

Raquel Pato¹, Yolanda Saco¹, Lorena Castillejos², Raquel Peña¹ and Anna Bassols¹

¹ Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.

² SNI BA (Servicio de Nutrición y Bienestar Animal) Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona

s.bioquimica.clinica@uab.cat

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las **citoquinas** son un conjunto de proteínas y glicoproteínas secretadas principalmente por células del sistema inmune. Desempeñan un papel clave en la respuesta inmune innata e inducen la respuesta inflamatoria estimulando la síntesis de proteínas de fase aguda. Son **biomarcadores tempranos** del estado de salud y bienestar animal.

La **saliva** refleja los niveles de algunos biomarcadores en suero. Se obtiene mediante procedimientos no invasivos, sin estrés para el animal y es posible recoger diferentes muestras en un intervalo reducido de tiempo, siendo esto de especial importancia en la determinación de citoquinas, ya que poseen una vida media corta. El análisis de citoquinas en saliva es un buen marcador de algunas enfermedades en la especie humana. En medicina veterinaria se han analizado varios biomarcadores en saliva porcina, p.ej. cortisol o proteínas de fase aguda, pero la información sobre citoquinas en saliva aún es escasa, siendo más común el análisis en suero/plasma.

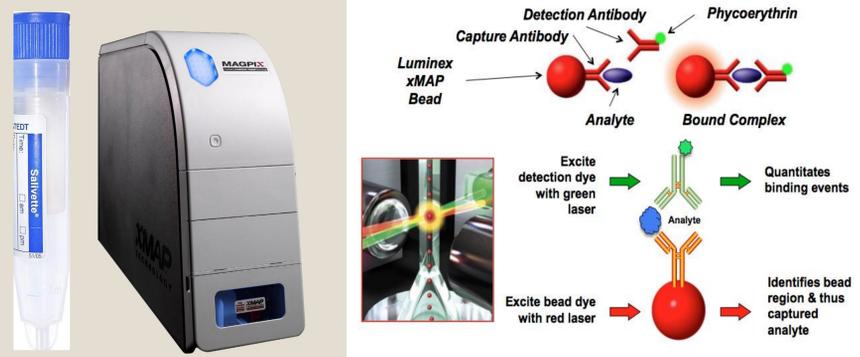
El **objetivo** de este trabajo fue desarrollar la **validación analítica** del Luminex® Assay Porcine Premixed Multi-analyte Kit (Bio-Techne® Ltd.) con muestras de saliva porcina.



MATERIAL Y MÉTODOS

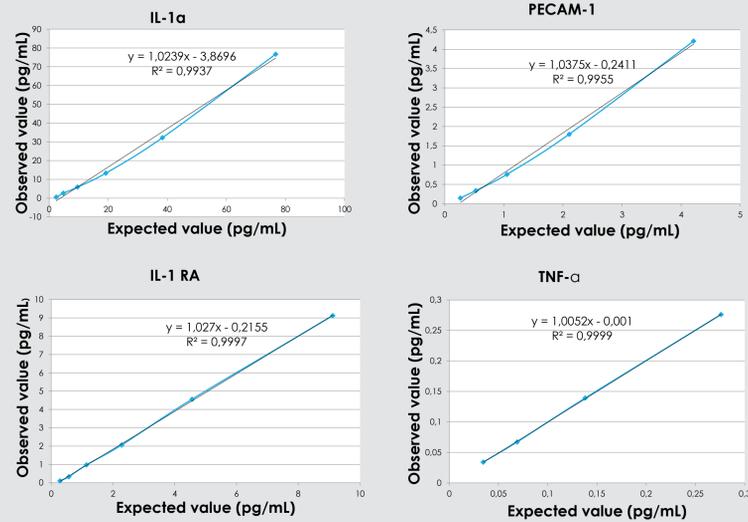
Para la validación analítica, se utilizaron muestras de saliva procedentes de cerdos de engorde Ibérico x Duroc, obtenidas mediante tubos Salivette® y conservadas a -20°C. El panel utilizado (Luminex® Assay Porcine Premixed Multi-analyte Kit, Bio-Techne® Ltd.) es un inmunoensayo que permite analizar 19 citoquinas simultáneamente (BMP-2, CD34, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α , IL-1 RA, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, MMP-1, PDGF-BB, PECAM-1, SERPIN E1/PAI-1 y TNF α) gracias a la tecnología Luminex®. La lectura de la microplaca se realizó con el analizador MAGPIX®, de Luminex®.

En la validación se realizaron estudios de: **exactitud** (linealidad bajo dilución y recuperación) y **precisión**. En este último, se calculó la media (n=8), SD y CV intra-ensayo de las 19 citoquinas.



RESULTADOS

LINEALIDAD



IL-1 α , IL-1 RA, PECAM-1 y TNF α mostraron buena linealidad bajo dilución ($R^2 > 0,99$).

La concentración del resto de citoquinas fue muy baja o indetectable en saliva porcina, lo cual no permitió calcular la linealidad bajo dilución.

PRECISIÓN

Parámetro (pg/mL)	Media (\bar{x}) (n=8)	SD	CV intra
BMP-2	0,13	0,01	6,91
CD34	226,26	11,30	4,99
GM-CSF	0,27	0,02	8,36
IFN γ	0,12	0,01	6,46
IL-1 α	37,08	1,50	4,05
IL-1 β	0,07	0,00	4,63
IL-1 RA	41,62	1,80	4,33
IL-2	0,44	0,06	13,36
IL-4	7,39	0,49	6,66
IL-6	indetectable	-	-
IL-8	18,35	0,96	5,23
IL-10	indetectable	-	-
IL-12	0,21	0,03	15,55
IL-18	110,89	5,44	4,91
MMP-1	0,18	0,03	15,54
PDGF-BB	indetectable	-	-
PECAM-1	5,42	0,18	3,28
SERPIN E1-PAI-1	2,97	0,10	3,26
TNF α	0,24	0,02	7,00

Los CV intra-ensayo fueron aceptables (<15%) para la mayoría de citoquinas.

En IL-12 y MMP-1 la imprecisión fue >15%. Debería reevaluarse con muestras de concentración superior al límite inferior de la recta patrón (0,24 y 0,37 pg/mL, respectivamente).

IL-6, IL-10 y PDGF-BB fueron indetectables en saliva porcina.

ESTUDIO DE RECUPERACIÓN

$$\% \text{ spike recovery} = \frac{C_{\text{spiked sample}} - C_{\text{unspiked sample}}}{C_{\text{added}}} \times 100$$

C spiked sample: muestra de saliva a la que se añade una concentración conocida del analito a evaluar (procedente del calibrador del kit).

C unspiked sample: muestra a la que se añade un volumen igual que a la anterior, pero de tampón (sin analito)

C added: concentración conocida de estándar añadida a la muestra **C spiked simple**.

Casi todas las citoquinas presentaron buena recuperación, excepto: BMP-2, IFN γ , IL-1 RA, IL-18.

RANGO ACEPTABLE = 80-120 %

Parámetro	% Recuperación
BMP-2	35,7
CD34	100,3
GM-CSF	100,8
IFN γ	57,8
IL-1 α	81,2
IL-1 β	88,6
IL-1 RA	59,2
IL-2	88,7
IL-4	82,6
IL-6	106,9
IL-8	92,8
IL-10	84,7
IL-12	92,1
IL-18	63,7
MMP-1	99,0
PDGF-BB	32,0
PECAM-1	92,3
SERPIN E1-PAI-1	93,9
TNF α	84,6

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La saliva porcina es una muestra adecuada para medir citoquinas mediante el sistema Luminex® (Luminex® Assay Porcine Premixed Multi-analyte Kit, Bio-Techne® Ltd.)

Las citoquinas que presentaron mejores resultados en la validación analítica en saliva fueron: IL-1 α , PECAM-1 y TNF α . El hecho de que algunas citoquinas presentaran concentraciones muy bajas o indetectables en saliva dificultó la validación. En estos casos, se deberían repetir los estudios con muestras de concentración superior (dentro de la curva estándar).

Se requieren futuros estudios para establecer valores de referencia en saliva porcina, así como evaluar el ritmo circadiano de secreción y el comportamiento de éstas bajo diferentes condiciones.

BIBLIOGRAFÍA:

- J. Sánchez, N. Fuentes, F.J. Ibañez-López, I. López-García, A.M. Gutiérrez A multi-herd study shows that saliva is more than a reflection of serum biomarkers in pigs (<https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100413>)
- Y. Muneta, Y. Minagawa, T. Nakane, T. Shibahara, T. Yoshikawa & Y. Omata (2011) Interleukin-18 expression in pig salivary glands and salivary content changes during acute immobilization stress, *Stress*, 14:5, 549-556 (<https://doi.org/10.3109/10253890.2011.565392>)
- L. Darwich, S. Pié, A. Rovira, J. Segalés, M. Domingo, I. P.Oswald, E. Mateu. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome, *Journal of General Virology* (2003), 84, 2117-2125 (<https://doi.org/10.1099/vir.0.19124-0>)
- H. Dawson, Y. Sang, J. Lunney. Porcine cytokines, chemokines and growth factors: 2019 update. *Research in Veterinary Science*, Volume 131, 2020, Pg 266-300 (<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.04.022>)
- J.E. Arnold, M.S. Camus, K.P. Freeman, L. Giori, E.H. Hooijberg, U. Jeffery, J. Korchia, M.J. Meindl, A.R. Moore, S.C. Sisson, L.M. Vap, J.R. Cook (2019). ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0). *Veterinary Clinical Pathology*, 48(4). (<https://doi.org/10.1111/vcp.12810>)

SI DESEA INFORMACIÓN SOBRE NUESTRO SERVICIO, ESCANEE ESTE CÓDIGO QR:

