



Validación analítica de las Proteínas de Fase Aguda en el Jabalí (*Sus scrofa*) Resultados Preliminares



**Bach-Raich E.¹; Pastor, J. ¹; Martínez-Subiela, S. ²; Tecles, F. ²;
Mesalles, M. ¹; Lavín, S. ¹ y Cuenca, R. ¹**

1. Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain

2. Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Universidad de Murcia, 30100-Murcia, Spain



Proteínas de fase aguda (PFAs) Definición

- Grupo de proteínas que cambian su concentración en animales sometidos a agresiones internas o externas.
- Componentes del sistema inmune innato
 - restaurar la homeostasia
 - limitar el crecimiento de los microorganismos



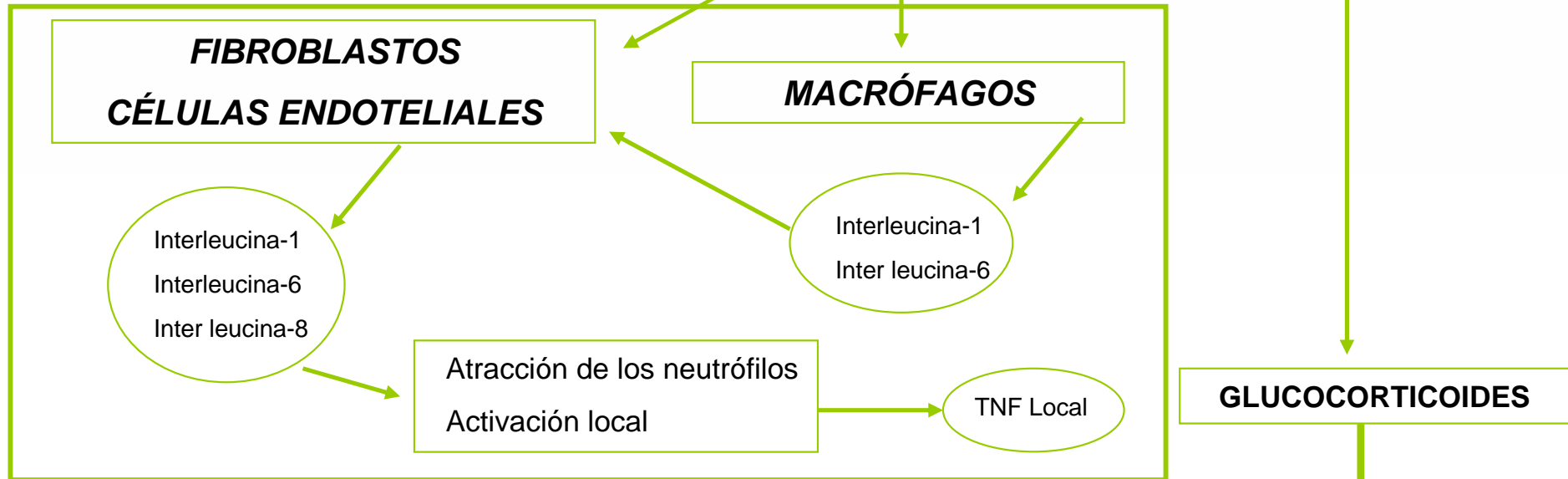
PFAs. Síntesis

ESTÍMULO

Destrucción tisular, Inflamación, Infección, Crecimiento neoplásico, productos bacterianos (Lipopolisacáridos, exotoxinas)

Estrés

RESPUESTA LOCAL



RESPUESTA SISTÉMICA

Localizaciones extrahepáticas

HÍGADO

PFAs



PFAs. Funciones

Actividad antiproteasa:

- α 1-antitripsina y α 2-macroglobulina

Localización y unión a los metabolitos liberados de la degradación celular

- Haptoglobina, Amiloide A sérico (SAA) y Proteína C-reactiva (CRP)

Actividad antibacteriana y habilidad para influir en el curso de la respuesta inmune

- Alfa-1 Glicoproteína Ácida (AGP), SAA y CRP.



PFAs. Utilidad clínica

- Estudio general de salud
- Diagnóstico de estados patológicos
- Marcadores para el pronóstico y monitorización de terapias

- Elevada sensibilidad para estados patológicos
- Baja especificidad para enfermedades particulares



Principales proteínas de fase aguda

- Proteínas más estudiadas en animales:
 - Fibrinógeno
 - Proteína C Reactiva (CRP)
 - Haptoglobina
 - Alfa-1 Glicoproteínas Ácida (AGP)
 - Ceruloplasmina
 - Amiloide A Sérico (SAA)
 - Proteína de Fase Aguda Mayor del Cerdo (Pig-MAP)
 - Albúmina
 - Transferrina



PFAs en el cerdo

- Gran diferencia fisiopatológica según especie
- Principales PFAs en el cerdo doméstico:
 - **Pig-MAP, CRP, Haptoglobina, ASG, SAA y Ceruloplasmina**



Introducción: Clasificación

- PFA positivas, aumentan durante la reacción de fase aguda
 - CRP, Haptoglobina, AGP, Ceruloplasmina, SAA y Pig-MAP
- PFA negativas, disminuyen durante la reacción de fase aguda
 - Albúmina y Transferrina



Introducción: Clasificación

- PFA mayores:
 - aumentos entre 100 - 1000 veces tras el estímulo
 - Pico máximo a las 24-28 horas
 - descenso rápido durante la recuperación

- PFA moderadas:
 - aumentos entre 5 - 10 veces
 - Pico máximo 2-3 días
 - descenso más lento que las PFA mayores

- PFA menores:
 - aumento del 50%-100% respecto al nivel basal
 - aumento y disminución graduales



Objetivos

- Validación analítica de los métodos que existen para determinar la Pig-MAP, CRP y ceruloplasmina en el jabalí
- Resultados preliminares del estudio global de "Validación de PFAs en ungulados salvajes (*Sus scrofa*, *Rupicapra pyrenaica*, *Capra pyrenaica*, *Capreolus capreolus*)"



Pig-MAP

Específica del cerdo.

Producida en los hepatocitos por inducción de IL-6.

Incrementos:

- Infecciones bacterianas (*M. hyopneumoniae*)
- Infecciones víricas (Circovirus tipo 2)
- Estados inflamatorios agudos
- Post-transporte



Proteína C reactiva

No es especie específica

Activa vías del complemento

Incrementos:

- Infecciones bacterianas (*M. hyopneumoniae*)
- Infecciones víricas (PRRSV, PMWS (PCV 2))
- Estados inflamatorios agudos
- Post-transporte



Ceruloplasmina

No es especie específica

Incrementos

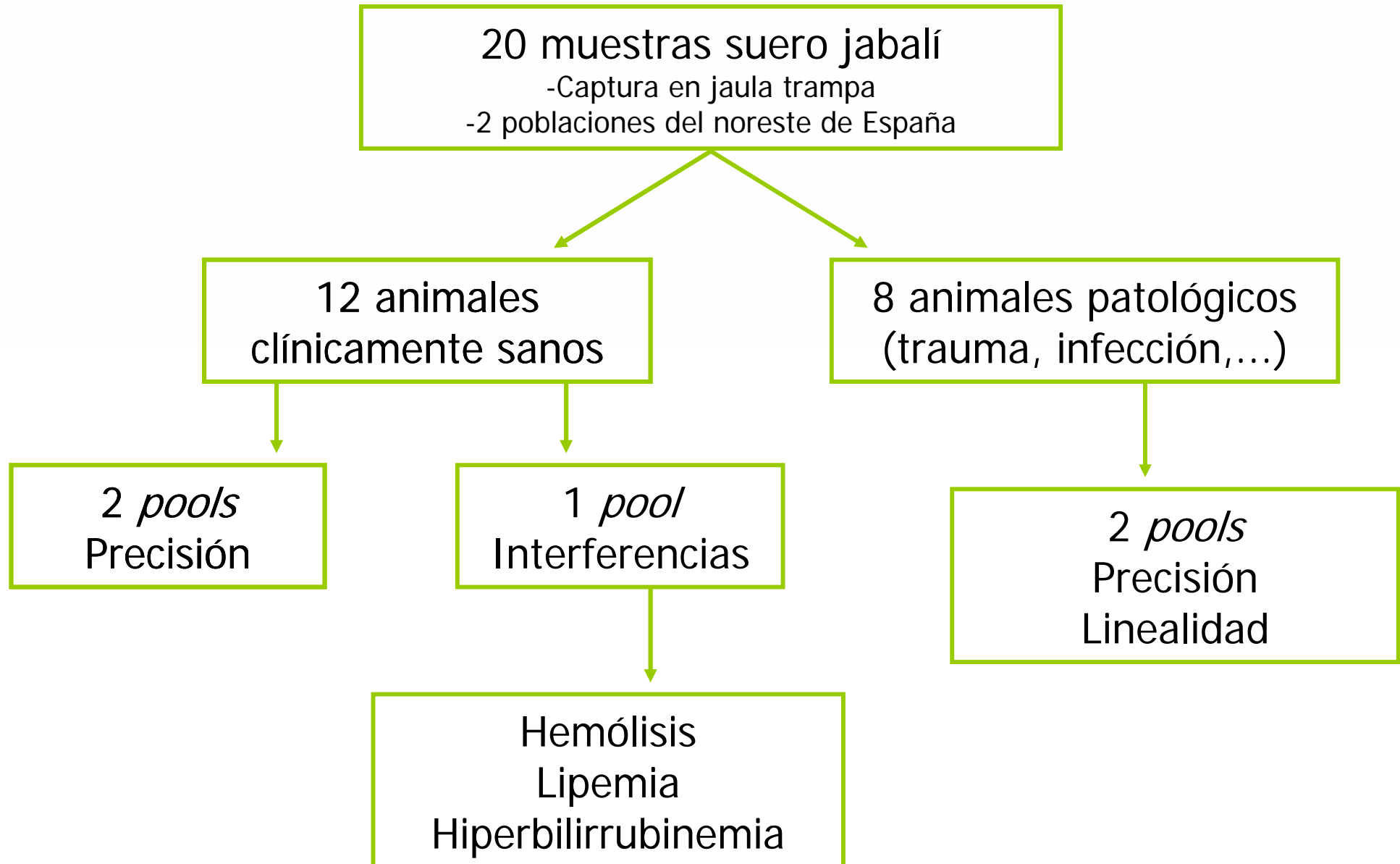
- Estados inflamatorios agudos (perros, cerdos)
- Pneumonitis, enteritis y arteritis (potros)

Descensos

- Deficiencia de cobre (vaca)



MATERIAL Y MÉTODOS: Muestras





Técnicas

- ELISA tipo sandwich
 - Pig-MAP (Pig-MAP kit ELISA, PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain) tipo de ELISA
 - Proteína C Reactiva (TriDelta Development Limited, Ireland)

- Espectrofotometria
 - Ceruloplasmina método descrito por Conner *et al.*, 1988



Validación: Límite de detección, Linealidad y Precisión

- Límite de detección:
 - 10 repeticiones del blanco: mínima concentración detectable

- Linealidad:
 - Diluciones seriadas (del pool alto: 100%, 75%, 50%, 25%, 12.5%)
 - Coeficiente de correlación

- Precisión:
 - Inter-ensayo: 5 repeticiones de los pools alto y bajo en ensayos realizados en diferentes días
 - Intra-ensayo: 5 repeticiones de los pools alto y bajo en el mismo ensayo



Interferencias

■ Hemólisis

- Hemolizado de eritrocitos de jabalí lisados
- Grado de hemólisis final: 20 g/L, 10 g/L, 5 g/L, 2.5 g/L, 1.25 g/L y 0.625 g/L

■ Lipemia

- Emulsión grasa (Lipofundina 20%, Braun Medical SA, Barcelona, Spain)
- Concentraciones finales de triglicéridos: 5 g/L, 2.5 g/L, 1.25 g/L, 0.625 g/L, 0.312 g/L y 0.1563 g/L.

■ Hiperbilirrubinemia:

- Bilirrubina (Sigma Chemical Company, St Louis, Missouri, USA).
- Concentraciones de bilirrubina: 0.15 g/L, 10.075g/L, 0.037g/L, 0.018g/L, 0.009g/L y 0.0047 g/L.



Resultados y discusión

■ Límite de detección

- Pig-MAP → 0,21 g/L
- CRP → 14,86 mg/L
- Ceruloplasmina → 0,0041 A/min

■ Linealidad

- Coeficiente de correlación: 0.85 - 0.98.



Precisión: Pig-MAP y CRP

		Inter-ensayo		Intra-ensayo	
<i>Pool</i>		Media (SD)	CV (%)	Media (SD)	CV (%)
Pig-MAP (g/L)	Alto	5,11 (0,42)	8,22	4,85 (0,14)	2,95
	Bajo	0,67 (0,08)	12,02	0,57 (0,09)	16,31
CRP (mg/L)	Alto	2717,14 (1035,84)	38,12	2014,06 (155,21)	0,76
	Bajo	421,10 (55,58)	13,20	399,85 (42,44)	10,61
Ceruloplasmina (A/min)	Alto	0,068 (0,0025)	3,58	0,066 (0,0006)	0,65
	Bajo	0,046 (0,0021)	4,49	0,044 (0,0005)	1,14



Precisión: Pig-MAP y CRP

- Precisión intra-ensayo buena para todas las proteínas estudiadas.

- Precisión inter-ensayo
 - Pig-MAP y Ceruloplasmina
 - Proteína C reactiva están muy alejada de lo aceptable.

 - Recomendación: Evaluar todas las muestras de un mismo lote de estudio en un solo ensayo (Tecles *et al.* y Eckersall *et al.*)

- Diferencia significativa en la concentración de CRP entre los *pools* alto y bajo
 - Los animales serían clasificados en “sano” y “enfermo” de forma correcta.



Precisión: Ceruloplasmina

		Inter-ensayo		Intra-ensayo	
<i>Pool</i>		Media (SD)	CV (%)	Media (SD)	CV (%)
Pig-MAP (g/L)	Alto	5,11 (0,42)	8,22	4,85 (0,14)	2,95
	Bajo	0,67 (0,08)	12,02	0,57 (0,09)	16,31
CRP (mg/L)	Alto	2717,14 (1035,84)	38,12	2014,06 (155,21)	0,76
	Bajo	421,10 (55,58)	13,20	399,85 (42,44)	10,61
Ceruloplasmina (A/min)	Alto	0,068 (0,0025)	3,58	0,066 (0,0006)	0,65
	Bajo	0,046 (0,0021)	4,49	0,044 (0,0005)	1,14

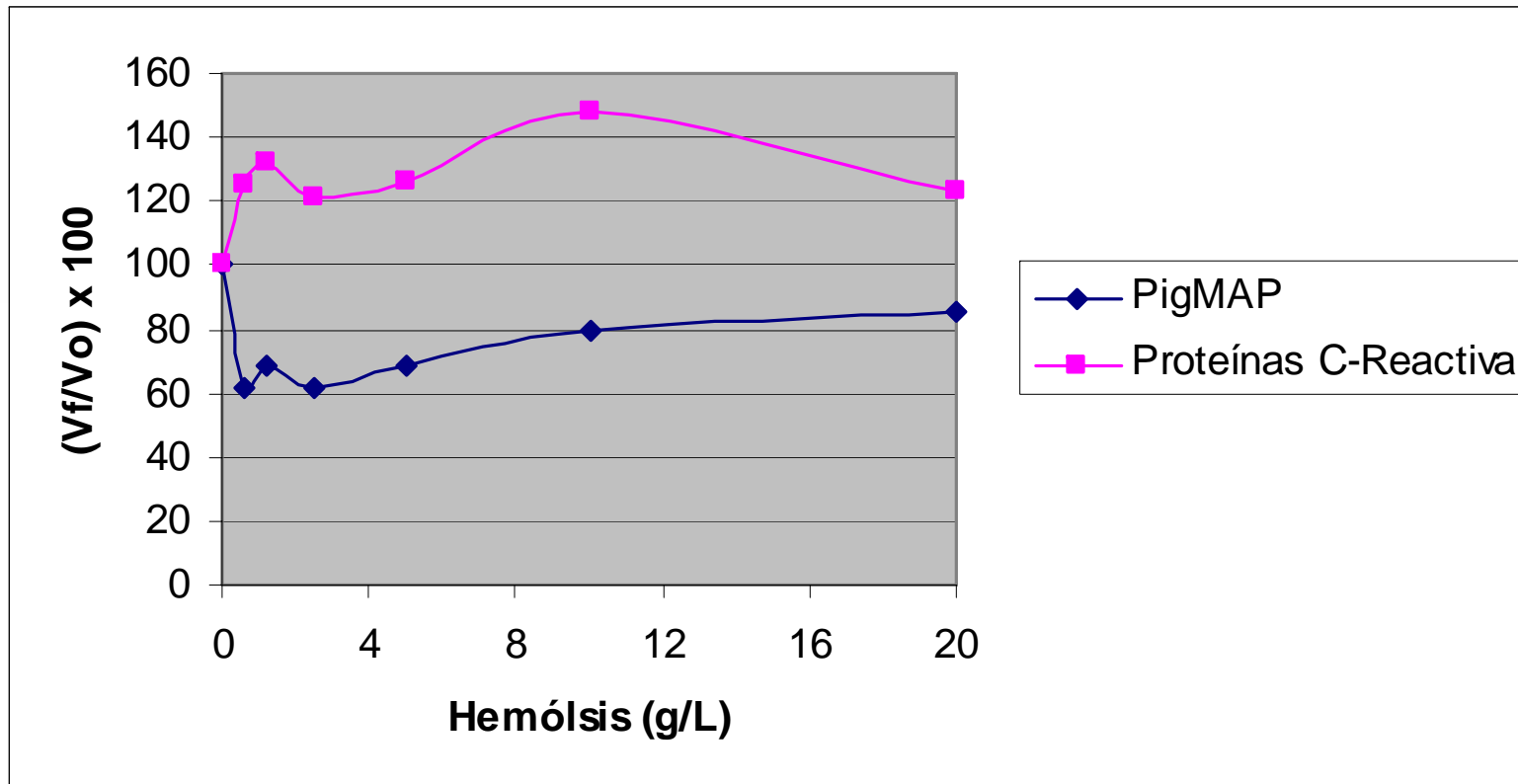


Ceruloplasmina

- La Ceruloplasmina muestra una buena linealidad y precisión
 - valores muy próximos al límite de detección
0,0041 A/min

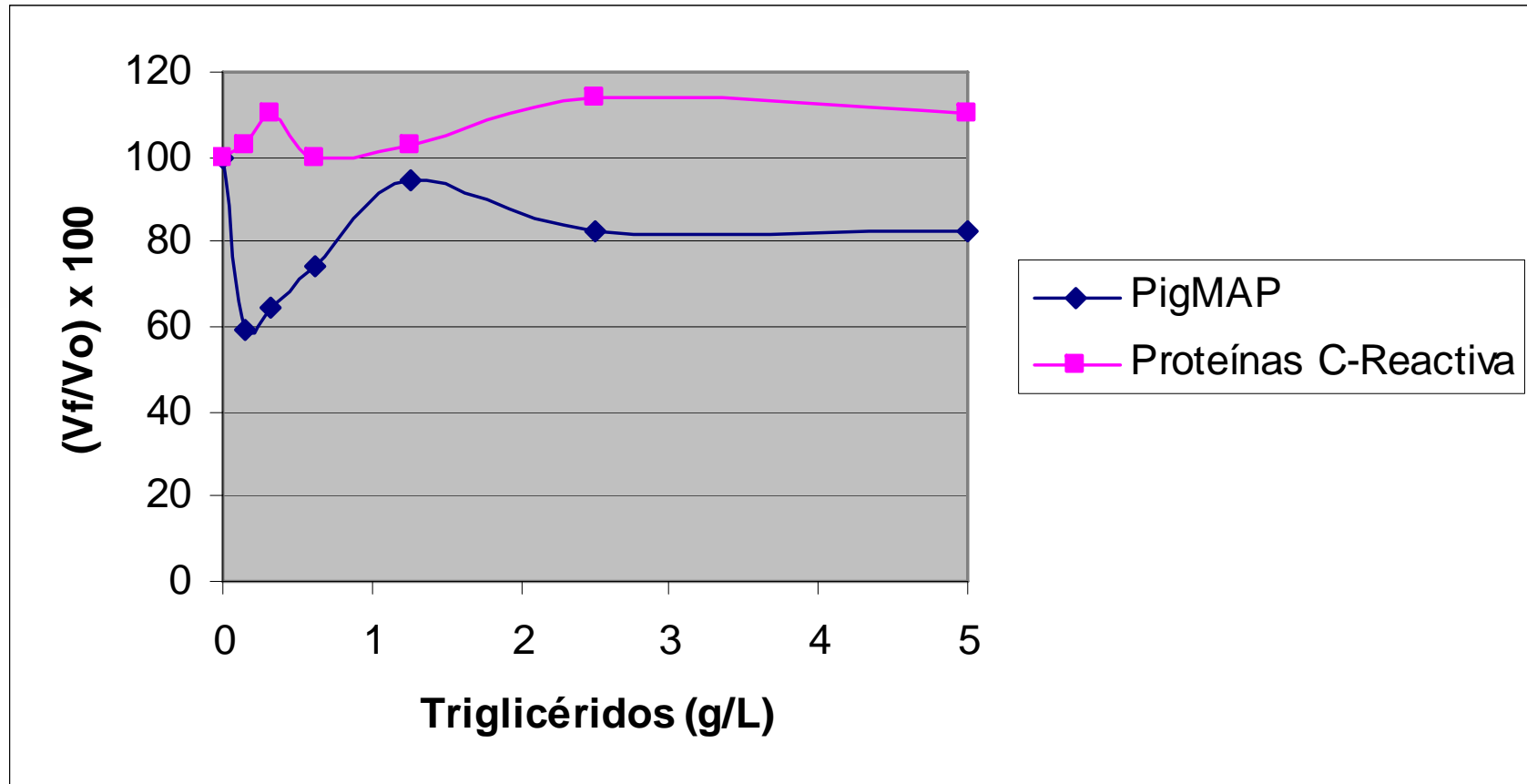


Interferencias: Interferogramas



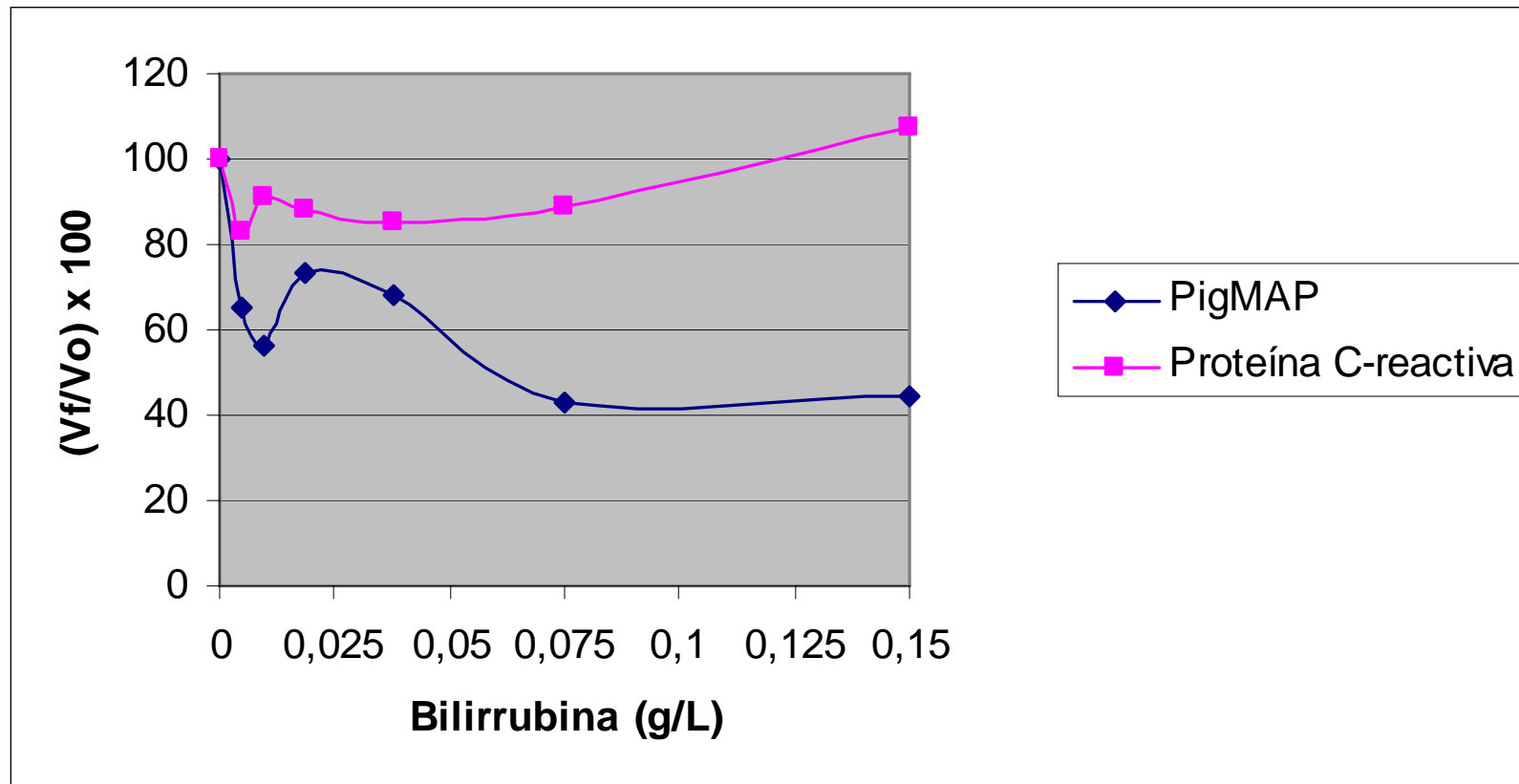


Interferencias: Interferogramas





Interferencias: Interferogramas





Interferencias: Mecanismos

- Hemólisis:
 - interferencias colorimétricas
 - interacciones químicas entre los componentes de los eritrocitos y los analitos.

- Lipemia:
 - dispersión de los rayos de luz producidos por los lípidos

- Bilirrubina:
 - Poco estudiada

Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and Ceruloplasmin assays. Silvia Martinez-Subiela, Jose J. Cerón. Can Vet J. July 2005. (46) 625-629



Conclusiones

1. Las técnicas utilizadas para evaluar la Pig-MAP, CRP y la ceruloplasmina en el cerdo, son aplicables al jabalí.
2. La Pig-MAP y la CRP en el jabalí, deben ser consideradas como PFAs mayores, si bien son necesarios estudios de validación clínica para demostrar su utilidad en la detección de estados patológicos en la población.
3. La Ceruloplasmina en el jabalí se debe considerar, al igual que ocurre en el cerdo, como una PFA menor.
4. La hemólisis, la lipemia y la hiperbilirrubinemia causan interferencias en la evaluación de la Pig-MAP y la CRP.



Agradecimientos



Gràcies *Gracias*

Merci *Grazie*

Este trabajo está financiado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT)