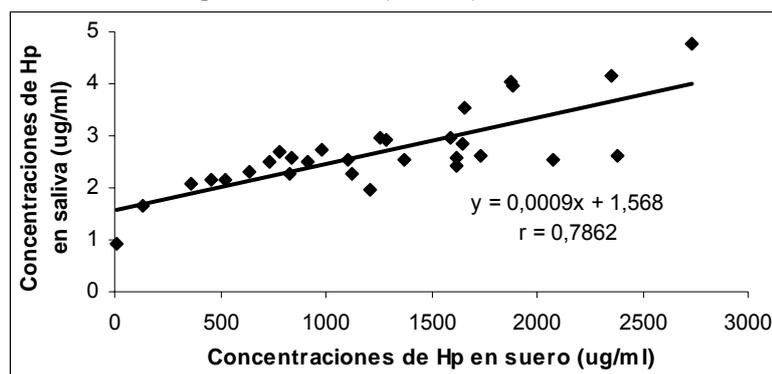
El límite de detección obtenido bajo las condiciones óptimas del ensayo detalladas anteriormente fue de 0.52ng/ml.

3.3.4. Correlación entre la determinación de las concentraciones de Hp medidas en suero y saliva porcina.

Se compararon las cuantificaciones de las concentraciones de Hp en pares de muestras saliva y suero de 30 animales y se obtuvo un coeficiente de correlación (r) igual a 0.786 ($p < 0.001$).

La recta obtenida ($y = 0.0009x + 1.568$) indica que las concentraciones de haptoglobina en suero son 323 veces mayores que aquellas presentes en saliva (Fig. 50).

Figura 50. Estudio de correlación entre las cuantificaciones de Hp porcina utilizando pares de muestras suero sanguíneo-saliva ($n = 30$). $r =$ coeficiente de correlación lineal.



3.3.5. Validación clínica

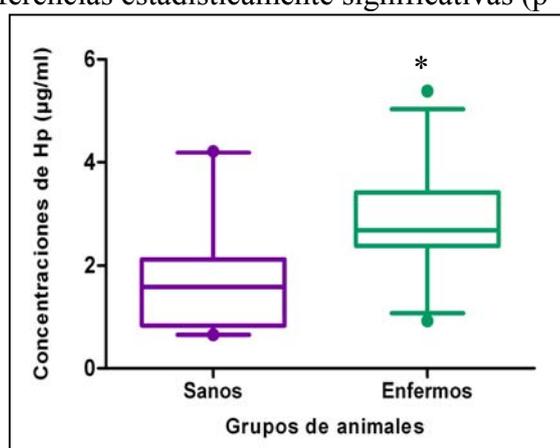
Las concentraciones de Hp para animales sanos presentaron una mediana de 1.58µg/ml (0.63 y 2.12, 25th y 75th percentiles respectivamente).

Para el grupo de los animales con procesos patológicos la mediana de las concentraciones de Hp obtenidas fue de 2.68µg/ml (2.31 y 3.23, 25th y 75th percentiles respectivamente).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales estudiados con un nivel de significación de $p = 0.0117$ (Fig. 51).

Figura 51. Niveles de Hp en saliva porcina de animales sanos ($n = 20$) y enfermos ($n = 30$). La línea horizontal dentro de la caja muestra la mediana. Los límites de la caja

muestran los percentiles 25th y 75th. Las barras representan los percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$)



3.4. Validación analítica y clínica del ensayo desarrollado para la determinación de Hp en jugo cárnico porcino.

3.4.1. Precisión analítica.

Los resultados obtenidos para la precisión del método desarrollado para la determinación de Hp en jugo cárnico porcino figuran en la tabla 14. Los coeficientes de variación intra-determinación oscilaron entre 1.58% y 3.16%. En cambio, la precisión inter-determinación presentó un coeficiente de variación algo superior, en un rango de 8.72% a 13.57%, aún así todos los valores estaban por debajo del 14%.

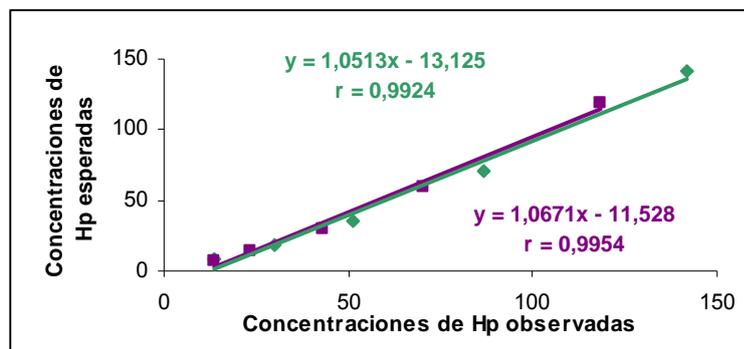
Tabla 14. Precisión intra e interdeterminación obtenida para el ensayo de medición de Hp en jugo cárnico. X: media, SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

| | para VALORES: | Intra-determinación | | | Inter-determinación | | |
|--------------------------------|---------------|---------------------|------|--------|---------------------|-------|--------|
| | | X (µg/ml) | SD | CV (%) | X (µg/ml) | SD | CV (%) |
| Análisis de Hp en jugo cárnico | Bajos | 21.39 | 0.67 | 3.16 | 16.81 | 2.28 | 13.57 |
| | Medios | 172.01 | 2.73 | 1.58 | 157.76 | 15.26 | 9.67 |
| | Altos | 212.17 | 5.58 | 2.63 | 211.10 | 18.42 | 8.72 |
| | Total | 135.19 | 2.99 | 2.46 | 128.56 | 11.99 | 10.65 |

3.4.2. Exactitud analítica.

En la figura 52 aparecen las curvas obtenidas tras realizar análisis de regresión de los valores obtenidos de la dilución seriada de dos muestras de jugo cárnico. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0.99 indicando que el método era capaz de determinar de forma lineal y proporcional la cantidad de proteína.

Figura 52. Linealidad bajo dilución de 2 muestras de jugo cárnico de elevadas concentraciones de Hp. r: coeficiente de correlación entre los resultados esperados y observados.



3.4.3. Limite de detección.

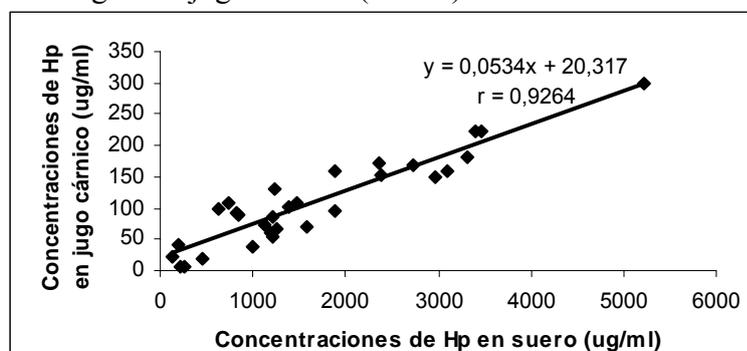
El límite de detección fue calculado anteriormente en el apartado de validación analítica del método desarrollado para la determinación de Hp en saliva porcina.

3.4.4. Correlación entre la determinación de las concentraciones de Hp medidas en suero y jugo cárnico porcino.

Cuando se compararon las determinaciones de Hp en pares de muestras jugo cárnico y suero de 30 animales se obtuvo un coeficiente de correlación (r) igual a 0.924 ($p < 0.001$).

La recta obtenida ($y = 0.0534x + 20.317$) indica que las concentraciones de Hp en suero son 12.32 veces mayores que las concentraciones de Hp medidas en jugo cárnico (Fig. 53).

Figura 53. Correlación entre las cuantificaciones de Hp porcina utilizando pares de muestras suero sanguíneo-jugo cárnico (n = 30). r = coeficiente de correlación lineal.



3.4.5.

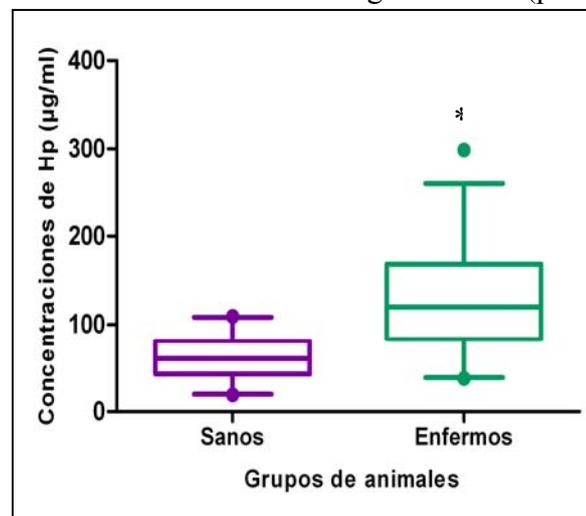
clínica.

Validación

En la figura 54 se muestran los resultados del estudio de validación clínica para la determinación de Hp en jugo cárnico porcino.

La mediana de las concentraciones de Hp en animales sanos fue de 60.61 $\mu\text{g/ml}$ (42.71 y 81.28, 25th y 75th percentiles respectivamente) y de 120.10 $\mu\text{g/ml}$ (77.28 y 163.35, 25th y 75th percentiles respectivamente) para animales con procesos patológicos. Las diferencias entre las medianas encontradas en ambos grupos fueron estadísticamente significativas con un nivel de significación de $p = 0.0021$.

Figura 54. Niveles de Hp en jugo cárnico porcino de animales sanos ($n = 20$) y enfermos ($n = 30$). La línea horizontal dentro de la caja muestra la mediana. Los límites de la caja muestran los percentiles 25th y 75th. Las barras representan los percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



3.5. Estabilidad de la proteína Hp en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

Los resultados obtenidos en el estudio de la estabilidad de la proteína Hp en saliva y jugo cárnico porcino tras el almacenamiento a -20°C se muestran en las figuras 55 y 56 respectivamente.

En el caso de la saliva porcina, se puede observar como las concentraciones altas y bajas de Hp oscilan en un rango estrecho y además no se encontraron diferencias estadísticamente significativas hasta los 7 meses desde el inicio del almacenamiento.

La Hp presenta una tendencia a aumentar con el tiempo en las muestras de jugo cárnico con valores iniciales medios y altos, pero no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas hasta los 7 meses de almacenamiento.

Figura 55. Estudio de estabilidad de los valores de Hp de un pool de saliva de alta y baja concentración de Hp a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C).

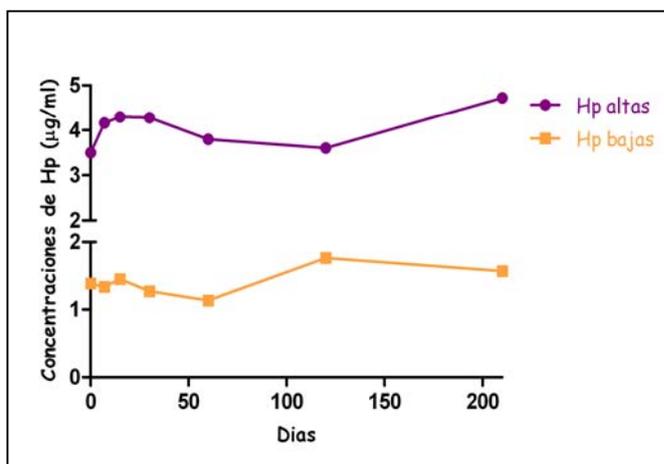
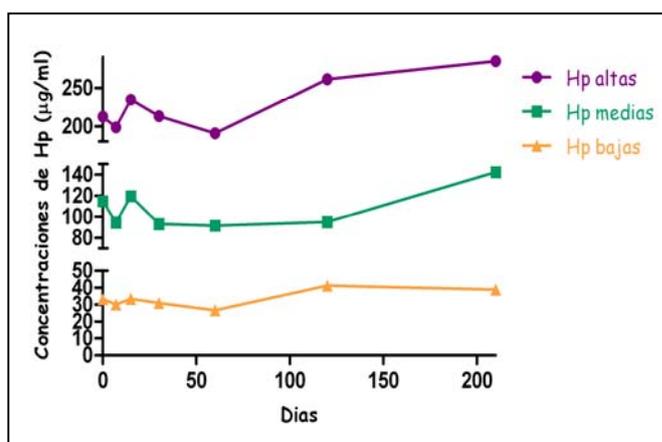


Figura 56. Estudio de estabilidad de los valores de Hp de un pool de jugo cárnico de alta, media y baja concentración de Hp a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C).



Del mismo modo, tras valorar el efecto de sucesivos ciclos de congelación-descongelación sobre la estabilidad de la proteína Hp a lo largo del tiempo en saliva y jugo cárnico porcino, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Hp cuantificadas (Fig. 57 y 58). Sin embargo, los valores de Hp aumentaron tras 100 días, sobre todo en muestras de alta concentración proteica en muestras de saliva.

Figura 57. Estudio de estabilidad de los valores de Hp de un pool de saliva de alta y baja concentración de Hp a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el

inicio del almacenamiento a -20°C) tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

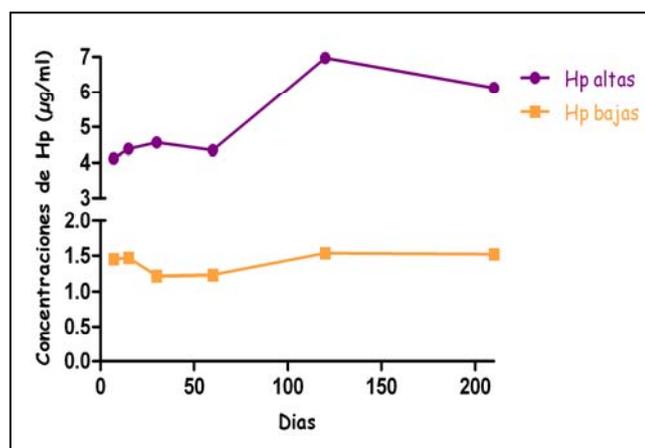
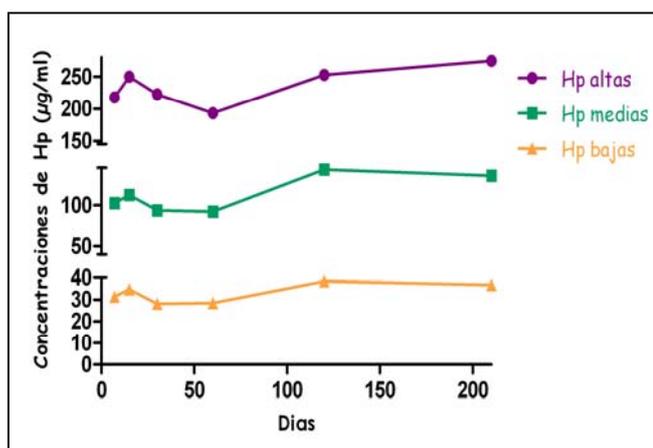


Figura 58. Estudio de estabilidad de los valores de Hp de un pool de jugo cárnico de alta, media y baja concentración de Hp a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C) tras sucesivos ciclos de **congelación-descongelación**.



SECCIÓN 4. DISCUSIÓN.

A lo largo de la presente experiencia 1 se ha descrito el desarrollo y la validación analítica y clínica de un ensayo para la determinación de las concentraciones de Hp en distintas muestras biológicas del ganado porcino. Se ha utilizado la fluorimetría a tiempo resuelto y anticuerpos monoclonales específicamente desarrollados para obtener un ensayo no-competitivo con una alta sensibilidad y especificidad y un bajo límite de detección y así poder cuantificar las bajas concentraciones de Hp en saliva y las concentraciones presentes en jugo cárnico sin sufrir interferencias por la muestra.

Los anticuerpos monoclonales purificados presentaron una elevada especificidad frente a la proteína Hp porcina tras ser testados mediante western blot, lo que permitió la reducción del ensayo hasta un único paso. Además tras un extenso estudio de optimización de parámetros, se consiguió reducir el tiempo de incubación del ensayo hasta 15 minutos.

La curva de calibración obtenida en el inmunoensayo desarrollado constó de siete estándares y proporcionó un amplio rango dinámico en el cual el efecto hook no interfirió con el límite superior del rango de trabajo del ensayo. El límite de detección obtenido fue bajo ($0.00052\mu\text{g/ml}$), a diferencia del ensayo comercial comúnmente utilizado para la determinación de Hp en suero, que presenta un límite de detección elevado (0.05mg/ml) (Tecles et al, 2007). La reducción en el límite de detección obtenida con nuestro método, permitió determinar las concentraciones de Hp en saliva y jugo cárnico de todos los animales estudiados. Además permitió la dilución de las muestras de saliva y jugo cárnico reduciendo el volumen de muestra utilizado para determinar las concentraciones de Hp.

Los coeficientes de variación obtenidos en la validación analítica fueron menores del 14% indicando una buena precisión y haciendo innecesario la utilización de duplicados durante el ensayo (Bioanalytical Method Validation, 2001), ahorrando, de este modo, volumen de muestra y reactivos y tiempo. Los CVs del presente estudio son menores que los obtenidos mediante ELISA (Hiss et al, 2003). Los estudios de linealidad bajo dilución mostraron una buena exactitud en todos los tipos de muestras estudiados, saliva y jugo cárnico.

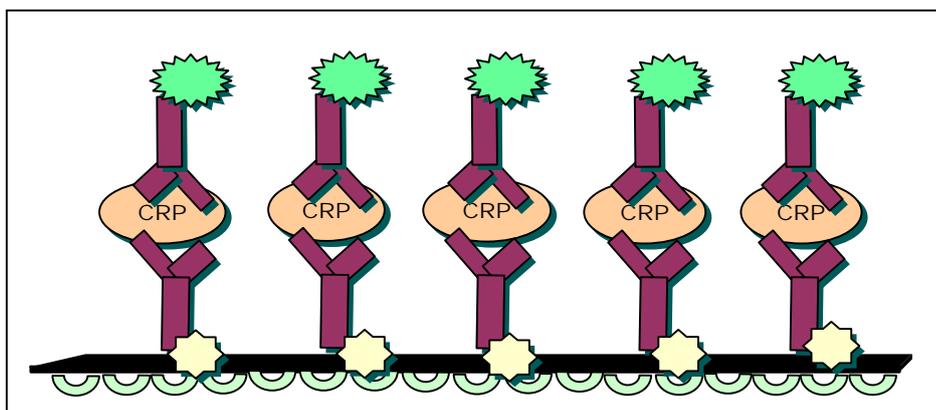
Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las concentraciones de Hp cuantificadas en animales sanos y enfermos tanto en saliva como en jugo cárnico, siendo mayores en animales enfermos, de modo que ambos tipos de muestras podrían ser utilizadas como alternativa al suero sanguíneo para cuantificar las concentraciones de Hp.

Los estudios de estabilidad de la proteína Hp porcina en saliva y jugo cárnico pusieron de manifiesto la posibilidad de almacenar las muestras a -20°C durante al menos 7 meses sin suponer cambios en la validez de los resultados. Se recomienda no someter a

las muestras a varios ciclos de congelación-descongelación ya que puede aumentar los valores de Hp tanto en saliva como en jugo cárnico.

Podemos concluir que la presente experiencia ha permitido obtener un inmunoensayo altamente sensible capaz de ser determinar las bajas concentraciones de Hp presentes en saliva y jugo cárnico sin interferencias. Los resultados indican que las muestras de saliva y jugo cárnico pueden ser utilizadas como alternativa al suero sanguíneo para la cuantificación de Hp porcina y que ambas muestras pueden ser almacenadas a -20°C hasta 210 días sin comprometer la validez de los resultados. Además, gracias a la alta especificidad del anticuerpo monoclonal producido, el ensayo desarrollado es simple, rápido y sencillo y proporciona un método para diferenciar entre animales sanos y enfermos con un gasto de reactivo y muestra mínimo, por lo que podría ser incluido como una herramienta práctica para el veterinario durante la inspección y monitorización rutinaria para valorar el estado de higiene y salud de los animales a nivel de granja y para la inspección cárnica a nivel de matadero.

Experiencia 2. Ensayo para la determinación de Proteína C reactiva porcina en muestras de saliva y jugo cárnico.



SECCIÓN 1. INTRODUCCIÓN.

La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de fase aguda y un mediador de la respuesta inmune innata y adaptativa (Chomdej et al, 2004). En cerdos, las concentraciones séricas de CRP pueden aumentar hasta 38 veces tras una inflamación aguda (Parra et al, 2006) y han sido utilizadas como biomarcador inflamatorio en infecciones experimentales como las producidas por *Streptococcus suis* (Sorensen et al, 2006), *Escherichia coli* (Carroll et al, 2004) o *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Heegaard et al, 1998) y en infecciones desencadenadas de forma natural como en la metritis-mastitis-agalaxia (Kostro et al, 2003), la infección por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, el circovirus porcino tipo 2 y la infección por *Mycoplasma* (Parra et al, 2006).

Los métodos comerciales disponibles en la actualidad para la cuantificación de los niveles de CRP en suero en el cerdo, no permiten determinar las concentraciones de PFA en saliva (Llamas et al, 2003). Además, hasta ahora, no se han desarrollado métodos para cuantificar las concentraciones de CRP ni en saliva ni en jugo cárnico del ganado porcino.

El objetivo de la presente **Experiencia 2** fue investigar si las concentraciones de CRP podían ser cuantificadas en saliva y jugo cárnico mediante la adaptación de un TR-IFMA desarrollado para medir CRP en sangre entera (Martínez-Subiela et al, 2007) y evaluar si el ensayo permitía distinguir entre animales sanos y enfermos en ambos fluidos biológicos.

SECCIÓN 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para desarrollar un inmunoensayo que permita determinar las concentraciones de CRP en el ganado porcino se disponía de 1 anticuerpo policlonal anti-CRP porcina desarrollado en cabra y cedido por el Profesor Peter David Eckersall de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Glasgow. Dicho anticuerpo fue validado y utilizado con anterioridad para el desarrollo de un TR-IFMA para la cuantificación de CRP porcina en sangre entera (Martínez-Subiela et al, 2007) por lo que los estudios de especificidad y afinidad frente a la CRP porcina mediante Western Blot ya estaban realizados.

2.1. Marcaje de anticuerpos

2.1.1. Biotinación de anticuerpos de captura.

La biotinación de anticuerpos anti-CRP porcina se realizó siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.1 del material y métodos común.

En resumen, se marcó 1mg de anticuerpo policlonal anti-CRP con biotina sulfosuccinimida (Sulfo-NHS-Biotina, Pierce Biotechnology, Rockford, USA) 40 veces en exceso molar en tampón salino fosfato pH 7.5. Se incubó la solución obtenida a temperatura ambiente durante 4 horas, tras lo cual se dializó frente a TSA pH 7.7 para eliminar excesos de biotina. Finalmente, se añadió albúmina sérica bovina al 0.1% para prevenir la agregación de anticuerpos durante la conservación a -25°C.

2.1.2. Marcaje de anticuerpos de detección con europio.

Para el marcaje de anticuerpos con europio se emplearon los mismos anticuerpos anti-CRP que se utilizaron para la biotinación. El marcaje se llevó a cabo según el protocolo estándar descrito en el apartado 3.2 del material y métodos común.

En breve, se incubó 1mg de anticuerpo con quelato de europio en exceso molar de 100 diluidos en 1ml en tampón carbonato 50mM pH 9.8 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente el exceso de quelato libre fue eliminado de la solución final mediante filtración en gel en una columna de Superdex 200, acoplada a un sistema FPLC, empleado tampón TSA pH 7.7 a un ritmo de 20 mL/hora.

2.2. Optimización de las diluciones de saliva y jugo cárnico a emplear en el ensayo.

Se estudió cual era la dilución óptima de muestras de saliva y jugo cárnico a utilizar, para cuantificar las concentraciones de CRP en dichos fluidos.

Se probaron distintas diluciones: 1:2, 1:4, 1:6, 1:10 y 1:20 para saliva y 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 y 1:2000 para jugo cárnico. Se tomó como dilución óptima de cada muestra la mayor dilución que presentó cuentas de fluorescencia en el rango de la curva estándar, se comportó de manera lineal y no se vió afectada por la aparición del efecto hook.

2.3. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en saliva porcina.

2.3.1. Validación analítica.

La validación analítica del fluoroinmunoensayo desarrollado para la determinación de la proteína C reactiva porcina en saliva se realizó como se detalló en el apartado 4 del material y métodos común, determinando:

- Precisión analítica. Dos mezclas o “pools” de saliva con alta y baja concentración de CRP respectivamente, fueron utilizados para realizar los estudios de precisión. Cada pool se preparó mediante la mezcla de volúmenes iguales de seis muestras de animales con similares concentraciones de CRP. Posteriormente se analizó la precisión intra-determinación mediante el coeficiente de variación obtenido tras cuantificar la concentración de CRP en los pools seis veces en una misma serie analítica. Para el caso del cálculo de los CV inter-determinación se cuantificaron ambos pools en cinco días diferentes a lo largo de 15 días.

- Exactitud analítica. Se realizaron diluciones seriadas de dos muestras de saliva de elevadas concentraciones de CRP y las concentraciones esperadas y observadas fueron correlacionadas.

- Limite de detección. Se calculó como la mínima concentración de CRP que puede distinguirse de una muestra cero.

- Correlación entre la determinación de las concentraciones de CRP medidas en suero y saliva porcina. Se tomaron pares de muestras suero-saliva de 50 animales, se cuantificaron los niveles de CRP en ambos tipos de muestras y se compararon los resultados obtenidos.

2.3.2. Validación clínica.

La capacidad del método para detectar y diferenciar entre animales con procesos inflamatorios y animales sanos fue evaluada mediante la comparación de los valores de CRP en saliva de dos grupos de animales:

- **Grupo 1:** 20 cerdos clínicamente sanos y con serología negativa a los principales virus porcinos (PRRS, enfermedad de Aujeszky, Circovirus porcino tipo 2 y Micoplasma).
- **Grupo 2:** 40 animales que presentaban signos de enfermedad como úlceras gástricas (n = 13), diarrea con descenso del crecimiento (n = 15), bronconeumonía y descarga nasal (n = 6) y abscesos múltiples (n = 6).

2.4. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en jugo cárnico porcino.

2.4.1. Validación analítica.

El fluoroinmunoensayo desarrollado para la determinación de la proteína C reactiva porcina en jugo cárnico fue validado analíticamente según el protocolo que se describe con más detalle en el apartado 4 del material y métodos común, determinando:

- Precisión analítica. Se utilizaron 3 pools de jugo cárnico con alta, media y baja concentración de CRP. Cada pool fue preparado mediante la mezcla de volúmenes iguales de 3 muestras de animales con concentraciones de CRP similares. La precisión intra-determinación e inter-determinación se calcularon del mismo modo que en el caso de la saliva porcina.

- Exactitud analítica. Se correlacionaron las concentraciones esperadas y observadas obtenidas de la dilución seriada de dos muestras de saliva con elevadas concentraciones de CRP.

- Límite de detección. Se calculó como la mínima concentración de CRP que puede distinguirse de una muestra cero al igual que en el caso de la saliva.

- Correlación entre la determinación de las concentraciones de CRP en suero y jugo cárnico porcino. Se compararon los resultados de la cuantificación de las concentraciones de CRP en muestras de suero y jugo cárnico de 29 animales con distintos estados sanitarios, para obtener la correlación existente entre ambos.

2.4.2. Validación clínica.

Para realizar el estudio de validación clínica del ensayo en muestras de jugo cárnico, se cuantificaron las concentraciones de CRP de dos grupos de animales:

- **Grupo 1:** 12 animales sin signos de enfermedad y serologicamente negativos a PRRS, enfermedad de Aujeszky, circovirus porcino tipo 2 y micoplasma. Estos animales no presentaron ninguna lesión en la inspección post-mortem.
- **Grupo 2:** 23 cerdos que presentaban signos clínicos compatibles con varias enfermedades y mostraron una o varias de las siguientes lesiones: bronconeumonía (62.5%), úlcera gástrica (54.16%), artritis (16.6%), ileítis crónica (29.16%) y abscesos (8.3%).

2.5. Estabilidad de la proteína CRP en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

Se tomaron 6 pools de muestras de saliva y jugo cárnico, 2 de elevadas concentraciones, 2 de concentraciones medias y 2 de bajas concentraciones de CRP, con el fin de estudiar el efecto del almacenamiento de las muestras a -20°C sobre las concentraciones de CRP en un periodo de tiempo de 7 meses. Los pools formados fueron alícuotados y se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis. Los niveles proteicos fueron cuantificados a los 0, 7, 30, 60, 120 y 210 días tras el inicio del almacenamiento.

Además, con el fin de valorar posibles alteraciones en la estabilidad de la CRP debidas a sucesivas congelaciones-descongelaciones de la muestra, se cuantificaron los niveles de CRP en diferentes días (7, 30, 60, 120 y 210 días tras el inicio de la prueba) de alícuotas de los mismos 6 pools de muestras almacenadas en a -20°C, que eran congeladas y descongeladas cada vez que se analizaban.

2.6. Estudio estadístico realizado.

Los coeficientes de variación (CV) intra e inter-determinación, así como los límites de detección, se calcularon utilizando procedimientos estadísticos descriptivos con el programa Microsoft Excel 2000. Para investigar la linealidad bajo dilución se

utilizó análisis de regresión ordinaria.

Las cuantificaciones de CRP en pares de muestras saliva-suero y jugo cárnico-suero fueron comparadas utilizando el software del programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo (GraphPad software Inc.).

Las concentraciones de CRP obtenidas en el estudio de validación clínica fueron evaluadas para comprobar si seguían una distribución normal utilizando la estadística de Kolmogorov–Smirnov. Como los resultados no mostraron criterios de distribución normal, para comparar las concentraciones de CRP entre animales sanos y animales enfermos tanto en saliva como en jugo cárnico así como para establecer la estabilidad de la proteína, se utilizó el test Wilconson para muestras no paramétricas. El nivel de significación estadístico utilizado fue de $p < 0.05$.

SECCIÓN 3. RESULTADOS.

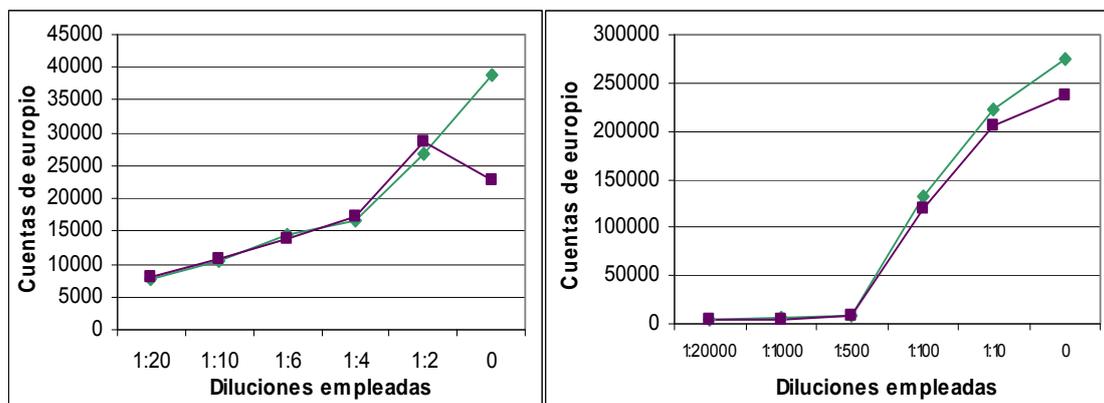
3.1. Optimización de las diluciones de saliva y jugo cárnico a utilizar.

En la figura 59 se muestran los resultados obtenidos tras realizar el estudio de optimización de la dilución de saliva a emplear en el fluoroimmunoensayo desarrollado.

La dilución 1:4 fue seleccionada como óptima para el caso de la saliva. Diluciones mayores presentaban cuentas de europio cercanas al límite de la curva estándar por lo que fueron descartadas.

En el caso del jugo cárnico, se seleccionó la dilución 1:500 ya que fue la que presentó un comportamiento lineal en todas las muestras analizadas.

Figura 59. Optimización de la dilución de muestras de saliva (izda) y jugo cárnico (drcha) para cuantificar las concentraciones de CRP porcina ($n = 2$).



3.2. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en saliva porcina.

3.2.1. Precisión analítica.

En la tabla 15 se exponen los resultados obtenidos para la precisión del método. Los coeficientes de variación intra-determinación medios fueron del 4,8% y para la precisión inter-determinación oscilaron entre el 7,63 % y el 11,83%.

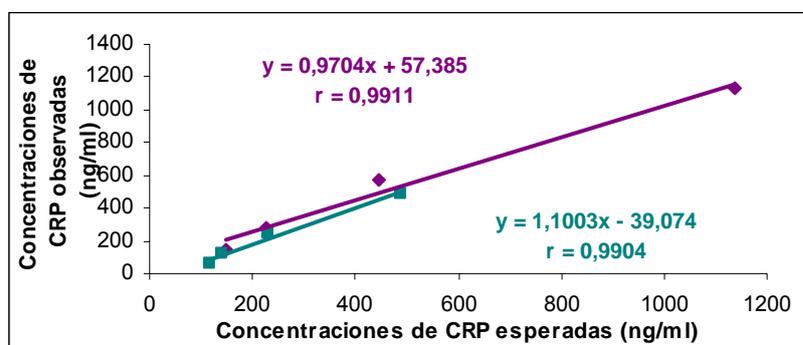
Tabla 15. Precisión intra e inter-determinación obtenida para el ensayo de medición de CRP en saliva. X: media, SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

| Análisis de CRP en saliva | para VALORES: | Intra-determinación | | | Inter-determinación | | |
|---------------------------|---------------|---------------------|-------|--------|---------------------|-------|--------|
| | | X (ng/ml) | SD | CV (%) | X (ng/ml) | SD | CV (%) |
| | Bajos | 29.3 | 1.38 | 4.71 | 31.96 | 3.78 | 11.83 |
| | Altos | 474.86 | 23.25 | 4.89 | 487.93 | 37.24 | 7.63 |
| | Total | 252.08 | 12.32 | 4.80 | 259.94 | 20.51 | 9.73 |

3.2.2. Exactitud analítica.

La dilución de dos muestras de saliva con altas concentraciones de CRP proporcionó unas rectas con una ecuación de regresión lineal (Fig. 60). El coeficiente de correlación en ambos casos resultó ser de 0,99 indicando la capacidad del método para determinar las concentraciones de CRP de modo lineal y proporcional.

Figura 60. Linealidad bajo dilución de dos muestras de saliva porcina con elevada concentración de CRP. r : coeficiente de correlación.



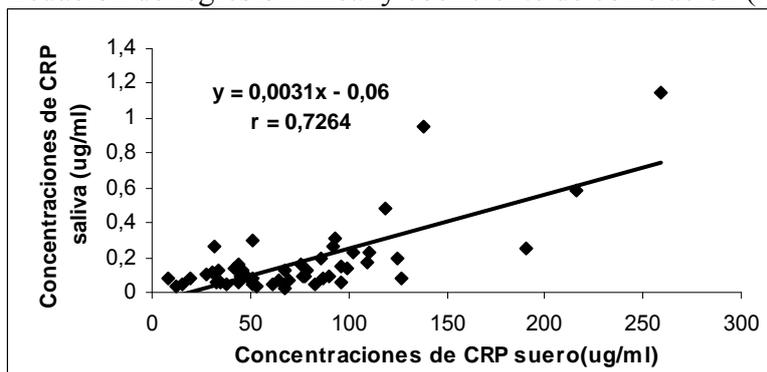
3.2.3. Límite de detección.

El límite de detección del fluoroinmunoensayo adaptado para la cuantificación de las concentraciones de CRP porcina en saliva fue de 0,38ng/ml.

3.2.4. Correlación entre la determinación de las concentraciones de CRP medidas en suero y saliva porcina.

Tras la medición de las concentraciones de CRP en suero y saliva de 49 animales mediante TR-IFMA y su posterior análisis de regresión se obtuvo un coeficiente de correlación de $r = 0,72$ (Fig. 61).

Figura 61. Correlación entre las concentraciones de CRP medidas en suero y saliva (n = 49). Ecuación de regresión lineal y coeficiente de correlación (r).

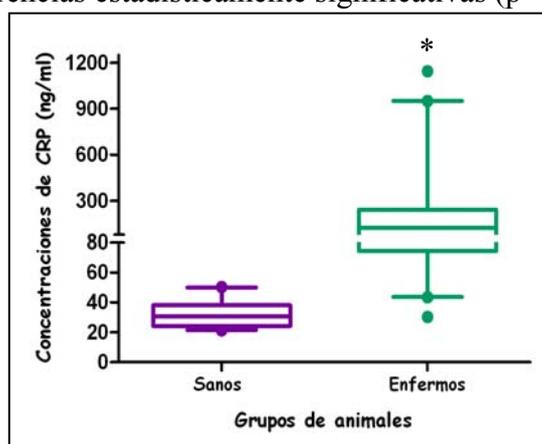


3.2.5. Validación clínica.

Se encontraron concentraciones de CRP en saliva significativamente mayores en animales con procesos patológicos en comparación con animales sanos con un nivel de significación de $p = 0.0001$ (Fig. 62).

La mediana para las concentraciones de CRP obtenidas para animales sanos fue de 30.75ng/ml (25th y 75th percentiles = 24.24 y 38.14 respectivamente). La mediana de las concentraciones de CRP en el grupo de animales con distintas patologías inflamatorias fue de 123.3ng/ml (25th y 75th percentiles = 74.38 y 242 respectivamente).

Figura 62. Concentraciones de CRP en saliva en animales sanos (n = 20) y enfermos (n = 40). La línea horizontal dentro de la caja muestra la mediana. Los límites de la caja muestran los percentiles 25th y 75th. Las barras representan los percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



3.2. Validación analítica y clínica del TR-IFMA adaptado para la cuantificación de CRP en saliva porcina.

3.2.1. Precisión analítica.

Los resultados obtenidos para la precisión del método figuran en la tabla 16. Los coeficientes de variación intra-determinación oscilaron entre 2,28% y 5,81%. La precisión inter-determinación presentó un coeficiente de variación algo superior, en un rango de 7,98% a 14,31%, aún así todos los valores estaban por debajo del 15%.

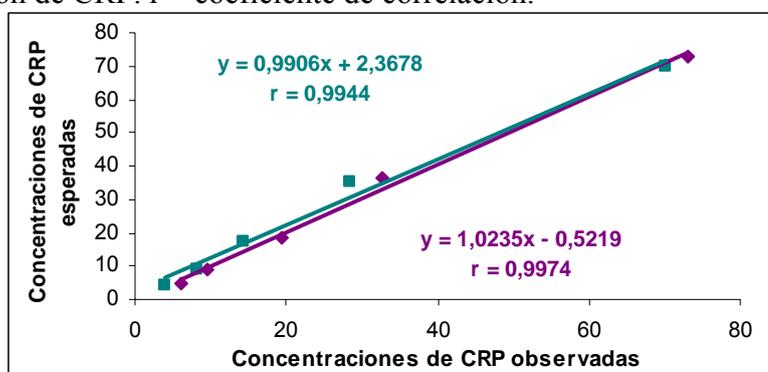
Tabla 16. Precisión intra e inter-determinación obtenida para el ensayo de medición de CRP en jugo cárnico. X: media, SD: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

| | para VALORES: | Intra-determinación | | | Inter-determinación | | |
|---------------------------------|---------------|------------------------|------|--------|------------------------|------|--------|
| | | X ($\mu\text{g/ml}$) | SD | CV (%) | X ($\mu\text{g/ml}$) | SD | CV (%) |
| Análisis de CRP en jugo cárnico | Bajos | 11.75 | 0.26 | 2.28 | 11.94 | 0.95 | 7.98 |
| | Medios | 16.57 | 0.96 | 5.81 | 15.59 | 1.75 | 11.24 |
| | Altos | 79.61 | 2.79 | 3.51 | 68.48 | 9.80 | 14.31 |
| | Total | 35.97 | 1.34 | 3.87 | 32.00 | 4.16 | 11.17 |

3.3.2. Exactitud analítica.

Cuando se analizó la exactitud mediante linealidad bajo dilución se obtuvieron unos coeficientes de correlación de $r = 0,99$ como se ven representados en la figura 63.

Figura 63. Resultado del analisis de regresión lineal de dos muestras de jugo cárnico de alta concentración de CRP. r = coeficiente de correlación.



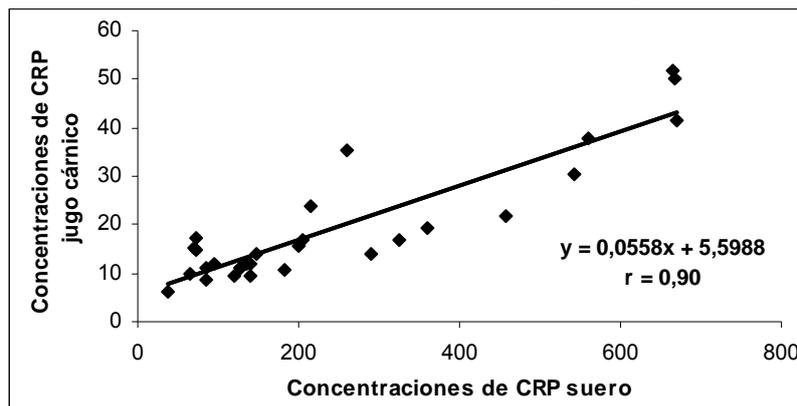
3.3.3. Límite de detección.

El límite de detección obtenido para la determinación de las concentraciones de CRP porcina en jugo cárnico fue, al igual que se describió para la saliva, de 0,38ng/ml.

3.3.4. Correlación entre la determinación de las concentraciones de CRP medidas en suero y jugo cárnico porcino.

El análisis de correlación de 29 pares de muestras suero-jugo cárnico mostró un coeficiente de correlación de $r = 0.90$ y un nivel de significación $p < 0.001$ (Fig. 64).

Figura 64. Estudio de correlación entre las concentraciones de suero y jugo cárnico determinadas mediante TR-IFMA (n = 29).

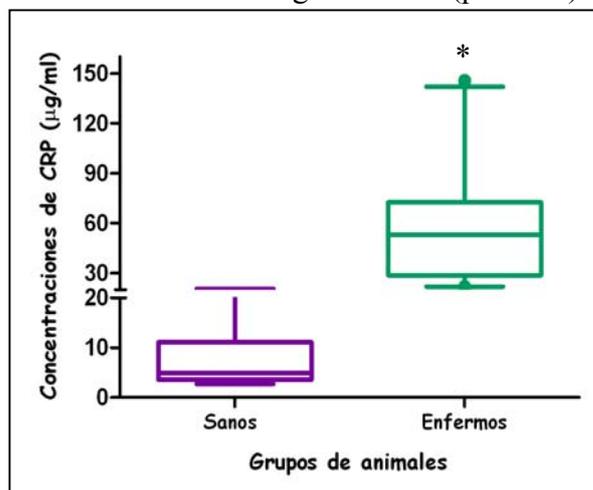


3.3.5. Validación clínica.

La mediana de las concentraciones de CRP en jugo cárnico en animales sanos fue de $4.97\mu\text{g/ml}$ (25th y 75th percentiles = 3.60 y 11.09 respectivamente) y de $53.11\mu\text{g/ml}$ (25th y 75th percentiles = 28.74 y 72.44 respectivamente) en animales con enfermedad inflamatoria.

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales con un nivel de significación de $p = 0.0005$ (Fig. 65).

Figura 65. Concentraciones de CRP en jugo cárnico en animales sanos (n = 12) y enfermos (n = 23). La línea horizontal dentro de la caja muestra la mediana, 25th y 75th percentiles (caja), 5th y 95th percentiles (extremos fuera de la caja). * diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).



3.4. Estabilidad de la proteína CRP en saliva y jugo cárnico tras el almacenamiento a -20°C y tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

Los resultados obtenidos tras estudiar la estabilidad de la proteína CRP porcina en muestras de saliva y jugo cárnico almacenadas a -20°C durante 7 meses se muestran en las figuras 66 y 67. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de CRP en saliva y jugo cárnico durante el periodo estudiado. No obstante se encontró una tendencia de las concentraciones de CRP en el pool de saliva alto a disminuir con el paso del tiempo. Este descenso fue especialmente marcado en los primeros días en las muestras de concentración de CRP altas.

Figura 66. Estudio de estabilidad de los valores de CRP en un pool de saliva de alta y otro de baja concentración de CRP a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C).

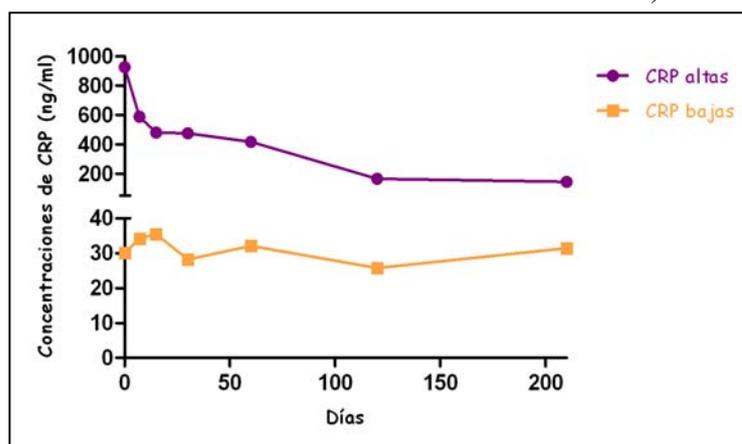
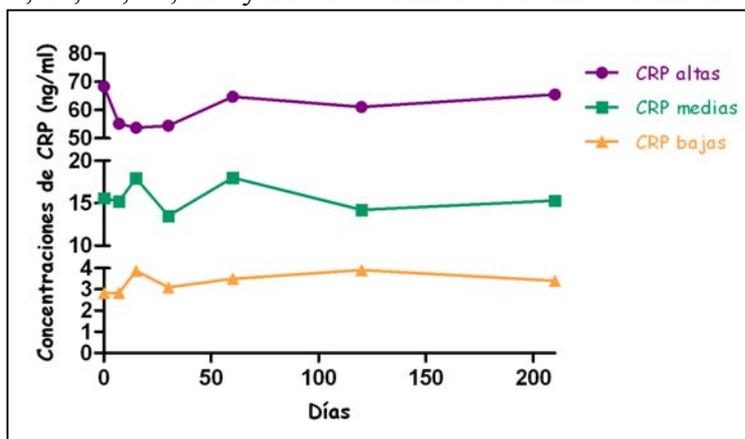


Figura 67. Estudio de estabilidad de los valores de CRP en diferentes pool de jugo cárnico de alta, media y baja concentración de CRP respectivamente a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C).



Los resultados obtenidos tras el estudio de la estabilidad de la proteína CRP en

muestras de saliva y jugo cárnico sometidas a sucesivos ciclos de congelación-descongelación tampoco mostraron grandes oscilaciones en las concentraciones de CRP (Fig. 68 y 69). Las concentraciones de CRP en el pool alto en saliva tendieron a disminuir sus valores aunque sin significación estadística, al igual que en el caso de la estabilidad tras el almacenamiento prolongado a -20°C .

Figura 68. Estudio de estabilidad de los valores de CRP en un pool de saliva de alta y otro de baja concentración de CRP a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C) tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.

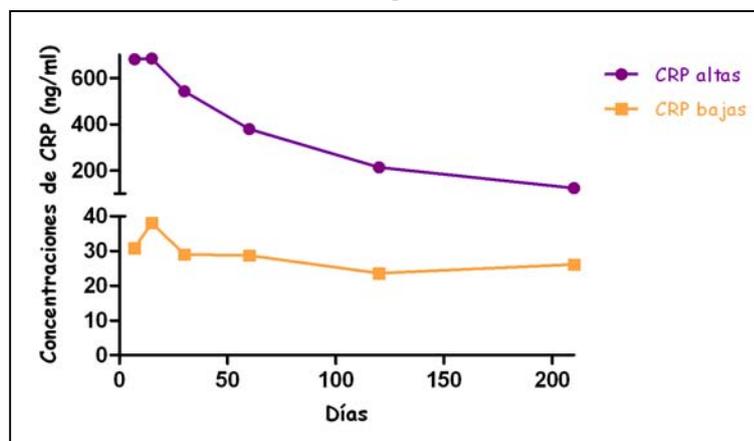
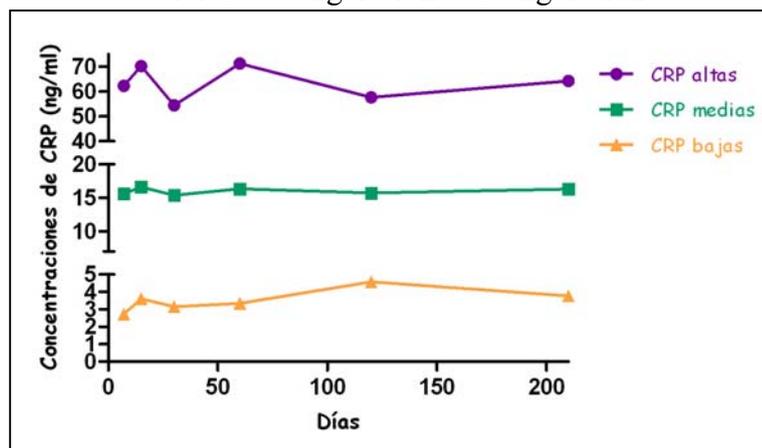


Figura 69. Estudio de estabilidad de los valores de CRP en diferentes pool de jugo cárnico de alta, media y baja concentración de CRP respectivamente a lo largo del tiempo (día 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 tras el inicio del almacenamiento a -20°C) tras sucesivos ciclos de congelación-descongelación.



SECCIÓN 4. DISCUSIÓN.

En la experiencia 2 se describe y evalúa un ensayo para la determinación de concentraciones de CRP en saliva y jugo cárnico basado en un ensayo previo producido para la cuantificación de los niveles de CRP porcina en sangre entera.

La inmunofluorometría a tiempo retardado fue seleccionada como la tecnología idónea para cuantificar las concentraciones de CRP porcina en ambos fluidos biológicos estudiados, saliva y jugo cárnico, ya que es una tecnología extremadamente sensible que se basa en el uso de quelatos de lantano con propiedades fluorescentes únicas (Hemmilä, 1994). Además presenta la ventaja de no verse afectada por la hemólisis (Parra et al., 2005) y otras interferencias de las muestras (Hemmilä, 1994), que generalmente interfieren los resultados cuando se utilizan otras tecnologías como el ELISA o los ensayos inmunoturbidimétricos.

Las diluciones 1:4 y 1:500 fueron consideradas como las óptimas para la saliva y el jugo cárnico respectivamente, ya que proporcionaba resultados de fluorescencia altos, dentro del rango de la curva estándar. El uso de muestras más concentradas ocasionó efecto hook. Este efecto hook aparece cuando altas concentraciones de antígeno, en este caso CRP, están presentes, por lo que se saturan tanto los anticuerpos de captura como los de detección sin que se lleguen a formar complejos, siendo los valores falsamente menores a lo esperado. Por el uso de muestras menos diluidas proporcionaron bajas cuentas de fluorescencia.

Cuando se evaluó analíticamente el método, se obtuvieron coeficientes de variación inter-determinación ligeramente superiores a los intra-determinación, pero en todo caso mostraron una precisión aceptable no excediendo el 15% (Byoanalytical Method Validation, Guidance for industry. Biopharmaceutics Coordinating Committee, May 2001). Como hasta ahora no se conocen otros ensayos que permitan cuantificar las concentraciones de CRP porcina ni en saliva ni en jugo cárnico, se compararon los resultados de este estudio con aquellos obtenidos para la determinación de CRP porcina en suero y sangre entera. Así los CVs fueron similares a los obtenidos por métodos inmunoturbidimétricos para la determinación de CRP porcina en suero (Kjelgaard-Hansen et al., 2007) y ligeramente inferiores a los obtenidos en sangre entera mediante TR-IFMA (Martínez-Subiela et al., 2007). Además los CVs obtenidos para la validación del método en muestras de saliva concuerdan con los publicados anteriormente para la determinación de CRP canina mediante TR-IFMA (Parra et al., 2005). Para el caso del jugo cárnico, los resultados son similares a los obtenidos por otros autores cuando utilizaron este fluido biológico para la determinación de Hp (Hiss et al., 2003).

El límite de detección del método fue muy bajo, demostrando la alta sensibilidad de la tecnología utilizada, lo que además permitió la cuantificación de CRP porcina en saliva y jugo cárnico en todos los animales estudiados. Dicho límite de detección resultó mucho menor que el de los kit comerciales disponibles para la determinación de CRP porcina (0.00038 μ g/ml versus 2mg/ml) (Kjelgaard-Hansen et al., 2007; Tecles et al., 2007). Las ligeras diferencias encontradas entre el límite de detección de nuestro ensayo y el publicado por nuestro grupo de investigación para la cuantificación de CRP en sangre entera (0.0028 μ g/ml) (Martínez-Subiela et al., 2007) podría deberse a que se utilizaron diferentes lotes del anticuerpo. Los estudios de linealidad bajo dilución mostraron una relación lineal entre un amplio rango de concentraciones de CRP y por lo tanto una buena exactitud en ambos tipos de muestras estudiadas.

Aunque las concentraciones de CRP en suero resultaron ser 322 veces más altas que las encontradas en saliva y 12,32 veces mayores que las obtenidas en jugo cárnico, se obtuvieron altos coeficientes de correlación entre las 3 muestras. Esto indicaría la posibilidad de utilizar la saliva y el jugo cárnico como muestras alternativas al suero sanguíneo para la determinación de las concentraciones de CRP. Los coeficientes obtenidos en el estudio de correlación entre suero y saliva son similares a los obtenidos en otros estudios donde se utiliza la saliva como muestra diagnóstica alternativa (Parra et al, 2005). Además el método demostró poseer la capacidad de diferenciar entre las concentraciones de CRP porcina presentes en animales sanos y animales con diferentes patologías inflamatorias tanto en saliva como en jugo cárnico.

Los estudios de estabilidad de la proteína C reactiva en saliva y jugo cárnico mostraron que hay un descenso marcado de la CRP sobre todo en saliva con concentraciones altas de esta proteína y en los primeros días de almacenamiento. Sería interesante, en el futuro, desarrollar estudios con distintos conservantes para evaluar si se pueden mejorar las condiciones de estabilidad de la CRP en almacenamiento.

En resumen, este ensayo permitió la determinación de los valores de CRP porcina en muestras de saliva y jugo cárnico. La cuantificación de CRP en saliva y jugo cárnico puede ser utilizada como herramienta práctica para establecer el estatus sanitario del ganado porcino durante todo el proceso de producción a nivel de granja y de matadero, con varias ventajas frente al uso de muestras séricas, como se describió en la introducción

de la presente Tesis Doctoral. Sería necesario investigar en el futuro si utilizando anticuerpos monoclonales específicos se podría reducir el número de pasos del ensayo y acortar los tiempos de incubación, para obtener un ensayo que sea más rápido y sencillo de realizar y que pueda adaptarse mejor a las condiciones de trabajo de los inspectores sanitarios.

Experiencia 3. Aplicación de los TR-IFMAs desarrollados en condiciones de campo.



SECCIÓN 1. INTRODUCCIÓN.

Las muestras de saliva y jugo cárnico han sido poco utilizadas como alternativa al suero sanguíneo, para valorar el estado sanitario de los animales en medicina veterinaria en general, y en el ganado porcino en particular. En cerdos, se ha empleado la saliva para la determinación de cortisol en estudios de estrés (Sorrells et al, 2007 y Chalouplová et al, 2007) y el jugo cárnico para la cuantificación de anticuerpos específicos frente a *Salmonella* (Mousing et al, 1997), *Aujeszky* (Le Potier, et al, 1998) y *Trichinella* (Papal et al, 1998). Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado ningún estudio en el que se utilice la saliva o el jugo cárnico como muestras para la determinación de PFA en condiciones de campo en el ganado porcino.

El objetivo de la **Experiencia 3** fue valorar si las muestras de saliva y jugo cárnico podían ser utilizadas, como alternativas al suero sanguíneo, para la evaluación de la respuesta de fase aguda en enfermedades producidas de forma natural en condiciones de campo. Para ello se determinaron las concentraciones de Hp y CRP en suero, saliva y jugo cárnico, utilizando los TR-IFMAs anteriormente desarrollados, en un grupo de animales sanos procedentes de una granja libre de patógenos específicos (SPF) y en un grupo de animales con el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) a diferentes edades.

Se seleccionaron animales con PRRS ya que, junto con el síndrome del desmedro post-destete porcino, es una de las enfermedades más importantes en el ganado porcino en todo el mundo, debido a las grandes pérdidas económicas que origina. El virus que ocasiona esta enfermedad es un virus ARN capaz de inducir viremias prolongadas, infecciones persistentes y una gran replicación a nivel de los macrófagos. Afecta a cerdos de todas las edades con algunas diferencias: los animales jóvenes presentan viremias mayores que los animales adultos y además excretan mayores cantidades de virus. Las principales manifestaciones clínicas de esta enfermedad es el fallo reproductivo en hembras gestantes así como retraso en el crecimiento, elevada mortalidad y enfermedad respiratoria secundaria en animales de engorde (Cho et al, 2006). La seroconversión de los animales se produce hacia los 14 días post- infección (Díaz et al, 2005) y se ha demostrado que las infecciones concomitantes potencian el desarrollo de los signos

clínicos (Harms et al, 2001 y Kennedy et al, 2000).

SECCIÓN 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Animales y muestras utilizadas.

Para llevar a cabo el presente estudio se tomaron muestras de suero, saliva y jugo cárnico (obtenidas según los procedimientos descritos en el apartado 5 del material y métodos común) de cerdos procedentes de dos granjas ubicadas en la Región de Murcia con distinto estatus sanitario. Todos los animales fueron machos de engorde del cruce Duroc X (Landrace X Large White) ya que es el comúnmente utilizado para el cebo de ganado porcino en esta Región.

Se utilizaron 60 cerdos, de distintas edades, con retraso en el crecimiento, síntomas de enfermedad respiratoria y serología positivas a las inmunoglobulinas específicas del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, procedentes de una granja afectada por dicho virus. Además 40 animales sanos procedentes de una granja libre de patógenos específicos (SPF) de las mismas edades que los animales enfermos, fueron empleados como animales control. Los animales se dividieron en función de su edad y estado sanitario en 6 grupos como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Clasificación de los animales utilizados en el estudio.

| Edad: | Animales post-destete (60 días de edad) | Animales de engorde (120 días de edad) | Animales adultos (180 días de edad) |
|---|--|---|--|
| Estatus sanitario: | | | |
| Animales con signos clínicos de PRRS | Jóvenes (n = 20) | Adultos 1 (n = 20) | Adultos 2 (n = 20) |
| Animales sanos | Control 1 (n = 10) | Control 2 (n = 10) | Control 3 (n = 20) |

Los cerdos enfermos fueron sacrificados humanitariamente mediante inyección endovenosa de pentobabital sódico y desangrado durante la realización de la necropsia y se recogieron muestras de saliva, sangre y músculo diafragmático. Las muestras de saliva se recogieron antes del sacrificio, la sangre fue recolectada durante el desangrado de los cerdos y las muestras cárnicas una vez comenzada la necropsia.

Los animales sanos en periodo post-desdete y en fase de engorde fueron muestreados para la recolección de muestras de saliva y sangre en la granja, mientras que

los animales sanos al final del periodo de engorde, o animales adultos, fueron muestreados en el matadero antes del sacrificio para la recolección de saliva, y tras el aturdimiento con CO₂ y el sangrado, para la toma de muestras de sangre y músculo diafragmático.

2.2. Concentración salivar de Hp y CRP porcina y serología de los animales estudiados.

Se determinaron las concentraciones de Hp y CRP en muestras de suero, saliva y jugo cárnico utilizando los fluoroinmunoensayos desarrollados y validados a lo largo de la presente Tesis Doctoral en las experiencias 1 y 2. Las cuantificaciones se realizaron antes de las 24 horas de la recogida de las muestras en todos los casos.

Además se realizó el estudio serológico de las muestras séricas, siguiendo las instrucciones del fabricante de cada kit comercial utilizado, para las siguientes enfermedades:

- Síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS). Se testaron los sueros para la presencia de anticuerpos específicos frente al virus del PRRS utilizando el kit HerdChek* PRRSV 2XR (IDEXX Laboratories, USA).
- Síndrome del desmedro porcino. Se cuantificaron las concentraciones de inmunoglobulinas séricas IgG e IgM específicas frente al Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) mediante ELISA (Ingenasa, Madrid, España).
- Enfermedad de Aujeszky. Se detectó la presencia de anticuerpos específicos frente a la glicoproteína E del virus de la enfermedad de Aujeszky mediante ELISA (ELISA CIVTEST SUIA ADVgE, Hipra laboratories, Gerona, España).
- Micoplasma. Los anticuerpos específicos frente a Mycoplasma hyopneumoniae fueron detectados utilizando el ensayo CIVTESTTM (Hipra Laboratories, Gerona, Spain).

2.3. Estudio estadístico realizado.

Para calcular las medianas y los percentiles de las concentraciones de Hp y CRP en los distintos grupos de animales se utilizaron procedimientos estadísticos descriptivos generales mediante el programa estadístico GraphPad Prism 5 Demo (GraphPad software Inc).

Para valorar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre animales sanos y animales con procesos patológicos a diferentes edades, se utilizó el test de Wilconson para muestras no paramétricas, ya que las concentraciones de PFA no siguen una distribución normal. El nivel de significación estadístico utilizado para establecer diferencias estadísticamente significativas fue de $p < 0.05$ y se calculó utilizando el programa estadístico GraphPad detallado anteriormente.

SECCIÓN 3. RESULTADOS.

Los animales sanos presentaron serología negativa para todos los virus estudiados, mientras que los animales con signos clínicos compatibles con PRRS presentaron serología positiva a PRRS. Los animales afectados por PRRS en fase de engorde y adultos fueron también seropositivos a PCV2 y Micoplasma (tabla 18).

Tabla 18. Resultados serológicos de los animales sanos (n = 40) y animales con síntomas compatible con PRRS (n = 60).

| Animales: | | Virus: | PRRS | PCV2 | Aujezsky | Micoplasma |
|-----------|-----------|--------|------|------|----------|------------|
| Sanos | Jóvenes | - | - | - | - | - |
| | Adultos 1 | - | - | - | - | - |
| | Adultos 2 | - | - | - | - | - |
| Enfermos | Control 1 | + | - | - | - | - |
| | Control 2 | + | + | - | - | + |
| | Control 3 | + | + | - | - | + |

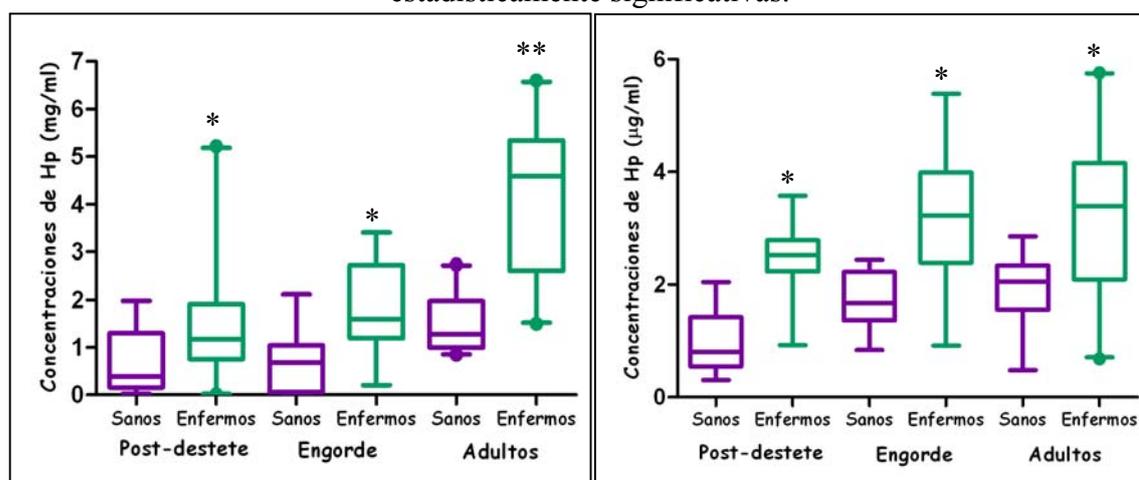
Los resultados de la cuantificación de las concentraciones de Hp y CRP en suero, saliva y jugo cárnico para cerdos con PRRS y cerdos sanos, de diferentes edades, se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Medianas de las concentraciones de Hp y CRP obtenidas en suero, saliva y jugo cárnico para animales sanos y animales afectados por PRRS.

| <i>Animales:</i> | | <i>Post-destete</i> | | <i>En fase de engorde</i> | | <i>Adultos</i> | |
|------------------|-----------------------|---------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | <i>Sanos</i> | <i>Enfermos</i> | <i>Sanos</i> | <i>Enfermos</i> | <i>Sanos</i> | <i>Enfermos</i> |
| <i>PFA:</i> | | <i>Control 1</i> | <i>Jóvenes</i> | <i>Control 2</i> | <i>Adultos 1</i> | <i>Control 3</i> | <i>Adultos 2</i> |
| Hp | Suero (mg/ml) | 0.39 (n = 10) | 1.16 (n = 20) | 0.67 (n = 10) | 1.58 (n = 20) | 1.28 (n = 20) | 4.59 (n = 20) |
| | Saliva (µg/ml) | 0.80 (n = 10) | 2.58 (n = 18) | 1.67 (n = 10) | 3.22 (n = 17) | 2.04 (n = 20) | 3.39 (n = 20) |
| | Jugo (µg/ml) | - | 101.4 (n = 20) | - | 131.1 (n = 20) | 60.62 (n = 20) | 148.4 (n = 20) |
| CRP | Suero (µg/ml) | 38.43 (n = 10) | 51.99 (n = 20) | 58.33 (n = 10) | 109.9 (n = 20) | 82.58 (n = 20) | 352.0 (n = 20) |
| | Saliva (ng/ml) | 34.01 (n = 10) | 94.80 (n = 16) | 37.80 (n = 10) | 163.1 (n = 17) | 93.53 (n = 20) | 426.5 (n = 20) |
| | Jugo (µg/ml) | - | 6.20 (n = 20) | - | 11.93 (n = 20) | 4.82 (n = 20) | 21.32 (n = 20) |

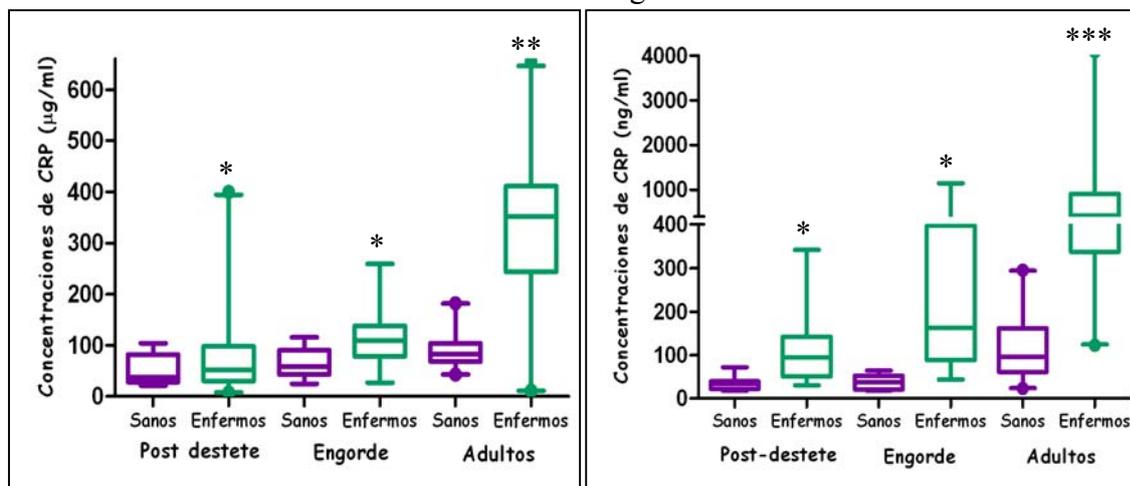
Las concentraciones de Hp y CRP fueron significativamente mayores en animales afectados por PRRS que en los animales sanos de las mismas edades, en todas las muestras biológicas utilizadas: suero, saliva y jugo cárnico (Fig. 70, 71 y 72). Por razones éticas no se sacrificaron animales sanos a diferentes edades por lo que las muestras de jugo cárnico procedentes de animales sanos solo se obtuvieron de cerdos adultos sacrificados al final de la fase de engorde.

Figura 70. Niveles de Hp séricos (izquierda) y salivares (derecha) de animales sanos y animales con PRRS de distintas edades. Línea horizontal en la caja: mediana. Límites de la caja: percentiles 25th y 75th. Barras: percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas.



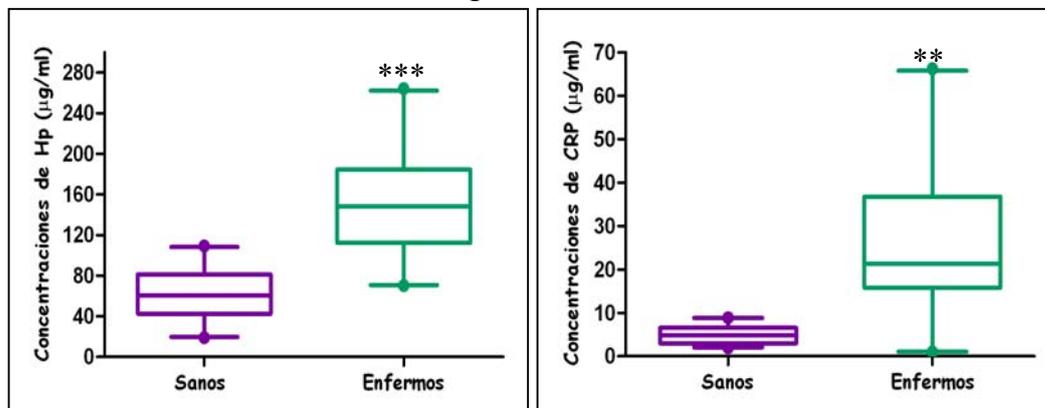
* $p < 0.05$ y ** $p < 0.0001$

Figura 71. Niveles de CRP en suero (izquierda) y saliva (derecha) de animales sanos y animales con PRRS de distintas edades. Línea horizontal en la caja: mediana. Límites de la caja: percentiles 25th y 75th. Barras: percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas.



* p < 0.05 ** p < 0.001. *** p < 0.0001

Figura 72. Niveles de Hp (izquierda) y CRP (derecha) en jugo cárnico de animales adultos sanos y con PRRS. Línea horizontal en la caja: mediana. Límites de la caja: percentiles 25th y 75th. Barras: percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas.

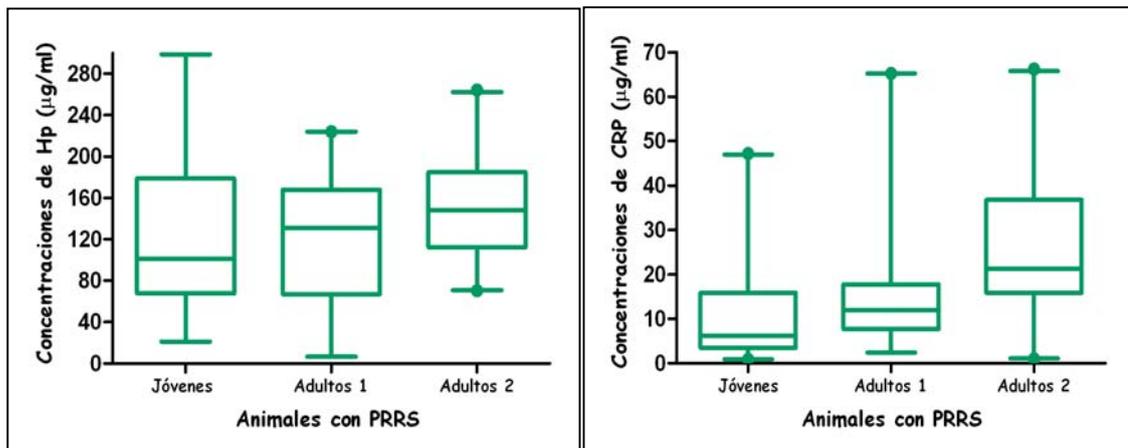


** p < 0.001. *** p < 0.0001

Se encontró un incremento en las concentraciones de Hp y CRP en suero y saliva con la edad en animales como se aprecia en las figuras 70 y 71, tanto en el grupo de animales sanos como en el grupo de animales afectados por PRRS. Las mayores concentraciones se encontraron en animales adultos de 180 días de edad.

De forma similar se produjo un incremento de las concentraciones de Hp y CRP en muestras de jugo cárnico procedentes de cerdos afectados por PRRS a distintas edades como aparece en la figura 73.

Figura 73. Niveles de Hp (izquierda) y CRP (derecha) en jugo cárnico de animales con PRRS (n = 60) de distintas edades. Línea horizontal en la caja: mediana. Límites de la caja: percentiles 25th y 75th. Barras: percentiles 5th y 95th. * diferencias estadísticamente significativas.



SECCIÓN 4. DISCUSIÓN.

En esta experiencia se estudió si la saliva y jugo cárnico podían ser utilizadas como muestras alternativas al suero para cuantificar los niveles de Hp y CRP en enfermedades a nivel de campo, utilizando el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) como modelo de enfermedad y empleando los TR-IFMAs anteriormente desarrollados.

En las tres muestras utilizadas: saliva, jugo cárnico y suero, se encontraron concentraciones superiores de Hp y CRP en los animales afectados por PRRS en comparación con los animales sanos. Por lo que la saliva y el jugo cárnico podrían ser empleadas como muestras alternativas al suero sanguíneo para la determinación de Hp y CRP porcinas con todas las ventajas de tipo práctico que esto conlleva.

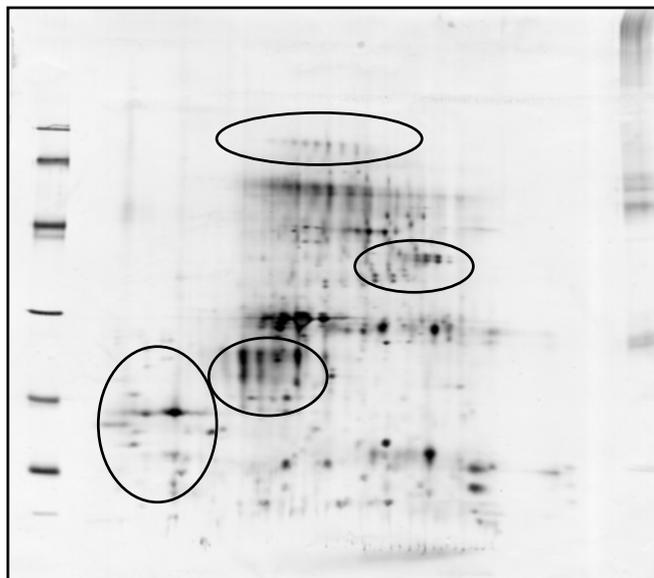
Se encontró un incremento en las concentraciones de Hp y CRP con la edad de los animales en todas las muestras analizadas, siendo mayores los niveles en animales adultos. Las mayores concentraciones encontradas en animales adultos en el grupo de cerdos afectados por PRRS podría ser debido a las infecciones concomitantes que estos animales presentaban, ya que los animales con PRRS suelen tener infecciones secundarias que suelen ser más frecuentes con la edad (Harms et al, 2001 y Tourlomoussis et al, 2004). En cuanto a los aumentos encontrados con la edad en

animales sanos SPF, podrían ser debidos a la presencia de alteraciones o enfermedades subclínicas que se producen con frecuencia en animales adultos en el cerdo y que pueden pasar desapercibidas en el examen físico e incluso en análisis serológicos (Petersen et al., 2002).

Las concentraciones séricas de Hp y CRP obtenidas en animales post-destete afectados por PRRS son similares a las encontradas en animales, de la misma edad, infectados con PRRS en condiciones de campo (Parra et al, 2006). Sin embargo las concentraciones séricas de Hp encontradas en animales en fase de engorde fueron superiores a las obtenidas en animales infectados experimentalmente con el virus del PRRS de la misma edad (Díaz et al, 2005). Las concentraciones superiores encontradas en nuestro estudio podrían ser debidas a las infecciones concomitantes con otros virus como PCV2 y *Mycoplasma* que aparecieron en nuestros animales y que ocurren generalmente en condiciones de campo (Harms et al, 2001 y Kennedy et al, 2000) y no suelen reproducirse en condiciones experimentales.

En conclusión, los resultados obtenidos en esta experiencia mostraron que, tanto la saliva como el jugo cárnico, pueden ser utilizados como muestras alternativas al suero sanguíneo para la cuantificación de Hp y CRP en animales con PRRS a distintas edades. Ambas muestras podrían ser empleadas para monitorizar el estatus sanitario de los cerdos en condiciones de campo, a lo largo de todo el proceso de producción y a nivel de matadero.

Experiencia 4. Primeras identificaciones de proteínas en saliva de cerdos mediante proteómica.



SECCIÓN 1. INTRODUCCIÓN.

La saliva ha sido ampliamente estudiada como fluido diagnóstico en medicina humana, principalmente debido a que contiene ciertas proteínas involucradas en la respuesta inmune, que podrían ser utilizadas como biomarcadores de enfermedad (Ghafouri et al, 2003 y Wong, 2006). Además la saliva se obtiene mediante una metodología simple, no invasiva y mínimamente estresante para el animal que permite muestrear un gran número de animales e incluso realizar tomas de muestras repetidas en un corto intervalo de tiempo (Kaufman et al, 2002).

El término proteómica se refiere al estudio de las proteínas expresadas por el genoma en un tejido determinado y en un momento concreto (Sironi et al, 2001). La proteómica tiene el potencial de revelar incrementos y descensos en la concentración de determinadas proteínas, así como modificaciones de las mismas, que podrían estar asociadas a procesos inflamatorios (Hogarth et al, 2004). Estudios proteómicos, realizados en muestras de saliva humana, han identificado biomarcadores específicos de diversas enfermedades como el cáncer de mama, de próstata o de ovario, la enfermedad de Alzheimer y la artritis reumatoide entre otros (Xiao et al, 2005). Además se ha demostrado que existen perfiles proteicos salivares específicos asociados a enfermedades concretas como desórdenes del tejido conectivo, fibrosis quística o diabetes mellitus (Huang, 2004).

Recientemente se ha caracterizado el mapa proteico sérico del cerdo (Miller et al, 2008), pero no existe ningún estudio referente a proteómica en saliva porcina. La obtención de un perfil salivar de referencia en animales sanos permitirá la identificación de proteínas que podrían ser utilizadas en un futuro como biomarcadores de enfermedad.

En esta **experiencia 4**, se describe, por primera vez, un estudio proteómico salivar porcino encaminado a establecer un perfil proteico de referencia y estudiar las posibles diferencias entre animales sanos y animales con procesos inflamatorios-infecciosos utilizando técnicas electroforéticas en dos dimensiones de alta resolución, espectrofotometría de masas e immunoblotting.

SECCIÓN 2. MATERIAL Y MÉTODOS.

Los procedimientos analíticos de esta experiencia se realizaron en el Laboratorio de Proteómica del Departamento de Ciencia Biomédica de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (Austria), donde la candidata realizó una estancia de investigación de tres meses incluida su el programa de formación predoctoral.

2.1. Muestras.

Se utilizaron muestras de saliva procedentes de dos grupos de animales, utilizando el protocolo de muestreo descrito en la sección 5 del material y métodos común:

- Grupo 1 (animales control): 10 animales sanos procedentes de una granja libre de patógenos específicos (SPF) con serología negativa frente al síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS), enfermedad de Aujeszky, Circovirus porcino tipo 2 (PCV2) y Micoplasma, y que no presentaron signos clínicos de enfermedad.
- Grupo 2 (animales con problemas inflamatorios-infecciosos): 10 animales procedentes de una granja con serología positiva a PRRS y PCV2 que presentaban síntomas clínicos inespecíficos como estornudos, tos, adelgazamiento y/o heridas en orejas y rabo.

Además, al inicio del estudio, para optimizar y adaptar los protocolos electroforéticos estándar para su uso en muestras de saliva, se utilizaron 2 pool de saliva. Cada pool estaba compuesto por volúmenes iguales de 5 muestras de animales sanos y 5 muestras de animales enfermos respectivamente.

Todos los animales fueron muestreados durante la tercera semana del inicio del cebo, que fue cuando los animales del grupo 2 comenzaron a presentar signos clínicos de enfermedad y se cuantificaron las concentraciones CRP y Hp utilizando los ensayos previamente desarrollados en los capítulos anteriores.

2.2. Estudio electroforético.

El estudio electroforético se llevó a cabo utilizando protocolos básicos estándar para la realización de electroforesis en 1 dimensión (SDS-PAGE) y 2 dimensiones (2-

DE) (SWISS-2DPAGE documents).

2.2.1. Estudio electroforético mediante electroforéris SDS-PAGE.

La electroforesis SDS-PAGE se realizó para obtener el peso molecular de las principales bandas proteicas presentes en la saliva de animales sanos y estudiar las posibles diferencias existentes en las principales bandas proteicas entre animales sanos y enfermos, y para obtener los geles de electroforesis necesarios para realizar la identificación posterior de proteínas mediante inmunoblot.

Con el fin de optimizar la cantidad de saliva que se debía aplicar en la electroforesis para obtener bandas proteicas claras, se probaron 2 concentraciones diferentes (2.5mg y 5mg de proteína total). El contenido proteico total de cada muestra se cuantificó según el método Bradford utilizando BSA como estándar (Bradford, 1975), con el fin de pipetear la misma cantidad de proteína y así poder comparar los resultados obtenidos.

Para realizar la electroforesis SDS-PAGE se prepararon las muestras de saliva y los geles de gradiente necesarios con anterioridad. Las muestras se prepararon tomando un volumen total de 5µl de solución proteica a los que se añadió el mismo volumen de agente reductor (DTT 20mg/ml diluido en SDS buffer) y se dejó actuar durante 5 minutos a 95°C. Posteriormente se centrifugaron las muestras y se añadieron 5µl de glicerina al 70%.

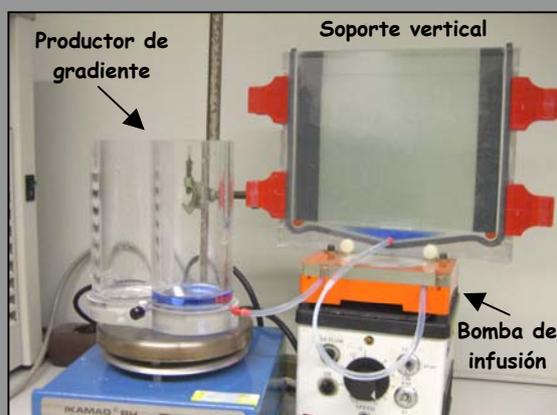
Los geles de gradiente de poliacrilamida del 10-15%, con un tamaño de 140 x 140 x 1.5mm, se produjeron de 3 en 3, debido a que era la capacidad máxima de los soportes verticales empleados (Multiple gel Caster SE-675 (Hoefer, Inc, San Francisco, USA), utilizando las soluciones que se detallan en la tabla 20 y siguiendo el protocolo descrito en la figura 74.

Tabla 20. Soluciones para la producción de geles de gradiente de 10-15% de acrilamida.

| Para producir 3 geles de gradiente 10-15% | | |
|---|-----------------|-----------------|
| Reactivos: | Solución al 10% | Solución al 15% |
| Acrilamida/bisacrilamida | 18.711ml | 28.083ml |
| Tampón 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 14.355ml | 14.355ml |
| Agua MiliQ | 23.1ml | - |
| Glicerina al 70% | - | 13.728ml |
| Persulfato amónico al 10% | 122µl | 122µl |
| Temed | 16.5µl | 16.5µl |

Figura 74. Producción de geles de gradiente para electroforesis.

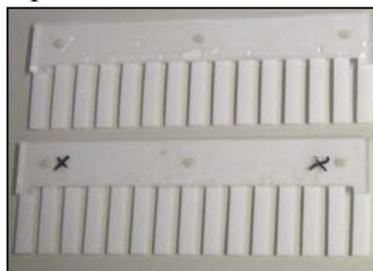
Una vez preparadas las soluciones de acrilamida necesarias, se vertieron en el productor de gradiente (SG 100, Gradient maker, Hoefer, Inc., San Francisco, Estados Unidos) para obtener un gradiente constante y lineal. La solución de menor concentración de acrilamida se vertió en el depósito derecho del productor de gradiente y la solución de mayor concentración en el depósito izquierdo. Se abrió la válvula del productor de gradiente y la solución de mayor concentración fue pasando lentamente al compartimento derecho produciendo una solución cada vez más concentrada de acrilamida. La bomba de infusión permitió el paso de la solución de poliacrilamida formada desde el productor de gradiente al soporte vertical. Para finalizar, se añadió una solución de glicerol con azul de bromofenol para que los geles alcancen una altura adecuada.



Los geles empaquetados en el soporte vertical se dejaron polimerizar a temperatura ambiente durante toda la noche, aunque en caso de no ser utilizados inmediatamente, también pueden conservarse a 4°C.

Posteriormente, se aplicó el gel concentrador (683µl de solución de acrilamida/bisacrilamida + 1035µl de tampón 0,5M Tris-HCl + 4g/l SDS, pH 6,8 + 2427µl de agua MiliQ + 50µl de solución de persulfato amónico al 10% +5,5µl de Temed), en la parte superior del gel de gradiente polimerizado, junto al peine correspondientemente de un grosor de 0,75mm (Fig. 75).

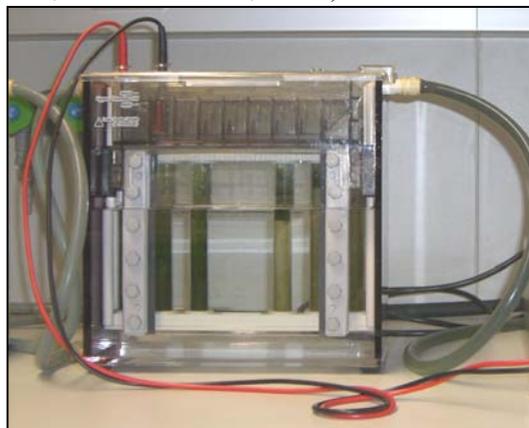
Figura 75. Peines utilizados para realizar electroforesis SDS-PAGE desde muestras.



Tras 30 minutos de incubación el gel concentrador polimerizó y se añadió el marcador de peso molecular (14-97kDa low molecular weight-SDS, GE Healthcare UK

Ltd, Buckinghamshire, Inglaterra) en la calle 1 y las muestras correspondientes en las demás calles (2-15), y se dispusieron los geles en la cubeta de electroforesis (Fig. 76).

Figura 76. Cubeta refrigerada para electroforesis vertical SE600 (Standard Dual Cooled Vertical Unit, Hoefer, Inc, San Francisco, USA) donde se realizaron las electroforesis.



Las condiciones de electroforesis fueron de 25mA/gel durante 4-5 horas y el tampón de recorrido utilizado se preparó mediante la adición de 36.03g de Glicerol + 2.5g de SDS + 7.58g de Tris en un volumen de 2,5ml de agua MiliQ. Tras la electroforesis los geles obtenidos fueron teñidos para poder detectar las bandas proteicas, utilizando solución de plata, como se describe en la figura 77.

Figura 77. Protocolo de tinción de geles de electroforesis SDS-PAGE.

1. Incubar 1 hora en 250ml de **solución de fijación**: 30% de etanol + 10% de ácido acético.
2. Incubar durante toda la noche con **solución sensibilizadora**: 17g de acetato sódico, 0.5g de disulfato sódico disuelto en 175ml de agua MiliQ + 75ml de etanol + 1.25ml de glutaraldeido.
3. Lavar 3 x 20min con 250ml de agua MiliQ.
4. Incubar 30min en **solución de teñido**: 0.4g de nitrato de plata en 200ml de agua MiliQ + 40μl de formalina.
5. Lavar 1 X 1min en 250ml de agua MiliQ.
6. Lavar 2 x 20 segundos en 125ml de **solución de revelado**: 18.75g de carbonato sódico en 750ml de agua MiliQ + 75ml de formalina.
7. Realizar 2 incubaciones de 3 minutos en 250ml de solución de revelado.
8. Incubar 20min en **solución stop**: glicina al 1%.
9. Lavar 3 x 10min con 250ml de agua MiliQ.
10. Dejar reposar 2 horas en **solución de conservación**: 25% etanol + 2% glicerol.
11. Escanear y dejar secar toda la noche a 30°C.

2.2.2. Estudio electroforético mediante electroforesis en 2 dimensiones (2-DE).

La electroforesis en dos dimensiones combina dos técnicas electroforéticas: el isoelectroenfoque y la electroforesis SDS-PAGE. El isoelectroenfoque se utiliza como primera dimensión electroforética, separando las proteínas en función del pI y emplea tiras como soporte. En la segunda dimensión electroforética se separan las proteínas de las tiras de isoelectroenfoque en función del peso molecular empleando la electroforesis SDS-PAGE.

2.2.2.1. IEF: primera dimensión.

Las tiras utilizadas como soporte para IEF se denominan tiras de isoelectroenfoque en gradiente inmovilizado de pH (tiras IPG) y fueron producidas siguiendo protocolos generales estándar (SWISS-2DPAGE documents). En breve, se preparó un gel de gradiente de pH comprendido entre 4 y 10 utilizando un productor de gradiente (SG 100 Gradient Maker, Hoefer, Inc, San Francisco, USA) y una bomba de infusión como se describió anteriormente para los geles de gradiente de acrilamida. Una vez el gel polimerizado, se almacenó en congelación hasta su posterior utilización.

Para obtener las tiras IEF, el día del análisis los geles almacenados fueron cortados en tiras de 0,5cm de grosor y se rehidrataron durante 7 horas en 340µl de solución de rehidratación (12g de Urea, 0,5g de CHAPS, 15, 625ml de agua MiliQ, 375µl de solución de DDT (37,5mg de DDT en 16ml de agua MiliQ) y 0,25ml de anfolitos).

Para preparar las muestras a aplicar en las tiras IPG, se tomó el volumen correspondiente a 30µg de proteína total y se liofilizó durante 2 horas, con el fin de evaporar el agua y concentrar la muestra debido a que el contenido proteico que presentaron las muestras de saliva era bajo. Tras la liofilización el precipitado resultante se resuspendió en 20µl de solución IPG (100mg de DTT, 400mg de CHAPS, 5,4g de urea, 6ml de agua MiliQ y 0,5ml de farmalitos a pH 8-10,5).

Posteriormente, las tiras IPG se colocaron en la cámara de isoelectroenfoque (Multiphor II electroforesis Chamber, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) como se muestra en la figura 78, de modo que el ánodo y el cátodo de las tiras quedaron alineados con su correspondiente electrodo, permitiendo el paso de corriente. Finalmente se aplicó

la muestra y se comenzó la electroforesis a un voltaje inicial de 100V que se incrementó lentamente hasta alcanzar un máximo de 15kV, siguiendo el protocolo descrito en la tabla 21.

Se estudió si el lugar de aplicación de la muestra, durante la realización del isoelectroenfoco, podía influir en la movilidad de las proteínas y su posterior detección. Para ello se realizaron IEF de duplicados de muestras aplicadas a nivel del polo negativo (ánodo) y del polo positivo (cátodo) y se evaluó el perfil proteico obtenido. Una vez terminado el IEF, las tiras se almacenaron cuidadosamente en el congelador a una temperatura de -28°C hasta la realización de la segunda dimensión electroforética.

Figura 78. Cámara de IEF (izda) Colocación de las tiras en la cámara (drcha).

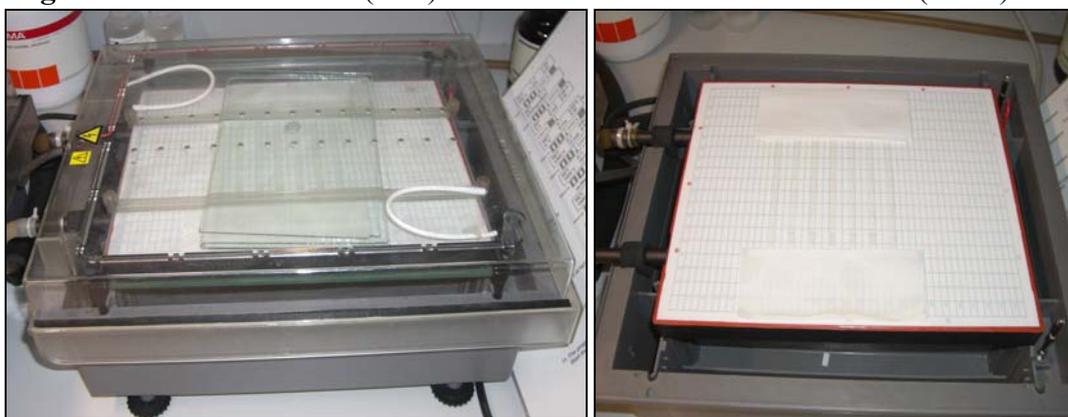


Tabla 21. Protocolo electroforético utilizado para IEF a 2mA, 3W y 15°C inicialmente.

| <i>Programa 1</i> | | |
|---|-------|--------------------|
| 100V | 1h | 0.1kVh |
| 200V | 1h | 0.2 kVh |
| 500V | 9.8h | 4.9kVh |
| 1000V | 5h | 5kVh |
| 2000V | 1.5h | 3kVh |
| <i>Se retira el papel de aplicación de la muestra y se comienza el programa 2</i> | | |
| 200V | 1h | 0.2kVh |
| 500V | 1h | 0.5kVh |
| 1000V | 0.5h | 0.5kVh |
| 2000V | 0.25h | 0.5kVh |
| Fin del programa | | Total: 15kV |

2.2.2.2. Electroforesis SDS-PAGE de tiras IPG: segunda dimensión.

Para realizar una electroforesis SDS-PAGE como segunda dimensión electroforética se utilizan los geles de gradiente al 10-15% de acrilamida como geles estándar (Westermeyer, 2004). Sin embargo, se probaron geles de gradiente 10-20% con

Experiencia 4

20% de porcentaje constante o Plateau, para valorar si de este modo se obtenía una mejor separación y detección de las proteínas de bajo peso molecular. Los geles de gradiente de 10-20%-20% Plateau se produjeron de igual modo que el descrito para los geles de 10-15% de gradiente pero utilizando las soluciones descritas en la tabla 22.

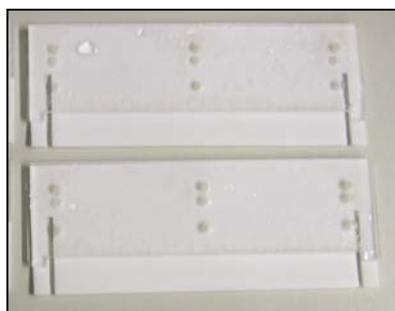
Tabla 22. Soluciones para la producción de geles de gradiente de 10-20%-20% Plateau.

| Para producir 3 geles de gradiente 10-20%-20% Plateau o constante | | | |
|---|-----------------|-----------------|------------------|
| Reactivos: | Solución al 10% | Solución al 20% | Solución Plateau |
| Acrilamida/bisacrilamida | 6.237ml | 12.474ml | 24.948ml |
| Tampón 1,5M Tris-HCl, pH 8,8 | 4.785ml | 4.785ml | 9.570ml |
| Agua MiliQ | 7.700ml | 0.187ml | 0.374ml |
| Glicerina al 70% | - | 1.276ml | 2.552ml |
| Persulfato amónico al 10% | 40.5 μ l | 40.5 μ l | 81 μ l |
| Temed | 5.5 μ l | 5.5 μ l | 11 μ l |

Para llevar a cabo la segunda dimensión electroforética, las tiras IPG preparadas tras el IEF fueron equilibradas durante 10 minutos en solución DTT (100mg DTT diluidos en 5ml de solución de equilibrio) y posteriormente en solución IAA (125mg de IAA diluidos en 5ml de solución de equilibrio) durante 5 minutos. La solución de equilibrio utilizada se produjo mediante la mezcla de: 9g de Urea + 0,5gr de SDS + 5ml de agua MiliQ + 2,5ml de buffer tampón 0,5M Tris-HCl + 4g/l SDS, pH 6,8 + 10ml de glicerina al 70%.

Mientras se equilibraron las tiras, los geles de gradiente se montaron en el soporte vertical y se aplicó el gel concentrador y el peine correspondiente (Fig. 79).

Figura 79. Peines utilizados para realizar electroforesis SDS-PAGE desde tiras IPG.



Tras 30 minutos de incubación se retiró el peine y se colocó la tira IPG

correspondiente en el hueco formado y se cubrió con 640µl de solución de agarosa al 2%. Posteriormente se añadió el marcador de peso molecular y se dispusieron los geles en la cubeta de electroforesis aplicando una corriente de 25mA/gel durante 4-5 horas.

2.3. Identificación proteica.

Una vez realizadas las separaciones electroforéticas en una y dos dimensiones, se trató de identificar las proteínas presentes en las muestras de saliva, mediante dos técnicas distintas: inmunoblotting y espectrofotometría de masas.

2.3.1. Identificación de proteínas de la saliva mediante inmunoblot.

2.3.1.1. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas de todas las muestras de saliva de los animales del estudio se separaron mediante SDS-PAGE y posteriormente se transfirieron desde el gel de electroforesis a una membrana de nitrocelulosa, utilizando un voltaje de 140mA/gel durante 2 horas.

Tras realizar la transferencia las membranas fueron almacenadas a 4°C hasta su posterior análisis.

2.3.1.2. Tinción general de las proteínas transferidas.

Para comprobar que las proteínas se transferían correctamente desde el gel de electroforesis a la membrana de nitrocelulosa, se las membranas se tiñeron con solución de rutenio (Sypro Ruby stain solution, Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos).

La solución de rutenio es luminiscente y capaz de unirse mediante un quelato a todas las proteínas de modo que se detecta la luminosidad del rutenio unido a las proteínas de la membrana. El protocolo utilizado para la tinción se describe en la figura 80.

Figura 80. Protocolo utilizado para la tinción general de proteínas mediante

1. Incubación de la membrana 15 minutos en 200ml de solución de fijación (7% ácido acético, 10% etanol diluidos en agua MiliQ).
2. Lavado 4 x 5 minutos con agua MiliQ.
3. Incubación durante 30 minutos, protegido de la luz, en solución fluorescente (solución stock a una dilución 1:50000 en agua MiliQ).
4. Lavado 5 x 5 minutos con agua MiliQ protegido de la luz.
5. Escaneo de la membrana con escáner de fluorescencia de luz azul.

fluorescencia.

2.3.1.3. Immunoblotting.

Mediante inmunoblotting, se trataron de identificar proteínas en saliva porcina en base a los anticuerpos comerciales de los que se disponía: anticuerpos frente a la cadena pesada de las inmunoglobulinas Ig G, Ig A e Ig M y las cadenas ligeras kappa (κ) y gamma (γ) de las inmunoglobulinas (Sigma Aldrich, Missouri, Estados Unidos).

Los anticuerpos utilizados eran específicos de la especie humana y presentaban reactividad cruzada frente a las inmunoglobulinas del ganado porcino. El protocolo utilizado para la realización de los inmunoblottings se describe en la figura 81.

Figura 81. Protocolo para la identificación de inmunoglobulinas mediante inmunoblotting.

1. Incubar las membranas de nitrocelulosa 30 minutos en solución de saturación (TBS + 1% de gelatina).
2. Lavado 2 x 5 minutos en TTBS.
3. Incubación de 2 horas con el anticuerpo primario diluido en TTBS + 1% de gelatina.
4. Lavado 3 x 5 minutos en TTBS.
5. Incubación de 2 horas con el anticuerpo secundario conjugado diluido en TTBS + 1% de gelatina.
6. Lavado 2 x 5 minutos en TTBS.
7. Lavado 1 x 5 minutos en TBS.
8. Incubación durante 5 minutos con solución substrato específica del enzima utilizado como conjugado en el anticuerpo.
9. Lavado 1 x 5 minutos en agua MiliQ.

2.3.2. Identificación de proteínas en saliva mediante MS.

Para realizar la identificación proteica de aquellas proteínas presentes en saliva que no fueron identificadas mediante inmunoblot, se prepararon dos geles 2-DE teñidos con solución de plata utilizando una solución sensibilizadora sin glutaraldehído, una solución de tinte sin formalina y una solución de conservación compuesta únicamente por agua MiliQ.

Aquellas manchas o “spots” que se querían identificar mediante espectrofotometría de masas, se cortaron directamente desde el gel de electroforesis y se remitieron al servicio de VETOMIC de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (Austria), donde realizaron la digestión de las “spots”, siguiendo el protocolo descrito en

la figura 82, para obtener péptidos capaz de ser identificados mediante espectrofotometría de masas.

Figura 82. Protocolo de digestión de “spots” con tripsina.

1. Escisión de “spots” del gel de electroforesis tras el teñido específico.
2. Lavado y desteñido de “spots”.
3. Reducción de uniones disulfuro y alquilación de los grupos tiol de la cisteína utilizando dithiothreitol, iodoacetamida y acetonitrilo.
4. Digestión con tripsina: tripsinización.
5. Extracción de péptidos.

La tripsina corta las uniones del carbono terminal por la arginina y la lisina en condiciones de pH 7-9, por lo que cada proteína presentará siempre los mismos péptidos si la digestión se realiza correctamente y la proteína no sufre demasiadas modificaciones post-translacionales. Los péptidos obtenidos tras la tripsinización se analizaron mediante espectrometría de masas utilizando un espectrofotómetro MALDI-TOF (Matrix Asisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) (Fig. 83) y los resultados obtenidos fueron procesados mediante tres técnicas diferentes: huella peptídica (Peptide mass fingerprint, PMF), fragmentación (Tandem mass spectrometry, MSMS) o secuenciación de novo.

Figura 83. Espectrofotómetro MALDI-TOF utilizado para la identificación proteica.



Mediante PMF se obtuvo un espectro de masas del conjunto de péptidos para aquellas proteínas que presentaron un gran número de péptidos homólogos a los existentes en las bases de datos consultadas. Por el contrario, cuando los péptidos obtenidos tras la digestión no eran capaces de dar información suficiente para su identificación o presentaron excesivas modificaciones post-translacionales, se analizaron

los péptidos individualmente mediante fragmentación y se generó un espectro de masas denominado espectro de fragmentación (Nyman, 2001).

Cuando ninguna de las técnicas anteriormente descritas conseguían dar una identificación para una proteína determinada se utilizó la técnica de secuenciación de *novo* que consiste en tratar de obtener la secuencia aminoacídica de la proteína desde el espectro de fragmentación obtenido comparando pequeñas secuencias nucleotídicas de los péptidos con las descritas en las bases de datos (Westermeyer et al, 2008).

SECCIÓN 3. RESULTADOS.

3.1. Concentración salivar de proteínas de fase aguda.

Los resultados obtenidos tras cuantificar las concentraciones de las proteínas de fase aguda, Hp y CRP, en las muestras de animales sanos y animales con procesos inflamatorios infecciosos utilizadas para la realización del estudio proteómico, se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Concentraciones salivares de CRP (ng/ml) y Hp (μ g/ml) en cerdos control y cerdos con procesos inflamatorios infecciosos.

| Animales control | Hp (μ g/ml) | CRP (ng/ml) | Animales con inflamación-infección | Hp (μ g/ml) | CRP (ng/ml) |
|------------------|------------------|--------------|------------------------------------|------------------|-------------|
| 1 | 0,8 | 24 | 1 | 5.4 | 62 |
| 2 | 1,4 | 28 | 2 | 5 | 54 |
| 3 | 1,8 | 32 | 3 | 5 | 74 |
| 4 | 2,2 | 27 | 4 | 5.1 | 60 |
| 5 | 1,4 | 35 | 5 | 5.2 | 62 |
| 6 | 1,2 | 35 | 6 | 3.2 | 103 |
| 7 | 0,5 | 19 | 7 | 3 | 63 |
| 8 | 1,7 | 21 | 8 | 4 | 61 |
| 9 | 1,5 | 23 | 9 | 3.5 | 71 |
| 10 | 1 | 18 | 10 | 5.5 | 52 |
| Mediana | 1,37 | 26.16 | Mediana | 5 | 62 |

Las concentraciones salivares de Hp y CRP del grupo de animales con procesos inflamatorios-infecciosos fueron superiores a las obtenidas en el grupo de animales sanos o control.

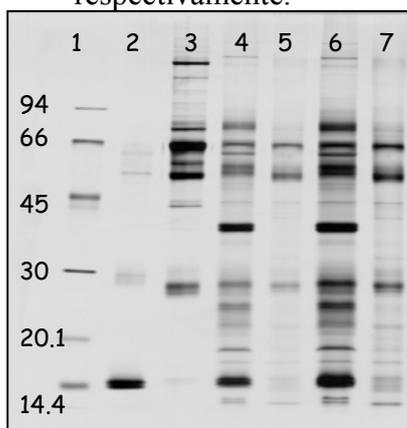
3.2. Estudio electroforético.

3.2.1. Estudio electroforético mediante SDS-PAGE.

En la figura 84 se muestra el gel de electroforesis obtenido en la prueba realizada

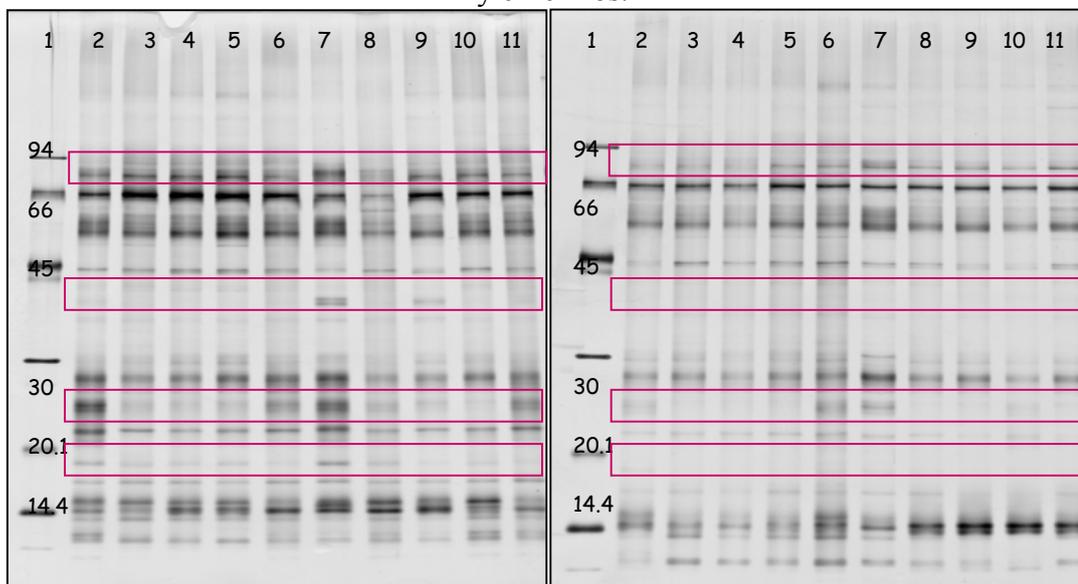
para la optimizar el contenido proteico a utilizar en SDS-PAGE. Empleando 2.5mg/ml de proteína total se obtuvieron bandas proteicas bien definidas y sin solapamientos mientras que con concentraciones de 5mg/ml las bandas eran demasiado gruesas y no quedaban bien definidas.

Figura 84. Gel de electroforesis para la optimización del contenido de proteína total. Calle 1: marcadores de peso molecular (kDa). Calle 2: Hemoglobina porcina. Calle 3: suero porcino. Calle 4 y 6: pool de animales sanos a 2.5mg/ml y 5mg/ml respectivamente. Calle 5 y 7: pool de animales enfermos a 2.5mg/ml y 5mg/ml respectivamente.



Una vez optimizada la concentración proteica a utilizar, se obtuvieron, mediante SDS-PAGE, los pesos moleculares de las principales bandas proteicas salivares y se estudiaron las diferencias más destacadas entre las bandas proteicas obtenidas en animales sanos y animales con procesos inflamatorios infecciosos (Fig. 85).

Figura 85. SDS-PAGE de 10 cerdos sanos (calle 2-11 izquierda) y 10 cerdos con procesos inflamatorios-infecciosos (calle 2-11 derecha). Calle 1: marcadores de peso molecular (kDa). Rectángulos de color: diferencias más destacadas entre animales sanos y enfermos.



Dentro de cada grupo de animales, sanos y enfermos, no se apreciaron diferencias en las bandas protéicas entre individuos. Sin embargo se obtuvieron diferencias en la intensidad de las bandas al comparar los animales sanos con los enfermos.

La utilización de SDS-PAGE no permitió obtener mayor información ya que no fue posible diferenciar si cada banda correspondía a una sola proteína o si, por el contrario, existía superposición de bandas proteicas.

3.2.2. Estudio electroforético mediante 2-DE.

Tras realizar en paralelo una 2-DE utilizando distintos geles de gradiente (10-15% y 10%-20-20% Plateau) aplicando la misma muestra en cada uno de ellos, no se encontraron mejoras en la visualización de las proteínas de bajo peso molecular, por lo que se utilizaron geles de 10-15% de gradiente de acrilamida en todas las electroforesis posteriores.

Cuando se estudio la influencia del lugar de aplicación de la muestra durante el IEF, las “spots” obtenidas se detectaron ligeramente mejor al utilizar la aplicación catódica, ya que cuando se aplicó la muestra en el ánodo no se visualizaron o se distinguieron débilmente algunas “spots” por lo que se utilizó la aplicación catódica para los análisis posteriores (Fig. 86 y 87).

Figura 86. Perfiles proteicos en el pool de animales sanos. Aplicación de la muestra en posición catódica (izquierda) y anódica (derecha).

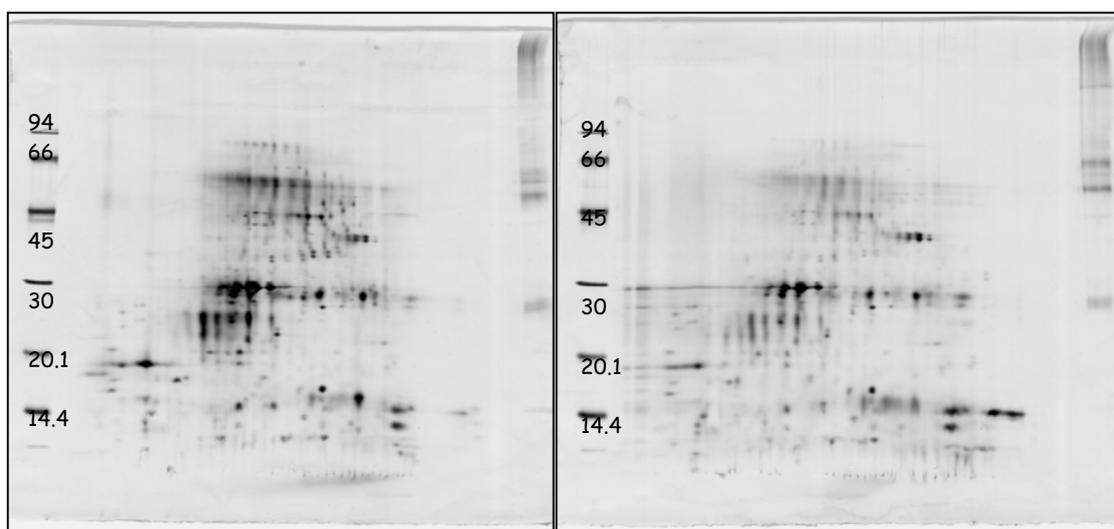
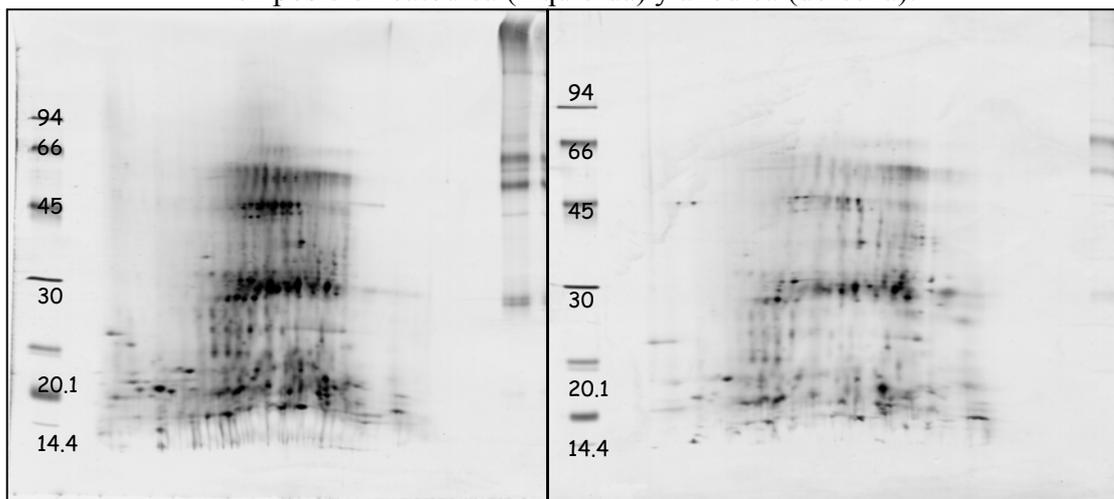


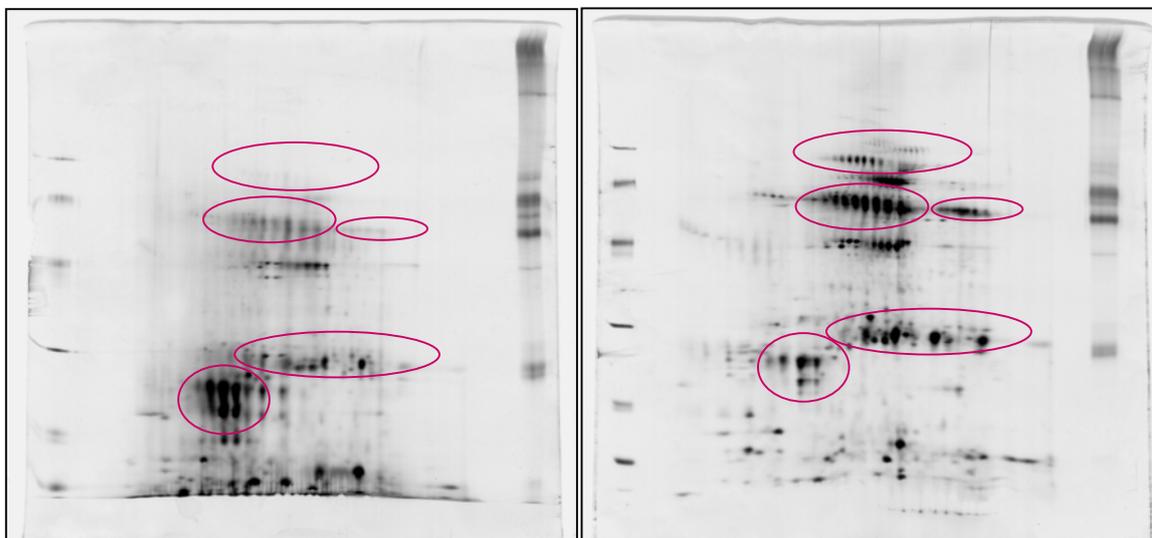
Figura 87. Perfiles proteicos en el pool de animales enfermos. Aplicación de la muestra en posición catódica (izquierda) y anódica (derecha).



La separación electroforética en dos dimensiones de saliva procedente de cerdos sanos y cerdos con problemas inflamatorios-infecciosos se muestra en la figura 98. Dichas imágenes son representativas de los dos grupos de animales estudiados. Las proteínas salivares aparecen en el patrón electroforético como “spots” únicas o como cadenas de “spots” (“spots” con diferente pI pero mismo peso molecular).

Mediante valoración visual se estudiaron las diferencias entre los perfiles proteicos salivares establecidos para animales sanos y animales con procesos inflamatorio-infecciosos. Las diferencias encontradas fueron, principalmente, en el nivel de intensidad de las “spots” obtenidas, como se resalta en las imágenes de la figura 88 mediante un ovalo de color.

Figura 88. Perfil general de proteínas salivares obtenido para animales sanos (izquierda) y para animales con procesos inflamatorios infecciosos (derecha). Óvalos de color: diferencias más destacadas entre los perfiles de los dos grupos de animales estudiados.



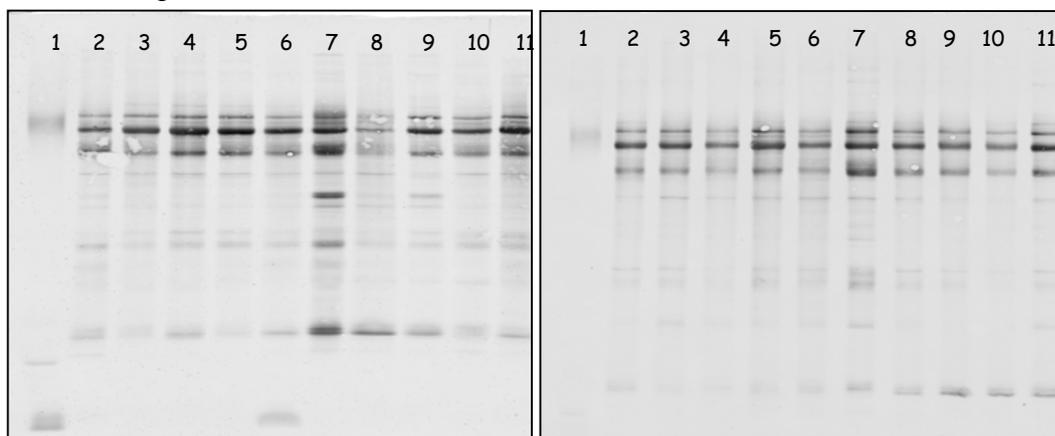
3.3. Identificación proteica.

3.3.1. Identificación de proteínas en saliva mediante inmunoblot.

3.3.1.1. Tinción general de las proteínas transferidas.

En la figura 89, se puede observar la tinción de fluorescencia realizada para poner de manifiesto las proteínas salivares en las membranas de transferencia para las muestras de animales sanos y de animales con problemas inflamatorios-infecciosos.

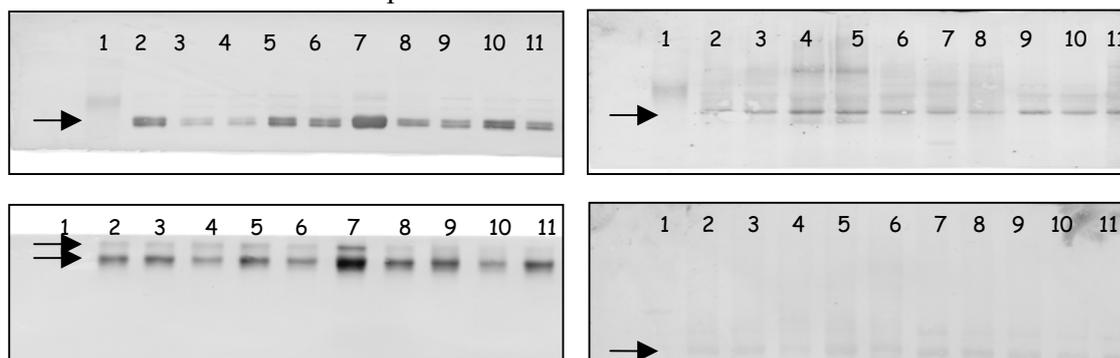
Figura 89. Tinción general de proteínas salivares en la membrana de nitrocelulosa de animales sanos (izda) y con procesos inflamatorios-infecciosos (drcha). Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2-11: muestras de saliva de los animales estudiados.



3.3.1.2. Resultado de la identificación proteica mediante inmunoblotting.

Mediante el uso de anticuerpos específicos y siguiendo el protocolo de inmunoblotting descrito anteriormente se consiguió identificar todas las inmunoglobulinas presentes en la saliva de los cerdos utilizados. En la figura 90 se muestran las imágenes de inmunoblot de las inmunoglobulinas identificadas.

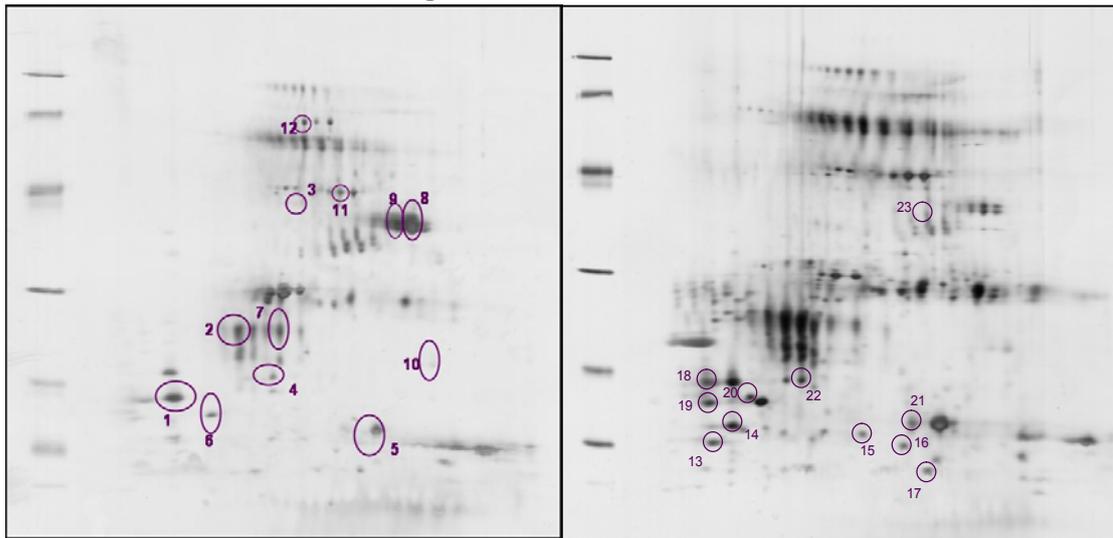
Figura 90. Imágenes de las inmunoglobulinas detectadas mediante inmunoblot. Ig A cadena pesada α (izda, arriba), Ig G cadena pesada γ (drcha, arriba), cadenas ligeras κ y λ de las inmunoglobulinas (izda, abajo) e Ig M cadena pesada μ (drcha, abajo). Calle 1: marcadores de peso molecular. Calle 2-11 muestras de saliva.



3.3.2. Identificación de proteínas en saliva mediante MS.

Las imágenes de los gels de electroforesis en dos dimensiones utilizados para la identificación proteica mediante espectrofotometría de masas así como las “spots” seleccionadas se muestran en la figura 91.

Figura 91. Gel de electroforesis en dos dimensiones utilizado para la identificación proteica mediante espectrofotometría de masas. Las “spots” seleccionadas para su posible identificación aparecen marcadas con un óvalo de color.



Los resultados de la identificación proteica remitidos por el servicio de VETOMICs (Plataforma tecnológica para la investigación de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena) para la identificación proteica de las “spots” seleccionadas se muestran en la tabla 24.

Tabla 24. Proteínas identificadas mediante espectrofotometría de masas.

| Número de “Spot” | Nombre de la proteína |
|------------------|---|
| 1, 13, 14, 18 | Homólogo del precursor de la prolactina |
| 2, 7, 15, 22 | Precursor de la lipocalina salivar |
| 3, 11 | α -amilasa I. |
| 4, 8, 9, 23 | Anhidrasa carbónica. |
| 5, 21 | Inhibidor de la proteasa de la glándula submandibular |
| 6 | Precursor de la lipocalina I. |
| 12 | Albúmina sérica |
| 16 | Cistatina B |
| 19, 20 | Lipocalina |

Algunos “spots” pudieron ser identificados directamente mediante huella peptídica (PMF) o espectro de fragmentación (MSMS), aportando información relativa a

las principales características moleculares de la proteína tales como el peso molecular (Pm) y el punto isoeléctrico (pI) (Tabla 25).

Tabla 25. Principales características obtenidas tras el análisis de “spots” por PMF y MS/MS.

| Spot N° Nombre de la proteína | Método de identificación | *Score molecular | **Score peptídico | Pm Péptidos | Pm (Da) | pI |
|------------------------------------|--------------------------|------------------|-----------------------------|--|---------|------|
| 1 Prolactina | MS/MS | | 76 | 1449.5701 | 17145 | 5.84 |
| 2 Lipocalina | PMF, MS/MS | 92 | 52 43 32 21 69 | 812.4637 899.5379 1194.5347 1307.6505 1634.8044 | 21859 | 5.19 |
| 6 Lipocalina | MS/MS | | 100 129 52 57 | 1645.7933 1956.9807 2126.028 2323.1626 | 19511 | 5 |
| 7 Lipocalina | PMF, MS/MS | 94 | 88 42 84 144 48 | 1291.5417 1307.5452 1497.703 1634.6926 1899.4348 | 21859 | 5.19 |
| 11 Albúmina | PMF, MS/MS | 56 | 6134 58 53 | 1344.6898 1478.7881 1622.9356 | 71643 | 6.08 |
| 12 α-amilasa | PMF, MS/MS | 92 | 89 19 7 | 1426.6953 1553.6358 1680.8447 | 57791 | 6.51 |
| 13 y 14 Prolactina | PMF | 79 | | | 17145 | 5.84 |
| 15 Lipocalina salivar | PMF | 139 | | | 19916.4 | 5.07 |
| 21 Inhib. proteasa gl. Subm. | PMF | 96 | | | 12787.6 | 8.61 |
| 23 Anhidrasa carbónica | PMF | 77 | | | 35554.9 | 6.32 |

*Emparejamiento entre los datos obtenidos para el conjunto de los péptidos de la proteína estudiada y los de la proteína a la que se asemeja según las bases de datos consultadas.

** Emparejamiento entre los datos obtenidos para cada uno de los péptidos de la proteína estudiada individualmente y los de la proteína a la que se asemeja según las bases de datos consultadas.

En cambio hubieron ciertos “spots” que requirieron de la realización de secuenciación *de novo* para identificar la secuencia amino acídica, debido a que la huella

peptídica y el espectro de fragmentación obtenido no aportaron suficiente información para obtener una buena identificación proteica (tabla 26).

Tabla 26. Características de las identificaciones realizadas mediante secuenciación *de novo*.

| Spot | Secuencia obtenida y emparejada | *Score aminoacídico |
|-----------------------------------|--|---------------------|
| 1 Prolactina | YTSC[I L]CDDYPR | 69 |
| 3 α -amilasa | ALVFVDNHDNQR | 59 |
| 4 Anhidrasa carbónica | TEVHVVHYS TYS DGE[I L]DEAH [K Q]YNPA[I L]R | 48 49 35 |
| 5 Inhibidor proteasa gl. Subm. | TYSSECLFCFLSQE [I L]HDM[K Q]S | 55 20 |
| 8 Anhidrasa carbónica | YSDWLDEAHW NTYYSDFIS LHFYLDNIDNNLEYLR | 34 37 71 |
| 9 Anhidrasa carbónica | WLDEAHWSR | 34 |
| 16 Cistatina B | VQVDDDDFVHLR VFESLPHENKPLTLSSYQTNK | 93 139 |
| 18 Prolactina | [K Q]AV[I L]TA[K Q] YTSCLCDDYPR | 20 59 |
| 19 Lipocalina | TNQPFTAYDGKR LVGRDPENNPEALEEFK DPENNPEALEEFKEVAR | 84 14 84 |
| 20 Lipocalina | TNQPFTFTAYDGKR | 71 |
| 22 Lipocalina salivar | TF[K Q]LMEFYGR VGDRVYTVAYYGENKFR | 54 85 |
| 23 Anhidrasa carbónica | VRVHVVHYN WLDEAHWSR | 43 34 |

*Emparejamiento entre los fragmentos de la secuencia aminoacídica de la proteína estudiada y los de la proteína a la que se asemeja según las bases de datos consultadas.

SECCIÓN 4. DISCUSIÓN.

En esta sección se ha desarrollado un estudio proteómico en saliva de cerdos con el fin de construir un mapa bidimensional de referencia de las proteínas salivares porcinas. Además se han comparado los perfiles salivares obtenidos para animales sanos y enfermos con el fin de valorar posibles diferencias que servirán como base para la identificación de nuevos biomarcadores de enfermedad.

Para la realización de la detección de proteínas en saliva se empleó el inmunoblotting y la espectrofotometría de masas. Estas metodologías son complementarias puesto que

identifican las proteínas en base a dos características diferentes, la inmunoreactividad y el patrón de división peptídico respectivamente (Miller et al, 2008). Mediante estas técnicas se identificaron trece identidades proteicas diferentes. Cuatro identidades fueron obtenidas mediante inmunoblot, desde muestras de saliva previamente separadas por electroforesis SDS-PAGE, y utilizando los anticuerpos comerciales específicos de los que se disponía. Las otras nueve identidades fueron identificadas mediante espectrofotometría de masas a partir de veintitrés “spot” recortadas de dos geles bidimensionales teñidos con solución de plata.

La mayoría de las proteínas identificadas en este estudio proteómico forman parte de la primera línea de defensa frente a procesos inflamatorios como son las inmunoglobulinas, la anhidrasa carbónica (Kivëla et al, 1999 y Vitorino et al, 2004), cistatina B (Giusti et al, 2007) o la α -amilasa. Otras identificaciones proteicas poseen diferentes funciones, así la prolactina es utilizada como marcador de estrés (Ghafouri et al, 2003) y la lipocalina presenta una función antioxidante (Giusti et al, 2007). Además se ha identificado por primera vez el inhibidor de la proteasa de la glándula submandibular mediante proteómica y presenta una doble función, según la base de datos consultada (UniProtKB/Swiss-Prot), inhibir la tripsina y la enzima elastasa. Estos resultados son similares a los obtenidos en estudios salivares en medicina humana, donde las proteínas salivares identificadas presentaron un papel importante como mediadores de procesos inflamatorios (Ghafouri et al, 2003, Vitorino et al, 2004 y Giusti et al, 2007).

Aunque las concentraciones de proteínas de fase aguda resultaron ser mayores en el grupo de animales con procesos inflamatorios-infecciosos que en el de animales sanos, no fueron lo suficientemente altas como para poder ser detectadas mediante los protocolos proteómicos utilizados. En estudios previos realizados en leche bovina, tampoco pudieron detectar las PFA mediante proteómica (Hogarth et al, 2004) y además se ha descrito la necesidad de eliminar las amilasas, albúminas e inmunoglobulinas de la saliva para poder detectar proteínas presentes en bajas concentraciones (Hu et al, 2005), como es el caso de las PFA. Por ello en futuros estudios será necesario utilizar técnicas específicas de precipitación para eliminar las proteínas abundantes en la saliva y así poder detectar las PFA.

En resumen, el estudio proteómico de la saliva porcina ha permitido identificar

trece proteínas que podrían servir en el futuro como biomarcadores de estado sanitario en el ganado porcino. Sin embargo, se necesitará un mayor esfuerzo para clarificar el significado funcional de todas las proteínas identificadas y examinar los cambios proteicos asociados con estados de enfermedad concretos.

Conclusiones.

1. El ensayo desarrollado en esta Tesis para la cuantificación de haptoglobina porcina, mediante el uso de la fluorometría a tiempo resuelto y anticuerpos monoclonales específicos, es más simple y rápido que los ensayos existentes hasta ahora, y permite la determinación de los niveles de Hp en muestras de saliva y jugo cárnico. Además posee una alta sensibilidad y especificidad, y una adecuada precisión y exactitud, según los resultados de validación analítica obtenidos. Este ensayo, que se realiza en un solo paso, podría ser utilizado de forma rutinaria por los inspectores veterinarios, en el sistema de control sanitario porcino.
2. La adaptación de un fluoroinmunoensayo a tiempo resuelto, previamente validado en sangre entera, para cuantificar la proteína C reactiva, permitió la determinación de dicha proteína en muestras de saliva y jugo cárnico y mostró una adecuada precisión y exactitud, con un límite de detección muy bajo. Sin embargo, deberían realizarse estudios adicionales, utilizando anticuerpos monoclonales específicos, para tratar de producir un ensayo más rápido y sencillo de utilizar que facilite su inclusión en los sistemas veterinarios de control sanitario.
3. Los resultados obtenidos al cuantificar las concentraciones de haptoglobina y proteína C reactiva en cerdos sanos y cerdos con el síndrome respiratorio y reproductivo porcino, mostraron que la saliva y el jugo cárnico podrían ser utilizados como muestras alternativas al suero sanguíneo para la determinación de dichas proteínas de fase aguda. La posibilidad de utilizar estos fluidos biológicos alternativos presentan como ventaja el empleo de técnicas de muestreo más rápidas y económicas, y una mayor facilidad de manejo. Además ambas muestras pueden recogerse en condiciones de campo por personal con entrenamiento mínimo.
4. Los estudios proteómicos realizados en saliva porcina identificaron varias proteínas, como la anhidrasa carbónica, la cistatina B, la α -amilasa o la prolactina, que podrían ser utilizadas como biomarcadores salivares en el futuro. Sin embargo, los protocolos proteómicos utilizados no permitieron detectar PFA en muestras de saliva, por lo que sería necesario, en estudios futuros, eliminar las proteínas más abundantes, como las inmunoglobulinas y la α -amilasa, para tratar de detectar las proteínas de fase aguda en saliva.

Resumen.

En el presente trabajo se realizaron cuatro experiencias con el fin desarrollar métodos simples y sensibles para la determinación de las proteínas de fase aguda saliva y jugo cárnico de cerdo, y contribuir a un mayor conocimiento sus posibles usos y aplicaciones.

En la primera experiencia se desarrolló y optimizó un inmunoensayo para la determinación de la haptoglobina porcina en muestras de saliva y jugo cárnico basado en la fluorimetría a tiempo resuelto. Para este ensayo se produjo un anticuerpo monoclonal específico utilizando protocolos estándar de fusión celular y de cultivo in vitro de hibridomas. Finalmente, se consiguió un método rápido, sencillo y fácil de realizar que permitió obtener resultados en 20 minutos. El ensayo fue validado analítica y clínicamente, obteniendo resultados satisfactorios y permitiendo la diferenciación entre animales sanos y enfermos mediante la cuantificación de los niveles de haptoglobina en la saliva y el jugo cárnico.

En la segunda experiencia se adaptó un inmunoensayo, previamente desarrollado para la determinación de la proteína C reactiva en muestras de sangre entera porcina, para la cuantificación de los niveles de dicha proteína en muestras de saliva y jugo cárnico. Se utilizaron anticuerpos policlonales y la inmunofluorimetría a tiempo resuelto y se obtuvo un ensayo con una buena precisión y exactitud y un límite de detección lo suficientemente bajo como para permitir el uso de muestras de saliva y jugo cárnico sin interferencias. Además la determinación de la CRP en saliva y jugo cárnico permitió diferenciar entre animales sanos y animales enfermos.

La tercera experiencia se centró en estudiar la utilidad práctica de los fluoroinmunoensayos desarrollados para evaluar la respuesta de fase aguda en enfermedades producidas en condiciones de campo. Además se valoró si la saliva y el jugo cárnico podrían utilizarse como muestras alternativas al suero sanguíneo para la determinación de Hp y CRP porcina. Para realizar esta experiencia, se utilizó un total de cien animales, sesenta animales con síndrome respiratorio y reproductivo porcino y cuarenta animales sanos procedentes de una granja libre de patógenos específicos. Los resultados obtenidos al cuantificar las concentraciones de haptoglobina y proteína C reactiva en ambos grupos de animales, mostraron que la saliva y el jugo cárnico podrían ser utilizados como muestras alternativas al suero sanguíneo para la monitorización del

estado sanitario de los animales mediante la determinación de dichas proteínas de fase aguda.

Finalmente, la cuarta experiencia consistió en un estudio proteómico en muestras de saliva porcina. Se utilizaron técnicas electroforéticas de alta resolución para realizar la separación de las proteínas salivares en una y dos dimensiones y permitir la identificación de dichas proteínas mediante inmunoblot y espectrofotometría de masas. Se obtuvo un mapa proteico salivar para animales sanos y otro para animales enfermos y se identificaron varias proteínas salivares que podrían utilizarse en un futuro como biomarcadores de enfermedad.

Assays for Haptoglobin and C-reactive protein measurements in porcine saliva and meat juice samples and preliminary studies



UNIVERSITY OF MURCIA

VETERINARY SCHOOL

DEPARTMENT OF ANIMAL MEDICINE AND SURGERY

about proteomics in PhD Thesis of Summary

INDEX

| | |
|---|------------|
| ○ Introduction..... | 163 |
| ○ Chapter 1: Development of a TR-IFMA for Haptoglobin quantifications in saliva and meat juice of pigs | 165 |
| 1.2. Introduction | 165 |
| 1.3. Material and methods | 166 |
| 1.1. Production, purification and characterization of a monoclonal antibody against porcine Hp..... | 166 |
| 1.2. Immunoassay procedure optimization..... | 167 |
| 1.3. Animals and sample collection..... | 168 |
| 1.4. Assessment of assay performance | 168 |
| 1.5. Statistical analysis..... | 169 |
| 1.4. Results and discussion | 169 |
| 1.1. Monoclonal antibody production, purification and characterization.... | 169 |
| 1.2. Immunoassay optimization..... | 170 |
| 1.3. Analytical validation of the immunoassay developed and Hp stability in saliva and meat juice samples stored at -20°C..... | 172 |
| ○ Chapter 2: Development of a TR-IFMA for C-reactive protein measurements in saliva and meat juice of pigs | 176 |
| 2.1. Introduction | 176 |
| 2.2. Material and methods | 176 |
| 2.2.1. Immunoassay procedure optimization | 176 |
| 2.2.2. Animals and samples collection | 177 |
| 2.2.3. Assessment of assay performance | 178 |
| 2.2.4. Statistical analysis..... | 179 |
| 2.3. Results and discussion | 179 |
| 2.3.1. Immunoassay procedure optimization..... | 179 |
| 2.3.2. Analytical validation of the immunoassay developed and CRP stability in saliva and meat juice samples stored at -20°C..... | 179 |

- **Chapter 3: Application of the TR-IFMAS developed in field conditions 183**
 - 3.1. Introduction..... 183
 - 3.2. Material and methods..... 183
 - 3.2.1. Animals and samples collection..... 183
 - 3.2.2. Serology and APP determinations..... 184
 - 3.3. Results and discussion 184

- **Chapter 4: First identifications of porcine whole saliva proteins using proteomics 189**
 - 4.1. Introduction..... 189
 - 4.2. Material and methods..... 189
 - 4.2.1. Sample collection and characterization..... 190
 - 4.2.2. 2-DE 190
 - 4.2.3. Saliva protein identifications..... 191
 - 4.3. Results and discussion 191

- **Conclusions 195**
- **Annex..... 196**

INTRODUCTION

Animal health and welfare are now accepted as an integral part of the “farm to fork” policies worldwide, and are considered as a strategic priority related to the development of more sustainable food production policies. Likewise the establishment of high sanitary standards and the reduction of the suffering in animals during all the pig production chain, including housing, production, transport, processing and related operations, are major issues nowadays for regulators, consumers and producers (Sánchez-Cordón et al, 2007). Therefore, objective markers useful to monitor animal health and welfare seem to be essential. In this context the development of new biomarkers that could improve the detection of clinical and sub-clinical diseases as well as the identification of stressed animals, such as acute phase proteins (APP), is being of great value during the last years (Eckersall et al, 2000).

Acute phase proteins (APP) are serum proteins whose concentrations change after tissue injury, infection or trauma (Kushner et al, 1993). APP have several potential applications in animal production, being of use for the identification of clinical or subclinical disease, monitoring therapy and, overall, the assessment of animal health status (Millet et al, 2005 and Heo et al, 2005). Because individual APP can vary in their response to inflammation and tissue damage, measurement of different APP in combination is recommended. The combination of a fast APP, such as C-reactive protein (CRP) and a slow one, such as haptoglobin (Hp) can be of use to differentiate between pathologic states and to provide information about temporal evolution of the disease (Eckersall et al, 2000). APP analysis in pig production has become an area of increasing interest to evaluate the level of immunological stress related to sub-clinical infection and to assess herd health status and welfare (Millet et al, 2005 and Heo et al, 2005) and had received a significant economic support for the European Commission in the recent years (Concerted action number QLK5-CT-1999-0153).

Serum is the most common specimen used for monitoring health status, however non-invasive sampling methods, such as the collection of saliva, are in increasing demand given enhanced awareness of animal welfare (Guzik et al, 2006). The use of saliva as an analytical tool might be intriguing for practical purposes due to the simple and minimally stressful sampling methodology required. In addition, other alternative fluids such as meat juice have been investigated in pigs to avoid the difficulties in collecting serum at the time of post-mortem inspection, because of the high speed of the

slaughter line and the brief time available to obtain the blood sample before clotting (Nielsen et al, 1998). The use of meat juice samples at slaughterhouse allows sampling a high number of animals without slowing down the slaughter line.

Commercially available kits for APP determinations in pigs can not detect the low levels of APP that are present in saliva (Llamas et al, 2003). Moreover commercial APP kits failed to quantify Hp and CRP concentrations in meat juice due to the sample colour interferences according to previous preliminary studies performed in our laboratory. This drawback could be solved by using highly sensitive detection techniques such as time-resolved immunofluorometry. The use of time-resolved immunofluorometric technologies allows obtaining non-competitive immunoassays with superior detection limit and high sensitivity without sample interferences (Lövgren et al, 1996). These technical advantages lead us to postulate that this technology could be applied for APP measurements in biological specimens with low protein concentrations such as saliva and meat juice.

We also aimed to make a preliminary study of proteomic in whole saliva, by using two-dimensional electrophoresis (2-DE) following by Mass spectrometry (MS) and immunoblotting, in order to evaluate if some other proteins of diagnostic value could be identified as reported in human medicine (Vitorino et al, 2004).

Thus the objectives of the present study were:

1. To develop and validate a time resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for Hp quantification in saliva and meat juice of pigs, including the study of the stability of Hp in those body fluids. A monoclonal antibody against porcine Hp was produced for this purpose allowing the development of a fast one-step assay that give results of a 95 wells plate in only 20 minutes.
2. To develop and validate a TR-IFMA for CRP quantification in saliva and meat juice of pigs, including the study of the stability of CRP in those body fluids.
3. To perform a clinical evaluation of the two TR-IFMAs developed in field conditions. For this purpose Hp and CRP were quantified in serum, saliva and meat juice of animals with PRRS at different ages and the results were compared in order to assess the usefulness of APP determinations in saliva and meat juice as an alternative to serum.

4. To perform a preliminary evaluation of whole saliva by proteomics for possible identifications of new biomarkers of disease in pigs.

CHAPTER 1: DEVELOPMENT OF A TR-IFMA FOR HAPTOGLOBIN QUANTIFICATIONS IN SALIVA AND MEAT JUICE OF PIGS.

Additional information about this chapter can be found in paper 1 (Annex).

1.1. Introduction.

Haptoglobin (Hp) is a major acute phase protein in pigs. An increase in serum Hp concentrations has been reported in swine in the course of the Classical and African swine fever (Sánchez-Cordón et al, 2007), porcine reproductive and respiratory syndrome (Díaz et al, 2005) and post-weaning multisystemic wasting syndrome (Segalés et al, 2004), as well as during bacterial infections such as those produced by *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* (Francisco et al, 1996), *Streptococcus suis* (Knura-Deszczka et al, 2002) or *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Lauritzen et al, 2003). Moreover Hp determinations in serum samples have been used as an indicator of the extent and severity of lung lesions in finishing pigs at slaughterhouse (Pallarés et al, 2008).

Implementation of Hp assays in the food chain inspection to improve food safety monitoring, depends on the feasibility under regular inspection conditions. If rapid robust and easy methodology was developed, Hp could be determined in real-time at the point of investigation.

The only method reported until now for Hp measurements in saliva and meat juice in pigs includes an overnight incubation (Hiss et al, 2003), which could limit its practical routine use. By using the sensitive time-resolved immunofluorometric technologies in combination of monoclonal antibodies, assay steps can be reduced with minimal detector noise allowing Hp measurements in biological specimens with low protein concentrations such as saliva or meat juice in a brief period of time.

The objective of this chapter was to develop and validate a one-step TR-IFMA for Hp quantifications in saliva and meat juice samples by using a specific monoclonal antibody (mAb) against Hp produced in our laboratory.

1.2. Materials and methods.

1.2.1. Production, purification and characterization of a monoclonal antibody against porcine Hp.

Monoclonal antibodies (mAbs) were produced at our laboratory in accordance with the European Centre for the Validation of Alternative Methods recommendations (ECVAM Workshop 23, 1997) and Canadian Council on Animal Care guidelines (CCAC guidelines, 2002) using general protocols (Wang et al, 2007, Berhane et al, 2006 and Ahn et al, 2003). In brief myeloma and splenic cells from Balb/c mice were fused according to Kohler and Milstein (1975) procedures and specific hybridomas secreting anti-Hp porcine antibodies were selected and growing by using the selective culture medium HAT (hypoxanthin aminopterin thymidine). From four specific hybridomas, the one named 4E₄A₆C₂, according to its position in culture plates, was chosen to be purified by affinity chromatography since possessed the highest absorbance when an ELISA screening was carried out. The anti-Hp antibodies were partially purified using precipitation with 60% of ammonium sulphate (Ito, 2000) and were finally purified using haptoglobin-affinity column chromatography. The affinity column was prepared by using CNBr-activated Sepharose-4B (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) according to the manufacturer's procedures and the antibody bound material was eluted with PBS pH 11 as previously described (Yueh et al, 2007).

The purity of the mAb obtained was assessed by SDS-PAGE performed according to Tseng (2004) using a 12% resolving gel of acrylamide.

The specificity of the mAb was evaluated by Western Blot. Following electrophoresis, separated porcine serum proteins were electro-blotted onto PVDF membranes (Hybond-P, Amersham, UK) by using a Semi-Dry trans-blot (Bio-Rad, Hercules, CA). The membranes were then blocked with 5% skimmed milk and incubated overnight with the mAb produced. After this incubation the membrane was washed and incubated with a secondary antibody conjugated to peroxidase (polyclonal goat anti-mouse IgG, Promega, Corporation, Madison, USA) which would join to the Hp-mAb complexes. After three washes a peroxidase substrate (ECL plus Western Blotting

detection reagents, Amersham, UK) was added and the chemiluminescence signal was detected using an autoradiography film (Hyperfilm ECL, Amersham, UK) and an exposure of 15 seconds.

1.2.2. Immunoassay procedure optimization.

The immunoassay developed is integrated by the monoclonal antibody (mAb) against porcine Hp produced in our laboratory labeled with Eu-chelate of N^1 -(p-isothiocyanatobenzyl)-Diethylenetriamine- N,N,N,N-tetraacetic acid (DTTA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Zaventem, Belgium) as detection antibody, and an affinity purified rabbit polyclonal anti-Pig haptoglobin (Immunology Consultants Laboratory, Inc. Newberg, USA) labeled with Sulfo-NHS-Biotin (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) as capture antibody. This assay was optimized for:

a) Concentration of biotinylated antibodies (AC-bio). A range of 50 a 200 ng/well of AC-bio concentrations were tested. The concentration with higher levels of fluorescent signal and lower background was selected for the immunoassay procedure.

b) Concentration of antibodies labeled with europium (AC-Eu). AC-Eu concentrations from 20 to 300ng/well were tested. As it was done for the AC-bio, the concentration with higher levels of fluorescent signal and lower background was selected for the immunoassay procedure.

c) Calibration curve. The calibration curve was selected in order to produce a wide range of detection avoiding hook effect by using a serum sample with known Hp levels.

d) Number of steps of the immunoassay. In order to reduce labour and reagent volume consumed, different combinations of integrated steps were tested. The simplest and fastest combination that produced fluorescence levels into the calibration curve with a lower background was selected.

e) Incubations time. To perform a rapid immunoassay some incubation times were tested: 45, 30 and 15 minutes. The shorter incubation time that produced high levels of fluorescence and minimal background was selected.

f) Saliva and meat juice sample dilution. 1:200, 1:500, 1:1000 and 1:200 dilutions were tested for meat juice samples and 1:2, 1:5, 1:10 and 1:20 dilutions were used for saliva samples optimization. To reduce sample volume the larger dilution with lineal behaviour and fluorescence levels in the range of the calibration curve was selected.

1.2.3. Animals and sample collection.

To perform the analytical and clinical validation of the assay, saliva and meat juice samples were obtained at slaughter from 2 groups of animals:

- **Group 1:** 20 pigs without adverse signs of disease after a clinical examination in herd and serologically negative for PRRS, Aujeszky's disease, porcine circovirus type 2. They did not show any lesion at necropsy.
- **Group 2:** 30 pigs that presented clinical disorders such as diarrhoea, post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), multiple abscesses, earache and external injuries in ears, tails and legs.

Saliva was collected using Salivette tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing a sponge. Pigs were allowed to chew on the sponge, which was clipped to a flexible thin metal rod, until the sponge was thoroughly moistened. Saliva was obtained after centrifugation for 10 min at 3000 x g and stored at -20°C until analysis.

Diaphragm muscle was collected in order to obtain meat juice samples. Muscle samples were placed in meat extract collectors specifically designed (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and frozen at -20°C overnight. Then they were thawed at room temperature. Released fluid was collected after centrifugation from the bottom of the tubes and stored at -20°C until analysis.

1.2.4. Assessment of assay performance.

The TR-IFMA performance was evaluated by:

- **Intra and inter-assay precision.** Three pools of saliva and meat juice, with high, medium and low levels of Hp respectively, were used. Each pool was prepared by mixing samples from 6 animals with similar Hp concentrations. The precision was calculated as the coefficient of variation (CV %).
- **Accuracy:** the accuracy was indirectly investigated by linearity under dilution of two porcine saliva and meat juice samples with high Hp concentrations.
- **The limit of detection:** the lowest concentration of Hp which could be distinguished from a zero sample (Eckersall et al, 1999) was calculated by assessment of the average of

Hp concentrations of repeated analysis ($n = 6$) of the zero calibrator plus two standard deviations.

- **Correlation study:** 30 samples of serum, saliva and meat juice were used to determine the correlation coefficients between Hp concentrations in these 3 specimens.

In addition the stability of Hp was studied in saliva and meat juice during the storage at -20°C . Six pools of saliva and meat juice (2 pools of high, 2 of medium and 2 of low levels of Hp) were prepared and aliquots were stored at -20°C until analysis.

1.2.5. Statistical analysis.

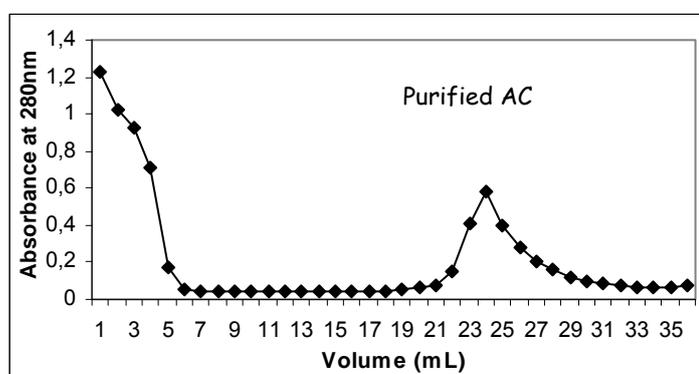
Mann-Whitney non-parametric test of significance (significance level was settled at $p < 0.05$) was used to compare values of Hp in healthy and diseased pigs by using the GraphPad Prism 5 Demo (GraphPad software Inc.). Correlations were determined using a nonparametric Spearman rank correlation analysis by using a statistical programme (SPSS statistical programme 14th edition. SPSS Inc. Chicago, Ill., USA). Intra and inter-assay CVs and detection limits were carried out by standard descriptive statistical methods by using Microsoft Excel 2000 (Microsoft Corporation. USA).

1.3. Results and discussion.

1.3.1. Monoclonal antibody production, purification and characterization.

Figure 92 shows a typical chromatography profile for the purification of the mAbs against porcine Hp on the affinity column by using PBS pH 11 as elution buffer.

Figure 92. Typical purification profile of monoclonal antibody using an affinity-column.



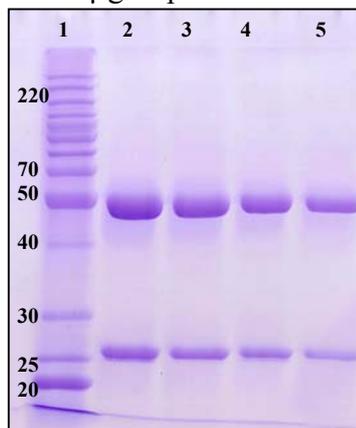
SDS-

PAGE,

used to check the purity of the monoclonal antibody, showed 2 bands of 50kDa and

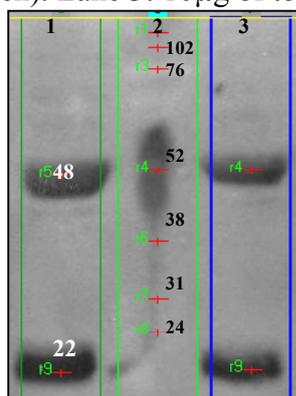
25kDa corresponding to the heavy and light chain of immunoglobulins respectively (Lane, 1988) as it is presented in figure 93.

Figure 93. Purity of the monoclonal antibody using 12% SDS-PAGE. Lane 1: molecular markers (kDa) (10–220 kDa unstained protein standard, Bench Mark™ Ladder, Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Lanes 2-3: 6 µg of purified MAbs. Lane 4-5: 4µg of purified MAbs.



In addition Western blot analysis provided a strong positive signal with a molecular weight of 48kDa, which corresponds to the β chain, and 22kDa which correspond to 2α chains of the porcine haptoglobin molecule (Yang et al 1999). The results of the Western Blot proved the good affinity of the monoclonal antibody produced. The detection image is showed in figure 94.

Figure 94. Immunoblot of the anti-porcine Hp 4E₄A₆C₂ mAb in swine serum. Lane 1: 20µg of total serum protein. Line 2: apparent molecular weight of the standard (12-125 kDa Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, Sweden). Lane 3: 10µg of total serum protein.



1.3.2. Immunoassay optimization.

Following extensive optimization studies, the immunoassay procedure was reduced in time, number of steps and reagents. Figure 95 shows the results for the optimization of biotilylated antibody concentration; 50ng/well was the optimal

concentration for AC-bio since with a concentration of 200ng/well a hook effect was observed and with 100ng/well the obtained europium counts were higher than the upper detection limit of the fluorometer (1000000 europium counts). For AC-Eu concentrations optimization the concentration of 20ng/well was the only one which gave fluorescent levels into the fluorometer counts range (Fig. 96).

Figure 95. Europium counts for 50, 100 and 200ng/well of AC-Bio using 20ng/well of AC-Eu.

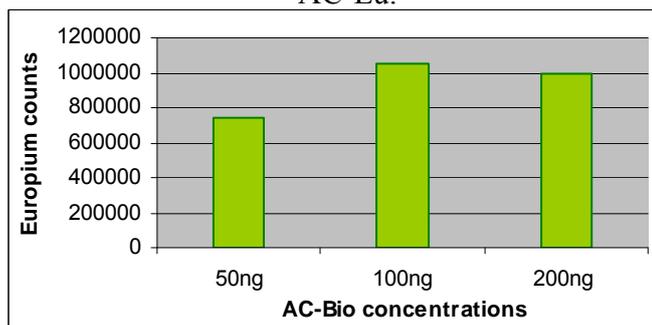
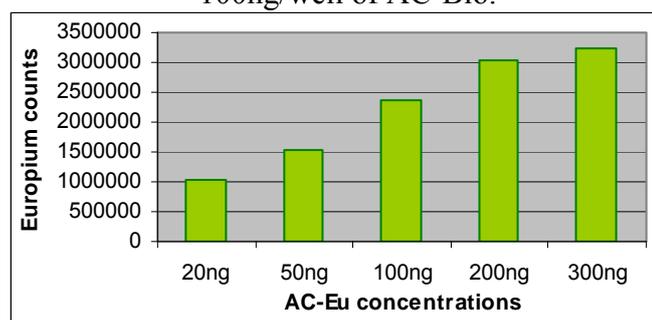
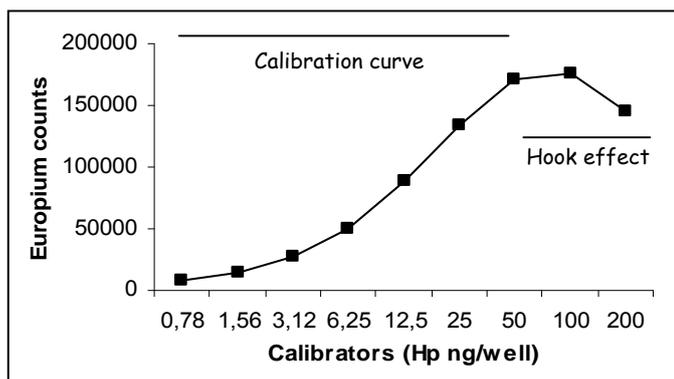


Figure 96. Europium counts for 20, 50, 100, 200 and 300ng/well of AC-Eu using 100ng/well of AC-Bio.



The calibration curve consisted on seven standards with Hp concentrations of 50, 25, 12.5, 6.25, 3.15, 1.56 and 0.78ng/well which represents a wide dynamic range in which the high-dose hook effect did not interfere with the upper working range of the assay (Fig. 97).

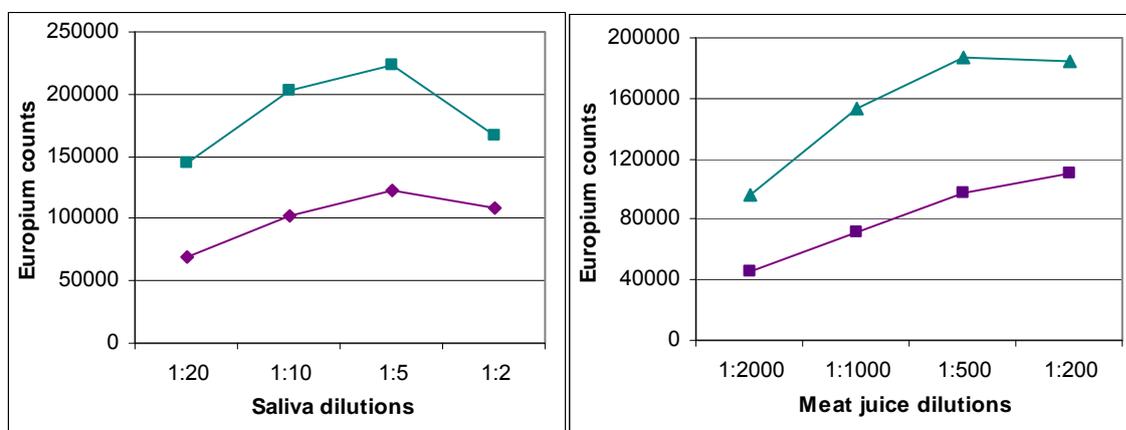
Figure 97. Calibration curve avoiding the effect of high Hp concentrations (hook effect) in the step developed. optimized one-immunoassay



Due to the high specificity of the mAb produced and the high fluorescent properties of the europium used as label, the immunoassay could be reduced to one-step format with only 15 minutes of incubation without increasing the background.

The dilution selected for saliva samples were 1:10 and for meat juice 1:1000 (Fig. 98). Higher dilutions produced small europium counts and lower dilutions caused hook effect in both types of samples.

Figure 98. Optimization of saliva (left) and meat juice (right) sample dilution for Hp determination.



In brief the optimized protocol consists on the use of coated streptavidin microtitration wells with 75µl of biotinylated antibody (50ng/well), addition of 50µl of samples or standards and 75µl of the Eu-labelled antibody (20ng/well), an incubation of 15 min at room temperature with continuous shaking, a four times washing the plates and a 5 min incubation with 200µl of enhancement solution (Perkin-Elmer Life Sciences, Zaventem, Belgium). The fluorescent signals are measured with a Victor 1420 multilabel counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Belgium).

1.3.3. Analytical validation of the immunoassay developed and Hp stability in saliva and meat juice samples stored at -20°C.

The limit of detection (LOD) for our immunoassay was 0.00052µg/ml, which is much lower than the detection limit of the commercial spectrophotometric assay commonly used for porcine Hp measurements in serum (0.05mg/ml) (Tecles et al, 2007) and allowed Hp determinations in saliva and meat juice.

The results of precision appear in table 27. CVs of 1.69% and 11.07% were obtained for the study of the intra-assay and inter-assay precision in saliva samples. In meat juice the CVs were between 1.58-3.16% for intra-assay and 8.72-13.57 for inter-assay studies. Those CVs show a good precision since all were <14% and such intra-assay variation made assays of duplicate samples unnecessary, saving both time and sample volume.

Table 27. Precisions of the TR-IFMA developed for saliva and meat juice samples.

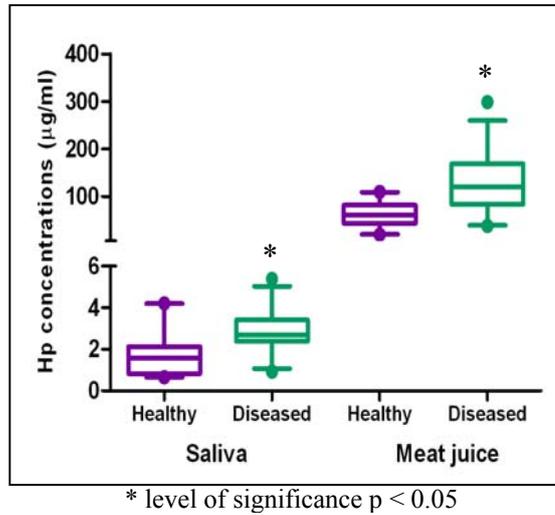
| | <i>Saliva ($\mu\text{g/ml}$)</i> | | | |
|------------------------------|---|--------------------|------------------|--------------------|
| | High | Medium | Low | Total |
| | Intra-assay | | | |
| X \pm SD | 4.27 \pm 0.06 | 2.51 \pm 0.02 | 0.56 \pm 0.01 | 2.45 \pm 0.03 |
| CV | 1.61 | 1.13 | 2.34 | 1.69 |
| | Inter-assay | | | |
| X \pm SD | 4.42 \pm 0.43 | 2.50 \pm 0.24 | 0.53 \pm 0.07 | 2.48 \pm 0.25 |
| CV | 9.84 | 9.76 | 13.63 | 11.07 |
| | <i>Meat juice ($\mu\text{g/ml}$)</i> | | | |
| | High | Medium | Low | Total |
| | Intra-assay | | | |
| X \pm SD | 212.17 \pm 5.58 | 172.01 \pm 2.73 | 21.39 \pm 0.67 | 135.19 \pm 2.99 |
| CV | 2.63 | 1.58 | 3.16 | 2.46 |
| | Inter-assay | | | |
| X \pm SD | 211.10 \pm 18.42 | 157.76 \pm 15.26 | 16.81 \pm 2.28 | 128.56 \pm 11.99 |
| CV | 8.72 | 9.67 | 13.57 | 10.65 |

The CVs of the present assay were lower than those obtained when an enzyme-linked immunoassay was used to measure Hp porcine concentrations in meat juice and saliva (Hiss et al, 2003). Accuracy was evaluated by the comparison of expected and measured Hp levels of serially diluted samples of saliva and meat juice and showed high correlation coefficients of 0.99 for saliva and meat juice.

In the correlation study, when the Hp concentrations in the saliva, meat juice and serum of 30 pigs were compared, a significant positive correlation was identified with a coefficient of correlation of $r = 0.786$ ($p < 0.001$) for saliva-serum and $r = 0.924$ ($p < 0.001$) for meat juice-serum comparison. Serum Hp concentrations were 1100 higher than those obtained in saliva, as indicated by the regression equation $y = 0.0009x + 1.568$ and 1.6 higher than meat juice Hp concentrations as indicated by the regression equation $y = 0.0534x + 20.31$. Both specimens evaluated, saliva and meat juice, showed significant higher Hp values in the group of diseased animals compared with the healthy group (Fig.

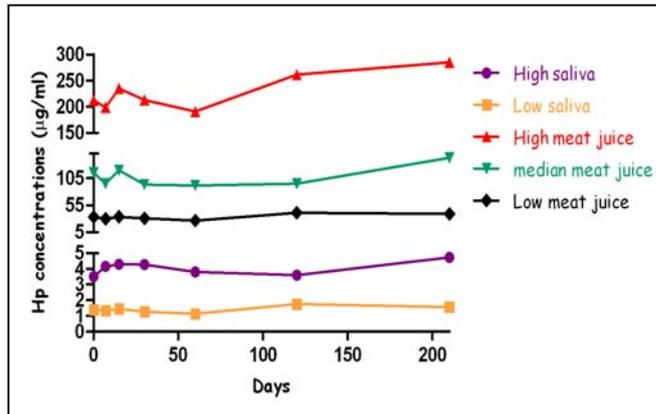
99).

Figure 99. Haptoglobin levels ($\mu\text{g/ml}$) in saliva and meat juice from control ($n = 20$) and diseased pigs ($n = 30$) by one-step TR-IFMA. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).



Stability studies showed that Hp determinations could be performed in saliva and meat juice samples stored at -20°C until 210 days after collection without compromising the validity of results (Fig. 100) since no significant statistical differences were found in Hp concentrations in saliva and meat juice during this storage period at -20°C .

Figure 100. Hp stability in saliva and meat juice in 6 pools during a 210 days period by use of the TR-IFMA developed.



In conclusion, the high sensitivity obtained in our assay allowed Hp determination in biological fluids with low protein concentrations such as saliva and meat juice without any interference. The results indicate that saliva and meat juice could be used as alternative samples to serum for Hp determinations in pigs. Moreover both samples could be stored at -20°C until 210 days after collection without compromising the validity of results. In addition, due to the high specificity of the monoclonal antibody used, the assay provides a rapid and simple method that can distinguish between healthy and diseased

pigs and reduce reagent, sample volume and labour cost, so it could be easily used in Hp measurements for the assessment of health and hygiene status of pigs at farm, and in meat inspection procedures at slaughter.

CHAPTER 2: DEVELOPMENT OF A TR-IFMA FOR C-REACTIVE PROTEIN MEASUREMENTS IN SALIVA AND MEAT JUICE OF PIGS.

Additional information of this chapter can be found in papers 2 and 3 (Annex).

2.1. Introduction.

C-reactive protein (CRP) is an acute phase protein and a mediator of innate and adaptative immunity (Chomdej et al., 2004). In pigs, serum CRP showed increases of up to 38-fold reported during acute inflammation (Parra et al., 2006) and have been used as an inflammatory biomarker in experimental infections such as those with *Streptococcus Suis* (Sorensen et al., 2006), *Escherichia coli* (Carroll et al., 2004) or *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Heegaard et al, 1998) and in naturally occurred diseases such as metritis-mastitis-agalaxia syndrome affected sows (Kostro et al, 2003), in porcine respiratory and reproductive syndrome, post-weaning multisystemic wasting syndrome, porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* infection (Parra et al., 2006).

To our knowledge, there are no reported methods to determine CRP in saliva and meat juice. Moreover it was found that commercial assays available for porcine CRP measurements do not allow the quantifications of CRP levels in other biological fluids alternative to serum (Llamas et al, 2003). The objectives of this study were to investigate if CRP could be quantified in pig saliva and meat juice using an adapted TR-IFMA, and whether the assay could be used to distinguish healthy from diseased animals.

2.2. Materials and methods.

2.2.1. Immunoassay procedure optimization.

The immunoassay used a polyclonal anti-CRP antibody developed in goat provided by Dr. P.D.Eckersall, University of Glasgow, Scotland, UK, labeled with Sulfo-NHS-Biotin (Pierce Biotechnology, Rockford, USA) as capture antibody and the same antibody labeled with Eu-chelate of N¹-(p-isothiocyanatobenzyl)-Diethylenetriamine-N,N,N,N-tetraacetic acid (DTTA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences Zaventem, Belgium) as detection antibody.

In brief, the adapted TR-IFMA protocol, as previously described (Martínez-Subiela et al., 2007), consists on coated streptavidin microtitration wells that are incubated 45 minutes at room temperature with 200µl of biotinylated antibodies. After washing the plate four times, samples or standards are added and further 45 min incubation are carried out at room temperature. Following the addition of 200µl of europium-labelled antibody solution to each well, a incubation of 45 min and a final washing step, 200µl of enhancement solution (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Belgium) are added followed by 20 min incubation at room temperature. The enhanced fluorescence, that was proportional to the quantity of CRP in the sample, is then measured in a Victor 1420 multilabel counter (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences, Zaventem, Belgium).

The adapted immunoassay was optimized for saliva and meat juice sample dilution. Different dilutions: 1:2, 1:4, 1:6, 1:10 and 1:20 were tested for saliva samples and 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 and 1:2000 dilutions were used for meat juice samples optimization. To reduce sample volume the larger dilution with lineal behaviour and fluorescence levels into the calibration curve was selected.

2.2.2. Animals and sample collection.

2.2.2.1. Saliva samples collection.

Saliva was collected using Salivette tubes (Sarstedt) containing a sponge as described in objective 1. Sixty male pigs from a local finishing unit of 1800 animals were sampled for saliva collection. The sampled pigs were divided into two groups:

- **Group 1:** 20 pigs without clinical signs of disease and serologically negative for PRRSV, Aujeszky's disease virus, and porcine circovirus type-2.
- **Group 2:** 40 pigs that presented a disease conditions such as gastric ulceration (n = 13), depressed growth rate with diarrhoea (n = 15), bronchopneumonia with nasal discharge (n = 6) and multiple abscessation (n = 6).

2.2.2.2. Diaphragmatic muscle samples collection.

Meat juice was collected as previously described in objective 1 from muscle

samples of 35 slaughtered pigs that were classified in two groups:

- **Group 1:** 12 animals without adverse signs of disease and serologically negative for PRRS, Aujeszky's disease, porcine circovirus type 2 and mycoplasma. These animals did not have any lesions at the post-mortem inspection.
- **Group 2:** 23 pigs that presented clinical signs compatible with various diseases and showed one or more of the following lesions: bronchopneumonia (62.5%), gastric ulcer (54.16%), arthritis (16.6%), chronic ileitis (29.16%), and abscesses (8.3%).

2.2.3. Assessment of assay performance.

The assessment of the TR-IFMA performance was done by evaluating:

- **Intra and inter-assay precision.** Two pools of saliva, one with high and one low levels of CRP, were used. Additionally three pools of meat juice (1 pool of high, 1 of medium and 1 of low levels of CRP) were used. Each pool was prepared by mixing samples from 6 animals with similar CRP concentrations. The precision was calculated as the coefficient of variation (CV %).

- **Accuracy:** indirectly investigated by linearity under dilution of two porcine saliva and meat juice samples with high CRP concentrations.

- **The limit of detection:** the lowest concentration of CRP which could be distinguished from a zero sample (Eckersall et al, 1999) was calculated by assessment of the average of CRP concentrations of repeated analysis (n = 6) of the zero calibrator plus two standard deviations.

- **Correlation study:** 50 pair of samples serum-saliva and 29 pair of samples serum-meat juice were used to determine the correlation coefficients between CRP concentrations in these sample types.

-

In addition to investigate the stability of CRP in saliva and meat juice, 4 pools of saliva (2 of high and 2 of low levels of CRP respectively) and 6 pools of meat juice (2 of high, 2 of and 2 of low levels of CRP respectively) were prepared and aliquoted. Each

pool were measured at 0, 7, 15, 30, 60, 120 y 210 days following sample collection. All samples were stored at -20°C until analysis.

2.2.4. Statistical analysis.

Intra and Inter-assay CVs, detection limits and correlation coefficients were calculated using routine descriptive statistical procedures with Microsoft Excel 2000. CRP values obtained in the clinical study were evaluated for approximate normality of distribution by using the Kolmogorov-Smirnov statistic.

As the results did not meet the normal distribution criteria, Mann-Whitney non-parametric test was used to compare CRP concentrations from healthy pigs and from pigs with inflammatory diseases.

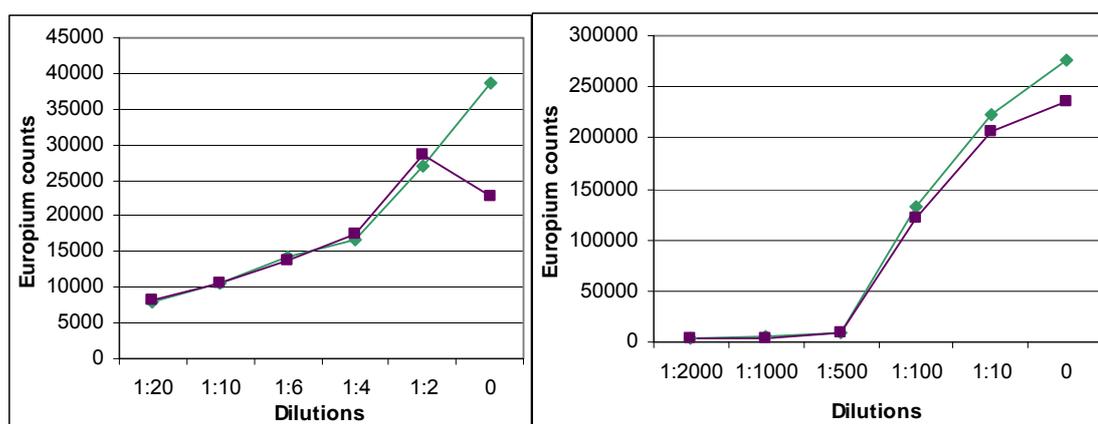
The statistical significance level was set at 0.05 and was determined by using the GraphPad Prism 5 Demo statistical programme (GraphPad software Inc.).

2.3. Results and discussion.

2.3.1. Immunoassay procedure optimization.

Dilutions selected for saliva samples were 1:4 and for meat juice 1:500 (Fig. 101). Higher dilutions produced small europium counts and lower dilutions caused hook effect in both types of samples.

Figure 101. Optimization of saliva (left) and meat juice (right) sample dilution for CRP determination.



2.3.2. Analytical validation of the immunoassay developed and CRP stability in saliva and meat juice samples stored at -20°C .

Intra-assay CVs were 5.75 % and 3.87 % for saliva and meat juice samples

respectively. The CVs obtained for inter-assay precision were higher than those for intra-assay precision, ranging from 7.63 % to 11.83 % for saliva samples and 7.98 to 14.31 for meat juice (Table 28). Coefficients of variation for the assay in all samples studied showed a good precision.

Table 28. Intra and inter-assay precisions of the TR-IFMA developed for CRP quantification in saliva and meat juice samples.

| <i>Saliva ($\mu\text{g/ml}$)</i> | | | | | |
|---|--|--------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | High | Low | Total | |
| | | Intra-assay | | | |
| X \pm SD | | 475 \pm 32.50 | 29 \pm 1.34 | 238 \pm 16.92 | |
| CV | | 6.84 | 4.57 | 5.75 | |
| | | Inter-assay | | | |
| X \pm SD | | 488 \pm 37.24 | 32 \pm 3.78 | 260 \pm 20.51 | |
| CV | | 7.63 | 11.83 | 9.73 | |
| <i>Meat juice ($\mu\text{g/ml}$)</i> | | | | | |
| | | High | Medium | Low | Total |
| | | Intra-assay | | | |
| X \pm SD | | 76.61 \pm 2.79 | 16.5 \pm 0.96 | 11.75 \pm 0.26 | 35.97 \pm 1.34 |
| CV | | 3.51 | 5.81 | 2.28 | 3.87 |
| | | Inter-assay | | | |
| X \pm SD | | 68.48 \pm 9.80 | 15.59 \pm 1.75 | 11.94 \pm 0.95 | 32 \pm 1.16 |
| CV | | 14.31 | 11.24 | 7.98 | 11.17 |

As far as the authors are aware, there is no previous validated method for the detection of CRP in porcine saliva or meat juice. However the precision results of our method were similar to those found for CRP quantification in dog saliva by TR-IFMA (Parra et al. 2005). The observed inter and intra-assay CVs were similar to those reported for two automated immunoturbidimetric assays for CRP that used serum (Kjelgaard-Hansen et al., 2007) and lower compared to whole blood CRP measurements using TR-IFMA (Martínez-Subiela et al., 2007).

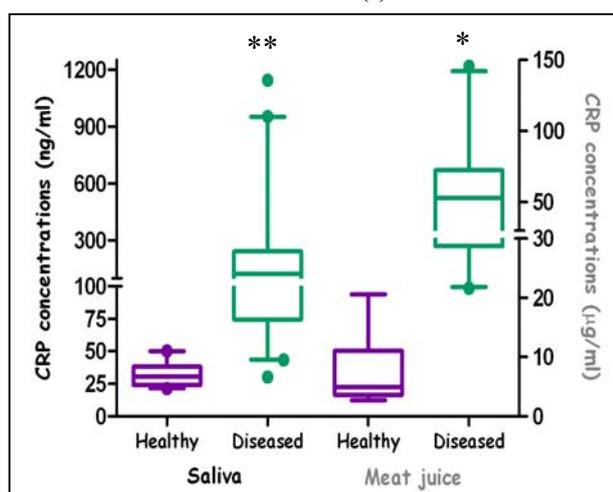
The limit of detection of our assay was significantly lower than that reported for other commercially available kits (0.47ng/ml versus 2 $\mu\text{g/ml}$) (Kjelgaard-Hansen et al. 2007; Tecles et al. 2007), and demonstrated the high sensitivity of the TR-IFMA that allows the determination of CRP in saliva and meat juice.

The accuracy test showed high correlation coefficients of 0.99 for saliva and meat

juice samples.

Statistically significant differences between both groups of animals (healthy and diseased pigs) were found in saliva and meat juice (Fig. 102). High levels of CRP were obtained in diseased animals in both types of samples.

Figure 102. C-reactive protein levels (ng/ml) in saliva (left Y axis) and meat juice (right Y axis) from control and diseased pigs by TR-IFMA. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).



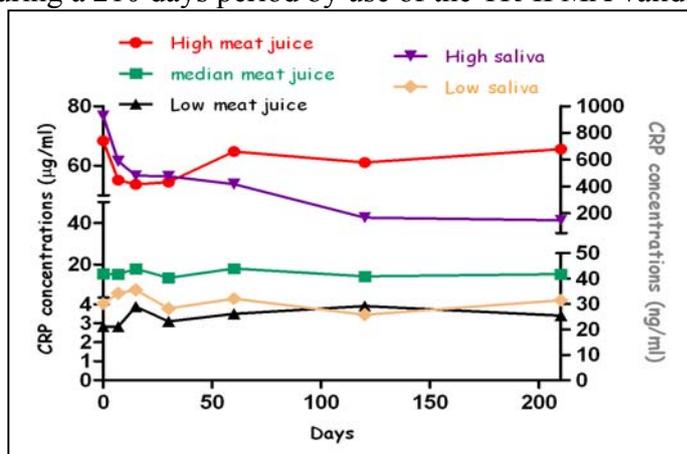
* level of significance $p < 0.001$ **level of significance $p < 0.0001$

A positive correlation was identified, with a coefficient of correlation of $r = 0.726$, between CRP concentrations in paired saliva-serum samples of the 20 healthy and 30 diseased pigs. Moreover a coefficient of correlation of $r = 0.90$ was obtained for the comparison of CRP concentrations in paired meat juice-serum samples from 29 pigs.

Serum CRP levels were almost 323 times higher than those in saliva, as indicated by the regression equation $y = 0.0031x - 0.06$ and 12.32-fold higher than the mean CRP concentrations in meat juice, as indicated by the regression equation $y = 0.058x + 5.59$.

Saliva and meat juice stability studies showed that CRP determinations could be performed in samples stored at -20°C until 210 days after collection without compromising the validity of results (Fig. 103) since no significant statistical differences were found.

Figure 103. CRP stability in saliva (right Y axis) and meat juice (left Y axis) in 6 pools during a 210 days period by use of the TR-IFMA validated.



The results of this study indicate that the TR-IFMA evaluated in our study can detect CRP concentrations in saliva and meat juice samples. The quantifications of CRP in saliva and meat juice can be used as a practical tool for animal health status assessment during all the pig production chain at farm or at slaughter, with several advantages of both alternative biological specimens over serum samples, as it was described before in the introduction of the PhD Thesis. It would be desirable in the future to undertake further investigations, by using specific monoclonal antibodies, to reduce the number of steps and, overall, the length of the assay, in order to make this assay more easy to do and suitable for routine purposes.

CHAPTER 3: APPLICATION OF THE TR-IFMAS DEVELOPED IN FIELD CONDITIONS.

3.1. Introduction.

Saliva and meat juice samples, as alternative biological specimens to serum, are not commonly used for health status assessment in veterinary medicine in general and particularly in pigs. In porcine the studies developed in these fluids include the use of saliva for cortisol determination in stress studies (Sorrells et al, 2007 and Chaloupková et al, 2007) or the use of meat juice for specific antibodies quantification of *Salmonella* (Mousing et al, 1997), *Aujeszky* (Le Potier et al, 1998), and *Trichinella* (Kapel et al, 1998). To our knowledge there are no published studies using saliva or meat juice specimens for APP determinations in field conditions.

The objective of the present study was to assess if saliva and meat juice could be used as alternative samples to serum for the evaluation of the acute phase response in naturally occurring diseases in field conditions. For this purpose the concentrations of Hp and CRP in serum, saliva and meat juice were determined by the TR-IFMAs previously developed in specific pathogen free (SPF) pigs and pigs with clinical signs compatible to porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) at different ages.

Animals with PRRS were selected in our study since this disease is, next to post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), the major cause of economic losses for swine production in the southeast of Spain by producing respiratory signs as well as progressive weight loss in affected animals (Chae et al, 2004 and Cho et al, 2006) and high level of reproductive failure.

3.2. Material and methods.

3.2.1. Animals and sample collection.

APP levels in PRRS was evaluated at different ages by comparing Hp and CRP concentrations in 60 pigs with clinical signs compatible with PRRS such as slow growth, respiratory symptoms and seropositive to specific immunoglobulin of PRRS from an

Summary

affected farm, and 40 age-matched clinically healthy pigs, from a specific pathogen-free (SPF) farm.

Animals were divided in six groups according to the age and health status of animals:

| | Post-weaning pigs (60 days of age) | Mid-fattening pigs (120 days of age) | Finishing pigs (180 days of age) |
|--------------------------------|---|---|---|
| Diseased animals | Young (n = 20) | Adult 1 (n = 20) | Adult 2 (n = 20) |
| Healthy control animals | Control 1 (n = 10) | Control 2 (n = 10) | Control 3 (n = 20) |

Sampling procedures used were described in chapter 1. Serum and saliva samples were collected from each diseased and control animal, while meat juice samples were collected from all diseased animals at the time of slaughter and from only 20 control animals from the group of finishing pigs. All procedures involving animals were approved by the Murcia University Ethics Committee.

3.2.2. Serology and APP determinations.

Serum samples from each animal were analyzed serologically, according to the manufacturer's instructions of the respective kits, for the following diseases: PRRS (HerdChek* PRRSV antibody test kit 2XR IDEXX Laboratories, USA), PMWS (IgG and IgM of PCV2, Ingenasa, Madrid, Spain), Aujeszky disease (CIVTEST Suis ADVgE, Hipra laboratories, Gerona, Spain) and Mycoplasma (CIVTEST™ Suis Mycoplasma hyopneumoniae, Hipra Laboratories, Gerona, Spain).

For APP determinations, CRP and Hp were measured in serum, saliva and meat juice by using the TR-IFMAs developed and validated in objectives 1 and 2.

3.3. Results and discussion.

Healthy pigs were seronegative to PRRS, PCV2 and Mycoplasma while diseased pigs of all ages were seropositive to PRRS and mid-fattening and finishing diseased pigs were concomitantly seropositive to PCV2 and Mycoplasma (table 29).

Table 29. Serological results in healthy animals (n = 40) and in animals with clinical signs compatible with PRRS infection (n = 60).

| Animals: | | Viruses: | PRRS | PCV2 | Aujezsky | Mycoplasma |
|---------------|-----------------------|----------|------|------|----------|------------|
| Healthy pigs | Control 1 (n = 10) | | - | - | - | - |
| | Control 2 (n = 10) | | - | - | - | - |
| | Control (n = 20) | | - | - | - | - |
| Diseased pigs | Young (n = 20) | | + | - | - | - |
| | Adult 1 (n = 20) | | + | + | - | + |
| | Adult 2 (n = 20) | | + | + | - | + |

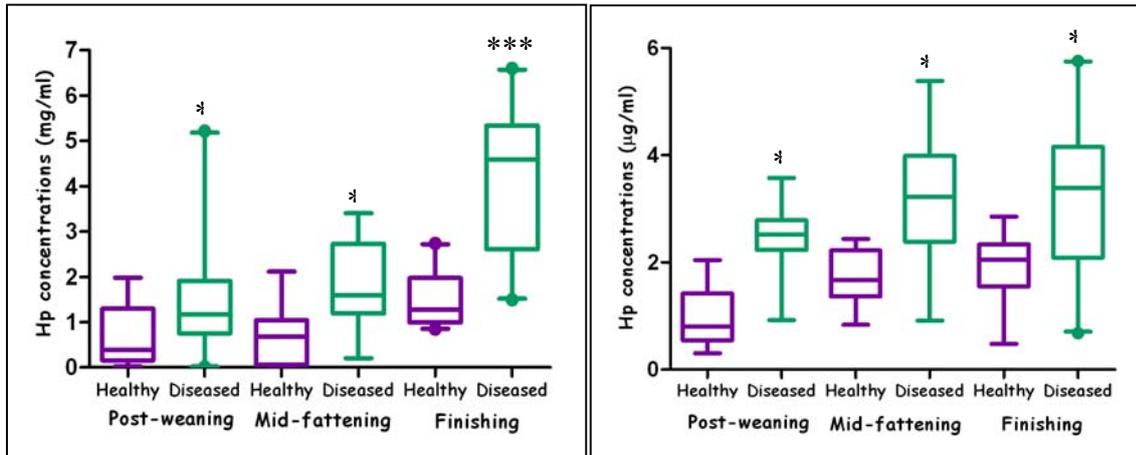
Median Hp and CRP concentrations in serum, saliva and meat juice samples, obtained in healthy and PRRS affected age-matched animals appear in table 30.

Table 30. Median Hp concentrations from animals affected with porcine respiratory and reproductive syndrome and healthy animals in serum, saliva and meat juice samples.

| Animals: | | Post-weaning | | Mid-fattening | | Finishing | |
|----------|-----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Healthy | Diseased | Healthy | Diseased | Healthy | Diseased |
| APP: | | Control 1 | Young | Control 2 | Adult 1 | Control 3 | Adult 2 |
| Hp | Serum (mg/ml) | 0.39 (n = 10) | 1.16 (n = 20) | 0.67 (n = 10) | 1.58 (n = 20) | 1.28 (n = 20) | 4.59 (n = 20) |
| | Saliva (µg/ml) | 0.80 (n = 10) | 2.58 (n = 18) | 1.67 (n = 10) | 3.22 (n = 17) | 2.04 (n = 20) | 3.39 (n = 20) |
| | Meat juice (µg/ml) | - | 101.4 (n = 20) | - | 131.1 (n = 20) | 60.62 (n = 20) | 148.4 (n = 20) |
| CRP | Serum (µg/ml) | 38.43 (n = 10) | 51.99 (n = 20) | 58.33 (n = 10) | 109.9 (n = 20) | 82.58 (n = 20) | 352.0 (n = 20) |
| | Saliva (ng/ml) | 34.01 (n = 10) | 94.80 (n = 16) | 37.80 (n = 10) | 163.1 (n = 17) | 93.53 (n = 20) | 426.5 (n = 20) |
| | Meat juice (µg/ml) | - | 6.20 (n = 20) | - | 11.93 (n = 20) | 4.82 (n = 20) | 21.32 (n = 20) |

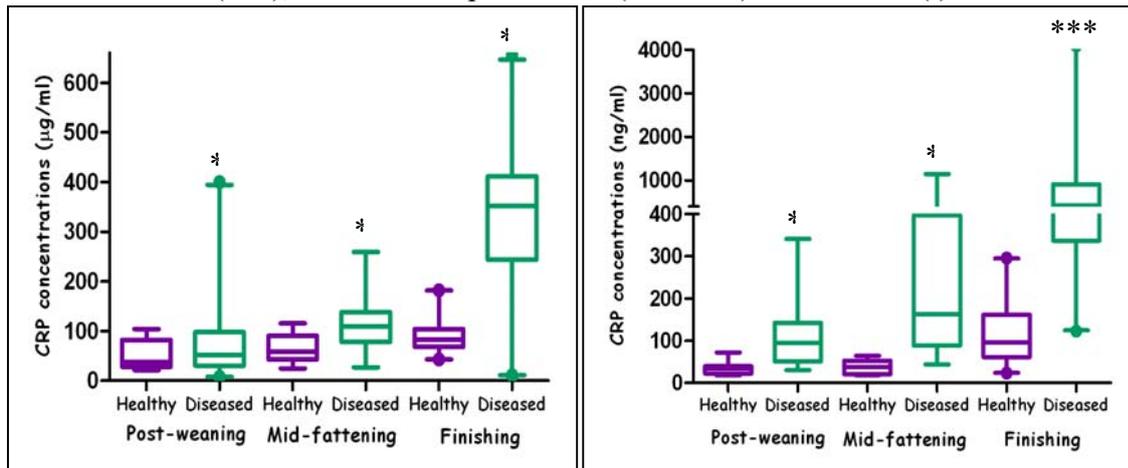
Hp and CRP concentrations were significantly higher in PRRS affected animals in comparison to the age-matched healthy pigs in all the biological specimens used: serum, saliva and meat juice (Fig. 104, 105 and 106). For ethical reasons healthy animals were only slaughtered at the end of the production process, so only meat juice samples from finishing pigs were collected in the group of healthy animals and compared with meat juice samples from age-matched diseased animals.

Figure 104. Hp levels in serum (left) and saliva (right) from healthy and PRRS affected pigs at different ages. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).



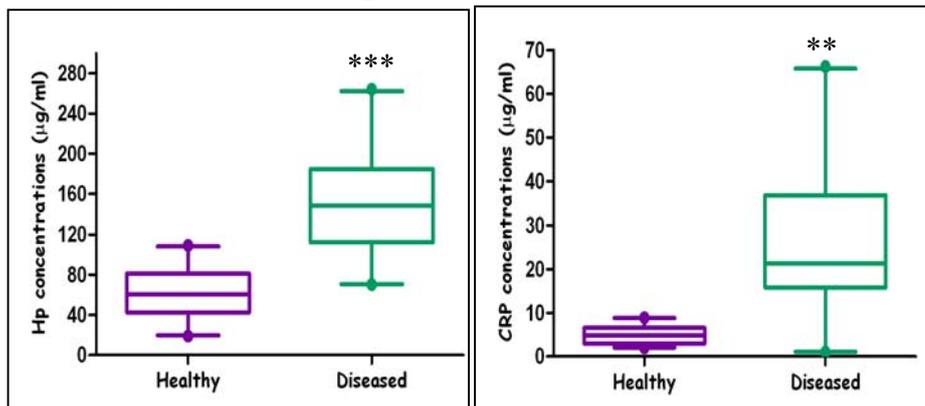
* level of significance $p < 0.05$. *** level of significance $p < 0.0001$.

Figure 105. CRP levels in serum (left) and saliva (right) from healthy and PRRS affected pigs at different ages. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).



* level of significance $p < 0.05$. *** level of significance $p < 0.0001$.

Figure 106. Hp (left) and CRP (right) levels in meat juice from finishing healthy and PRRS affected pigs. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).

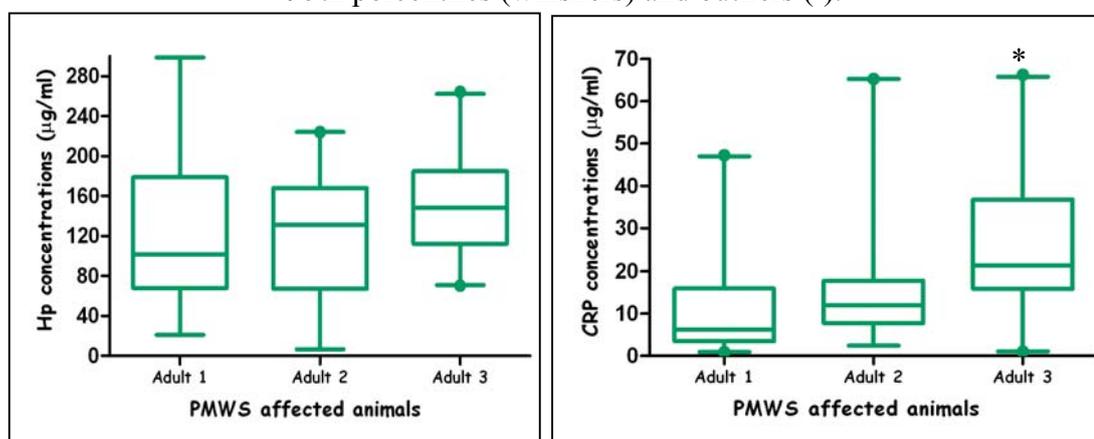


** level of significance $p < 0.001$. *** level of significance $p < 0.0001$.

In addition it was observed an increase in Hp and CRP concentrations with age, in both healthy SPF and diseased animals in all biological specimens (Fig. 104, 105 & 107). This increase with age has been previously reported for serum samples in healthy conventional pigs but not in SPF herds (Petersen et al, 2002).

The increases in Hp and CRP concentrations observed in diseased pigs with age could be influenced by the concomitant infection with other potential pathogens such as PCV2 and Mycoplasma that usually occurs with PRRS at advanced ages producing severe clinical signs of disease (Harms et al, 2001).

Figure 107. Hp (left) and CRP (right) levels in meat juice from diseased pigs at different ages. The plot shows median (line within box), 25th and 75th percentiles (box), 5th and 95th percentiles (whiskers) and outliers (°).



* level of significance $p < 0.05$

Median Hp and CRP concentrations obtained in our study in serum from PRRS affected animals at post-weaning state were similar than those obtained in animals of similar age with PRRS infection in field conditions (Parra et al, 2006). However Hp serum concentrations in mid-fattening diseased animals of our study were higher than those reported in age-matched animals experimentally infected with PRRS (Díaz et al, 2005). Our higher values could be due to the concomitant infections of our animals which are very common in field conditions (Harms et al, 2001 and Kennedy et al, 2000) and that usually do not occurs in experimental studies.

In conclusion, the results obtained in our study showed that saliva and meat juice can be used as alternative specimens to serum for Hp and CRP measurements in pigs with clinical signs of disease compatible to PRRS at different ages and highlighted the

Summary

potential use that APPs quantification in saliva and meat juice could have for health status monitoring in field conditions.

CHAPTER 4: FIRST IDENTIFICATIONS OF PORCINE WHOLE SALIVA PROTEINS USING PROTEOMICS.

4.1. Introduction.

Saliva, as a diagnostic fluid, has been increasingly used in human mainly because it contains several proteins involved in the immune response, that can be used as biomarkers of different diseases (Ghafouri et al, 2003 and Wong et al, 2006). In addition saliva sampling is a non-invasive, simple and stress-free procedure and allows sampling of large number of animals and repeated sampling over short time-intervals (Kaufman et al, 2002).

Proteome refers to proteins expressed by a genome in a given tissue at a given time (Sironi et al, 2001). A proteomic approach has the potential to reveal up- and down-regulation of proteins as well as modifications which could be associated with an inflammatory process (Hogarth et al, 2004). Human serum proteomic studies have identified biomarkers in different diseases such as breast, prostate and ovarian cancers, Alzheimer's disease and rheumatoid arthritis (Xiao et al, 2005). Moreover previous studies have demonstrated that different proteins profiles in saliva were associated with defined diseases, including connective tissue disorders, cystic fibrosis, diabetes mellitus, and periodontitis (Huang, 2004).

Serum proteome maps have been recently published in pigs (Miller et al, 2008), but no studies have been reported until now for porcine saliva proteome. The establishment of a reference pattern of saliva proteins in healthy animals would allow the identification of possible specific biomarkers of disease that could be used in the future. So in this study a reference map of porcine saliva proteome was developed and differential protein expression in porcine saliva between healthy animals and animals with an acute phase reaction was examined by high resolution 2-DE following by immunoblotting and MS.

4.2. Material and methods.

Analytical procedures were developed in the laboratory of proteomics of the

Department of Biomedical Science at the Veterinary Medicine University of Vienna (Austria), in which the PhD candidate made a research visit including in her training programme.

4.2.1. Sample collection and characterization.

Saliva samples were obtained as previously described in objective 1. Briefly, saliva was collected using Salivette tubes (Sarstedt) containing a sponge. Pigs were allowed to chew on the sponge until the sponge was thoroughly moistened. The sponges placed in the test tubes were centrifuged for 10 min at 3000 x g and saliva was removed and stored at -20°C until analysis.

Saliva samples were collected from male pigs, conventional Duroc x (Landrace x Large White) at the beginning of the fattening period from three finishing units from Murcia (Spain) and were divided in 2 groups according to the health status of the farm:

| Group 1 | Group 2 |
|--|---|
| Animals from a SPF (Specific pathogens free) farm (n = 10) | Animals from a PCV2 and PRRS affected farm (n = 10) |

From each saliva sample, total protein content was determined according to Bradford methodology with serum bovine albumin as standard. In addition salivary CRP and Hp concentrations were measured by the TR-IFMAs previously developed.

4.2.2. 2DE.

For 2-DE an IPG-DALT system was used with home-made gels for both dimensions according to generally used protocols (SWISS-2DPAGE database <http://us.expasy.org/ch2d/protocols/>).

First-dimensional immobilized pH-gradients (IPGs) were run under reducing and denaturing conditions in a Multiphor II electrophoresis chamber (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) in non linear gradients pH 4-10 (Gianazza *et al*, 1985) of 11 cm length. Equilibration of the strips with DTT and IAA (Bjellqvist *et al*, 1993) was followed by SDS-PAGE according to Laemmli (1970) on 140 x 140 x 1.5 mm gels in a Hoefer SE 600 vertical electrophoresis chamber (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA).

4.2.3. Saliva protein identifications.

Immunoblotting and mass spectrometry (MS) were used for protein identifications. Immunoblotting was performed after the 2-DE run.

Proteins were transferred onto nitrocellulose (GE Healthcare) by semi-dry blotting (Hoefer Semi-Phor TE 70, Hoefer Scientific Instruments) and tested with the appropriate primary and horse-radish peroxidase conjugated secondary antibodies.

A colorimetric staining (4-chloro-1-naphthol) (Miller and Gemeiner, 1992) was used for the detection of conjugated antibodies. Primary antibodies used were anti-human IgG, IgA, IgM and anti-light kappa and lambda chains which were cross-reactive with each corresponding porcine immunoglobulin.

MS identifications were performed from well-detected spots excised from the gel and following in-gel digestion with trypsin. The resulting mixtures of peptides were characterized by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight spectrophotometer (MALDI-TOF) and two different approaches were used for the protein identification: Peptide mass fingerprinting (PMF) and tandem mass spectrometry (MS/MS). When a protein was not identified from any database search, then genuine *de novo* sequencing was performed (Westermeier, 2008).

4.3. Results and discussion.

The levels of Hp and CRP of the healthy pigs and pigs with an inflammatory-infection condition appear in table 31.

Median levels of salivary Hp and CRP in animals with an inflammatory- infection condition were higher than those obtained in age-matched healthy SPF animals.

Table 31. Salivary levels of Hp and CRP in the healthy SPF and animals with a inflammatory-infection condition used for the proteomic study.

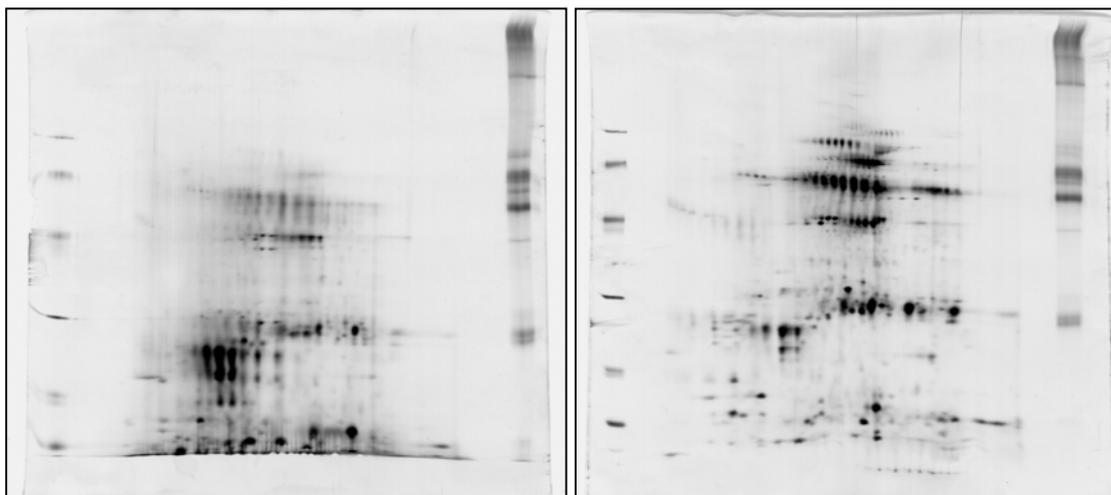
| Healthy animals (SPF) | CRP (ng/ml) | Hp ($\mu\text{g/ml}$) | Animals with Inflammatory-infection condition | CRP (ng/ml) | Hp ($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------------|-------------|-------------------------|---|-------------|-------------------------|
| 1 | 24 | 0,8 | 1 | 62 | 5.4 |
| 2 | 28 | 1,4 | 2 | 54 | 5 |
| 3 | 32 | 1,8 | 3 | 74 | 5 |
| 4 | 27 | 2,2 | 4 | 60 | 5.1 |
| 5 | 35 | 1,4 | 5 | 62 | 5.2 |
| 6 | 35 | 1,2 | 6 | 103 | 3.2 |
| 7 | 19 | 0,5 | 7 | 63 | 3 |

Table 31 (continuation). Salivary levels of Hp and CRP in the healthy SPF and animals with a inflammatory-infection condition used for the proteomic study.

| Healthy animals (SPF) | CRP (ng/ml) | Hp ($\mu\text{g/ml}$) | Animals with Inflammatory-infection condition | CRP (ng/ml) | Hp ($\mu\text{g/ml}$) |
|-----------------------|--------------|-------------------------|---|-------------|-------------------------|
| 8 | 21 | 1,7 | 8 | 61 | 4 |
| 9 | 23 | 1,5 | 9 | 71 | 3.5 |
| 10 | 18 | 1 | 10 | 52 | 5.5 |
| Median | 26.16 | 1,37 | Median | 62 | 5 |

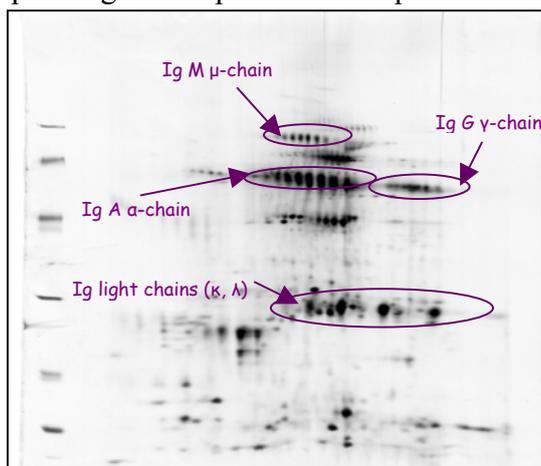
Saliva samples from healthy and diseased animals were evaluated by 2-DE in order to obtain protein maps for healthy and diseased animals. Typical 2-DE gel images of porcine salivary proteins from each group of animals are shown in figure 108. Those images are representative for the saliva pattern of the groups of healthy and diseased animals analysed.

Figure 108. Two-dimensional gel map of whole saliva, obtained in IPG pH4-10 non linear, 10-15% gradient gel of SDS-PAGE and silverstaining, from healthy pigs (left) and pigs with an inflammatory-infection condition (right).

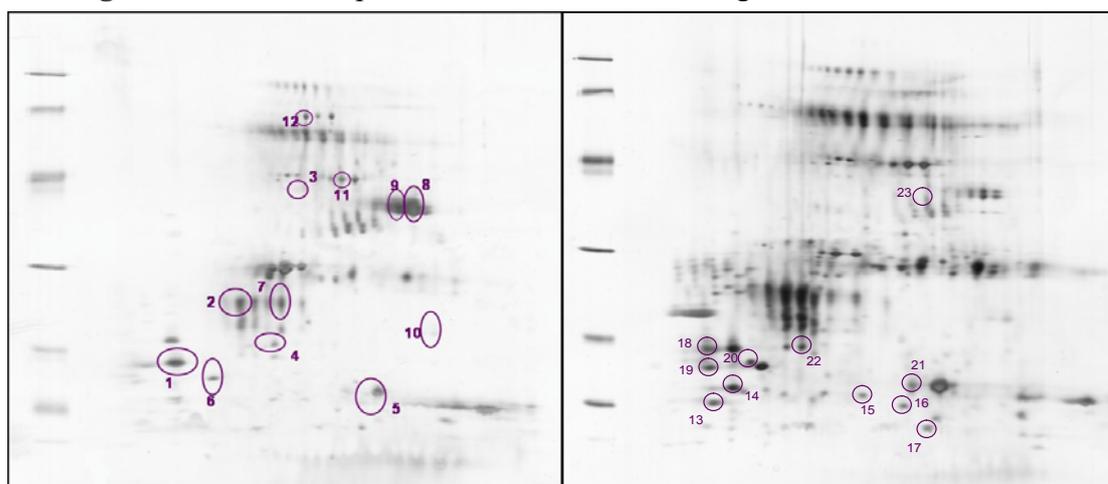


Immunoblotting and mass spectrometry are two powerful methods for the identification of electrophoretically separated proteins in 2-DE gels. These two methods are complementary, as they can identify proteins on the basis of immunoreactivity (epitopes with similar structure, i.e. conformation and/or sequence) and on their peptide cleavage patterns (Miller et al, 2008). A total of 13 different protein identities were obtained by using these technologies.

Four identities were identified by immunoblotting by using commercial available cross-reactive anti-human antibodies. These proteins matched with some 2-DE spots as are shown in figure 109.

Figure 109. Corresponding 2-DE spots from the proteins identified by immunoblotting.

The other nine different identities were identified from twenty-three spots excised from 2 whole saliva 2-DE gels stained with silver (Fig. 110). Twenty one spots gave identifications with several overlaps (table 32).

Figure 110. Excised spots from whole saliva 2-DE gels for MS identification.**Table 30.** Identified proteins in porcine whole saliva by MS.

| Spot number | Protein name |
|---------------|---|
| 1, 13, 14, 18 | Prolactin-inducible protein homolog precursor |
| 2, 7, 15, 22 | Salivary lipocalin precursor |
| 3, 11 | Alpha-amylase I precursor |
| 4, 8, 9, 23 | Carbonic anhydrase |
| 5, 21 | Double-headed protease inhibitor, submandibular gland |
| 6 | Lipocalin 1 precursor |
| 12 | Serum albumin precursor |
| 16 | Cystatin B |
| 19, 20 | Lipocalin precursor |

It was surprising that neither Hp nor CRP proteins was identified in saliva samples using 2-DE analysis, as TR-IFMA detected different concentrations between healthy and diseased pigs, with higher APP concentrations in diseased animals. It is likely that even though the concentrations of Hp and CRP were increased in diseased animals, they were still too low to be identified with the methodology used in our proteomic study. It has been suggested that removal of amylases, albumins and immunoglobulins, which are highly abundant saliva proteins, could allow the detection and visualization of proteins of low concentrations such as Hp and CRP (Hu et al, 2005). Previous proteomic studies reported the same problems in APP identifications in bovine milk (Hogarth et al, 2004).

Most of the identified proteins in this work are part of the first line defence against inflammatory processes such as immunoglobulins, carbonic anhydrase (Kivelä et al, 1999 and Vitorino et al, 2004), cystatin B (Giusti et al, 2007) or alpha-amylase (Imanguli et al, 2007). Moreover other proteins could have other roles such as stress markers, as prolactin (Ghafouri et al, 2003) or antioxidative stress function, as lipocalin (Giusti et al, 2007). Other identified protein was the double-headed protease inhibitor from the submandibular gland which is composed by two homologous actively inhibiting halves, with two specific functions: inhibit trypsin and inhibit elastase, according to database information (UniProtKB/Swiss-Prot). To the authors knowledge it is the first time in which this protein is identified by proteomics in any biological fluid.

In summary, we applied proteomic method to study the protein profile in porcine saliva and 13 proteins have been successfully identified which could serve in the future as biomarkers of health status in pigs. Nevertheless much greater effort must be put on clarifying the functional significance of all the identified proteins and examine protein changes associated with disease processes.

CONCLUSIONS:

5. The assay developed for haptoglobin quantifications in this PhD Thesis, by using the time-resolved immunofluorometric methodology and a specific monoclonal antibody, is simpler and faster than the assays reported until now, and allows Hp measurements in saliva and meat juice samples of pigs. Moreover analytical validation results showed a high sensitivity and specificity of the assay without sample interferences and with a good precision and accuracy. This fast one-step assay could be implementing as a practical routine tool for veterinary inspectors to improve food safety monitoring.

6. The adaptation of a previously reported time-resolved immunofluorometric assay for C-reactive protein measurements in whole blood allows the quantification of this acute phase protein in saliva and meat juice samples of pigs and showed good precision and accuracy with a very low detection limit. Even so, further studies with specific monoclonal antibodies should be performed in order to develop a faster porcine CRP assay which could be implemented in the food chain inspection as an objective tool for the evaluation of animal health status.

7. The results obtained when haptoglobin and C-reactive protein were quantified in different specimens for healthy pigs and pigs affected with porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) suggest that saliva and meat juice could be used as alternative samples to serum for Hp and CRP quantifications, since both specimens could differentiate between healthy and PRRS affected pigs. The possibility to use these alternative biological fluids to serum samples as analytical tools offer a wide range of advantages since saliva and meat juice collections are simpler and more economical and easier to handle for diagnostic purposes. Moreover both specimens could be collected in remote sites by personnel with limited training.

8. Proteomic studies of whole saliva of pigs identified several proteins, such as immunoglobulins, carbonic anhydrase, cystatin B, alpha-amylase or prolactin, which could be of use as potential salivary biomarkers in the future. However proteomic did not allow detecting and identifying APP in saliva samples so further investigations by removing high abundant salivary proteins should be performed.

ANNEX:

- Paper 1: A.M. Gutiérrez, S. Martínez-Subiela, A. Montes, M.D. Parra, J.J. Cerón. 2008. C-reactive protein measurements in meat juice of pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 22: 250-5.

- Paper 2: Gutiérrez AM, Martínez-Subiela S, Eckersall PD, Cerón JJ. 2008. C-reactive protein quantification in porcine saliva: A minimally invasive test for pig health monitoring. *Vet J.* doi:10.1016/j.tvjl.2008.03.021.

- Paper 3: Gutiérrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J. 2008. A fast immunoassay for porcine haptoglobin determination in different biological specimens. *Am J Vet Res.* Accepted.

Bibliografía.



- Adlercreutz, H., Wang, G.J., Lapcik, O., Hampl, R., Wähälä, K., Mäkelä, T., Lusa, K., Talme, M., Mikola, H. (1998). Time-resolved fluoroimmunoassay for plasma enterolactone. *Anal Biochem.* 265: 208-215.
- Aggerbeck, H., Norgaard-Pedersen, B., Heron, I. (1996). Simultaneous quantitation of diphtheria and tetanus antibodies by double antigen, time-resolved fluorescence immunoassay. *J Immunol Meth.* 190: 171-183.
- Ahn, J.S., Choi, S., Jang, S.H., Chang, H.J., Kim, J.H., Nahm, K.B., Oh, S.W., Choi, E.Y. (2003). Development of a point-of-care assay system for high-sensitivity C-reactive protein in whole blood. *Clin Chim Acta.* 332: 51-59.
- Akunda, J.K., Johnson, E., Ahrens, F.A., Kramer, T.T. (2001). Chlortetracycline modulates acute phase response of ex vivo perfused pig livers, and inhibits TNF-alpha secretion by isolated Kupffer cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 24: 81-89.
- Amory, J.R., Mackenzie, A.M., Eckersall, P.D., Stear, M.J., Pearce, G.P. (2007). Influence of rearing conditions and respiratory disease on haptoglobin levels in pig at slaughter. *Res Vet Sci.* 83: 428-435.
- Anderson, L., Anderson, N.G. (1977). High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Nat Acad Sci USA.* 74: 5421-5425.
- Asai, T., Mori, M., Okada, M., Uruno, K., Yazawa, S., Shibata, I. (1999). Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol.* 70: 143-148.
- Bacigalupo, M.A., Iacobello, C., Meroni, G., Ius, A. (1992). Affinity of europium-labelled proteins A and G for immunoglobulin G from seven mammalian species. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 30: 529-530.
- Barnard, G., Kohen, F. (1998). Monitoring ovarian function by the simultaneous time-

resolved fluorescent immunoassay of two urinary steroid metabolites. *Clin Chem.* 44: 1520-1528.

- Benesch, R.E., Ikeda, S., Benesch, R. (1976). Reaction of haptoglobin with hemoglobin covalently cross-linked between the $\alpha\beta$ dimers. *J Biol Chem.* 251: 465-470.
- Berhane, Y., Berry, J.D., Ranadheera, C., Marszal, P., Nicolas, B., Yuan, X., Czub, M., Weingartl, H. (2006). Production and characterization of monoclonal antibodies against binary ethylenimine inactivated Nipah virus. *J Virol Methods.* 132: 59-68.
- Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sánchez, J.-C., Hochstrasser, D.F., (1993). A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* 14: 1357–1365.
- Bürger, W., Fennert, E.M., Pohle, M., Wesemeier, H. (1992). C-Reactive Protein a characteristic feature of health control in swine. *J Vet Med.* 39: 635-638.
- Bürger, W., Ewald, C., Fennert, E.M. (1998). Increase in C-reactive protein in the serum of piglets (pCRP) following ACTH or corticosteroid administration. *Zentralbl Veterinarmed B.* 45: 1-6.
- Carpintero, R., Alonso, C., Piñeiro, M., Iturralde, M., Andrés, M., Le Potier, M.F., Madec, F., Alava, M.A., Piñeiro, A., Lampreave, F. (2007). Pig major acute-phase protein and apolipoprotein A-I responses correlate with the clinical course of experimentally induced African Swine Fever and Aujeszky's disease. *Vet Res.* 38: 741-753.
- Carroll, J.A., Fangman, T.J., Hambach, A.K., Wiedmeyer, C.E., (2004). The acute phase response in pigs experimentally infected with *Escherichia coli* and treated with systemic bactericidal antibiotics. *Livest Prod Sci.* 85: 35-44.
- Chae, C. (2004). Postweaning multisystemic wasting syndrome: a review of aetiology,

diagnosis and pathology. *Vet J.* 168: 41-49.

- Chaloupková, H., Illmann, G., Neuhauserová, K., Tománek, M., Valis, L. (2007). Prewaning housing effect on behaviour and physiological measures in pigs during the suckling and fattening periods. *J Anim Sci.* 85: 1741-1749.
- Chen, H.H., Lin, J.H., Fung, H.P., Ho, L.L., Yang, P.C., Lee, W.C., Lee, Y.P., Chu, R.M. (2002). Serum acute phase proteins and swine health status. *Can J Vet Res.* 67: 283-290.
- Cheville, N.F. (1988) Pathogenesis of Acute Inflammation. En: *Introduction to Veterinary Pathology.* Ed: Iowa State University Press.USA. 322-29.
- Cho, J.G., Dee, S.A. (2006). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology.* 66: 655-662.
- Chomdej, S., Ponsuksili, S., Schellander, K., Wimmers, K. (2004). Detection of SNPs and linkage and radiation hybrid mapping of the porcine C-reactive protein (CRP) gene. *Anim Genet.* 35(6):469-70.
- Clapperton, M., Bishop, S.C., Glass, E.J. (2005). Innate immune traits differ between Meishan and Large White pigs. *Vet Immunol Immunopathol.* 104: 131-144.
- Clary, E.M., Bruch, S.M., Lau, C.L., Ali, A., Chekan, E.G., Garcia-Oria, M.J., Eubanks, S. (2002). Effects of pneumoperitoneum on hemodynamic and systemic immunologic responses to peritonitis in pigs. *J Surg Res.* 108: 32-38.
- Commission of the European Communities. Community Action Plan on The Protection and Welfare of Animals. SEC(2006) 65. Available in: http://ec.europa.eu/food/animal/welfare/com_action_plan230106_es.pdf. Accessed April 2008.

- Conrad, D.H., Goyette, J., Thomas, P.S. (2008). Proteomics as a method for early detection of cancer: a review of proteomics, exhaled breath condensate, and lung cancer screening. *J Gen Intern Med.* 23: 78-84.
- Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med.* 42: 200-202.
- Davies, C. (2005). Introduction to immunoassay principles. En: *The immunoassay handbook*. Third Edition. D. Wild (Ed). 3-40.
- Dawes, C. (1987). Physiological factors affecting salivary flow rate, oral sugar clearance, and the sensation of dry mouth in man. *J Dent Res.* 66: 648-653.
- Dawes, C. (1993). Considerations in the development of diagnostic tests on saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 694: 265-269.
- Devillers, N., Farmer, C., Mounier, A.M., Le Dividich, J., Prunier, A. (2004). Hormones, IgG and lactose changes around parturition in plasma, and colostrum or saliva of multiparous sows. *Reprod Nutr Dev.* 44: 381-396.
- Dhainaut, J.F., Mrin, N., Mignon, A., Vinsonneau, C. (2001). Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit. Care. Med.* 29: S42-47.
- Díaz, I., Darwich, L. Pappaterra, G., Pujols, J., Mateu, E. (2005). Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus as markers of good health and hygiene during production at farm *J Gen Virol.* 86: 1943-1951.
- Díaz-Llano, G., Smith, T.K. (2006). Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins with and without a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent on reproductive performance and serum chemistry of pregnant gilts. *J Anim*

Sci. 84: 2361-2366.

- Dickson, E.F., Pollak, A., Diamandis, E.P. (1995). Time-resolved detection of lanthanide luminescence for ultrasensitive bioanalytical assays. *J Photochem Photobiol B.* 27: 3-19.
- Dobryszicka, W. (1997). Biological functions of haptoglobin: new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 35: 647-54.
- Dong, Q., Wright, J.R. (1996). Expression of C-reactive protein by alveolar macrophages. *J Immunol.* 156: 4815-4820.
- Eaton, J.W., Brandt, P., Mahoney, J.R. (1982). Haptoglobin: A natural Bacteriostat. *Science.* 215: 691-693.
- Ebersole, J.L., Capelli, D. (2000). Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontol.* 23: 19-49.
- Eckersall, P.D. (1995). Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp Haematol Int.* 5: 93-97.
- Eckersall, P.D., Duthie, S., Toussaint, M.J., Gruys, E., Heegaard, P., Alava, M., Lipperheide, C., Madec, F. (1999). Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv Vet Med.* 41:643-55.
- Eckersall, P.D. (2000). Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and food safety. *Ir Vet J.* 53: 307-311.
- Eckersall, P.D. (2000). Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue Med Vet.* 151: 577-584.
- Erkens, J.H., Dieleman, S.J., Dressendörfer, R.A., Strasburger, C.J. (1998). A time-

resolved fluoroimmunoassay for cortisol in unextracted bovine plasma or serum with optimized procedures to eliminate steroid binding protein interference and to minimize non-specific streptavidin-europium binding. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 67: 153-161.

- Eurell, T.E., Bane, D.P., Hall, W.F., Schaeffer, D.J. (1992). Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Can J Vet Res.* 56: 6-9.
- European Center for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). (1997). Workshop 23. Statement on the scientific acceptability and practical availability of in vitro methods for the production of monoclonal antibodies Available in: http://ecvam.jrc.it/publication/MAB_statement.pdf.
- Francisco, C.J., Shryock, T.R., Bane, D.P., Unverzagt, L. (1996). Serum haptoglobin concentration in growing swine after intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica* and toxigenic *Pasteurella multocida* type D. *Can J Vet Res.* 60: 222-227.
- Fuentes, P. (2006). Purificación de la Haptoglobina porcina. En: Desarrollo de métodos simples y rápidos para la purificación de haptoglobina, proteína C reactiva y ceruloplasmina en el ganado porcino. Tesis Doctoral. Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la Universidad de Murcia.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K.B. (2000). C-Reactive Protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an anti-inflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity. *J Exp Med.* 192: 1353-1364.
- Ghafouri, B., Tagesson, C., Lindhal, M. (2003). Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics.* 3: 1003-1015.
- Gianazza, E., Giacom, P., Sahlin, B., Righetti, P.G. (1985). Non-linear pH courses with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 6: 53-56.
- Gianazza, E., Eberini, I., Villa, P., Fratelli, M., Pinna, C., Wait, R., Gemeiner, M.,

Miller, I. (2002). Monitoring the effects of drug treatment in rat models of disease by serum protein analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 771: 107-130.

- Giusti, L., Baldini, C., Bizzichi, L., Ciregia, F., Tonazzini, I., Mascia., Giannaccini, G., Bombardieri, S., Lucacchini, A. (2007). Proteome analysis of whole saliva: A new tool for rheumatic diseases-the example of Sjögren's syndrome. *Proteomics.* 7: 1634-1643.
- Guidance for industry. (2001). Bioanalytical Method Validation. Biopharmaceutics Coordinating Committee. Available in: <http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.pdf>
- Gutterige, J.M.C. (1987). The antioxidant activity of haptoglobin towards haemoglobin-stimulated lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta.* 17: 219-223.
- Guzik, A.C., Matthews, J.O., Kerr, B.J., Bidner, T.D., Southern, L.L. (2006). Dietary tryptophan effects on plasma and salivary cortisol and meat quality in pigs. *J Anim Sci.* 84: 2251-2259.
- Hall, W.F., Eurell, T.E., Hansen, R.D., Herr, L.G. (1992). Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Am Vet Med Assoc.* 201: 1730-3.
- Hale, M.L., Campbell, T.A., Campbell, Y.G., Fong, S.E., Stiles, B.G. (2001). Development of a time-resolved immunofluorometric assay for quantitation of mucosal and systemic antibody responses. *J Immunol Methods.* 257: 83-92.
- Harms, P.A., Sorden, S.D., Halbur, P.G., Bolin, S.R., Lager, K.M., Morozov, I., Paul, P.S. (2001). Experimental reproduction of severe disease in CD/CD pigs concurrently infected with type 2 porcine circovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Pathol.* 38: 528-539.
- Heegaard, P.M.H., Klausen, J., Nielsen, J.P., González-Ramón, N., Piñeiro, M., Lampreave, F., Alava, A.M., (1998). The porcine acute phase response to infection with

Actinobacillus pleuropneumoniae. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp Biochem Physiol.* 119: 365-373.

- Heinrich, P.C., Castell, J.V., Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J.* 265: 621-636.
- Hemmilä, I., Harju, R. (1995). Time-resolved fluorometry. En: *Bioanalytical applications of labelling technologies*. Hemmilä, I., Stahlberg, T., Mottran, P. Turku. 83-119.
- Heo, J., Kattesh, H.G., Roberts, M.P., Morrow, J.L., Dailey, J.W., Saxton, A.M. (2005). Hepatic corticosteroid-binding globulin (CBG), messenger RNA expression and plasma CBG concentration in young pigs in response to heat and social stress. *J Anim Sci.* 83: 208-215.
- Hiss, S., Knura-Deszczka, S., Regula, G., Hennies, M., Gymnich, S., Petersen, B., Sauerwein, H. (2003). Development of an enzyme immuno assay for the determination of porcine haptoglobin in various body fluids: testing the significance of meat juice measurements for quality monitoring programs. *Vet Immunol Immunopathol.* 15: 73-82.
- Hiss, S., Sauerwein, H. (2003). Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 87: 2-11.
- Hjertén, S., Liu, Z.Q, Zhao, S.L. (1983). Polyacrylamide gel electrophoresis: recovery of non-stained and stained proteins from gel slices. *J Biochem Biophys Methods.* 7: 101-113.
- Hogarth, C.J., Fitzpatrick, J.L., Nolan, A.M., Young, F.J., Pitt, A., Eckersall, P.D. (2004). Differential protein composition of bovine whey: a comparison of whey from healthy animals from those with clinical mastitis. *Proteomics.* 4: 2094-2100.

- Hu, S., Xie, Y., Rachandran, P., Loo, R.R.O., Li, Y., Loo, J.A., Wong, D.T. (2005). Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry. *Proteomics*. 5: 1714-1728.
- Huang, C. (2004). Comparative proteomic analysis of human whole saliva. *Arch Oral Biol*. 49: 951-962.
- Hultén, C., Johansson, E., Fossum, C., Wallgren P. (2003). Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Microbiol*. 95: 75-89.
- Imanguli, M.M., Atkinson, J.C., Harvey, K.E., Hoehn, G.T., Ryu, O.H., Wu, T., Kingman, A., Barrett, A.J., Bishop, M.R., Childs, R.W., Fowler, D.H., Pavletic, S.Z., Hart, T.C. (2007). Changes in salivary proteome following allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Exp Hematol*. 35: 184-192.
- Jackson, L.R., Fox, J.G. (1995). Institutional policies and guidelines on adjuvants and antibody production. *ILAR J*. 37: 141-152.
- Jacobson, M., Fellström, C., Lindberg, R., Wallgren, P., Jensen-Waern, M. (2004). Experimental swine dysentery: comparison between infection models. *J Med Microbiol*. 53: 273-280.
- Jayachandran, M., Okano, H., Chatrath, R., Owen, W.G., McConnell, J.P., Miller, V.M. (2004). Sex-specific changes in platelet aggregation and secretion with sexual maturity in pigs. *J Appl Physiol*. 97: 1445-1452.
- Johnson, C.J., Zhukovsky, N., Cass, A.E., Nagy, J.M. (2008). Proteomics, nanotechnology and molecular diagnostics. *Proteomics*. 8: 715-730.
- Jungersen, G., Jensen, L., Riber, U., Heegaard, P.M., Petersen, E., Poulsen, J.S., Bille-Hansen, V., Lind, P. (1999). Pathogenicity of selected *Toxoplasma gondii* isolates in young pigs. *Int J Parasitol*. 29: 1307-1319.

- Kaneko, H., Noguchi, J., Kikuchi, K., Todoroki, J., Hasegawa, Y. (2002). Alterations in peripheral concentrations of inhibin A in cattle studied using a time-resolved immunofluorometric assay: relationship with estradiol and follicle-stimulating hormone in various reproductive conditions. *Biol Reprod.* 67: 38-45.
- Kapel, C.M.O., Webster, P., Lind, P., Pozio, E., Henriksen, S.A., Murrell, K.D., Nansen, P. (1998). *Trichinella spiralis*, T. Britovi, and T. Nativa: infectivity, larval distribution in muscle, and antibody response after experimental infection in pigs. *Parasitol Res* 84: 264-271.
- Katnik, I., Pupek, M., Stefaniak, T. (1998). Cross reactivities among some mammalian haptoglobins studied by a monoclonal antibody. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 119: 335-40.
- Kaufman, E., Lamster, I.B. (2002) Diagnostic applications of saliva. A review. *Crit Rev Oral Biol Med.* 13. 197-212.
- Kennedy, S., Moffett, D., McNeilly, F., Meehan, B., Ellist, J., Krakowka, S., Allan, G.M. (2000). Reproduction of lesions of postweaning multisystemic wasting syndrome by infection of conventional pigs with porcine circovirus type 2 alone or in combination with porcine parvovirus. *J Com Path.* 122: 9-24.
- Kent, U.M. (1999). Purification of antibodies using ammonium sulfate fractionation or gel filtration. *Methods Mol Biol.* 115: 11-18.
- Kimura, H., Mukaida, M., Wang, G., Yuan, J., Matsumoto, K. (2000). Dual-label time-resolved fluoroimmunoassay of psychopharmaceuticals and stimulants in serum. *Forensic Sci Int.* 113: 345-351.
- Kivelä, J., Parkkila, S., Parkkila, A., Leinonen, J., Rajaniemi, H. (2008). Salivary Carbonic anhydrase isoenzyme VI. *J Physiol.* 520: 315-320.

- Kjelgaard-Hansen, M., Martínez-Subiela, S., Petersen, H.H., Jensen, A.L., Cerón, J.J. (2007). Evaluation and comparison of two immunoturbidimetric assays for the heterologous determination of porcine serum C-reactive protein. *Vet J.* 173: 571-577.
- Knura-Deszczk, S., Lipperheide, C., Petersen, B., Jobert, J.L., Berthelot-Hérault, F., Kobisch, M., Madec, F. (2002). Plasma haptoglobin concentration in swine after challenge with *Streptococcus suis*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 49: 240-4.
- Kofer, J., Kleb, U., Pless, P. (2006). The Styrian Salmonella monitoring programme for pork production. *J Vet Med B.* 53: 209-212.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 256: 495-497.
- Kostro, K., Wawron, W., Szczubial, M., Luft-Deptula, D., Glinski, Z. (2003). C-reactive protein in monitoring and evaluation of effects of therapy of the MMA syndrome of sows. *Pol J Vet Sci.* 6: 235-8.
- Kropf, J., Quitte, E., Gressner, A.M. (1991). Time-resolved immunofluorometric assays with measurements of a europium chelate in solution: application for sensitive determination of fibronectin. *Anal Biochem.* 197: 258-265.
- Kushner, I., Mackiewicz, A. (1993). The acute phase response: an overview. In: *Acute phase protein, molecular biology, biochemistry and clinical applications.* Mackiewicz, A., Kushner, I., Baumawn, H. CDC Press. London. 3-19.
- Lammeli, U. K. 1970. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature.* 222: 680-685.
- Lampreave, F., González-Ramón, N., Martínez-Ayensa, S., Hernández, M.A., Lorenzo, H.K., García-Gil, A., Piñeiro, A. (1994). Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis.* 15: 672-676.

- Lauritzen, B., Lykkesfeldt, J., Skaanild, M.T., Angen, Ø., Nielsen, J.P., Friis, C. (2003). Putative biomarkers for evaluating antibiotic treatment: an experimental model of porcine *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection. *Res Vet Sci.* 74: 261-270.
- Lauritzen, B., Lykkesfeldt, J., Friis, C. (2005). Evaluation of a single dose versus a divided dose regimen of amoxicillin in treatment of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs. *Res Vet Sci.* 79: 61-67.
- Le Floch, N., Jondreville, C., Matte, J.J., Seve, B. (2006). Importance of sanitary environment for growth performance and plasma nutrient homeostasis during the post-weaning period in piglets. *Arch Anim Nutr.* 60: 23-34.
- Le Potier, M.F., Fournier, A., Houdayer, C., Hutet, E., Auvigne, V., Hery, D., Sanaa, M., Toma, B. (1998) Used of muscle exudates for the detection of anti-gE antibodies to Aujeszky's disease virus. *Vet Rec.* 3: 385-387.
- Liddell, E. (2005). Antibodies. En: *The Immunoassay Handbook*. Third Edition. D. Wild (Ed). Pages: 144-166.
- Lim, S.K. (2001). Consequences of haemolysis without haptoglobin. *Redox Rep.* 6: 375-8.
- Llamas Moya, S., Boyle, L., Lynch, P.B. Arkins, S. (2003). Measurements of pro-inflammatory cytokines in saliva: a potential indicator of animal welfare. *Proceedings of the Fourth European Colloquium on Acute Phase Proteins*. Segovia. Spain.
- Lockhart, W.L., Chung, W.P., Smith, D.B. (1972). Studies on the dissociation of porcine haptoglobin. *Can J Biochem.* 50: 775-781.
- Løvendahl, P., Purup, H.M. (2002). Technical note: time-resolved fluoro-immunometric assay for intact insulin in livestock species. *J Anim Sci.* 80: 191-5.

- Løvendahl, P., Adamsen, J., Lund, R., Lind, P. (2003). Technical note: time-resolved immunofluorometric assay for growth hormone in ruminants. *J Anim Sci.* 81: 1294-1299.
- Lövgren, T., Meriö, L., Mitrunen, K., Mäkinen, M.L., Mäkelä, M., Blomberg, K., Palenius, T., Pettersson, K. (1996). One-step all-in-one dry reagent immunoassays with fluorescent europium chelate label and time-resolved fluorometry. *Clin Chem.* 42: 1196-1201.
- Lövgren, T., Pettersson, K. (2000). Time-resolved fluoroimmunoassay, advantages and limitations. En: *Luminescence immunoassay and molecular applications.* Van Dyke, K., Van Dyke, R., Boca Raton, Florida: CRC Press. 233-253.
- Magnusson, U., Wilkie, B., Artursson, K., Mallard, B. (1999). Interferon-alpha and haptoglobin in pigs selectively bred for high and low immune response and infected with *Mycoplasma hyorhinitis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 68: 131-137.
- Marnell, L., Mold, C., Volzer, M.A., Burlingame, R.W., Du Clos, T.W. (1995). Expression and radiolabeling of human C-Reactive Protein in Baculovirus-infected cell lines and *Trichoplusia* in larvae. *Protein Expr Purif.* 6: 439-46.
- Martínez-Subiela, S., Eckersall, P.D., Campbell, F.M., Parra, M.D., Fuentes, P., Cerón, J.J., (2007). A Time-resolved immunofluorometric assay for porcine C-reactive protein quantification in whole blood. *Luminescence* 22: 171-6.
- Matsumoto, K., Yuan, J., Wang, G., Kimura, H. (1999). Simultaneous determination of alpha-fetoprotein and carcinoembryonic antigen in human serum by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal Biochem.* 276: 81-87.
- McNair, J., Kennedy, D.G., Bryson, D.G., Reilly, G.A., McDowell, S.W., Mackie, D.P. (1997). Evaluation of a competitive immunoassay for the detection of bovine haptoglobin. *Res Vet Sci.* 63: 145-149.

- Miller, I., Gemeiner, M., (1992). Two-dimensional electrophoresis of cat sera: protein identification by cross reacting antibodies against human serum proteins. *Electrophoresis* 13: 450–453.
- Miller I, Friedlein A, Tsangaris G, Maris A, Fountoulakis M, Gemeiner M. (2004). The serum proteome of *Equus caballus*. *Proteomics*. 4: 3227-3234.
- Miller, I., Robin Wait, R., Sipos, W., Gemeiner, M. (2008). A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res Vet Sci*. doi:10.1016/j.rvsc.2008.05.018.
- Millet, S., Cox, E., Buyse, J., Goddeeris, B.M., Janssens, G.P. (2005). Immunocompetence of fattening pigs fed organic versus conventional diets in organic versus conventional housing. *Vet J*. 169: 293-299.
- Mortensen, S., Strandbygaard, B., Botner, A., Feld, N., Willeberg, P. (2001) Monitoring porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection status in swine herds based on analysis of antibodies in meat juice samples. *Vet Res*. 32: 441-453.
- Mousing, J., Jensen, T.P., Halgaard, C., Bager, F., Feld, N., Mielsen, B., Nielsen, J.P., Bech-Nielsen, S. (1997). Nation-wide salmonella enterica surveillance and control in Danish slaughter swine herds. *Prev Vet Med* 29: 247-261.
- Murata, H., Miyamoto, T. (1993). Bovine haptoglobin as a possible immunomodulator in the sera of transported calves. *Br Vet J*. 149: 277-283.
- Newcombe, C., Newcombe, A.R. (2007). Antibody production: polyclonal-derived biotherapeutics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 848: 2-7.
- Nielsen, B., Ekeroth, L., Bager, F., Lind, P. (1998). Used of muscle fluid as a source of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pigs herds. *J Vet Diagn Invest* 10: 158-163.

- Nieuw Amerongen, A.V., Ligtenberg, A.J., Veerman, E.C. (2007). Implications for diagnostics in the biochemistry and physiology of saliva. *Ann N Y Acad Sci.* 1098: 1-6.
- Nyman, T.A. (2001). The role of mass spectrometry in proteome studies. *Biomol Eng.* 18: 221-227.
- Ogine, T., Kohsaka, T., Taya, K. (1998). Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of porcine relaxin. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 107: 276-280.
- Ohtaki, T., Moriyoshi, M., Nakada, K., Nakao, T., Kawata, K. (1997). Radioimmunoassay of saliva estrone sulfate in pregnant sows. *J Vet Med Sci.* 59: 759-763.
- Pallarés F.J., Martínez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabé, A., Muñoz, A., Cerón, J.J. (2008). Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Vet J.* 177: 369-373.
- Pappin, D.J., Hojrup, P., Bleasby, A.J. (1993). Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol.* 3: 327-332.
- Parra, M.D., Tecles, F., Martínez-Subiela, S. Cerón, J.J. (2005). C-reactive protein measurement in canine saliva. *J Vet Diagn Invest.* 17: 139-144.
- Parra, M.D., Tuomola, M., Cabezas-Herrera, J., Ceron, J.J. (2006) Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Vet Res Commun.* 30: 113-26.
- Pepys, M.B., Hirschfield, G.M. (2003). C-Reactive Protein: a critical update. *J Clin Invest.* 111: 1805-12.
- Peruski, A.H., Johnson, L.H. 3rd, Peruski, L.F. Jr. (2002). Rapid and sensitive detection of biological warfare agents using time-resolved fluorescence assays. *J Immunol Methods.* 263: 35-41.

- Petersen, H.H., Ersbøll, A.K., Jensen, C.S., Nielsen, J.P. (2002). Serum-haptoglobin concentration in Danish slaughter pigs of different health status. *Prev Vet Med.* 54: 325-35.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35: 163-187.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Lampreave, F. (2007a). Characterization of the pig acute phase response to road transport. *Vet J.* 173: 669-674.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Andrés, M., Lorenzo, E., Del Pozo, M., Alava, M.A., Lampreave, F. (2007b). *Vet J.* doi:10.1016/j.tvjl.2007.08.010.
- Polonovski, M., Jayle, M.F. (1939). Peroxidases animales. Leur spécificité et leur role biologique. *Bull Chim. Biol.* 66-91.
- Preßlmayer, A., Identificierum caniner serum proteine mittels elektrophoretischer verfahren, Diplomarbeit 2002. University of Veterinary Medicine, Vienna. Austria.
- Putnam, F.W. (1975). Haptoglobin. En: *The plasma proteins.* Academic Press. Ed. Putnam F.W.
- Roncada, P., Begni, B., Amadori, M., Cristoni, S., Archetti, I.L., Boldetti, C., Fortin, R., Deriu, F., Greppi, G.F. (2007). Blood serum proteome for welfare evaluation in pigs. *Vet Res Commun.* 31: 321-325.
- Ruis, M.A., Te Brake, J.H., Engel, B., Ekkel, E.D., Buist, W.G., Blokhuis, H.J., Koolhaas, J.M. (1997). The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress. *Physiol Behav.* 62: 623-630.
- Rychlik, A., Biogoszewski, M., Depta, A., Kander, M., Majewski, M. (2001). Effect of

diarrhea on the level of C-reactive protein (CRP), albumins and α 1-globulins in the blood serum of piglets. *Bull Vet Inst Pulawy*. 45: 219-226.

- Sánchez-Codón, P.J., Cerón, J.J., Núñez, A., Martínez-Subiela, S., Pedrera, M., Romero-Trevejo, J.L., Garrido, M.R., Gómez-Villamandos, J.C. (2007). Serum concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in pigs inoculated with African swine fever or classical swine fever viruses. *Am J Vet Res*. 68: 772-777.
- Segalés, J., Piñeiro, C., Lampreave, F., Nofrarías, M., Mateu, E., Calsamiglia, M., Andrés, M., Morales, J., Piñeiro, M., Domingo, M. (2004). Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Res*. 35: 275-282.
- Shevchenko, A., Loboda, A., Shevchenko, A., Ens, W., Standing, K.G. (2000). MALDI quadrupole time-of-flight mass spectrometry: a powerful tool for proteomic research. *Anal Chem*. 72: 2132-2141.
- Sironi, L., Tremoli, E., Miller, I., Guerrini, U., Calvio, A.M., Eberini, I., Gemeiner M., Asdente, M., Paoletti, R., Gianzza, E. (2001). Acute-phase proteins before cerebral ischemia in stroke-prone rats identification by proteomics. *Stroke*. 32: 753-759.
- Sorensen, N.S., Tegtmeier, C., Andersen, L.O., Piñeiro, M., Toussaint, M.J.M., Campbell, F.M., Lampreave, F., Heegaard, P.M.H., (2006). The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus Suis*. *Vet Immunol Immunopathol*. 113: 157-168.
- Sorrells, A.D., Eicher, S.D., Harris, M.J., Pajor, E.A., Richert, B.T. (2007). Periparturient cortisol, acute phase cytokine, and acute phase protein profiles of gilts housed in groups or stalls during gestation. *J Anim Sci*. 85: 1750-1757.
- SWISS-2DPAGE documents. Available in: <http://us.expasy.org/ch2d/protocols/>. Accessed May 2008.

- Tarkkinen, P., Palenius, T., Lövgren, T. (2002). Ultrarapid, ultrasensitive one-step kinetic immunoassay for C-reactive protein (CRP) in whole blood samples: measurement of the entire CRP concentration range with a single sample dilution. *Clin Chem.*48: 269-277.
- Tecles, F., Fuentes, P., Martínez-Subiela, S., Parra, M.D., Muñoz, A., Cerón, J.J. (2007). Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Res Vet Sci.* 83. 133-9.
- Terrestrial Animal Health Code. (2007). Appendix 3.7.1. Introduction to the guidelines for animal welfare. Article 3.7.1.1. Available in: http://www.oie.int/eng/normes/Mcode/en_sommaire.htm. Accessed January 2008.
- Tillett, W.S., Francis T., (1930). Serological reactions in pneumonia with non-protein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*, 52: 561-571.
- Toussaint, M.J.M., Van Ederen, A.M., Gruys, E. (1995). Implication of clinical pathology in assessment of animal health and in animal production and meat inspection, *Comp Haematol Int.* 5: 149–157.
- Tseng, C.H., Huang, H.Y., Yang, Y.T., Mao, S.J.T. (2004). Purification of human haptoglobin 1-1, 2-1, and 2-2 using monoclonal antibody affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* 33. 265-273.
- Tumola, M., Harpio, R., Knuuttila, P., Mikola, H., Lövgren, T. (1997). Time-resolved fluoroimmunoassay for the measurement of androsterone in porcine serum and fat samples. *J Agric Food Chem.* 45: 3529-3534.
- Tumola, M., Vainio, J., Lövgren, T. (2002). Rapid rime resolved immunofluorometric assay for the measurement of creatin kinase in serum and whole blood samples. *J Agric Food Chem.* 50: 6659-6662.

- Van der Stede, Y., Cox, E., Van den broeck, W., Goddeeris, B.M. (2001). Enhanced induction of the IgA response in pigs by calcitriol after intramuscular immunization. *Vaccine*. 19: 1870-1878.
- Vercruyse, J., Geurden, T., Peelaers, I. (2006). Development and bayesian evaluation of an ELISA to detect specific antibodies to *sarcoptes scabiei* var *suis* in the meat juice of pigs. *Vet Rec*. 158: 506-508.
- Vitorino, R., Lobo, M.C.J., Ferrer-Correira, A.J., Dubin, J.R., Tomer, K.B., Domingues, P.M., Amado, F.M.J. (2004). Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics*. 4:1109-1115.
- Wait, R., Miller, I., Eberini, I., Cairoli, F., Veronesi, C., Battocchio, M., Gemeiner, M., Gianazza, E. (2002). Strategies for proteomics with incompletely characterized genomes: the proteome of *Bos taurus* serum. *Electrophoresis*. 23: 3418-3427.
- Wallegren, P., Persson, M. (2000). Relationship between the Amounts of Antibodies to *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 Detected in Blood Serum and in Fluid Collected from Muscles of Pigs. *J. Vet. Med. B*. 47: 727-737.
- Wang, Z., Zhang, S., Nesterenko, I.S., Eremin, S.A., Shen, J. (2007). Monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay for sulfamethoxypyridazine and sulfachloropyridazine. *J Agric Food Chem*. 55: 6871-6878.
- Westermeier, R., Barnes, N., Gronau-Czybulka, S. (1993). *Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice*. Published by: Willey-VCH.
- Westermeier, R., Naven, T., Höpker, H. (2008). *Mass Spectrometry*. In: *Proteomics in Practice. A guide to successful experimental design*. Second edition. Published by: Willey-VCH. 215-258.
- Wolffs, P, Knutsson, R, Norling, B, Radström, P. (2004). Rapid quantification of *Yersinia enterocolitica* in pork samples by a novel sample preparation method, flotation,

prior to real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42: 1042-1047

- Wong, D.T. (2006). Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J Am Dent Assoc.* 137: 313-21.
- Xiao, Z., Prieto, D., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Issaq A.J. (2005). Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol.* 230: 95-106.
- Yalow, R.S., Berson, S.A. (1960) Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.*39: 1157-75.
- Yang, S.J., Mao, S.J. (1999). Simple high-performance liquid chromatographic purification procedure for porcine plasma haptoglobin. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* 731 (2). 395-402.
- Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E.G., McGeer, P.L. (2001). Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol.* 158: 1039-1051.
- Young, N.M., Williams, R.E. (1978). Comparison of the secondary structures and binding sites of C-reactive protein and the phosphorylcholine-binding murine myeloma proteins. *J Immunol.* 121: 1893-1898.
- Yueh, S.C.H., Lai, Y.A., Chen, W.L., Hsu, H.H., Mao, S.J.T. (2007). An improved method for haptoglobin 1-1, 2-1 and 2-2 purification using monoclonal antibody affinity chromatography in the presence of sodium dodecyl sulphate. *J Chromatogr B* 845. 210-217.
- Zamora, B.M., Hartung, M., (2002). Chemiluminiscent immunoassay as a microtiter system for the detection of salmonella antibodies in the meat juice of slaughter pigs. *J. Vet Med B.* 49: 338-345.

- Zhu, Y., Osterlundh, I., Hultén, F., Magnusson, U. (2004). Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, serum amyloid A, haptoglobin, and cortisol concentrations in sows following intramammary inoculation of *Escherichia coli*. *Am J Vet Res.* 65: 1434-1439.

