

Estudio de la eficiencia de antibióticos mediante el análisis de CRP y ADA en saliva

Introducción y objetivo del estudio

La reducción del uso de antibióticos en producción porcina es una preocupación global a nivel europeo y mundial. La necesidad de antibióticos está ligada a la presencia de procesos infecciosos por ello la detección precoz asegura el empleo del medicamento adecuado.

Este trabajo presenta una forma fácil y eficaz de detectar procesos infecciosos y monitorizar la eficiencia de su tratamiento.



Material y métodos

- **Animales:** 5 cerdos comerciales de engorde con procesos respiratorios agudos por *Actinobacillus pleuropneumoniae* y 5 cerdos con diarrea severa por alto nivel de micotoxinas en pienso.
- **Muestreo:** recolección de saliva mediante esponja en el momento del diagnóstico del proceso patológico y durante 4 días de tratamiento con antibióticos.
- **Analítica:** medición de proteína C reactiva y adenosina desaminasa previamente validados y optimizados^{1y 2}.
- **Estadística:** análisis no paramétrico de medidas repetidas (Friedman t test, Graph Pad Prism versión 9.5.0).

Resultados y discusión

Los cerdos con infección respiratoria presentaban altas concentraciones salivales de CRP y ADA en el momento del diagnóstico. No fue así para el caso de los cerdos con diarrea por altos niveles de micotoxinas (Figura 1).

Las concentraciones en saliva de CRP disminuyeron significativamente a los 4 días de tratamiento, mientras que los niveles de ADA disminuyeron desde el día 2 de tratamiento en el grupo de afección respiratoria mientras que no se observaron modificaciones de ningún tipo en los animales con diarrea.

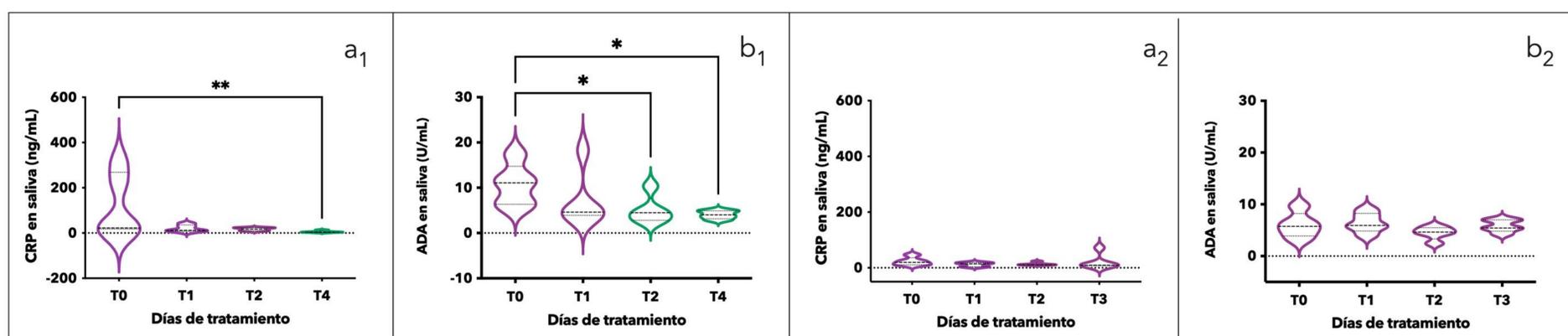


Figura 1. Niveles de CRP (a) y ADA (b) durante el tratamiento en el grupo de animales con enfermedad respiratoria debida a infección por *Actinobacillus pleuropneumoniae* (1) y en el grupo de animales con diarrea por micotoxinas (2). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$.

La medición de biomarcadores inflamatorios-infecciosos como CRP y ADA parecen ser útiles para distinguir entre animales con patologías que necesitan terapia antimicrobiana de patologías que mejoran con otras terapias. Además, se puede verificar la eficacia de la terapia antimicrobiana mediante la monitorización de los niveles de CRP y ADA en muestras de saliva.

Referencia:

¹Circadian pattern of acute phase proteins in the saliva of growing pigs. Gutiérrez AM, Escribano D, Fuentes M, Cerón JJ. Vet J. 2013 May;196(2):167-70. doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.003. Epub 2012 Nov 8.

²Easy and non-invasive disease detection in pigs by adenosine deaminase activity determinations in saliva. Gutiérrez AM, De La Cruz-Sánchez E, Montes A, Sotillo J, Gutiérrez-Panizo C, Fuentes P, Tornel PL, Cabezas-Herrera J. PLoS One. 2017 Jun 8;12(6):e0179299. doi: 10.1371/journal.pone.0179299. eCollection 2017.

El modelo estadístico para detectar enfermedad en saliva

Introducción y objetivo del estudio

La saliva se ha considerado como un fluido capaz de reflejar los marcadores séricos. Sin embargo, se ha descrito que la saliva tiene mejor capacidad para detectar cambios en parámetros como las proteínas de fase aguda.

Este trabajo analiza la capacidad para detectar enfermedad en saliva y suero utilizando un panel de biomarcadores



Material y métodos

- **Animales:** 93 cerdos comerciales de engorde de 4 granjas (40 sanos y enfermos).
- **Muestreo:** recolección de saliva mediante esponja y sangre por punción yugular.
- **Analítica:** medición de proteína C reactiva, haptoglobina, adenosina desaminasa, capacidad antioxidante, cobre, zinc y proteína total utilizando ensayos previamente validados y optimizados¹.
- **Estadística:** cálculo del poder diagnóstico mediante curvas ROC y obtención de un modelo de regresión logarítmico para predecir enfermedad (R versión 4.12, R Core Team 2021).

Resultados y discusión

La saliva presenta mayor poder de discriminación (área bajo la curva (AUC), tabla 1) que el suero en 4 de los 7 biomarcadores (CRP, Hp, ADA y TP).

Los modelos de saliva y suero (tabla 2) tienen buenos valores de predicción con valores de AUC de 0.93 y 0.94 respectivamente.

Tras validar los modelos, por la técnica de re-muestreo, la saliva presenta una calibración aceptable mientras que el suero debe ser desechado (figura 1).

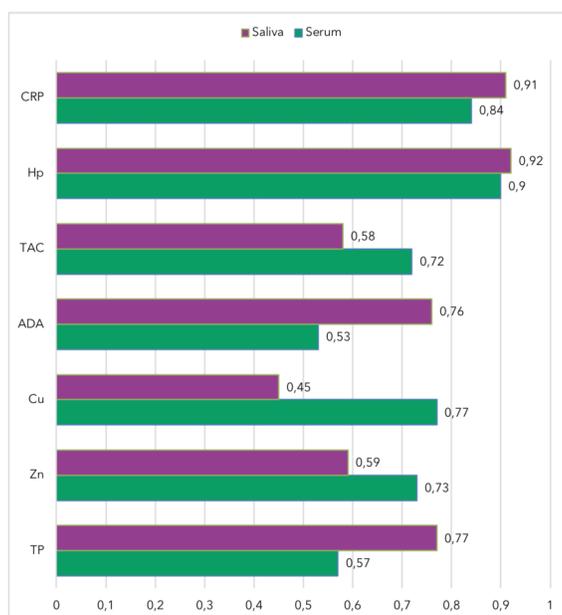


Tabla 1. AUC de los biomarcadores estudiados en saliva y suero.

Modelo	Odd ratio	Percentil	Percentil
saliva			
CRP	1.19	2.5	97.5
Hp	3.95	1.04	18.17
ADA	1.00	1.21	1.01
TAC	0.90	0.81	0.99
suero			
CRP		2.5	97.5
Hp	1.01	1.00	1.01
Cu	3.95	2.07	9.30
	5.77	1.00	40.21

Tabla 2. Odd ratios de los biomarcadores incluidos en cada modelo.

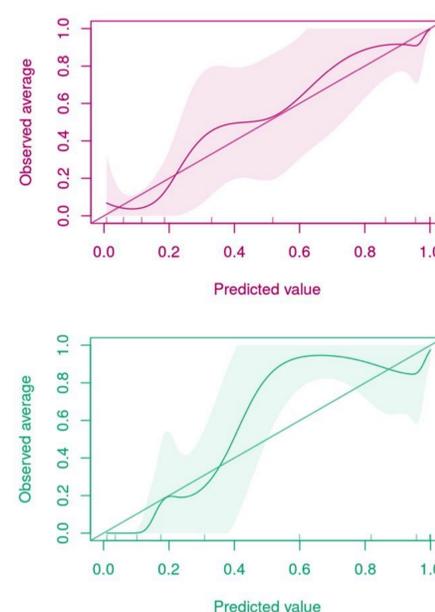


Figura 1. Curva de calibración de los modelos en saliva (arriba) y suero (abajo).

Teniendo en cuenta los ensayos utilizados para la cuantificación de los biomarcadores incluidos en cada modelo, así como el poder diagnóstico y los resultados de la calibración de los modelos, se concluye que la saliva proporciona una mayor eficiencia para la detección de enfermedad que el suero, utilizando el modelo que incluye el panel de biomarcadores CRP, Hp, ADA y TAC.

Referencia:

¹A multi-herd study shows that saliva is more than a reflection of serum biomarkers in pigs. Sánchez J, Fuentes N, Ibáñez-López FJ, López-García I, Gutiérrez AM. Animal. 2021 Dec;15(12):100413. doi: 10.1016/j.animal.2021.100413.

Equipo y objetivos PigMarkSaL.

Proyecto PID2020-116310RB-I00

Quienes somos

Ana María Gutiérrez Montes
Dra. Veterinaria
Investigadora principal



Juan Sotillo Mesanza
Dr. Veterinaria



Francisco Javier García Ibáñez
Dr. Matemáticas



Gerardo Diego Robles Reinaldos
Dr. Bellas Artes



UNIVERSIDAD DE
MURCIA



Susana Ros Lara
Técnico Superior en Laboratorio
de Diagnóstico Clínico y
Licenciada en Ciencias Químicas



Anna Bassols Texeidó
Dra. Farmacia



UAB
Universitat Autònoma
de Barcelona

Yolanda Saco Rodríguez
Dra. Veterinaria



Pablo Fuentes Parco
Dr. Veterinaria



Cefusa

Jorge Sánchez Hernández
Licenciado en Veterinaria



Carlos Piñeiro
Dr. Veterinaria



pigChamp
pro europa

Julián González
Ingeniero Técnico en Informática
de Gestión



Matilde Piñeiro
Dra. Ciencias Químicas



Acuvet
biotech

Objetivos del proyecto



Objetivo principal:

Producir una herramienta que permita realizar una monitorización periódica del estado sanitario y del bienestar animal para una correcta prevención, un diagnóstico precoz y un correcto tratamiento de patologías porcinas en condiciones de campo empleando la saliva como muestra analítica.

- Objetivo específico 1:** desarrollar ensayos para medir, adecuadamente, los biomarcadores seleccionados, definir los rangos de referencia y estudiar su comportamiento en condiciones patológicas.
- Objetivo específico 2:** obtener un modelo de predicción del estado de salud y bienestar de los cerdos empleando muestras de saliva.
- Objetivo específico 3:** desarrollar un software que permita probar el modelo en un programa de control de salud conectando a los agentes implicados.

Perfil salival para la distinción de enfermedades porcinas.

Proyecto PID2020-116310RB-I00

Introducción y objetivos

La conexión entre el estrés y la enfermedad ha sido ampliamente fundamentada. Además, uno de los indicadores de falta de bienestar animal es la elevada prevalencia de enfermedad debido a una inmunidad débil.

El trabajo analiza por primera vez el comportamiento de biomarcadores de estrés e inmunidad en diferentes patologías para buscar como distinguir enfermedades.



Material y métodos

- **Animales:** 107 cerdos comerciales de engorde de 5 granjas (40 sanos 13 con prolapso rectal, 13 con diarrea, 13 con mordedura de cola, 13 con cojeras y 14 con disnea).
- **Muestreo:** recolección de saliva mediante esponja
- **Analítica:** medición de proteína C reactiva, haptoglobina, adenosina desaminasa, capacidad antioxidante, estado oxidativo, cobre, zinc, cortisol, amilasa y proteína total utilizando ensayos previamente validados y optimizados¹.
- **Estadística:** análisis de componentes principales (R versión 4.12, R Core Team 2021).

Resultados y discusión

Tres componentes principales (PCs) explicaron un 65,2% de las varianzas. Todos los biomarcadores presentan una contribución de al menos un 10% en un PC excepto la Hp que muestra un máximo de un 5,8% (tabla 1).

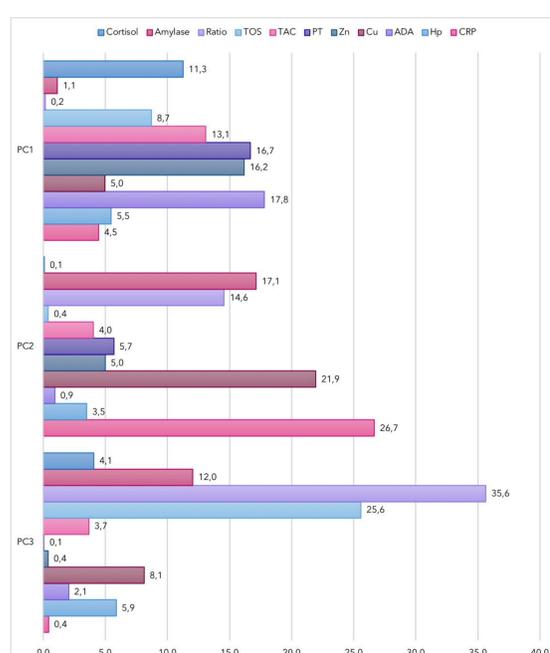


Tabla 1. Contribución de cada marcador a los tres componentes principales (PC1, PC2 and PC3).

Se puede diferenciar cada enfermedad del grupo de animales sanos (Figura 1). Además, el análisis mostró que todas las vías fisiológicas analizadas son importantes para poder diferenciar entre condiciones patológicas.

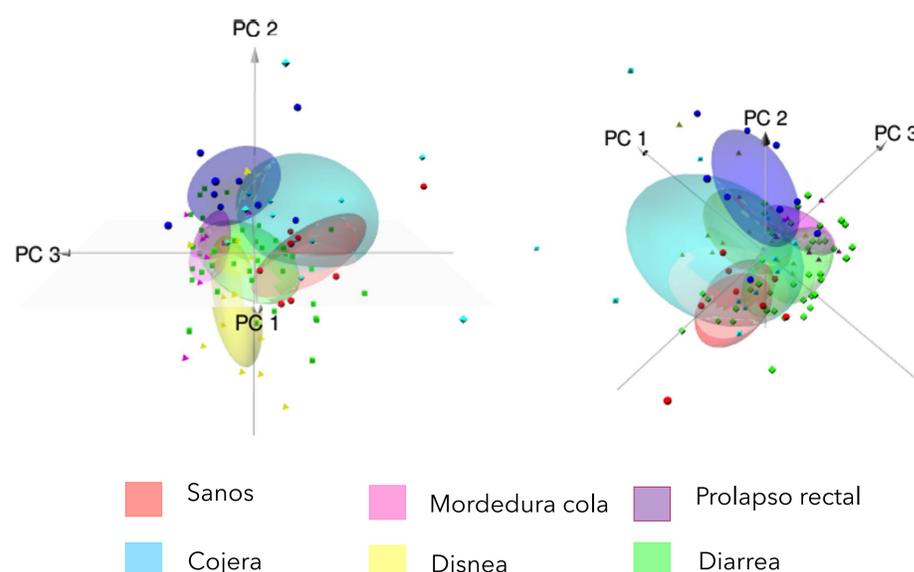


Figura 1. Imágenes representativas del análisis de componentes principales (PC1, PC2 y PC3).

El análisis global de la saliva puede diferenciar condiciones patológicas. La inclusión de varios biomarcadores de vías fisiológicas distintas permite realizar una interpretación específica de enfermedad que debe ser explorado en profundidad para ayudar a la clínica porcina de campo.

Referencia:

¹The connection between stress and immune status in pigs: a first salivary analytical panel to disease differentiation. Sánchez J, Matas M, Ibáñez-López FJ, Hernández I, Sotillo J, Gutiérrez AM. Front. Vet. Sci., 16 June 2022. Sec. Veterinary Experimental and Diagnostic Pathology. Volume 9 - 2022. doi.org/10.3389/fvets.2022.881435

Resultados analíticos primera anualidad

Proyecto PID2020-116310RB-I00

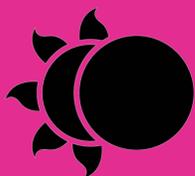
Validación ensayos



Nuevos ensayos para valorar salud animal

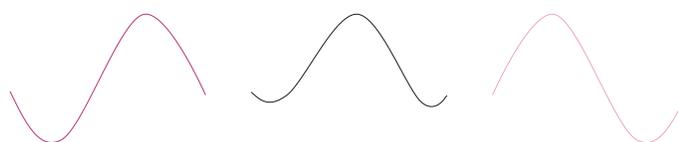
- 2 novedosos biomarcadores de salud animal.
- Presentan excelente precisión y buena exactitud y límite de detección.
- Muestran grandes diferencias entre animales sanos y enfermos con gran relación los niveles medidos en muestras de suero y saliva.

Ritmo circadiano



Ritmo circadiano de biomarcadores

- 3 tipos de patrones circadianos entre los biomarcadores estudiados.



- Variaciones diarias muy similares en machos y en hembras.

Rango de referencia



Rangos de referencia optimizados en edad y sexo

- La edad o etapa productiva afecta a los niveles de referencia en prácticamente todos los biomarcadores.
- La influencia de la edad no es homogénea entre biomarcadores.
- Los rangos de referencia varían según sexo en 8 de 13 biomarcadores.

Temperatura saliva



Temperatura de almacenamiento de saliva

- La saliva puede almacenarse en refrigeración hasta 6 horas sin riesgo.
- Es posible congelar la saliva a -20°C hasta 2 semanas sin alteraciones.
- EXCEPCIÓN: 1 biomarcador que debe analizarse como máximo a las 24 horas de la recogida de las muestras y debe almacenarse a -20°C .

Línea temporal y desarrollo del trabajo (Proyecto PID2020-116310RB-I00)

1. Plan de acción 1: Biomarcadores en saliva



2. Plan de acción 2: App móvil



Con el sector por el sector. Proyecto PID2020-116310RB-I00

Personal veterinario + personal investigador + personal de granja

1. Estudio del ritmo circadiano de los biomarcadores salivales (Mayo 2022).



2. Estudio de los rangos de referencia en cerdos sanos a lo largo del proceso productivo (Junio 2022).



Gracias por vuestra
colaboración

3. Estudio del efecto del almacenamiento en la estabilidad de los biomarcadores (Septiembre 2022).



El éxito solo es posible si trabajamos en equipo.