

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES
EN MEDICINA Y PRODUCCIÓN PORCINA

Yolanda Saco Rodríguez

Directores

Anna Bassols Teixidó

Lorenzo José Fraile Sauce

Joaquim Segalés i Coma

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2013

PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES EN MEDICINA Y PRODUCCIÓN PORCINA

Tesis doctoral realizada por
Yolanda Saco Rodríguez
para optar al grado de Doctor

Tesis realizada bajo la dirección de la Dra. Anna Bassols i Teixidó, el Dr. Lorenzo José Fraile Sauce y el Dr. Joaquim Segalés i Coma, en el *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular* de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, dentro del programa de Doctorado de Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina.

Yolanda Saco Rodríguez

Anna Bassols i Teixidó

Lorenzo José Fraile Sauce

Joaquim Segalés i Coma

Agradezco a mis tres directores de tesis (Anna Bassols, Lorenzo Fraile y Quim Segalés) por el apoyo que me han ofrecido a lo largo de todo este tiempo que ha supuesto la preparación de la misma. Me siento muy afortunada de poder trabajar con vosotros y aprecio mucho el tiempo que me habéis dedicado y la confianza que me habéis transmitido. Seguro que con Anna voy a seguir realizando trabajos de investigación en el Servicio de Bioquímica Clínica Veterinaria y en la Unidad de Bioquímica de Veterinaria, pero también me gustaría seguir colaborando con mis otros dos directores en aquellos estudios que consideréis interesantes para desarrollar en el laboratorio de bioquímica clínica. Muchas gracias a los tres.

Anna, no podia deixar de fer-te una menció especial. El teu recolzament ha estat molt important per mi. Estic molt contenta de treballar amb tu, t'admiro molt i per mi ets un referent tant a nivell professional com personal, on sempre he tingut el teu reconeixement en tot el que hem engegat des del Servei. Parlant del Servei, crec que part d'aquesta tesi es fruit del mateix, que tants cops ens ha tingut a les dues força entretingudes i engrescades per dotar-lo cada cop de més recursos i veient la seva evolució, crec que ens hem de sentir orgullosos. Gràcies Anna.

También quiero agradecer a Raquel Pato y Raquel Peña, por el apoyo y la ayuda que me han ofrecido en todo momento. Gracias a vosotras he podido concentrar parte de mi tiempo en este proyecto y tengo la suerte de compartir con vosotras no sólo trabajo sino también muchos buenos momentos llenos de anécdotas, confidencias y alegrías. Gracias a las dos, ¡sois estupendas!

Además tengo que mencionar a todo el personal presente y pasado de la Unidad de Bioquímica de Veterinaria, no voy a especificar nombres porque no me gustaría olvidarme de nadie pero a todos ellos los considero muy buenos compañeros, dispuestos siempre a colaborar. Como personal del Servicio quiero dar las gracias a Merçè Giménez, juntas compartimos el inicio de esta tesis y a lo largo del tiempo que hemos coincidido siempre ha estado dispuesta a participar y ayudar.

Y por último, gracias a mi familia, mis padres, mi marido y mis hijas. Muy especialmente a mi madre que siempre me ha ayudado en todo lo que ha podido, es la persona más buena, amable y generosa que he conocido. Os quiero.

ÍNDICE

1.- RESUMEN	3
2.- INTRODUCCIÓN	7
2.1.- FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN	9
2.2.- RESPUESTA DE FASE AGUDA	11
2.3.- INFLAMACIÓN CRÓNICA	14
2.4.- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA	15
2.5.- PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA	18
2.5.1.- Proteínas de fase aguda en medicina humana	19
2.5.2.- Proteínas de fase aguda en pequeños animales	19
2.5.3.- Proteínas de fase aguda en rumiantes.....	20
2.5.4.- Proteínas de fase aguda en la especie equina.....	20
2.5.5.- Proteínas de fase aguda en la especie porcina.....	20
2.5.5.1.- Proteínas de fase aguda en procesos inflamatorios inducidos experimentalmente.....	21
2.5.5.2.- Proteínas de fase aguda en condiciones de campo.....	24
2.5.5.3.- Proteínas de fase aguda en condiciones subclínicas	24
2.5.5.4.- Proteínas de fase aguda como indicadores de parámetros productivos	25
2.5.5.5.- Proteínas de fase aguda en cerdos de matadero como indicadores del estado sanitario	27
2.5.5.6.- Caracterización de la respuesta de proteínas de fase aguda en situaciones de estrés.....	28
2.5.5.7.- Valores de referencia de proteínas de fase aguda en la especie porcina	30
2.5.5.8.- Métodos analíticos para la determinación de proteínas de fase aguda en la especie porcina	31

2.6.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	33
2.6.1.- Aspectos generales	33
2.6.2.- Recomendaciones para el estudio de la precisión	35
2.6.3.- Recomendaciones para el estudio de la veracidad mediante la comparación de procedimientos de medida	36
2.6.4.- Interpretación y tratamiento	41
3.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	43
4.- RESULTADOS	47
4.1.- Capítulo 1: Validation of an immunoturbidimetric method for determination of serum C-reactive protein	49
4.2.- Capítulo 2: Acute phase proteins as a monitoring tool throughout the pig rearing period	61
4.3.- Capítulo 3: Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs	77
4.4.- Capítulo 4: The acute phase response induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between different isolates.....	97
4.5.- Capítulo 5: Serum acute phase proteins as biomarkers of pleuritis and cranio- ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs	111
5.- DISCUSIÓN	129
6.- CONCLUSIONES	139
7.- BIBLIOGRAFÍA GENERAL.....	143

ABREVIATURAS

ACTH = adrenocorticotropina

ADV = virus de la enfermedad de Aujeszky

A. pleuropneumoniae = Actinobacillus pleuropneumoniae

ASFV = virus de la peste porcina Africana

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

Cp = ceruloplasmina

CP = circovirus porcino

CRP = proteína-C-reactiva

CRH = corticotropina

CSFV = virus de la peste porcina Africana

CV = coeficiente de variación

CVinter = coeficiente de variación interdiario

CVintra = coeficiente de variación intraserial

CVPC = consolidación pulmonar cráneo-ventral

GPA = α 1-glicoproteína ácida

Hp = haptoglobina

HPA = hipotálamo - pituitario - adrenal

IL = interleuquina

IFN- γ = interferón gamma

ITI = inhibidor de tripsina inter- α

ITIH4 = inter- α -trypsin inhibitor heavy chain

MAA = mammary-associated serum amyloid A

MCP-1 = proteína quimioatrayante de monocitos

M. hyopneumoniae = Mycoplasma hyopneumoniae

PAMP = patrones moleculares asociados a patógenos

PCV2 = circovirus porcino tipo 2

Pig-MAP = pig major acute phase protein

P. multocida = Pasteurella multocida

PfAs = proteínas de fase aguda

PRDC = complejo respiratorio porcino

PRRS = síndrome respiratorio y reproductivo porcino

PRRSV = virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino

s = desviación estándar

SAA = amiloide sérico A

SEQC = Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Biología Molecular

SI = sistema internacional

SIRS = síndrome inflamatorio de respuesta sistémica

SIV = virus de la influenza porcina

SNPs = single nucleotide polymorphisms

S. Suis = Streptococcus suis

TLR = receptor de patrones de reconocimiento o toll-like receptor

TNF- α = factor de necrosis tumoral

WBC = recuento de células blancas

xm = media

1. RESUMEN

En esta tesis se han realizado cinco estudios en los que se han determinado las concentraciones de proteínas de fase aguda (PFAs) en sueros porcinos procedentes de estudios experimentales y observacionales. El objetivo fundamental fue valorar si éstas se pueden utilizar como biomarcadores de enfermedades e indicadores de los parámetros productivos.

En el **estudio 1** se realizó la validación de un método inmunoturbidimétrico utilizado para la determinación de proteína-C-reactiva (CRP) humana para su uso con muestras porcinas. La imprecisión obtenida con este método fue inferior a la obtenida con el ELISA comercial específico de especie con el que se comparó. El método evaluado discriminó claramente entre animales sanos y enfermos; pero los resultados obtenidos mediante el método inmunoturbidimétrico no fueron comparables con los del ELISA, pues los valores absolutos fueron más bajos. Estas diferencias disminuyeron cuando se utilizó con el método inmunoturbidimétrico un calibrador porcino. Se concluyó que el método de humana debido a su mejor precisión, al empleo de calibrador trazable y a que es fácilmente automatizable, se puede utilizar con muestras porcinas mientras no existan métodos específicos de referencia ni materiales de referencia específicos de especie.

En el **estudio 2** se evaluó la cinética de las concentraciones plasmáticas de haptoglobina (Hp), CRP y Pig-MAP (*Pig Major Acute Phase Protein*) a lo largo de todo el ciclo productivo en una explotación de engorde (desde la semana 6 hasta la semana 23 de vida), bajo unas condiciones de manejo y protocolos de vacunación estándar. No se detectaron diferencias en la concentración de estas proteínas en función del sexo y se observó que la concentración de Pig-MAP disminuye con la edad. Hp y Pig-MAP fueron las proteínas que presentaron un mayor grado de correlación entre ellas con independencia de la edad de los animales. A la semana 8 de vida se detectó una infección subclínica producida por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) que no causó incremento de la concentración de PFAs. En cambio, al final del período de este estudio, las tres PFA determinadas incrementaron considerablemente debido a un brote clínico con problemas respiratorios graves.

En el **estudio 3** se determinaron los niveles de Hp y Pig-MAP en cerdos de la misma granja comercial del estudio 2 incorporando un grupo de animales que recibieron una dieta enriquecida con un inmunomodulador. Los animales que recibieron en la dieta este aditivo mostraron niveles más bajos de Hp tras tres semanas de tratamiento y presentaron un mayor incremento de peso y de ganancia media diaria. Por el contrario, las concentraciones de Pig-MAP no mostraron cambios a lo largo del estudio. Las

concentraciones de Hp también se incrementaron en ambos grupos tras la administración de una vacuna frente al virus de la enfermedad de Aujeszky, la cual afectó de forma menos significativa a la concentración de Pig-MAP. En conclusión, este estudio demostró que la Hp es un buen biomarcador para monitorizar los parámetros productivos y la respuesta a la vacuna frente al virus de la enfermedad de Aujeszky bajo condiciones estándar de producción.

En el **estudio 4** se llevó a cabo una infección experimental con seis cepas diferentes de PRRSV, cuatro de ellas pertenecientes al genotipo tipo I y dos al genotipo tipo II. Tras la inoculación, se monitorizaron los signos clínicos, se determinó la concentración plasmática de Hp, Pig-MAP y CRP, y se obtuvieron muestras de pulmón para realizar estudios histopatológicos e inmunohistoquímicos. Hp y CRP resultaron ser las PFAs que se incrementaron de forma más acusada tras la infección, en cambio, la concentración sérica de Pig-MAP no se alteró de forma significativa a lo largo del período de estudio. Además, se observó una gran variabilidad en la respuesta de fase aguda dependiendo del tipo de cepa inoculada, lo que confirma que la intensidad de la respuesta innata es, en parte, dependiente de la cepa de virus. La correlación entre la concentración de las PFAs con los signos clínicos y el grado de lesión pulmonar no fue significativa.

Por último, en el **estudio 5** se investigó la relación entre la presencia de lesiones pulmonares y la concentración sérica de Hp, CRP y Pig-MAP en cerdos de matadero. Los cerdos procedían de 24 granjas clasificadas en función del grado de lesión característica de pleuritis (pleuritis negativa: P-, o pleuritis positiva: P+) y de consolidación pulmonar cráneo-ventral (CVPC negativa: M- y CVPC positiva: M+) observadas en matadero. Se obtuvieron muestras de suero de 20 animales de cada granja en las que se analizaron las concentraciones de las tres PFAs. Las tres proteínas incrementaron claramente en las granjas M+, pero sólo Hp y Pig-MAP incrementaron significativamente en las P+. Los análisis ROC realizados concluyeron que la PFA que mejor discriminaba entre los grupos P+/P- y M+/M- era la Pig-MAP. Es por ello que se considera a esta última PFA como un biomarcador adecuado para caracterizar y discriminar las lesiones respiratorias crónicas de las granjas de las cuales proceden los cerdos sacrificados en matadero.

2. INTRODUCCIÓN

2.1.- FISIOPATOLOGÍA DE LA INFLAMACIÓN.

La inflamación aguda es la respuesta coordinada del organismo al daño o lesión tisular producidos por agentes físicos (traumatismos, operaciones quirúrgicas, quemaduras, etc.), químicos (irritación por tóxicos) o biológicos (invasión por parte de agentes infecciosos). La reacción inflamatoria es un componente de la reacción inmune innata. Cuando la inflamación es localizada, constituye una respuesta protectora benigna y adecuada, cuya finalidad es limitar, eliminar y reparar el daño producido.

La patogénesis de la inflamación se asocia a un grupo de moléculas biológicas llamadas mediadores de la inflamación que incluyen derivados de sistemas enzimáticos plasmáticos y los mediadores liberados por las células que intervienen en la respuesta inflamatoria.

Los derivados de sistemas enzimáticos plasmáticos (sistema de la coagulación, sistema de las quininas y sistema del complemento) son un conjunto de proteínas, coordinadas en sus funciones, que se encuentran en el plasma y funcionan de acuerdo con unas propiedades funcionales comunes: activación rápida, activación secuencial añadida y amplificación.

El sistema de la coagulación es el responsable de reforzar el trombo plaquetario para interrumpir la hemorragia. El sistema de las quininas se encarga de aumentar la luz vascular para aumentar el aporte sanguíneo y de contraer el músculo liso para evitar la difusión del agente proinflamatorio. Por último, la activación del sistema del complemento permite la lisis directa del patógeno o su opsonización. Si el complemento no logra eliminar el patógeno aumenta el flujo de células y moléculas a la zona de infección.

Los mediadores liberados por las células que intervienen en la respuesta inflamatoria son responsables de múltiples funciones. Una de ellas tiene lugar en las fases más iniciales de la respuesta inflamatoria: la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular. Estos mediadores son los derivados de la oxidación del ácido araquidónico de las membranas celulares de las células endoteliales e inflamatorias (que se encuentran en el tejido conectivo implicado en la lesión), se trata principalmente de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas. Mastocitos, basófilos y plaquetas son también importantes fuentes de mediadores vasoactivos como la histamina y la serotonina. El endotelio dañado también puede causar la activación de la cascada de la coagulación (García de Lorenzo y Mateos, A. et al., 2000).

Las células inflamatorias (mastocitos, leucocitos y macrófagos) liberan citoquinas proinflamatorias interleuquina (IL)-1 β y factor de necrosis tumoral (TNF- α) que activan las células endoteliales e inducen la expresión en su superficie de moléculas de adhesión. Estas moléculas facilitan la adherencia y trans migración de los leucocitos hacia el sitio de la lesión.

Los monocitos y macrófagos presentan en su superficie “receptores de patrones de reconocimiento” o *toll-like receptors* (TLR), que interaccionan con determinadas estructuras moleculares compartidas por grupos de microorganismos y que se denominan “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP). Esta interacción entre PAMP y TLR activa rutas que conducen a la activación del factor NF- κ B, que una vez activado migra desde el citoplasma al núcleo e induce la transcripción de citoquinas (García de Lorenzo y Mateos, A. et al., 2000).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular, a menudo glicosiladas, sintetizadas por células del sistema inmunitario en respuesta a patógenos, sus productos u otras señales asociadas. Sus principales funciones biológicas se asocian a:

- Respuesta inflamatoria local y sistémica.
- Reparación tisular.
- Defensa frente a la infección viral
- Respuestas inmunes innatas y específicas.
- Proliferación y regulación de linfocitos T y B.

Las citoquinas liberadas durante la reacción inflamatoria desencadenan la respuesta de proteínas de fase aguda (PFAs), componente también de la respuesta inmune innata (García de Lorenzo y Mateos, A. et al., 2000).

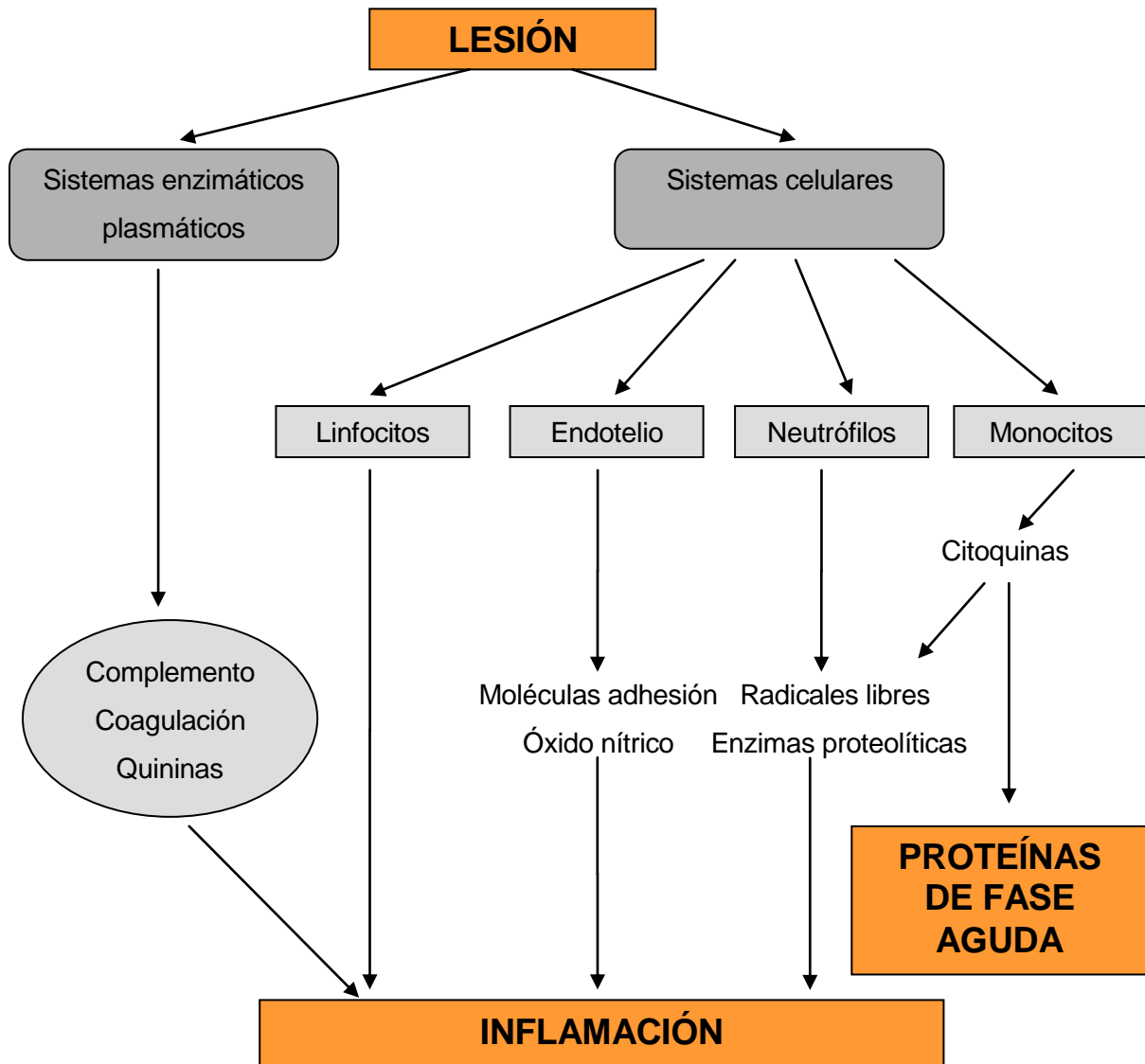


Figura 1: Esquema general de la fisiopatología de la inflamación.

2.2.- RESPUESTA DE FASE AGUDA.

La respuesta de fase aguda es un proceso dinámico que engloba cambios sistémicos y metabólicos que proporcionan un rápido mecanismo de defensa no específico (inmunidad innata) frente a aquellos cambios que pueden comprometer el estado de salud de los animales y del hombre. Uno de los cambios más importantes que se producen afecta a la síntesis de PFAs (Gabay and Kushner, 2001).

La síntesis de PFAs está inducida por citoquinas proinflamatorias liberadas principalmente por monocitos o macrófagos activados por infecciones y daño tisular. Las principales citoquinas que se producen son la IL-1- β , IL-6 y TNF- α (Murata et al., 2004), responsables de activar la síntesis de PFAs en el hígado. Esta activación se produce mediante diferentes mecanismos que comprenden receptores de citoquinas, vías de señalización e inducción de la transcripción de mRNA específicos (figura 2).

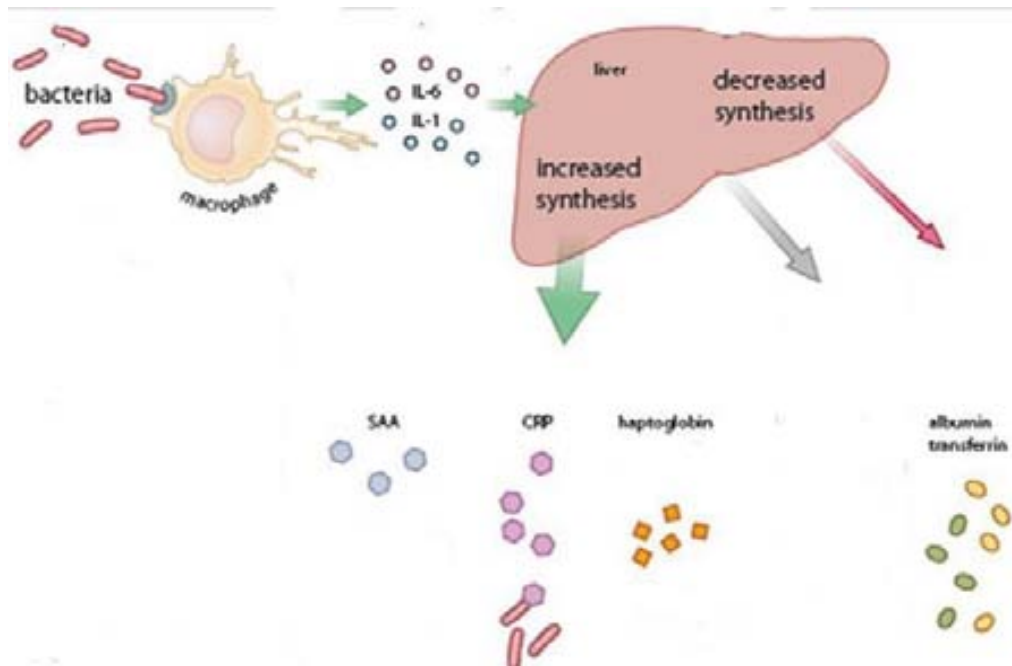


Figura 2: Principales componentes que intervienen en la respuesta de fase aguda (Rogier Trompert Medical Art <http://www.medical-art.eu/>).

La síntesis de algunas proteínas incrementa durante la respuesta de fase aguda (PFAs positivas), mientras que en otros casos disminuye su concentración (PFAs negativas). Se especula que la disponibilidad de aminoácidos se ve reducida al incrementarse la síntesis de PFAs positivas y por tanto se reduce la síntesis de otras (principalmente albúmina) (Ceciliani et al., 2002).

La cinética de la respuesta de PFAs varía en función de la especie animal y del tipo de agente inductor. En general la concentración máxima de PFAs se produce a las 24-48 horas del inicio de la respuesta y disminuye en el momento en que se produce una mejora del estado de salud (Eckersall, 2008).

Existe a su vez una interacción entre la respuesta inmune innata y los sistemas nervioso y endocrino. Así pues, el aumento de la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias y otros mediadores de la inflamación también activan rápidamente el sistema nervioso central que responde junto con el sistema inmune a través de rutas de señalización hormonales y neuronales (Sternberg, 2006). Las fibras C no mielinizadas del sistema nervioso periférico tienden a amplificar la respuesta inmune innata local, a través de un mecanismo que incluye la liberación de neuropéptidos (básicamente sustancia P). La sustancia P interacciona con los macrófagos a través del receptor NK-1R, estimulándose de esta forma la secreción de citoquinas proinflamatorias (figura 3).

Por otro lado, el sistema nervioso simpático y parasimpático inhibe la respuesta inmune innata. Los neurotransmisores noradrenalina y acetilcolina se unen a receptores de las células inmunitarias y producen la supresión de la producción de citoquinas proinflamatorias (Sternberg, 2006) (figura 3).

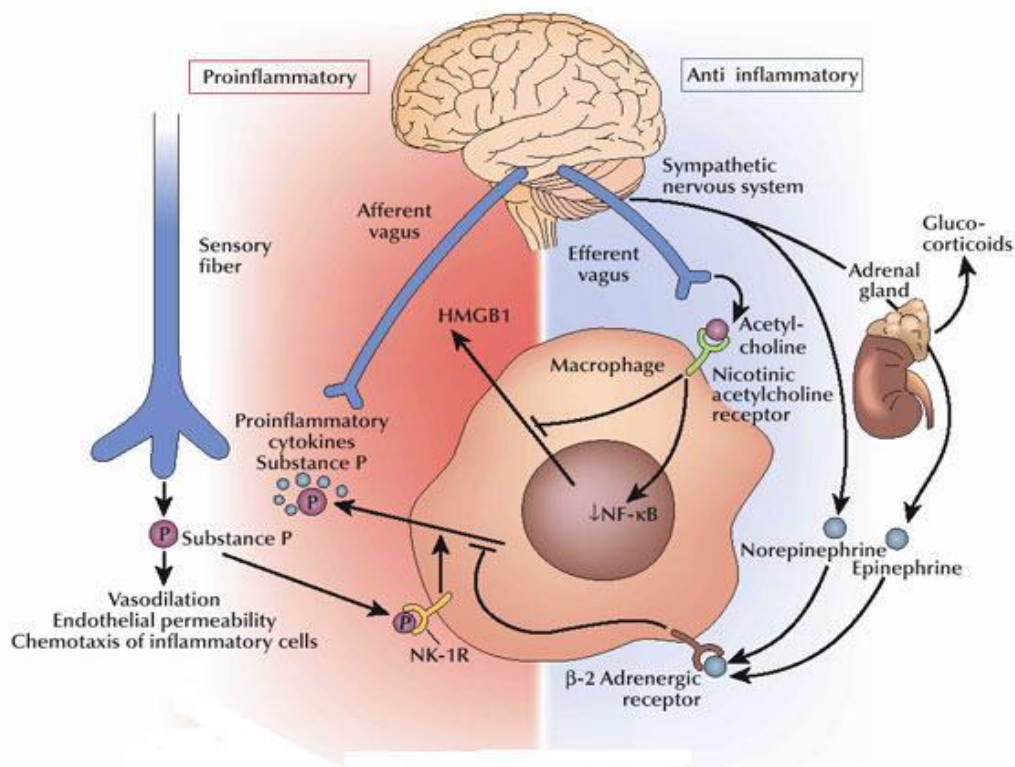


Figura 3: Esquema de las principales vías inmuno-neuroendocrinas que desencadenan efectos proinflamatorios y antiinflamatorios (Matthay and Ware, 2004).

Los estímulos proinflamatorios, físicos y psicológicos producen la activación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA), desencadenando la producción de cortisol. Éste, a

su vez, activa un mecanismo de retroalimentación negativo debido a que los corticoides inhiben la expresión de citoquinas proinflamatorias (Sternberg, 2006).

2.3.- INFLAMACIÓN CRÓNICA.

La respuesta de fase aguda está ampliamente evaluada en situaciones de inflamación aguda pero mucho menos en casos de inflamación crónica, aunque en medicina humana se utilizan PFAs como biomarcadores de algunas enfermedades que cursan con inflamación crónica (Levy et al., 2007) (Torres-Ramos et al., 2009).

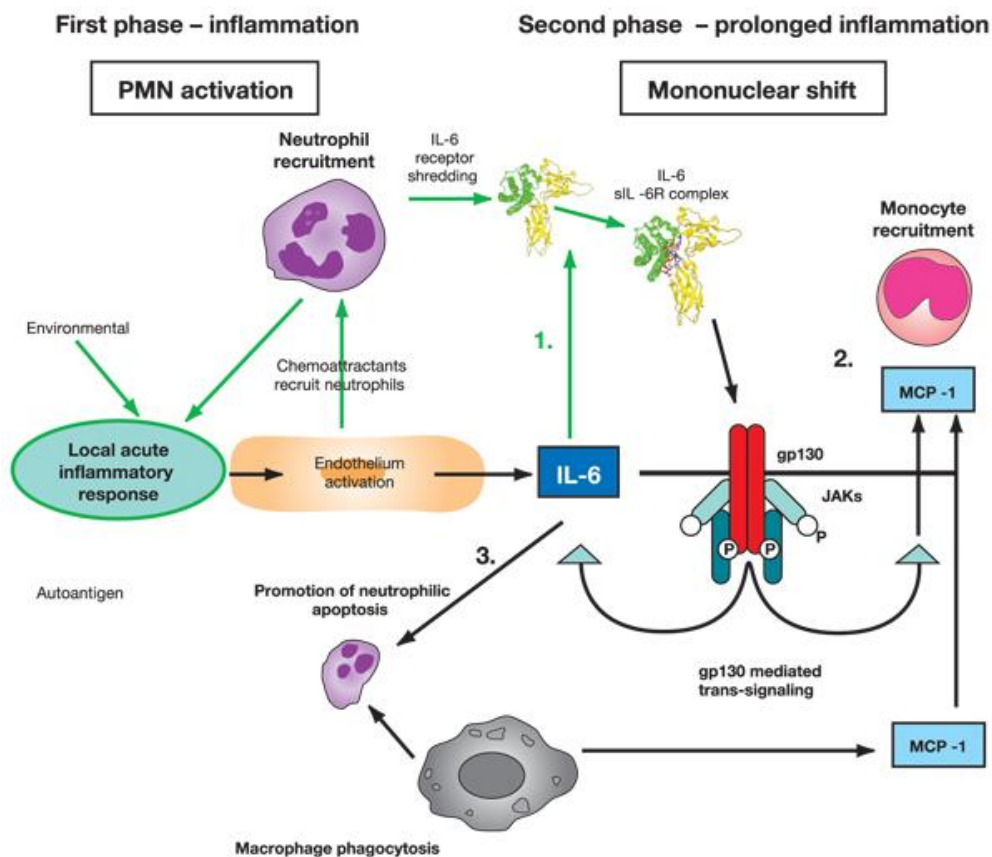


Figura 4: Modelo de transición de inflamación aguda a crónica en el cual la IL-6 juega un papel central. MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos (papel proinflamatorio: atrae a los monocitos a la zona de lesión para que se conviertan en macrófagos) (Gabay, 2006).

El mecanismo por el cual se produce la inflamación crónica no se conoce con precisión pero se postula que niveles persistentes de IL-6 inducen la transición a inflamación crónica (Borghetti et al., 2009). Tras una reacción inflamatoria aguda las células

endoteliales liberan quimioatrayentes que son los responsables del reclutamiento de neutrófilos y de la liberación, por parte de estos, del receptor soluble IL-6R α . Al unirse dicho receptor con la IL-6 secretada por las células endoteliales, se induce la producción de MCP-1 por parte de dichas células. Esto se lograría tras la unión del complejo sIL-6R α con la proteína de transducción gp130. Por otro lado los neutrófilos estimulados de forma continua por IL-6 derivan en apoptosis y pasan a ser fagocitados por los macrófagos incrementándose así la producción de MCP-1. La secreción continua de MCP-1 es la que favorece la transición de inflamación aguda (infiltrados de neutrófilos) a inflamación crónica (dominada por células inflamatorias mononucleares: macrófagos, linfocitos y células plasmáticas) (Gabay, 2006) (figura 4).

2.4.- CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y FUNCIÓN FISIOLÓGICA DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA.

En resumen, las PFAs son proteínas plasmáticas sintetizadas mayoritariamente por el hígado cuya concentración se altera en respuesta, principalmente, a inflamaciones, infecciones y traumas.

En todas las especies y teniendo en cuenta el tipo de respuesta, las PFAs se clasifican como positivas (incrementan su concentración plasmática durante la respuesta de fase aguda) o negativas (disminuyen su concentración). Las PFAs positivas se dividen en mayoritarias, moderadas o minoritarias en función de la intensidad de la respuesta que presentan (Eckersall, 2008). Las PFAs mayoritarias en animales sanos presentan una concentración muy baja en plasma (<0.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$). No obstante, en respuesta al estímulo, éstas incrementan su concentración en sangre de 100 a 1000 veces, apareciendo el pico máximo a las 24-48 horas de la agresión, y volviendo rápidamente a los valores normales durante la fase de recuperación. Las PFAs moderadas están presentes en la sangre de animales sanos pero su respuesta se caracteriza por un incremento en su concentración del orden de 5 a 10 veces. El pico máximo de las mismas se produce a los 2-5 días del efecto del estímulo y su concentración disminuye más lentamente que las proteínas mayoritarias. Las PFAs minoritarias incrementan gradualmente su concentración entre un 50% y un 100% su nivel basal.

Tabla 1: Proteínas de fase aguda positivas según especie animal.

Especie	PFA mayoritarias	PFA moderadas
Gato	SAA	GPA, Hp
Vaca	Hp, SAA	GPA
Perro	CRP, SAA	Hp, GPA, Cp
Caballo	SAA	Hp
Ratón	SAA	Hp, GPA
Cerdo	CRP, Pig-MAP	Hp, Cp
Rata	α 2-macroglobulina	Hp, GPA

SAA: Amiloide sérico A; CRP: Proteína-C-reactiva; Hp: Haptoglobina; Pig-MAP: *pig major acute phase protein*; GPA: α_1 glicoproteína ácida; Cp: ceruloplasmina.

Los hepatocitos son los principales responsables de la síntesis de las PFAs pero recientemente se han publicado estudios que demuestran que otros tejidos como pulmón, intestino e incluso células como adipocitos, incrementan la expresión de mRNA de PFAs tras la estimulación por citoquinas (Skovgaard et al., 2009). La glándula mamaria también sintetiza Hp y MAA (*mammary-associated serum amyloid A*), que incrementan de manera significativa durante las infecciones que afectan a la glándula (Eckersall, 2008).

En general, las funciones de las PFAs van dirigidas a contrarrestar la reacción inflamatoria, potenciar los procesos de curación y reparación, y restablecer la homeostasis (Gruys et al., 2005). Algunas de sus funciones todavía permanecen descritas de forma incompleta. A continuación se describen las características específicas de las PFAs más comunes en las especies domésticas.

Haptoglobina (Hp)

La Hp es una glicoproteína formada por 2 subunidades α y 2 subunidades β . La subunidad α presenta un peso molecular de 16 a 23 kDa y la subunidad β de 35 a 40 kDa. La Hp humana presenta tres subtipos descritos como polimorfismos genéticos según el tipo de subunidad α que presentan (Hp 1-1, Hp 1-2, Hp 2-2). La Hp canina es similar a la Hp 1-1 humana, mientras que la bovina se parece más a la Hp 2-2 humana (Eckersall, 2008).

Se ha demostrado una asociación entre determinados SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) en el gen porcino que codifica para la Hp y los niveles basales de Hp en el suero de esta especie (Diack et al., 2008). Esto podría llegar a permitir la selección de cerdos en relación a sus niveles basales de Hp y, por tanto, mejorar la resistencia de los animales frente a enfermedades (Clapperton et al., 2009).

La Hp presenta una elevada capacidad de unión a la hemoglobina, de forma que previene el daño oxidativo que pueden sufrir los tejidos debido a la actividad peroxidasa que presenta de forma inherente la hemoglobina libre. Además, gracias a la capacidad que tiene de unión al grupo hemo, reduce la disponibilidad del hierro necesario para el crecimiento de las bacterias (Eckersall, 2008).

Pig Major Acute Phase Protein (Pig-MAP)

La Pig-MAP (también conocida como ITIH4: *inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 4*) se ha identificado en la especie porcina como una glicoproteína de 120 kDa que muestra homología con las proteínas de la familia ITI (inhibidor de tripsina inter- α). Estas proteínas están formadas por dos cadenas pesadas (H1 y H2), covalentemente unidas mediante un enlace condroitín sulfato a una cadena ligera denominada bikunina (responsable de la actividad antiproteasa característica de estas proteínas) (Eckersall, 2008). La Pig-MAP no presenta la secuencia correspondiente a la bikunina y por tanto no presenta capacidad antiproteasa. A pesar de que la estructura de la Pig-MAP está bien definida, su función fisiopatológica es todavía desconocida (Lampreave et al., 1994) (Gonzalez-Ramon et al., 2000).

Proteína C-reactiva (CRP)

La CRP es una pentraxina formada por cinco subunidades, cada una de ellas con un peso molecular de ~20 kDa. Cada subunidad presenta sitios de unión para ligandos como la fosforilcolina y capacidad para unirse directamente a diferentes tipos de microorganismos activando la vía clásica del complemento, hecho que permite la opsonización de los microorganismos. El complejo resultante de la unión de CRP y patógenos interacciona con los receptores específicos de los fagocitos, induce la producción de citoquinas antiinflamatorias y modula la función de los neutrófilos (Eckersall, 2008).

Amiloide sérico A (SAA)

El SAA es una proteína hidrofóbica pequeña (9 a 14 kDa) que se encuentra en el suero asociada a lipoproteínas de alta densidad (HDL). Presenta un número variable de isoformas según la especie animal. En bovinos destaca la *milk-SAA* (MAA), cuya síntesis se induce en la ubre a causa de las mastitis (Eckersall, 2008).

Al SAA se le atribuyen diferentes tipos de funciones como son por ejemplo el transporte de colesterol de las células dañadas a los hepatocitos y la activación de plaquetas (Eckersall, 2008).

α_1 glicoproteína ácida (GPA)

La GPA es una de las proteínas plasmáticas con más puntos de glicosilación, con un elevado contenido de carbohidratos y un peso molecular de 43kDa. Presenta una elevada capacidad para unirse a compuestos farmacológicos pudiendo producir cambios en la farmacocinética de los medicamentos. Su habilidad para unirse a ligandos de bajo peso molecular le confiere un efecto protector al unirse a lectinas tóxicas y endotoxinas (Eckersall, 2008).

2.5.- PROTEÍNAS DE FASE AGUDA COMO BIOMARCADORES EN MEDICINA HUMANA Y VETERINARIA.

La determinación de la concentración de PFAs en suero o plasma es una herramienta ampliamente utilizada en medicina humana. En los animales domésticos son cada vez más los estudios que se realizan para evaluar la utilidad de estos parámetros en medicina y producción animal y que demuestran la capacidad que tienen de actuar como un “termómetro molecular”. Se trata de parámetros bioquímicos que proporcionan información diagnóstica, de pronóstico y de monitorización de los pacientes bajo control veterinario. Son parámetros inespecíficos indicadores de la presencia de condiciones inflamatorias pero que no indican su causa. Su determinación es especialmente útil para monitorizar la evolución clínica y evaluar la respuesta al tratamiento (Eckersall and Bell, 2010).

2.5.1.- Proteínas de fase aguda en medicina humana.

Las indicaciones clínicas de la medición de la concentración de las PFA en el plasma son múltiples. La CRP es la PFA más utilizada en la especie humana; su concentración se incrementa a las 6-8 h de producirse la inflamación, llegando a su concentración máxima aproximadamente a las 48 h. Los niveles plasmáticos de CRP suelen ser más altos en infecciones bacterianas que en infecciones víricas. Su determinación se utiliza principalmente para monitorizar enfermedades inflamatorias como por ejemplo la artritis reumatoide, en la exploración de la septicemia y meningitis neonatales, y para detectar el posible riesgo de sufrir enfermedades coronarias (Johnson, 2006).

2.5.2.- Proteínas de fase aguda en pequeños animales.

En perros y gatos se han definido las alteraciones que sufren las PFAs en diferentes tipos de patologías, a pesar de que en el gato la respuesta de PFAs no se ha estudiado tan extensamente como en el perro. Ambas especies muestran pequeñas diferencias en cuanto al comportamiento de las PFAs; en el perro se considera la CRP y la SAA como las principales PFAs mientras que en el gato son la SAA y la GPA (Ceron et al., 2005).

El recuento de células blancas (WBC) es un test clásico que se utiliza ampliamente en estas especies para el diagnóstico y monitorización de las enfermedades que cursan con inflamación. Existe cierta relación entre el WBC y la concentración plasmática de PFAs (Ceron et al., 2005), pero se considera que la determinación de PFAs presenta ventajas con respecto al WBC. Por ejemplo, las PFAs se incrementan en determinados casos en los que no se observan cambios en el WBC, son más estables que los componentes celulares de la sangre y, en teoría, la respuesta de PFAs es más rápida que los cambios producidos en el WBC (Ceron et al., 2005).

En la especie canina se ha demostrado el incremento de la concentración sanguínea de PFAs en enfermedades gastrointestinales, pancreatitis, síndrome inflamatorio de respuesta sistémica (SIRS), neoplasias, hiperadrenocorticismos y en meningitis-arteritis que responde a corticosteroides. También se describen incrementos de la concentración plasmática de CRP en numerosas enfermedades infecciosas como por ejemplo la leishmaniosis, babesiosis, leptospirosis, parvovirus y en la endotoxemia producida por *Escherichia coli* (Eckersall and Bell, 2010).

En la especie felina la determinación de GPA es un biomarcador reconocido de peritonitis infecciosa felina. La SAA es la PFA que responde de forma más rápida en esta especie y se ha demostrado su utilidad diagnóstica y de monitoreo en determinadas enfermedades inflamatorias e infecciosas (Eckersall and Bell, 2010).

2.5.3.- Proteínas de fase aguda en rumiantes.

Las PFAs mayoritarias en rumiantes son la Hp y la SAA. La determinación de Hp es una herramienta de ayuda en el diagnóstico y pronóstico de mastitis, enteritis, peritonitis, neumonía, endocarditis y endometritis. La concentración plasmática de SAA bovina se incrementa más en procesos agudos que en procesos crónicos y una isoforma de SAA (M-SAA3) se secreta en la leche de vacas con mastitis (Cecilianí et al., 2012). En estas especies también se utiliza la determinación de PFAs para evaluar el estado de bienestar de los animales (Eckersall and Bell, 2010).

2.5.4.- Proteínas de fase aguda en la especie equina.

Como sucede en el gato, hay pocos estudios relacionados con las PFAs en la especie equina. La SAA es la PFA mayoritaria en el caballo, su concentración es muy baja o indetectable en caballos sanos, y responde de forma muy rápida a los estímulos inflamatorios. La SAA equina tiene una vida media muy corta, lo que permite evaluar de forma eficaz la resolución de las enfermedades. Se han descrito concentraciones plasmáticas de SAA incrementadas en artritis infecciosas (también se puede determinar su concentración en el líquido sinovial), neumonías y en la infección por el virus de la influenza. La determinación de SAA también se ha propuesto con el objetivo de ayudar a detectar enfermedades de difícil diagnóstico en potros neonatos que muestran debilidad y sintomatología clínica inespecífica (Jacobsen and Andersen, 2007).

2.5.5.- Proteínas de fase aguda en la especie porcina.

En la especie porcina se han realizado diferentes trabajos que estudian la respuesta de PFAs bajo diferentes condiciones.

2.5.5.1.- Proteínas de fase aguda en procesos inflamatorios inducidos experimentalmente.

En cerdos se ha inducido la inflamación aguda en modelos experimentales no infecciosos, utilizando la aplicación subcutánea de turpentina (Lampreave et al., 1994). Este modelo ha permitido caracterizar la respuesta de PFAs en esta especie y describir que las proteínas que mayormente modifican su concentración plasmática en estas condiciones son la Hp, CRP y Pig-MAP.

La exposición de los animales a microorganismos generalmente se asocia a inflamación y a la producción de citoquinas y, por tanto, el inicio de la respuesta de PFAs. En la especie porcina existe un amplio número de estudios experimentales con infecciones bacterianas o víricas.

Las principales finalidades de estos ensayos son ampliar los conocimientos sobre la respuesta de fase aguda e investigar la utilización de las PFAs como herramientas para la evaluación de agentes antimicrobianos y antiinflamatorios, así como para incluirlas en los estudios sobre la eficacia de vacunas. En general, el protocolo que se sigue en estos estudios se inicia con la inoculación del agente infeccioso que puede ser por diferentes vías. A continuación se recogen muestras de sangre a diferentes períodos post-inoculación y se mide la concentración de las principales PFAs en plasma o suero.

Infecciones bacterianas

La cinética de la respuesta de Hp, Pig-MAP, CRP y SAA es similar en las infecciones de *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Las concentraciones plasmáticas de Hp y Pig-MAP se incrementan rápidamente y de forma prolongada. En cambio, las de CRP y SAA muestran incrementos muy rápidos pero los valores de normalidad se restablecen antes, sobretodo en el caso de la SAA (Heegaard et al., 1998) (Sjolund et al., 2011) (Sorensen et al., 2006). Los niveles de concentración de las PFAs se correlacionan con el grado de afectación clínica de los animales y en el caso de *A. pleuropneumoniae* se detectan antes que los anticuerpos específicos frente a la bacteria (Heegaard et al., 1998).

En uno de los mencionados estudios en el cual se infectan cerdos con *A. pleuropneumoniae* (Sjolund et al., 2011) se utilizó la determinación de PFAs para evaluar la eficacia de tres antimicrobianos: penicilina, enrofloxacin y tetraciclina. Los animales

que recibieron el tratamiento con enrofloxacin respondieron con niveles plasmáticos más bajos de Hp y Pig-MAP. De hecho, estos animales no seroconvirtieron frente a *A. pleuropneumoniae* y al provocar una reinfección con el patógeno, ya sin el uso de antibiótico, los animales desarrollaron la enfermedad. En cambio los animales que recibieron los tratamientos con los otros dos fármacos presentaron concentraciones más elevadas de PFAs, seroconvirtieron frente a *A. pleuropneumoniae* y no desarrollaron síntomas clínicos tras la reinfección. En este caso la determinación de PFAs sirvió para evaluar el tipo de respuesta de fase aguda que desarrollan los animales en función del tratamiento antibiótico suministrado. El antimicrobiano que resultó ser más efectivo en la fase inicial (enrofloxacin) impidió en gran medida la infección y una respuesta inmunitaria específica, así como el desarrollo de una adecuada respuesta de fase aguda (Sjolund et al., 2011). De ahí que la subsiguiente reinfección provocara el desarrollo clínico de la enfermedad.

Un estudio reciente sobre infección experimental con *Haemophilus parasuis* (agente etiológico de la enfermedad de Glässer) utilizó la determinación de PFAs para determinar la eficacia de diferentes tipos de vacunas. Se evaluó la respuesta de PFAs en animales vacunados previamente a la inoculación con esta bacteria. Los animales que presentaron una protección más efectiva frente a la enfermedad mostraron concentraciones de Hp, CRP y Pig-MAP post-inoculación más bajas (Martinez-Martinez et al., 2011)

Las concentraciones séricas de CRP y Hp también se incrementan tras infecciones experimentales producidas por *Yersinia enterocolitica* (Platt-Samoraj et al., 2009) y *Pasteurella multocida* (Pomorska-Mol et al., 2011).

Infecciones víricas

En las infecciones producidas por el virus de la peste porcina Africana (ASFV) y virus de la enfermedad de Aujeszky (ADV) se desarrolla una respuesta de fase aguda caracterizada por el incremento de la concentración plasmática de Pig-MAP, Hp y CRP, aunque se observaron diferentes patrones de respuesta (Carpintero et al., 2007). La concentración de CRP se modificó ligeramente en el caso de la infección con ASFV, pero en cambio incrementó considerablemente en la infección con ADV. Pig-MAP y Hp incrementaron su concentración en sangre en ambas enfermedades, pero se comportaron de forma diferente. Así, en la infección por el ASFV la concentración plasmática máxima de Hp (4-5 días post-infección) apareció antes que la de Pig-MAP (día 6 post-infección). Los cambios en la concentración de Pig-MAP evolucionaron de

modo paralelo a los niveles de viremia observados en los cerdos inoculados y su concentración se incrementó, relativamente, más que la de Hp. En el caso de la infección por ADV, las concentraciones plasmáticas de Pig-MAP y Hp siguieron la misma cinética (la concentración máxima se obtuvo el día 7 post-infección), pero los niveles de Hp se incrementaron considerablemente más que los de Pig-MAP.

En otro estudio se describe un incremento significativo de la concentración plasmática de SAA, CRP y Hp en infecciones experimentales realizadas con el ASFV y el virus de la peste porcina clásica (CSFV), siendo el incremento de la concentración plasmática de SAA el más destacado (Sanchez-Cordon et al., 2007). En ambos casos se restablecieron las concentraciones de PFAs normales rápidamente.

Dos de las enfermedades que actualmente causan un impacto económico importante en las explotaciones porcinas son el síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) y la circovirus porcina (CP), causadas respectivamente por el virus del PRRS (PRRSV) y circovirus porcino tipo 2 (PCV2).

El PRRSV se caracteriza por presentar una respuesta inmunitaria innata débil y sobretodo una producción muy baja de interferón gamma (IFN- γ). La infección por PRRSV no produce cambios muy significativos en la concentración de citoquinas proinflamatorias por lo que no se induce una respuesta de fase aguda eficiente (Gomez-Laguna et al., 2010a) (Subramaniam et al., 2011). Un estudio reciente también muestra que en animales infectados con PRRSV se produce una respuesta inflamatoria débil y que sólo incrementa claramente la CRP (Heegaard et al., 2011). Por el contrario, en otras infecciones experimentales con PRRSV la concentración de Hp se incrementó de forma significativa a los 7 días post-inoculación y se mantuvo hasta el día 21 post-inoculación (Asai et al., 1999) (Diaz et al., 2005). Otros autores también describen un aumento de las concentraciones plasmáticas de Hp y CRP, llegando a una concentración máxima el día 21 post inoculación. La CRP presenta una cinética similar a la Hp, al contrario de lo que sucede en algunas de las infecciones bacterianas descritas en el apartado anterior (Gomez-Laguna et al., 2010a, Gomez-Laguna et al., 2010b).

En animales infectados por PCV2 también se incrementa la concentración de CRP a partir del tercer día post infección, pero las diferencias entre animales enfermos y animales con infección subclínica se detectó solamente el día 14 post infección (Stevenson et al., 2006).

El virus de la influenza porcina (SIV) es uno de los principales agentes etiológicos que produce enfermedades de tipo respiratorio en el cerdo. Con este virus se han realizado estudios experimentales diseñados para evaluar la respuesta de fase aguda y muestran las concentraciones séricas más elevadas de CRP y Hp a las 48h post-infección (Barbe et al., 2011). Otros autores también describen incrementos en la concentración de SAA a los tres días post-inoculación, en cambio no detectan cambios en la Pig-MAP (Pomorska-Mol et al., 2012a).

2.5.5.2.- Proteínas de fase aguda en condiciones de campo.

En infecciones naturales, la respuesta de PFAs es, en general, mayor en animales que presentan síntomas clínicos y que además presentan infecciones víricas concurrentes con infecciones bacterianas. Se describe una respuesta de PFAs de mayor magnitud en enfermedades bacterianas (*Mycoplasma hyopneumoniae*) y en CP comparada con la que se observa en cerdos afectados por PRRS o enfermedad de Aujeszky (Parra et al., 2006). De hecho, animales infectados de forma natural por el ADV sólo muestran variaciones en la concentración de Hp (Parra et al., 2006). Hp y CRP incrementan más en aquellos cerdos con PRRS que además presentan una infección concomitante con *M. hyopneumoniae* (Gutierrez et al., 2009). Pig-MAP y Hp sólo incrementan de forma significativa en animales que desarrollan clínicamente CP (Grau-Roma et al., 2009) (Segales et al., 2004).

Algunos autores proponen la determinación de PFAs como herramienta para el diagnóstico diferencial de enfermedades que provocan emaciación en cerdos de engorde. De hecho se observa concentraciones más elevadas de CRP en cerdos con CP que en cerdos con clínica respiratoria asociada al complejo respiratorio porcino (PRDC), mientras que estos últimos se caracterizan por presentar unas concentraciones bastante más elevadas de Hp (Quereda et al., 2012).

2.5.5.3.- Proteínas de fase aguda en condiciones subclínicas.

Las infecciones subclínicas se suelen presentar con bastante frecuencia en las explotaciones porcinas. La exposición a los patógenos que producen este tipo de infecciones tiene cuatro efectos principales: (1) reducción en la ingestión diaria de alimento (2) aumento en las necesidades de proteína y energía para mantenimiento,

debido a la necesidad de reparar los daños tisulares, (3) menor eficacia en la utilización de los ingredientes del alimento, como la proteína y la energía, e (4) incapacidad de los animales de alcanzar su potencial de crecimiento. Algunos de estos fenómenos son consecuencia directa de la respuesta inmune frente a los patógenos, especialmente en cerdos que no han tenido contacto previo con ellos (Kyriazakis, 2008). La detección de este tipo de infecciones subclínicas puede ayudar a mejorar el bienestar de los animales además de evitar que se produzcan pérdidas económicas significativas. La determinación de PFAs se puede considerar un biomarcador temprano de este tipo de infecciones, pues la respuesta de fase aguda es muy rápida y se produce antes que se desarrolle la respuesta inmune específica (Ceron et al., 2005).

Por ejemplo, en la infección experimental inducida con *S.suis* (Sorensen et al., 2006) se observó como un animal que no desarrolló sintomatología clínica, y que por tanto presentaba una infección subclínica, desarrolló respuesta detectable de PFAs. Por otro lado, en una infección subclínica experimental causada por el virus de la gripe H1N1 se detectaron niveles elevados en la concentración sérica de Hp y SAA antes de que aparecieran anticuerpos específicos en sangre (Pomorska-Mol et al., 2012b). Igualmente, en una infección experimental con *A. pleuropneumoniae*, se detectaron niveles de PFAs antes que los anticuerpos específicos frente a esta bacteria (Heegaard et al., 1998). Asimismo, también se han detectado niveles de estas proteínas antes que se pudiera demostrar seroconversión en animales que enferman de forma natural por las infecciones con el PRRSV y *M. hyopneumoniae* (Parra et al., 2006). No obstante, sería conveniente contrastar de forma más clara si la respuesta de fase aguda se puede utilizar como biomarcador de infección subclínica en la especie porcina.

2.5.5.4.- Proteínas de fase aguda como indicadores de parámetros productivos.

En el cerdo se ha descrito que las PFAs se pueden utilizar como biomarcadores para valorar los rendimientos zootécnicos. Así, existe una correlación inversa entre niveles séricos de PFAs y los parámetros productivos (a mejores parámetros productivos, menores concentraciones séricas de PFA).

Se ha propuesto que la determinación de la concentración de Hp en suero de cerdos con 7 semanas de edad puede ser un indicador de la ganancia de peso que van a tener los animales (Eurell et al., 1992). Aquellos animales que presentaron concentraciones más bajas de Hp a las 7 semanas de vida tuvieron una mayor ganancia de peso (el estudio

finalizó cuando los animales tenían 13 semanas de edad). Los niveles altos de Hp también se han asociado a una disminución del rendimiento productivo en animales de 24 semanas de edad (Clapperton et al., 2005a) y a una menor ganancia de peso diaria en animales en período post destete (Hiss and Sauerwein, 2003).

Tabla 2: Resumen de las PFAs y patógenos que más frecuentemente afectan a la especie porcina y que se han estudiado tanto en infecciones experimentales como en condiciones de infección natural.

PATÓGENO	PFA	Referencias
<i>Streptococcus suis</i>	CRP, Hp, Pig-MAP, SAA.	Sorensen et al., 2006.
<i>Pasteurella multocida</i>	Hp, Pig-MAP CRP, SAA.	Pomorska-Mól et al., 2011.
Virus de la peste porcina Africana	CRP, SAA.	Sánchez-Cordón et al., 2007. Carpintero et al., 2007. Parra et al., 2006.
Virus de la peste porcina clásica	CRP, SAA.	Sánchez-Cordón et al., 2007.
<i>Haemophilus parasuis</i>	CRP, HP, Pig-MAP.	Martínez-Martínez et al., 2011.
Virus de la enfermedad de Aujeszky	CRP, HP, Pig-MAP.	Carpintero et al., 2007. Parra et al., 2006.
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	CRP, Hp, Pig-MAP, SAA.	Heegaard et al., 1998. Sjölund et al., 2011.
Virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino	CRP, Hp.	Asai et al., 1999. Gómez-Laguna et al., 2010. Heegaard et al., 2011.
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	CRP, Hp.	Gutierrez et al., 2009.
Circovirus porcino tipo 2	CRP, Hp, Pig-MAP.	Stevenson et al., 2006. Quereda et al., 2011. Grau-Roma et al., 2009. Segalés et al., 2004.

2.5.5.5.- Proteínas de fase aguda en cerdos de matadero como marcadores del estado sanitario.

Recientemente se han realizado estudios que indican que se podría utilizar la determinación de las PFAs como complemento a la inspección *ante mortem* de los animales. Ello podría ofrecer información del grado de bienestar y salud de las granjas de las cuales proceden los cerdos, teniendo en cuenta que animales aparentemente sanos que llegan al matadero pueden presentar un estado crónico de enfermedad.

Los resultados que relacionan el incremento de la concentración de PFAs en patologías crónicas de la especie porcina son escasos. Se ha descrito el incremento de la concentración de Hp en plasma de animales con inflamación crónica en los pulmones de origen no infeccioso, inducida de forma experimental mediante la administración intravenosa del adyuvante completo de Freund (Melchior et al., 2004).

La determinación de la concentración de PFAs en animales de matadero suele reflejar situaciones de inflamación crónica derivadas de enfermedades que han sufrido los animales a lo largo de su ciclo productivo. Se ha visto que la concentración de Hp en cerdos en edad de sacrificio pero procedentes de granjas con diferentes estados sanitarios muestran valores medios distintos (Petersen et al., 2002a). Por tanto, se considera que la determinación de Hp en matadero puede ser de uso potencial para identificar problemas en las granjas (van den Berg et al., 2007).

La consolidación pulmonar cráneo-ventral (CVPC) y la pleuritis son las lesiones patológicas que se encuentran de forma más frecuente en pulmones de cerdos en el matadero, siendo *M. hyopneumoniae* y *A. pleuropneumoniae* los patógenos respiratorios primarios más importantes que están involucrados en la etiopatogenia de ambos cuadros, respectivamente. Estas patologías se asocian con pérdidas económicas importantes debidas principalmente a una disminución del crecimiento y del índice de conversión.

En los últimos años se han publicado estudios que correlacionan los niveles de PFAs de cerdos en matadero con este tipo de lesiones. La concentración de Hp es significativamente más alta en animales con lesiones de CVPC en comparación con animales sin este tipo de lesiones (Amory et al., 2007). Se han descrito también diferencias significativas en las concentraciones de CRP y Hp cuando se comparan animales sin síntomas clínicos pero con lesiones pulmonares (80% de los animales con

CVPC y 20% de los animales con pleuritis) con animales sin lesiones pulmonares y que no tenían sintomatología clínica respiratoria (Pallares et al., 2008).

2.5.5.6.- Caracterización de la respuesta de proteínas de fase aguda en situaciones de estrés.

La especie porcina está generalmente expuesta a condiciones ambientales estresantes que pueden afectar a la respuesta inmunitaria y favorecer el riesgo de padecer enfermedades. El transporte, estrés social, calor y cambios en el tipo de alimentación son algunas de las principales causas que producen estrés. El bienestar de los animales durante el transporte al matadero es importante ya que el impacto del estrés está muy relacionado con la calidad de la carne (Foury et al., 2011).

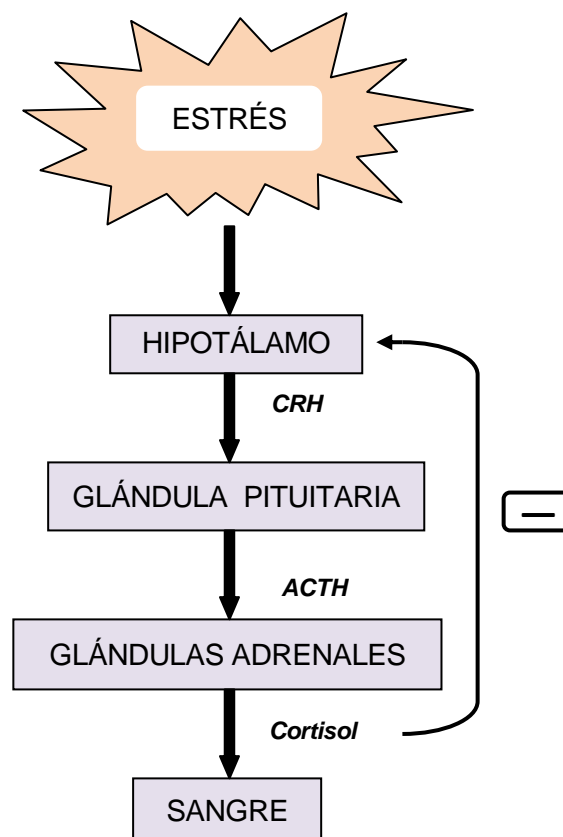


Figura 5: Estimulación del eje hipotálamo-pituitario-adrenal en respuesta al estrés. CRH (corticotropina), ACTH (adrenocorticotropina).

Existen diferentes estudios que indican que el estrés puede inducir una respuesta de PFAs. En respuesta al estrés se activa el eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) produciendo un incremento en la liberación de corticotropina (CRH) que a su vez estimula la glándula pituitaria anterior liberando adrenocorticotropina (ACTH); esta última estimula la producción de glucocorticoides en la glándula adrenal (figura 5). Se describe a los glucocorticoides como los responsables de la activación de la síntesis de PFAs en situaciones de estrés, pero los mecanismos a través de los cuales actúan no están todavía bien definidos. Lo que está más documentado es la capacidad que presentan los glucocorticoides de inhibir la síntesis de citoquinas, pero por otro lado se ha sugerido que la respuesta de fase aguda puede ser debida a que los glucocorticoides pueden aumentar la producción de algunas citoquinas (Murata et al., 2004) (Sorrells and Sapolsky, 2007).

Por otra parte, existe controversia sobre el efecto del estrés en la concentración de PFAs, dado que es difícil diferenciarlo del efecto que también ejercen los traumas o las infecciones subclínicas (Petersen et al., 2004). A pesar de esto, hay estudios (descritos a continuación) en los cuales se plantea la utilidad de las PFAs como indicadores del grado de estrés que sufren los animales.

Se ha demostrado que la concentración sanguínea de PFAs se incrementa tras un transporte prolongado o debido a cambios en el régimen de alimentación y de manejo en general. En un estudio se ha descrito que los animales que se someten a un transporte de 6 h presentan concentraciones altas de Pig-MAP y Hp en muestras obtenidas después del aturdimiento en el matadero (20 -21 horas después del inicio del transporte) (Saco et al., 2003). CRP y SAA también incrementan en animales que han permanecido 6 h en matadero después de realizar un transporte de 12 h, mientras que Pig-MAP y Hp presentan incrementos más moderados, probablemente porque son proteínas de respuesta más lenta (Pineiro et al., 2007a). No solamente la duración del transporte afecta a las PFAs, sino también las condiciones en las que se desarrolla. Además se mostró que la concentración de Pig-MAP obtenida en los animales sometidos a un transporte de 24 h sin acceso a agua, comida ni presencia de serrín como cama de los animales fue de 3.28 mg/mL de media. Ello contrastó con el valor de 1.39 mg/mL de concentración sérica de Pig-MAP que presentaban animales que habían finalizado un transporte de 48 h pero con serrín, agua y comida, además de disponer de mayor espacio por cada animal (Pineiro et al., 2007a).

La duración del período de estabulación después del transporte y que precede al sacrificio de los animales es un factor que puede afectar a los cambios que se dan en las

concentraciones de PFA, ya que se requieren unas horas para que la síntesis hepática de PFAs tenga lugar. Así lo exponen algunos autores que no detectan alteraciones en las concentraciones de PFA debidas al transporte (Weschenfelder et al., 2012).

La concentración de PFAs también se incrementa debido al estrés que sufren los animales al tener que adaptarse a un nuevo entorno. En un estudio en el cual las PFAs presentaron concentraciones bajas transcurridos 5 días después del transporte, éstas incrementaron a los 14 días debido a la adaptación a un nuevo entorno (Salamano et al., 2008).

Las alteraciones en el patrón de la alimentación que reciben los animales también pueden afectar al bienestar animal y pueden producir estrés. Se observaron niveles de Pig-MAP, Hp y CRP más elevados en animales que se sometieron a un patrón de alimentación desordenado (a lo largo del día se alternaban períodos de libre acceso a la comida con períodos en donde se retiraba la comida de los comederos) en comparación con las concentraciones que presentan los animales que recibieron un tipo de alimentación *ad libitum*. Estas diferencias se correlacionaron de forma inversa con la ganancia de peso diaria (Pineiro et al., 2007b).

Otro de los factores al que actualmente se le está prestando especial atención es la densidad de estabulación. Cerdos que permanecen alojados en corrales a alta densidad presentan concentraciones de Pig-MAP más elevadas que los que están en espacios más amplios. En este mismo estudio se evaluaron también biomarcadores de estrés (cortisol, indicadores de estrés oxidativo, etc.) que se correlacionaron con la Pig-MAP (Marco-Ramell et al., 2011).

2.5.5.7.- Valores de referencia de proteínas de fase aguda en la especie porcina.

Recientemente se han publicado dos estudios en los cuales se caracterizan y obtienen valores de referencia para PFAs en cerdos de diferentes edades, orígenes y líneas genéticas (Pineiro et al., 2009a) (Diack et al., 2011). Las conclusiones más destacadas son que las concentraciones de Hp y Pig-MAP en cerdos de engorde muestran diferencias en función de la edad, el sexo (la concentración de Hp es mayor en cerdas que en verracos, con la Pig-MAP se observa el efecto contrario) y que en cerdos jóvenes las concentraciones plasmáticas de Pig-MAP son más elevadas probablemente debido al estrés que sufren los animales después del destete (Pineiro et al., 2009a). La

concentración de CRP muestra diferencias entre diferentes líneas genéticas (Diack et al., 2011). Los dos estudios citados muestran una correlación significativa entre Pig-MAP, CRP y Hp.

Las concentraciones plasmáticas de PFAs en los trabajos disponibles en la literatura emplean métodos diferentes para su determinación, con lo que no se puede realizar una comparación directa entre los estudios, dada la existencia de diferencias entre las técnicas utilizadas. Esta problemática hace necesario establecer métodos y calibradores de referencia para que se puedan comparar, de un modo más sencillo, los resultados obtenidos entre diferentes laboratorios.

2.5.5.8.- Métodos analíticos para la determinación de proteínas de fase aguda en la especie porcina.

Existen diferentes métodos comerciales específicos para la determinación de PFAs que se han validado para la especie porcina (Tabla 3). Se trata principalmente de kits ELISA para Hp, Pig-MAP, CRP y SAA y de un método espectrofotométrico para la Hp basado en la actividad peroxidasa de los complejos Hp-hemoglobina.

El principal problema que presenta la técnica ELISA es la elevada imprecisión que se observa, obteniéndose valores de coeficiente de variación interdiaria (CV_{inter}) superiores al 20% (Tecles et al., 2007). Se trata de técnicas ELISA en las que se requiere realizar dilución de las muestras con lo cual se añade un componente importante que incrementa la imprecisión.

Por otro lado, la hemólisis afecta a la determinación de la Hp utilizando el método basado en la actividad peroxidasa de la hemoglobina, ya que la hemoglobina libre de la muestra reacciona con la Hp alterándose de esta forma los resultados. Por tanto hay que tener en cuenta que muestras hemolíticas no se deberían procesar mediante este método (Tecles et al., 2007).

Existen métodos para la determinación de PFAs en muestras humanas que se han validado para la especie porcina. Por ejemplo, la CRP porcina presenta cierto grado de homología con la CRP humana y se ha demostrado que los reactivos inmunoturbidimétricos desarrollados para la especie humana pueden funcionar con muestras porcinas (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). La ventaja que presenta la

adaptación de los métodos de humana para poder ser utilizados con muestras de origen animal, radica principalmente en que al tratarse de métodos automatizados presentan una mejor precisión, son métodos robustos y adecuados para su uso rutinario.

De todas formas, para armonizar los resultados de PFAs en las diferentes especies animales se deberían desarrollar materiales y métodos de referencia para estandarizar los ensayos a nivel internacional.

Tabla 3: Ejemplos de diferentes métodos y fabricantes de reactivos para la determinación de PFAs en suero porcino.

REACTIVO	METODOLOGÍA	Fabricante/distribuidor Referencia	Especificidad
PIG Haptoglobin ELISA Test kit	ELISA tipo sándwich	Life Diagnostics, Inc.	Porcino
RIDASCREEN Haptoglobin	ELISA competitivo	R-Biopharm AG.	Porcino
Tridelta PHASE Haptoglobin Assay	Espectrofotométrico	Tridelta Development Ltd.	Multiespecies
Porcine Hp SRID	Inmunodifusión radial	Cardiotech services, Inc.	Porcino
PIG CRP ELISA Test kit	ELISA tipo sándwich	Life Diagnostics, Inc.	Porcino
Phase Porcine CRP Assay kit	ELISA tipo sándwich	Tridelta Development Ltd.	Porcino
C-Reactive Protein	Inmunoturbidimetría	RANDOX (Kjelgaard-Hansen, M. 2007)	Humana validado en cerdo
PigMAP® Kit ELISA	ELISA tipo sándwich	PigCHAMP® Pro Europa	Porcino
Stick PigMAP®	Inmunocromatografía	PigCHAMP® Pro Europa	Porcino

2.6.- VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

2.6.1.- Aspectos generales.

Como se ha comentado anteriormente, la determinación de las PFAs se realiza empleando métodos de tipo colorimétrico (para Hp) e inmunoanálisis (ELISA, inmunturbidimetría, etc.). Actualmente, no existen métodos recomendados para la determinación de PFAs en muestras de origen animal, ni materiales de referencia para asignar valores a los calibradores de los métodos.

Los métodos comerciales deben estar validados por el fabricante (Directiva 98/79/CE) y los desarrollados por el laboratorio deben ser completamente validados por él mismo, ya que así se especifica en las actuales normas de calidad específicas para los laboratorios de análisis (ISO 15189). Por tanto cada laboratorio debe validar sus métodos de análisis siguiendo las recomendaciones que se especifican en la bibliografía por los organismos expertos, en concreto la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Biología Molecular (SEQC) y el *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

La principal característica metrológica a evaluar, y que siempre debe confirmar el laboratorio aunque se trate de métodos comerciales, es la exactitud (se relaciona de forma inversa con el error de medida). Ésta se define como el grado de concordancia entre el resultado de la medición y el valor verdadero del mesurando. Engloba la precisión (error aleatorio) y la veracidad (error sistemático) (figura 6). Una buena exactitud permite obtener resultados con los que se puede realizar una interpretación clínica correcta (comparación con valores de referencia, discriminantes, etc.) y comparar con otros resultados del mismo animal obtenidos en diferentes ocasiones o en distintos lugares. Las metodologías que existen para estimar la exactitud de los procedimientos de medida están bien establecidas y son las mismas tanto en humana como en veterinaria.

Otro aspecto muy importante es que los resultados obtenidos deben de ser trazables. La trazabilidad relaciona el resultado con referencias establecidas (patrones nacionales e internacionales), permitiendo la comparabilidad de los resultados en el tiempo y entre laboratorios. Es decir, deben emplearse procedimientos de medida con calibradores que tengan el valor asignado trazable, siendo este un requisito que deben garantizar los fabricantes de reactivos (Directiva 98/79/CE).

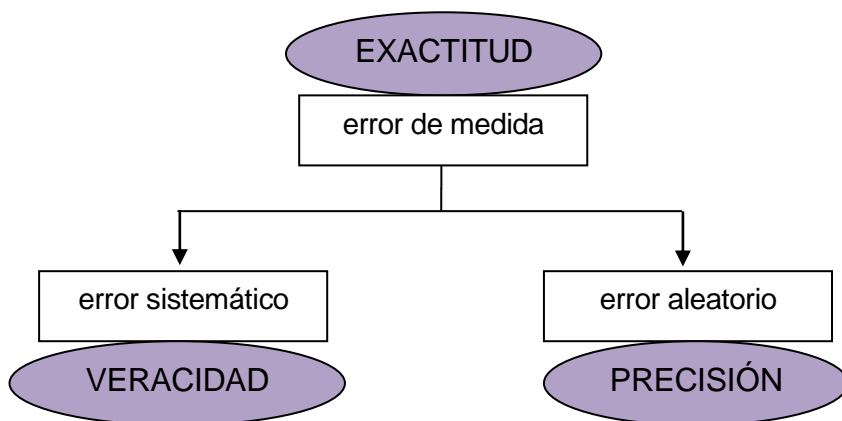


Figura 6: Componentes de la exactitud. Relación entre los distintos tipos de error y los correspondientes conceptos cualitativos.

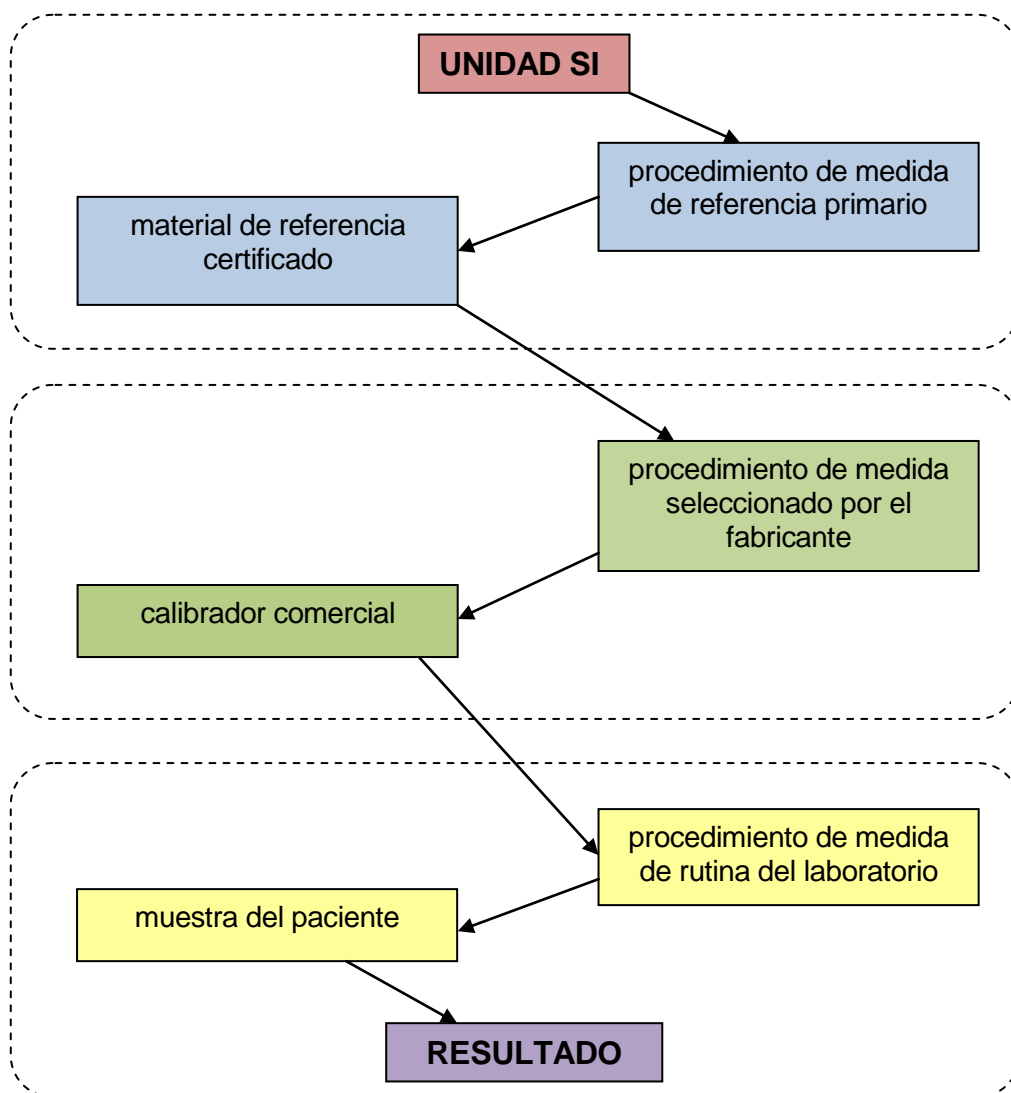


Figura 7: Diferentes niveles que forman parte de la cadena de trazabilidad, (SI: sistema internacional).

Para que se establezca de forma correcta la cadena de trazabilidad, los procedimientos de medida que forman parte de la cadena tienen que tener la misma especificidad analítica (esto no siempre es fácil, especialmente cuando se trata de inmunoanálisis). Además, los calibradores empleados en los procedimientos deben de ser conmutables (el analito se comporta en el calibrador igual que en las muestras) (figura 7).

2.6.2.- Recomendaciones para el estudio de la precisión.

La precisión es una de las características metrológicas más importantes a tener en cuenta para la selección e implantación de un procedimiento de medida en el laboratorio clínico. Conocer el valor de la precisión permite interpretar de forma objetiva la significación de un cambio entre dos valores consecutivos de una magnitud bioquímica. La precisión se define como el grado de concordancia entre resultados repetidos y se relaciona con la existencia de errores de tipo aleatorio (impredecible). Se cuantifica como imprecisión, que se define como el coeficiente de variación de un conjunto de resultados obtenidos al medir repetidamente un mensurando con un mismo procedimiento de medida (Canalias, 2003).

Para el estudio de la precisión se pueden desarrollar diferentes protocolos. A continuación se describe el documento de la SEQC (Canalias, 2003). En general, siempre se recomienda utilizar dos muestras con diferentes concentraciones de la magnitud, una con valor fisiológico o próximo al valor discriminante, y otra con valor patológico. Las muestras tienen que ser estables durante el período de tiempo que dure el estudio. Estas muestras se deben analizar mediante el procedimiento de medida a evaluar bajo dos tipos de condiciones diferentes:

-condiciones de repetibilidad: se realizan 30 determinaciones con el mismo método, en muestras idénticas, en el mismo laboratorio, realizadas por el mismo operador y utilizando los mismos componentes del sistema de medida, durante un corto intervalo de tiempo y sin calibraciones entre las mediciones. Calculando la imprecisión bajo estas condiciones se obtiene la imprecisión intraserial (CV_{intra}).

- condiciones intermedias: se obtienen resultados de las dos muestras durante 30 días, a lo largo de los cuales se calibra con la frecuencia habitual (diaria, semanal, etc.), y se puede cambiar el operador, el lote de calibrador y el lote de reactivos. Calculando la imprecisión bajo estas condiciones se obtiene la imprecisión interdiaria (CV_{inter}).

El tratamiento estadístico de los resultados debe hacerse separadamente para cada una de las muestras y antes de realizar los cálculos se deben eliminar los valores aberrantes. Se calcula la media (\bar{x}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) de los resultados obtenidos bajo condiciones de repetibilidad (CV_{intra}) y los obtenidos en condiciones intermedias (CV_{inter}).

$$CV (\%) = (s/\bar{x}) \times 100$$

2.6.3.- Recomendaciones para el estudio de la veracidad mediante la comparación de procedimientos de medida.

La veracidad se define como el grado de concordancia entre el valor medio de una serie de muchos resultados de medida y un valor verdadero, con lo que se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático: constante y proporcional. Por tanto, para estudiar la veracidad de un procedimiento de medida es necesario comparar los resultados obtenidos con un valor convencionalmente verdadero. En el laboratorio puede considerarse valor verdadero el obtenido con un procedimiento de medida de referencia (Martínez et al., 2011).

Los requisitos que debe de cumplir este procedimiento de medida de referencia son:

- debe tener similar o superior jerarquía metrológica a la del procedimiento de medida a evaluar (debe disponer de evidencias de la ausencia de error sistemático).
- debe tener la misma especificidad.
- el intervalo de medida del procedimiento de comparación debe ser, al menos, tan amplio como el intervalo del procedimiento a evaluar.

El documento de la SEQC que se describe a continuación se basa en la comparación de procedimientos de medida para estimar el error sistemático (Martínez et al., 2011). Se recomienda analizar, mediante los dos procedimientos (el de referencia y el que es objeto de estudio), un mínimo de 40 muestras de diferentes individuos a lo largo de 3-5 series analíticas (se debe calibrar de forma independiente cada serie). Al menos el 50% de las muestras procesadas deben tener concentraciones fuera del intervalo de referencia del laboratorio para la magnitud medida. Es muy importante que los valores del mensurando estén distribuidos de forma más o menos uniforme a lo largo de todo el intervalo de referencia y cada muestra debe ser analizada por los dos procedimientos en un intervalo de tiempo lo menor posible.

Se considera conveniente realizar el cálculo del coeficiente de correlación r , en el caso de que sea $> 0,975$ indica que los resultados siguen una distribución adecuada. Valores inferiores muestran que (Martínez et al., 2011):

- La distribución de valores no es adecuada. Se deben de analizar más muestras cubriendo todo el intervalo de medida.
- Los procedimientos de medida a comparar no tienen la misma especificidad. La dispersión de los puntos es excesiva.

El documento de la SEQC aconseja analizar los resultados obtenidos mediante el estudio estadístico de las diferencias, utilizando el método del análisis de las diferencias y la regresión lineal. Antes de trabajar los datos deben de eliminarse los valores aberrantes.

- Análisis de las diferencias (diagrama de Bland-Altman):

Para realizar el análisis de las diferencias se tienen que calcular:

a) Las diferencias (D_i) entre el resultado obtenido con el procedimiento evaluado (x_e) y el resultado con el procedimiento de comparación (x_r):

$$D_i = x_e - x_r$$

b) El promedio de cada pareja de resultados:

$$(x_e + x_r) / 2$$

En la gráfica del diagrama de Bland-Altman se representan las diferencias entre los dos métodos (D_i) frente al promedio de ambos valores (figuras 8, 9 y 10). Analizando los gráficos obtenidos mediante este test se puede detectar la tendencia a la presencia de error constante o de error proporcional (Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006).

Cuando ambos procedimientos de medida proporcionan resultados idénticos, las diferencias se distribuyen aleatoriamente por encima (positivas) y por debajo (negativas) del valor cero (figura 8). Cuando existe una diferencia sistemática de tipo constante las diferencias están por encima o por debajo de 0 y son más o menos constantes, independientemente del valor medio (figura 9). Los resultados indican la presencia de error sistemático de tipo proporcional cuando las diferencias incrementan su valor absoluto a medida que incrementa el valor medio (figura 10).

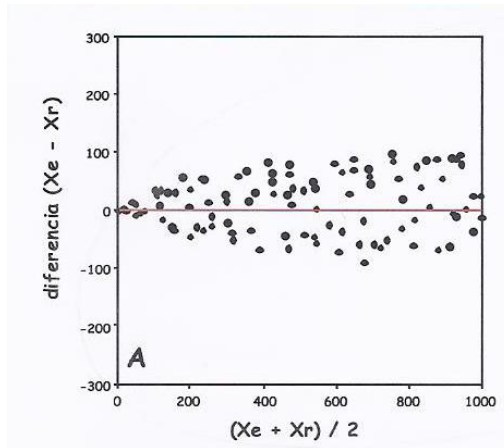


Figura 8: Diagrama de Bland-Altman en el cual se refleja la ausencia de error sistemático.

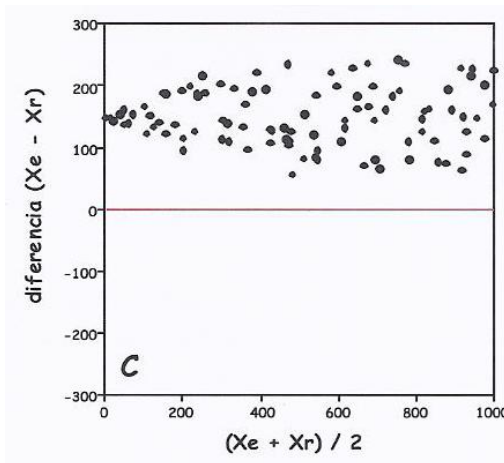


Figura 9: Diagrama de Bland-Altman en el cual se refleja la presencia de error constante.

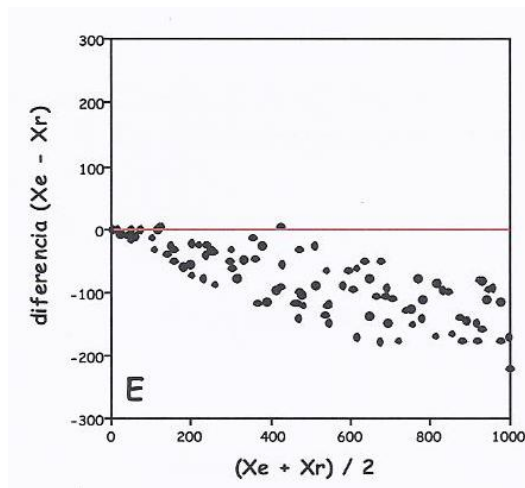


Figura 10: Diagrama de Bland-Altman en el cual se refleja la presencia de error sistemático proporcional.

- Regresión lineal:

La diferencia entre los valores obtenidos con el método evaluado y el de referencia refleja el error sistemático del primero y, esta diferencia se puede cuantificar utilizando la regresión lineal no paramétrica de Passing-Bablok (Passing and Bablok, 1983). De esta forma se obtiene la ecuación de la recta que relaciona las parejas de resultados obtenidos para cada muestra con el procedimiento evaluado (y) y el de referencia (x):

$$y = a + bx$$

a = valor de la ordenada en el origen

b = valor de la pendiente

La regresión lineal también proporciona los valores medios de a y b , así como los intervalos para estos valores con un determinado nivel de confianza (usualmente el 95%). Examinado estos intervalos se pueden presentar los siguientes casos:

- Contiene el valor $a=0$ y el valor $b=1$: el procedimiento evaluado proporciona valores que no son significativamente diferentes a los obtenidos con el de referencia.
- No contiene el valor 1 para b : el procedimiento evaluado presenta un error sistemático proporcional respecto al de referencia (figura 11).
- No contiene el valor 0 para a : el procedimiento evaluado presenta un error sistemático constante respecto al de referencia (figura 12).
- No contiene el valor 0 para a ni el valor 1 para b : el procedimiento evaluado presenta un error sistemático mixto (constante y proporcional) respecto al de referencia.

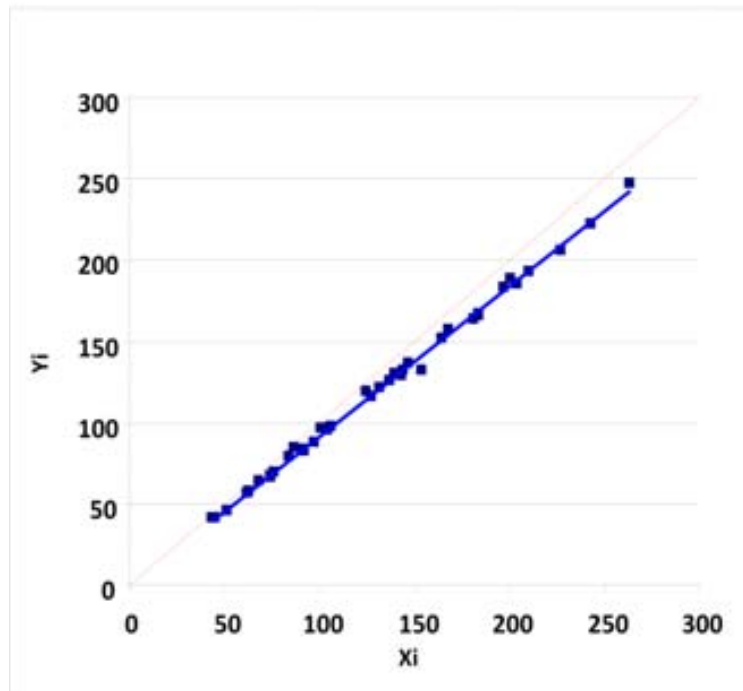


Figura 11: Ejemplo de regresión lineal en la cual se refleja un error sistemático proporcional. La línea roja indica la igualdad entre ambos procedimientos. Cada punto representa una de las muestras medidas con los dos procedimientos.

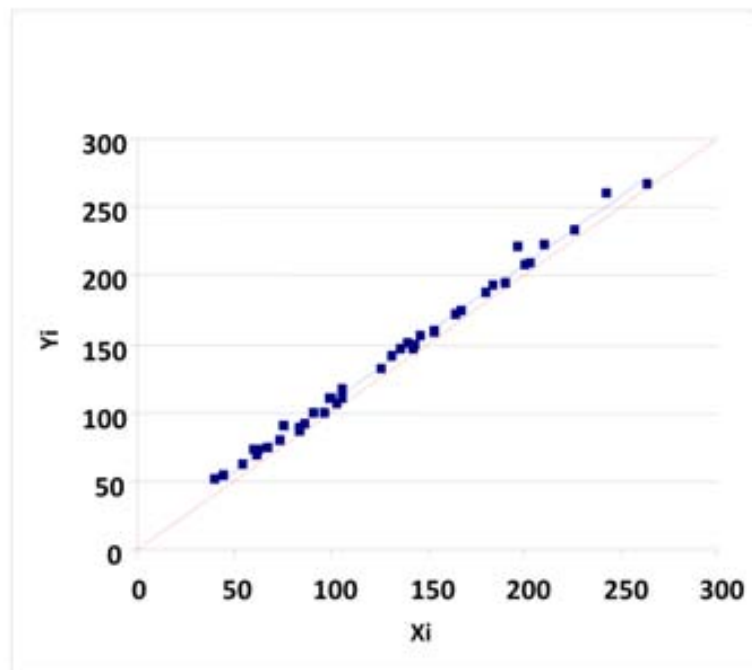


Figura 12: Ejemplo de regresión lineal en el cual se refleja un error sistemático constante. La línea roja indica la igualdad entre ambos procedimientos. Cada punto representa una de las muestras medidas con los dos procedimientos.

2.6.4.- Interpretación y tratamiento.

Los errores sistemáticos de tipo constante son de difícil interpretación ya que pueden ser ocasionados por un efecto de la matriz de la muestra sobre uno de los procedimientos comparados (Martínez et al., 2011). No obstante, en algunos casos sucede que los procedimientos de medida que se comparan no tienen la misma especificidad, esto suele suceder cuando se comparan inmunoanálisis. Las diferencias detectadas pueden ser debidas a que los procedimientos comparados reaccionan de forma distinta con una u otra de las varias formas moleculares del analito y no a la existencia de un error constante.

Por tanto, no suele ser conveniente corregir los errores sistemáticos de tipo constante. Si existen diferencias debidas a la diferente especificidad de los métodos que se comparan, se debe valorar si afectan al valor diagnóstico de los resultados y establecer nuevos valores de referencia (Martínez et al., 2011).

Los errores sistemáticos de tipo proporcional suelen deberse a diferencias en la calibración y se pueden corregir cambiando o modificando los calibradores o el proceso de calibración (Martínez et al., 2011).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En la especie porcina se han propuesto las PFAs como unos buenos marcadores de infección e inflamación, y existen numerosos estudios que describen la cinética de PFAs en diferentes procesos patológicos, la mayor parte de ellos inducidos de forma experimental. También se han evaluado estas proteínas como indicadores de estrés y del índice de rendimiento productivo de los animales. Incluso se ha postulado su uso en el *screening* antemortem de los animales para de esta forma asegurar su salud antes de entrar en la cadena alimentaria humana (Eckersall, 2004). Finalmente, el estudio de la respuesta de fase aguda mediante la determinación de PFA se emplea en el desarrollo de vacunas y de agentes antimicrobianos y antiinflamatorios (Eckersall, 2004).

Sin embargo, la realidad es que la determinación de las PFAs aún no se ha incorporado al conjunto de parámetros que el veterinario maneja de manera cotidiana. Esto indica que el conocimiento de sus posibles aplicaciones es, con toda probabilidad, todavía insuficiente. En este trabajo de tesis doctoral se han planteado algunas cuestiones relevantes en el campo de las PFAs y su aplicabilidad en el ámbito de la producción y sanidad porcina.

El primer inconveniente con el que se topó al inicio de esta tesis doctoral fue la falta de métodos de determinación robustos y estandarizados. Muchos métodos siguen siendo todavía demasiado complejos para su uso como métodos de rutina. A este problema se añadía el inconveniente de no disponer de valores de referencia bien definidos, en parte por la complejidad que representa establecer los diferentes tipos de poblaciones de referencia que se dan a lo largo de los ciclos productivos de la especie porcina, y de no disponer de suficiente información sobre las posibles alteraciones de los niveles de PFAs debido al manejo habitual de los animales durante la fase de cría. Por otro lado, aunque se ha propuesto que las PFAs pueden ser útiles para monitorizar parámetros productivos, lo cierto es que los datos son escasos.

La cinética de diversas PFAs se ha estudiado en diferentes tipos de enfermedades infecciosas a nivel experimental y de campo. En muchos casos se dispone sólo de información a nivel experimental, pero los estudios a nivel de campo suelen reflejar mejor la situación real. La información sobre infecciones subclínicas es especialmente escasa, por ejemplo en el caso del PRRS, una enfermedad grave cuyo agente etiológico es el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino. Este virus se caracteriza por desarrollar una respuesta inmune atípica. Los expertos en esta enfermedad están tratando de elucidar las razones por las cuales el virus es capaz de “escapar” a una respuesta inmunitaria adecuada y no se consigue elaborar una vacuna eficaz. Además,

existen diversas cepas víricas con distinta virulencia, de las que se desconoce la respuesta de fase aguda que provocan y si hay relación entre estos dos aspectos.

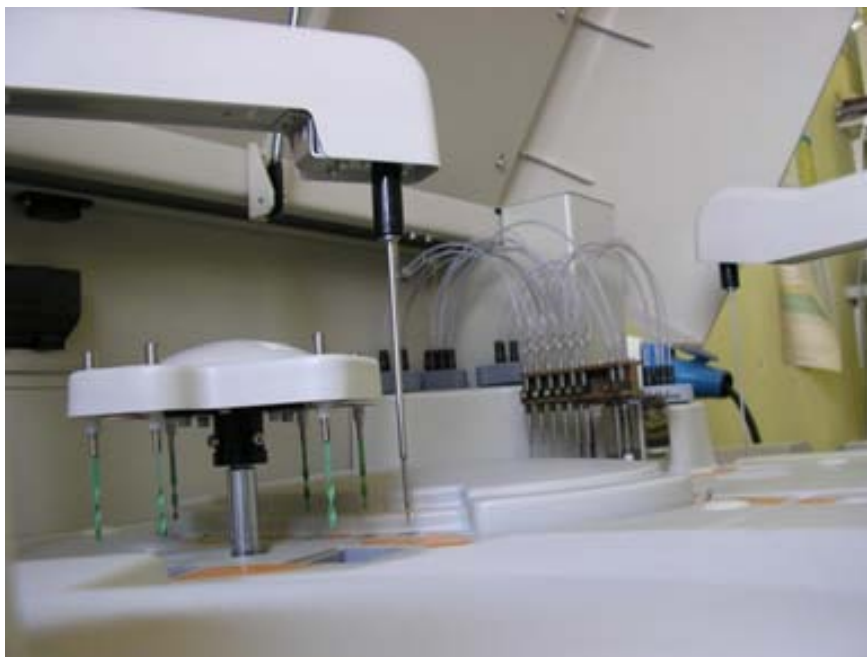
Finalmente, en medicina humana se utilizan las PFAs para monitorizar algunas enfermedades de tipo crónico, con lo que también se debería contemplar la relación que pueden tener las PFAs con la presencia de lesiones crónicas en el cerdo; este aspecto prácticamente no ha sido estudiado en el ámbito veterinario. En el matadero es habitual encontrar lesiones pulmonares de tipo crónico y la determinación de PFAs puede dar información tanto a nivel individual como a nivel de granja en relación al estado de salud de los animales.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo global de esta tesis doctoral ha sido el estudio de las PFAs en ganado porcino como potenciales biomarcadores en sus diversos ámbitos de aplicación: metodología, producción, patología y análisis post-mortem. Los objetivos específicos han sido los siguientes:

- 1.- Validación de un método inmunoturbidimétrico para la determinación de CRP porcina.
- 2.- Estudiar el perfil cinético que presentan las concentraciones de PFAs en cerdos de una explotación de engorde.
- 3.- Evaluar las PFAs como biomarcadores de parámetros productivos en el cerdo, concretamente durante el uso de un inmunomodulador con capacidad de mejorar el rendimiento productivo.
- 4.- Estudio de la respuesta de fase aguda inducida tras la infección experimental con diferentes cepas del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV).
- 5.- Evaluar las PFAs como biomarcadores de lesiones pulmonares crónicas (pleuritis y consolidación cráneo-pulmonar) en cerdos de matadero.

4. RESULTADOS

Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein.



Yolanda Saco, Lorenzo Fraile, Mercè Giménez, Francesca Canalias and Anna Bassols.

Research in Veterinary Science 2010; 89: 159-162

Abstract

Measurement of porcine C-reactive protein (CRP) in serum is an important tool for monitoring health and welfare in pigs. In this study, an immunoturbidimetric method from Olympus System Reagent (OSR 6147) used to measure human CRP in serum that employ a human traceable calibrator has been evaluated in porcine serum samples. Intra- and inter-assay imprecision were lower than that obtained with the porcine-specific commercially available ELISA. The expected difference in serum CRP between healthy and non-healthy pigs was detected. CRP values measured by the immunoturbidimetric method showed a good correlation with those obtained by ELISA, although differences in absolute CRP values were observed. When an in-house porcine standard was used a better agreement was obtained. In conclusion, the immunoturbidimetric method of Olympus can be used with porcine samples. The easier use of this method should facilitate the implementation of CRP serum determination for diagnostic and prognostic purposes in swine medicine. The results emphasise the need to establish species-specific standard and methods to decrease inter-laboratory discrepancies.

Keywords: CRP, immunoturbidimetric method, validation, pig, reference standard.

C-reactive protein (CRP) is a rapid reacting first line acute phase protein. It is induced primarily by pro-inflammatory cytokines and is characterized by a fast increase in serum concentration early after inflammation, infection or trauma (Petersen et al., 2004). The most important biological functions of CRP are the prevention of tissue migration of neutrophils, activation of the classical complement pathway and induction of anti-inflammatory cytokines (Eckersall, 2008). In pig, CRP is a major acute phase protein that can be used for diagnostic and prognostic purposes in many areas.

CRP increases in pigs following experimental infection with *Streptococcus suis* (Sorensen et al., 2006), African swine fever or classical swine fever viruses (Sanchez-Cordon et al., 2007). Moreover, CRP levels increase significantly with Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus (PRRSV), Porcine Circovirus type 2 (PCV2) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) infection under field conditions (Parra et al., 2006). Finally, CRP serum concentration may be used as an indicator of lesions in pigs at slaughter (Pallares et al., 2008) and it has been also suggested that CRP can be correlated with the quality of animal transport (Pineiro et al., 2007).

Methods available to measure CRP concentrations in swine are not standardized and available assays employ calibrators of different origin. Several authors emphasize the need for standardized acute phase protein assays and for species-specific standards to enable global availability of traceable calibration material which is necessary to compare results between laboratories (Skinner, 2001).

The immunoturbidimetric method of Olympus System Reagent (OSR 6147) used for measurement of human CRP employ a calibrator traceable to the international reference material CRM470 (Whicher, 1998). It is adapted to biochemical analysers which facilitate the clinical applicability of serum CRP determinations. Cross-reactivity of an anti-human CRP antibody with porcine CRP was previously observed to be partial but specific (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). Taking into account this information, it is foreseeable that this analytical method may be useful for pig samples.

The purpose of the study reported here was to validate the Olympus System Reagent immunoassay to measure CRP concentrations in swine serum samples through evaluating its accuracy (precision and trueness) comparing this technique with a species-specific ELISA method for porcine CRP. This study would facilitate the use of CRP as a routine acute phase marker and sustain the feasibility of heterologous assays as reported by other authors (Kjelgaard-Hansen et al., 2007).

Protein assays: The immunoturbidimetric method is based on CRP binding to goat anti-human CRP antibodies to yield insoluble aggregates. The method was performed following the manufacturer recommendations and, additionally, a species-specific internal quality control (swine in this case) was included to continuously monitor the performance of the antibody cross-reactivity (Kjelgaard-Hansen et al., 2004). On the other hand, the commercial ELISA available is a solid phase sandwich immunoassay validated for this specie (Phase porcine CRP assay, Tridelta Ltd., Kildare, Ireland). Other acute phase proteins were analyzed in the same samples. Haptoglobin was quantified by using a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) from Tridelta and performed on an automated analyzer Olympus AU400 (Hamburg, Germany). Pig-MAP levels were assessed with an specific ELISA kit for porcine samples (PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain).

Precision and trueness study: The precision study was performed following the experimental protocol of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Two serum samples with low (19,15 $\mu\text{g/mL}$) and high CRP concentrations (47,4 $\mu\text{g/mL}$) were

used. Four replicate samples of both concentrations were analyzed daily in the same run for five days. Intra and inter assay coefficients of variation were calculated. Trueness was assessed by a comparison experiment. Briefly, 32 samples of (Landrace x Duroc) x Pietrain pigs from one Spanish finishing farm were analyzed with the immunoturbidimetric method of Olympus and the commercial ELISA for determination of pig serum CRP concentration. Blood samples were collected in tubes without anticoagulant; serum was obtained after centrifugation and frozen until assay. Samples were distributed evenly over a wide interval of CRP concentration. Passing-Bablok regression analyses were used to evaluate differences between the two methods and Bland-Altman plot was used to define the type of any possible bias (Passing and Bablok, 1983).

Clinical confirmation: Blood samples from two groups of animals were selected. *Group 1* included 23 clinically healthy pigs of (Landrace x Duroc) x Pietrain breed, 11 females and 12 males fed with standard feed according to the I.N.R.A recommendations and with free access to feed and water. They had absence of any relevant clinical signs and were serologically negative for PRRSV, Mhyo and Swine Influenza Virus. *Group 2* included 23 animals with evident clinical signs of respiratory disease. Serological analysis demonstrated that these animals had suffered a Mhyo and PRRSV infection. Mann-Whitney test was used to compare values obtained in samples from group 1 and group 2. Finally, a correlation analysis was carried out to compare CRP with Pig-MAP and haptoglobin serum concentrations determined in parallel in 53 pig samples as a way to verify that the assay is measuring acute phase activity.

The experiment received prior approval from the Local Ethical Committee for Animal Experimentation of the Institution. The treatment, housing and husbandry conditions conformed to the European Union Guidelines (The Council of the European Communities, 1986).

Results of the precision study agree with the manufacturer specifications for human samples. $CV_{\text{intra-assay}} = 2,62\%$ and $1,26\%$ and $CV_{\text{inter-assay}} = 3,34\%$ and $2,40\%$, for low ($19,15\ \mu\text{g/mL}$) and high ($47,4\ \mu\text{g/mL}$) CRP serum samples respectively. They were similar to those reported for two other automated immunoturbidimetric CRP assays (Kjelgaard-Hansen et al., 2007) and lower than that obtained with the porcine-specific commercially available ELISA (Tecles et al., 2007). Furthermore, the total error calculated from the within-animal and between-animal variations was lower than the maximum allowable value for imprecision calculated from data on biological variation of canine and human CRP (Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006).

CRP values showed a good correlation with those obtained by ELISA ($r = 0,938$), although differences in absolute CRP values were observed. Results from the immunoturbidimetric method were substantially lower than those obtained by ELISA with a porcine calibrator (Fig. 1A) and similar to the concentration range of CRP obtained with CRP-TIA reagent of Bayer that also uses a human calibrator (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). Accordingly, results of the Passing-Bablok analysis showed mixed systematic error (95 % confidence interval): intercept = 5,17 (2,12 to 6,85) and slope = 0,105 (0,086 to 0,123) (Fig.1A). As observed in Fig. 1B, the discrepancy in measured levels of CRP between methodologies has a proportional nature as revealed by a Bland-Altman plot analysis (Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006).

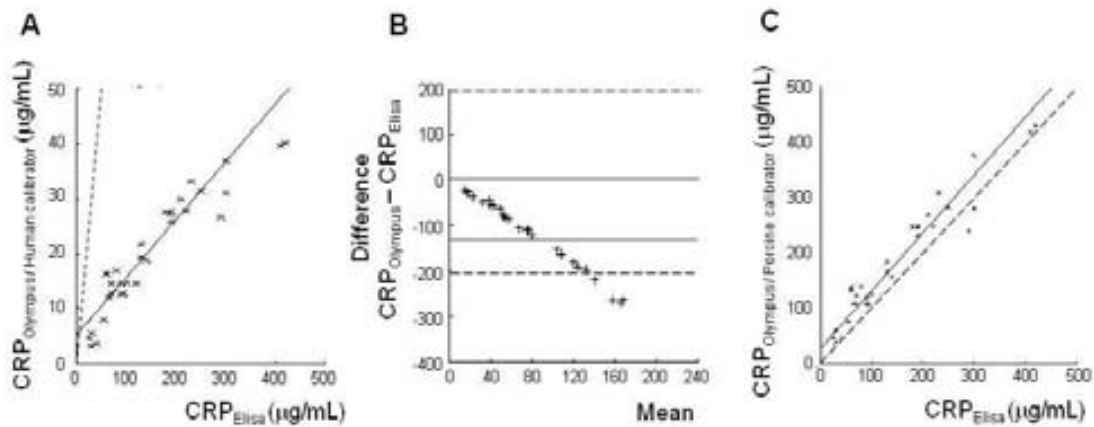


Figure 1. Comparison of methodologies for determination of porcine serum CRP. (A) Olympus immunoturbidimetric assay calibrated with a traceable human material and the species-specific ELISA assay were compared by means of Passing-Bablok regression analysis. (B) Bland – Altman plot of the Olympus immunoturbidimetric assay calibrated with a traceable human material and the species-specific ELISA. Data fitted to the linear model, although a proportional discrepancy is detected. (C) Olympus immunoturbidimetric assay calibrated with an in-house porcine serum standard and the species-specific ELISA assay were compared by means of Passing-Bablok regression analysis.

In order to reduce the systematic error, the immunoturbidimetric assay was calibrated with an in-house porcine serum standard quantified with the porcine specific ELISA. CRP

values showed a good correlation with those obtained by ELISA ($r = 0,961$). Results of the Passing-Bablok analysis showed only constant error (95 % confidence interval): intercept = 25,673 (8,67 to 44,92) and slope = 1,056 (0,920 to 1,214) (Fig. 1C).

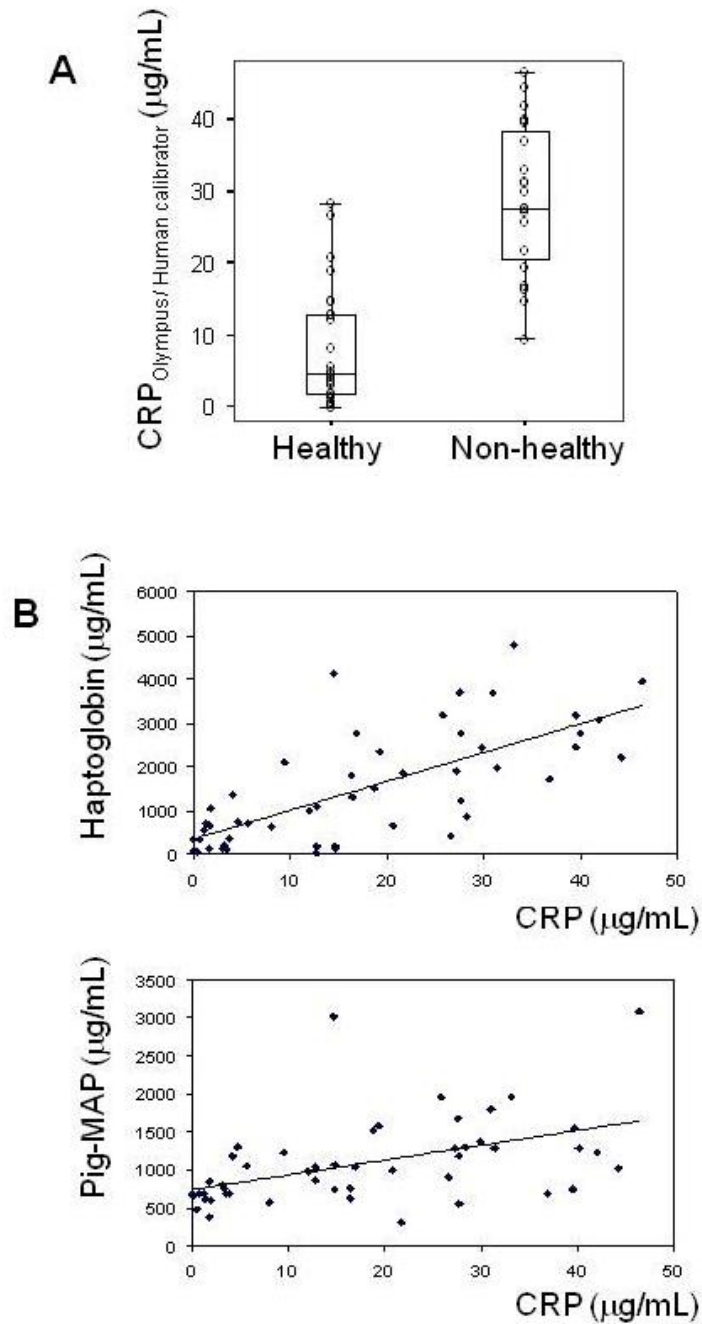


Figure 2. Biological validation of CRP assays. (A) CRP concentration in healthy and diseased animals. CRP was determined by the immunoturbidimetric method of Olympus System Reagent calibrated with a traceable human material. (B) Correlation plot of CRP versus Pig-MAP and haptoglobin in porcine serum samples.

The CRP serum concentrations determined by the proposed analytical method using the human traceable calibrator was able to clearly discriminate between healthy and non-healthy individuals under field conditions ($p < 0,001$) (Fig. 2A). Other acute phase proteins (haptoglobin and Pig-MAP) determined in parallel in the same set of samples showed a similar correlation (Fig. 2B, $r = 0,716$ for haptoglobin and $r = 0,480$ for Pig-MAP) to those reported in other studies (Clapperton et al., 2007; Heegaard et al., 2009). The control group used in the present work was not raised under SPF conditions, in contrast to the group used by Kjelgaard-Hansen et al. (2007). This fact may explain the differences observed between CRP serum concentrations in healthy animals from both studies.

In conclusion, immunoturbidimetric methods are preferable to ELISA methods due to the possibility of automation and the wider linearity range. Similar reagents for human CRP (Bayer and Randox) have been already evaluated for the heterologous determination of porcine CRP with good results (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). The method from Olympus is also based in an immunological reaction using an antibody against human CRP and uses a human calibration material traceable to the human serum standard CRM470. It has good precision, good correlation with the ELISA method and it is able to discriminate between healthy and diseased individuals. The use of the human calibrator has the important advantage of traceability, enabling the comparison of measurements between laboratories. However it has to be taken into account that new reference values for CRP should have to be obtained, as recommended for methods that do not produce identical results (Jensen and Kjelgaard-Hansen, 2006). It would be also convenient to perform a validation study for each new batch of antibodies.

The use of the Olympus method with an in-house porcine standard showed a better agreement when comparing to the ELISA method, indicating that these discrepancies would be resolved by developing a species-specific immunoturbidimetric method and preparing common species-specific calibration materials, as initiated by the EU-Concerted Action on Acute Phase Proteins Standardization (Alava et al., 1997; Skinner, 2001).

We concluded that meanwhile there is not a reference method nor a reference material for determination of CRP in pig, the immunoturbidimetric method of Olympus is suitable for routine use in laboratory. It has a good precision and satisfactory overlap performance. This method simplifies the CRP determination since it is an automated method and has a wide linearity range.

Conflicts of interest

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was funded by grant AGL2006-02364/GAN from the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia” and grant 2009SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya. Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union.

References:

- Alava, M.A., González-Ramón, N., Heegaard, P., Guzylack, S., Toussaint, M.J.M., Lipperheide, C., Madec, F., Gruys, E., Eckersall, P.D., Lampreave, F., Piñeiro, A., 1997. Pig-MAP, Porcine Acute Phase Proteins and Standardisation of Assays in Europe. *Comparative Haematology International* 7, 208-213.
- Clapperton, M., Bishop, S.C., Pineiro, M., Campbell, F.M., Glass, E.J., 2007. The association between plasma levels of acute phase proteins, haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), Pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119, 303-309.
- CLSI EP15-A2. 2005. User Verification of Performance for Precision and Trueness.
- Eckersall, P.D. 2008. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias. Kaneko, J.J., Harvey J.W., Bruss M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press. San Diego, USA. pp. 117-155.
- Heegaard, P.M., Pedersen, H.G., Jensen, A.L., Boas, U., 2009. A robust quantitative solid phase immunoassay for the acute phase protein C-reactive protein (CRP) based on cytidine 5'-diphosphocholine coupled dendrimers. *Journal of Immunological Methods* 343, 112-118.
- Jensen, A.L., Kjelgaard-Hansen, M., 2006. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 276-286.
- Kjelgaard-Hansen, M., Jensen, A.L., Kristensen, A.T., 2004. Internal quality control of a turbidimetric immunoassay for canine serum C-reactive protein based on pooled patient samples. *Veterinary Clinical Pathology* 33, 139-144.

- Kjelgaard-Hansen, M., Martinez-Subiela, S., Petersen, H.H., Jensen, A.L., Ceron, J.J., 2007. Evaluation and comparison of two immunoturbidimetric assays for the heterologous determination of porcine serum C-reactive protein. *Veterinary Journal* 173, 571-577.
- Pallares, F.J., Martinez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabe, A., Munoz, A., Ceron, J.J., 2008. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Veterinary Journal* 177, 369-373.
- Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martinez-Subiela, S., Martinez, J.S., Munoz, A., Ceron, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *Journal of Veterinary Medicine B* 53, 488-493.
- Passing H, Bablok W., 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 21,709-720.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Pineiro, C., Pineiro, M., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2007. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133-139.
- Sanchez-Cordon, P.J., Ceron, J.J., Nunez, A., Martinez-Subiela, S., Pedrera, M., Romero-Trevejo, J.L., Garrido, M.R., Gomez-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. *American Journal of Veterinary Research* 68, 772-777.
- Skinner, J.G. 2001. International standardization of acute phase proteins. *Veterinary clinical pathology* 30, 2-7.
- Sorensen, N.S., Tegtmeier, C., Andresen, L.O., Pineiro, M., Toussaint, M.J., Campbell, F.M., Lampreave, F., Heegaard, P.M., 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 157-168.
- Tecles, F., Fuentes, P., Martinez Subiela, S., Parra, M.D., Munoz, A., Ceron, J.J., 2007. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in Veterinary Science* 83, 133-139.

Whicher, J.T. 1998. BCR/IFCC reference material for plasma proteins (CRM 470).
Community Bureau of Reference. International Federation of Clinical Chemistry.
Clinical Biochemistry 31, 459-465.

Acute phase proteins as a monitoring tool throughout the pig rearing period



Yolanda Saco, Lorenzo Fraile, Raquel Pato, Raquel Peña, Francesca Canalías y
Anna Bassols.

Suis 2012; 90: 22-31

Summary

The kinetic profile of haptoglobin, C-reactive protein (CRP) and pig-major acute-phase protein (Pig-MAP) were evaluated in pigs throughout the productive cycle in a fattening barn with standard management procedures and vaccination protocols, as well as its clinical evolution and serological monitoring against common pathogens. The three evaluated acute phase proteins (APPs) behave differentially depending on age and vaccination status of the animals, but all three increased concomitantly to a clinical outbreak with severe respiratory problems. In conclusion, changes in APP serum concentrations throughout the productive cycle are reported, providing useful information for the use of APPs as markers of health and welfare in pigs.

Keywords: swine, haptoglobin, Pig-MAP, C-reactive protein, biomarker.

Introduction

Acute phase proteins (APPs) are produced by the liver upon stimulation by the pro-inflammatory cytokines in response to infection, inflammation or trauma.¹ The main APPs in pigs are haptoglobin, CRP (C-reactive protein) and Pig-MAP (Major Acute Phase Protein). APPs are used as biomarkers for infection and inflammation,¹ in the assessment of anti-microbial or anti-inflammatory agents and vaccine development,² and to monitor diseases at a herd level basis since they indicate the hygienic level and health status of the farm.^{3,4} Besides their accepted role as biomarkers for disease, APPs have been also proposed as indicators of stress conditions after road transport, alteration of the feeding regime of pigs or changes in its space allowance⁵⁻⁷ and also as an index for monitoring productive performance.^{8,9}

The productive cycle for pigs includes transport of piglets from the sow farm at 6-7 weeks of age to a fattening unit where they will be housed until shipping to the slaughterhouse (approximately at 6 months of age). During the rearing period, many events are likely to occur, such as subclinical virus circulation or disease outbreaks with evident clinical signs. In this sense, porcine respiratory and reproductive syndrome virus (PRRSV), swine influenza virus (SIV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) are highly prevalent diseases in pigs in Europe and in North America. In fact, it is believed that few pigs reared under commercial conditions can be expected to reach the slaughterhouse without contracting some sort of lung lesion across their productive life.¹⁰ On the other hand, pigs are subjected to a vaccination program during the fattening period that varies between

countries but some vaccines are of common use. Thus, Aujeszky modified live vaccination (MLV) is widely used in Spain due to the in course compulsory national eradication program.

The aim of the present work was to analyze the kinetics of Pig-MAP, CRP and haptoglobin in a longitudinal study in a conventional fattening barn, under the assumption that the analysis of the fluctuations in APP serum levels during a standard productive cycle is a previous and necessary step before these proteins can be used as markers for diseases and stress or to monitorize productive performance.

Materials and methods

Thirty Landrace x Duroc x Pietrain pigs (16 male and 14 female) randomly selected from one Spanish pig farm, working in a multi-site production system, were included in this study. Briefly, this multi-site production system included 700 sows. Pigs were moved to a nursery at a weaning age of 21 days. The nursery was single-origin by site, single-aged by room, and managed all in-all out by room. The finishing units were filled with pigs from this nursery at 7-8 weeks of age and were managed all in-all out by building (800 pigs per barn). This study began in the nursery (6 weeks of age) and ended up in one fattening unit (23 weeks of age). The distance between the nursery and the fattening unit was 25 kilometers. Pigs were fed with standard feed according to the National Research Council recommendations¹¹ and had free access to food and water. Animals were vaccinated with an Aujeszky MLV (modified live vaccine) european vaccine (Auskipra GN, Hipra Laboratories, Spain) at 11 and 15 weeks of age. Blood samples were drawn at 6, 8, 9, 10, 11, 13, 15, 17, 19, 21 and 23 weeks of age in tubes without anticoagulant (see Figure 1 for details). Serum was collected after centrifugation (3500 rpm, 10 min) and frozen (-20 °C) until assay. The experiment received prior approval from the local ethical committee for animal experimentation of the institution. The treatment, housing and husbandry conditions were conformed to the European Union Guidelines (The Council of the European Communities, 1986).

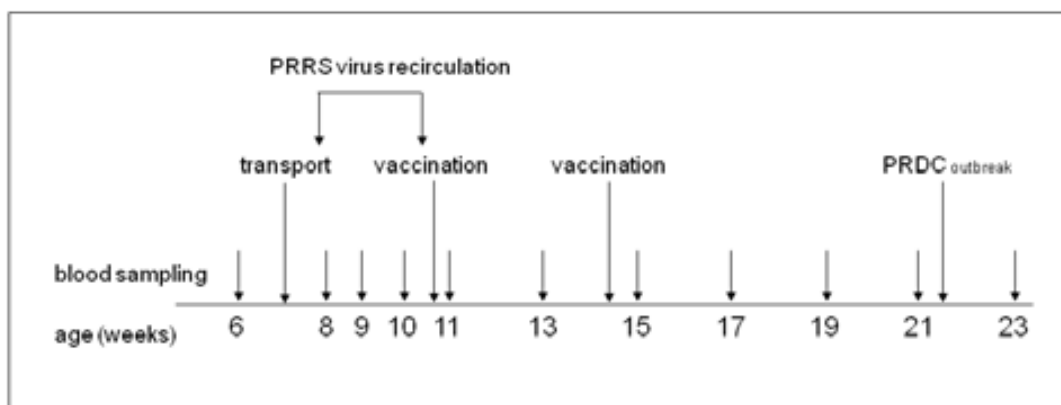


Fig. 1. Schematic representation of the blood sampling, transport and vaccination time that took place in this longitudinal study.

Haptoglobin was quantified by using a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) with a commercial reagent from Tridelta Development Ltd. (Ireland) and performed on an automated analyzer (Olympus AU400, Hamburg, Germany). Pig-MAP levels were assessed with an ELISA kit (PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation for both techniques have been reported previously.⁹ Serum CRP concentration was determined using a commercial immunoturbidimetric method (Olympus System Reagent, OSR 6147) validated for porcine samples.¹²

Antibodies to Mhyo, SIV and PRRSV were determined using HerdChek® Mycoplasma hyopneumoniae Antibody Test, CIVTEST Suis Influenza and HerdChek® Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Antibody Test ELISA kits, respectively, following manufacturer's instructions (Idexx Laboratories Inc, Maine, USA). Moreover, three animals with evident respiratory symptoms were humanely sacrificed by an intravenous overdose of pentobarbital under sedation with azaperone to carry out a microbiological isolation from the lungs focused on the bacteria normally involved (*Mycoplasma hyopneumoniae*, *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida*) in porcine respiratory disease complex. Bacteria were isolated and identified by microbiological methods. In addition, tissue samples (lung, superficial inguinal lymph node, spleen, kidney and liver) were submitted to the histopathology department (Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain) for histopathology testing. All statistical analyses were carried out using the PASW Statistics 17.0 software. Descriptive statistics (means \pm SD) of haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations values in pigs from 6 to 23 weeks of age are presented and range intervals were expressed as the 10th to 90th

percentiles, following CLSI recommendations.¹³ For all analyses, pig was used as the experimental unit. The significance level (α) was set at 0.05 with statistical tendencies reported when $P < 0.10$. The Shapiro Wilk's and the Levene test were used to evaluate the normality of the distribution of the examined quantitative variables and the homogeneity of variances, respectively. A non-parametric test (Mann–Whitney) was used to compare the concentrations of serum APPs between males and females merging data from all the sampling times. Thereafter, a Friedman test was carried out to determine whether APPs serum concentrations changes throughout time. Wilcoxon paired test was performed to compare APPs serum concentrations between sampling times. Finally, a correlation analysis was performed to quantify the association between all pairs of APPs each sampling time.

Results

No relevant clinical signs were observed from 6-week-old to 19-week-old piglets. At 21 weeks of age, mild respiratory symptoms and anorexia were observed in 5 out of 30 animals (16 % prevalence). This clinical situation got worse and dyspnea, coughing, acute depression, anorexia, fever, and nasal discharge were detected in 80% of the studied animals (24 out of 30 pigs) at 23 weeks of age. Three animals with evident respiratory symptoms were sacrificed: Mhyo and *Pasteurella multocida* were isolated from their lungs and purulent broncho-catharral pneumonia was diagnosed.

Serum antibodies against PRRSV, Mhyo and SIV were observed at the beginning of the trial (6 weeks of age) in 10 (33 %), 15 (50 %) and 24 (80 %) of piglets which are attributable to colostral antibodies.¹⁴⁻¹⁶ These percentages of positive animals decreased progressively for Mhyo and SIV, until all animals were serologically negative for these pathogens at 15 weeks of age and remained negative until the last sampling time. One animal positive out of 30 to Mhyo at 23 weeks of age was an exception. On the other hand, a sudden increase in the percentage of positive animals to PRRSV was observed between 8 (33.3 % positive animals) and 9 weeks (77 % positive animals) of age indicating that this virus recirculated during this period of time in the pig population although clinical symptoms were absent. All animals remained seropositive for PRRSV throughout the study.

Haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations determined throughout the trial are shown in Table 1 and Figure 2. All the studied APP serum concentrations changed significantly throughout time ($P < 0.001$ for each APP using a Friedman analysis). No

significant differences were observed in haptoglobin, Pig-MAP and CRP concentrations between males and females ($P = 0.400$, $P = 0.628$ and $P = 0.114$, respectively). Statistical results obtained comparing values of haptoglobin, Pig-MAP and CRP between all pairs of weeks of age using a Wilcoxon test are shown in Table 2. Pig-MAP serum concentration decreased between weeks 6 and 8 ($P = 0.002$), that was the period where animals entered into the fattening farm. Curiously, the concentration of this protein decreased progressively until 13 weeks of age. On the other hand, haptoglobin and CRP did not show significant fluctuations in their serum concentrations from 6 to 10 weeks of age.

Between 11 and 15 weeks of age, APP serum concentrations showed some oscillations. Thus, an increase in haptoglobin and CRP serum concentration, but not Pig-MAP, was detected at 11 weeks of age whereas all three APP increased at 15 weeks of age, especially CRP. From 15 to 19 weeks of age, APP serum concentrations did not change significantly but, at 21 weeks of age, haptoglobin and CRP concentration showed a statistical tendency to increase compared with the previous sampling time ($P = 0.061$ for haptoglobin and $P = 0.074$ for CRP), whereas no changes were observed in Pig-MAP ($P = 0.724$). Finally, all three APP serum concentrations increased significantly at 23 weeks of age compared with the values observed at 21 weeks of age ($P < 0.001$).

A Pearson correlation analysis was performed between all pairs of haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations at each sampling time. The association between each pair of proteins, measured as the coefficient of correlation, was variable depending on the studied week and the specific protein. The highest significant positive correlation was found between haptoglobin and Pig-MAP, which correlated 9 weeks out of a total of 11 weeks ($r > 0.6$ and $P < 0.05$). CRP showed a lower association with the other APPs, with the highest significant correlation with haptoglobin and Pig-MAP at 19 and 21 weeks of age ($r > 0.7$ and $P < 0.01$).

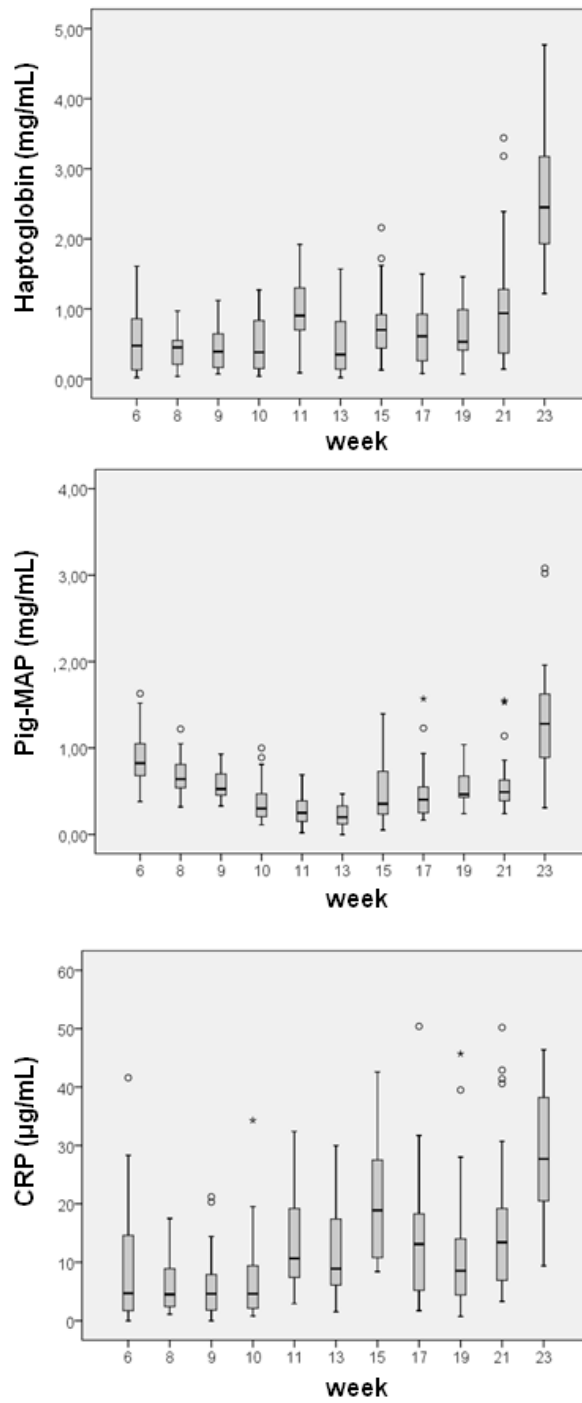


Fig. 2. Haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations throughout the productive cycle (from 6 to 23 weeks of age) in this longitudinal study.

Table 1. Descriptive statistics of haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations values in pigs from 6 to 23 weeks of age.

SD, standard deviation; a10th to 90th percentiles interval.

Age	Haptoglobin (mg/ml)			Pig-MAP (mg/ml)			CRP (μ g/ml)		
	Mean	SD	Range ^a	Mean	SD	Range ^a	Mean	SD	Range ^a
6	0.56	0.47	0.04-1.36	0.89	0.31	0.57-1.35	9.98	10.03	1.15-26.77
8	0.41	0.25	0.06-0.78	0.67	0.20	0.44-0.86	5.85	4.43	1.20-12.60
9	0.43	0.30	0.10-0.87	0.58	0.18	0.42-0.89	6.40	5.86	0.80-14.99
10	0.49	0.39	0.05-1.11	0.36	0.23	0.14-0.82	5.98	5.14	1.50-13.94
11	0.94	0.48	0.18-1.60	0.28	0.18	0.09-0.59	12.73	7.4	3.64-23.40
13	0.50	0.45	0.05-1.38	0.24	0.12	0.10-0.45	11.02	6.93	4.06-21.29
15	0.78	0.49	0.23-1.62	0.48	0.34	0.11-1.09	20.78	9.94	9.40-34.90
17	0.67	0.43	0.17-1.34	0.48	0.33	0.20-1.02	13.04	8.57	3.57-29.38
19	0.69	0.40	0.07-1.35	0.54	0.19	0.34-0.84	12.27	11.23	2.49-27.92
21	1.03	0.85	0.20-2.39	0.59	0.33	0.33-1.14	16.01	13.04	3.60-41.40
23	2.66	0.93	1.46-4.06	1.35	0.69	0.58-2.59	28.90	10.37	15.28-43.38

Table 2. Statistical results obtained comparing values of haptoglobin, Pig-MAP and CRP between all pairs of weeks of age using a Wilcoxon test. NA: Not applicable. NS: not significant; * *P* between 0.05 and 0.01; ** *P* between 0.01 and 0.001

Haptoglobin	6	8	9	10	11	13	15	17	19	21	23
6	NA	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**	**
8		NA	NS	NS	**	NS	**	*	**	**	**
9			NA	NS	**	NS	**	NS	**	**	**
10				NA	**	NS	**	NS	NS	**	**
11					NA	NS	NS	NS	NS	NS	**
13						NA	*	NS	NS	**	**
15							NA	NS	NS	**	**
17								NA	NS	**	**
19									NA	NS	**
21										NA	**
23											NA
Pig-MAP	6	8	9	10	11	13	15	17	19	21	23
6	NA	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
8		NA	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**
9			NA	**	**	**	NS	NS	NS	NS	**
10				NA	NS	*	*	NS	**	**	**
11					NA	NS	**	**	**	**	**
13						NA	**	**	**	**	**
15							NA	NS	NS	**	**
17								NA	NS	NS	**
19									NA	NS	**
21										NA	**
23											NA
CRP	6	8	9	10	11	13	15	17	19	21	23
6	NA	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	**
8		NA	NS	NS	**	**	**	**	**	**	**
9			NA	NS	**	**	**	**	**	**	**
10				NA	**	**	**	**	**	**	**
11					NA	NS	**	NS	NS	NS	**
13						NA	**	NS	NS	NS	**
15							NA	**	**	**	**
17								NA	NS	NS	**
19									NA	NS	**
21										NA	**
23											NA

Discussion

Haptoglobin and CRP serum concentration did not change significantly from 6 up to 21 weeks of age, except after vaccination (see below), whereas Pig-MAP showed a different profile. Thus, its serum concentration was higher at 6 weeks of age and decreased progressively up to 13 weeks of age. These results are similar to those reported for fattening pigs, where the authors suggested that high values in young pigs might be due to stress caused by weaning.¹⁷ No differences in serum concentration for any of the three APPs were found after short transport (30 min), i.e., between 6 and 8 weeks of age. These results were similar to those reported by us in a previous study.⁵

Pigs received an Aujeszky MLV vaccine at 11 and 15 weeks of age. After the first vaccination, CRP and haptoglobin serum concentrations significantly increased compared with the previous sampling time ($P < 0.001$ for both). Afterwards, this value decreased in the following sampling time (week 13) reaching pre-vaccination values and it increased after the second vaccine, being CRP more sensitive to the vaccine administration. In contrast, significant differences ($P < 0.05$) in Pig-MAP serum concentration were only observed after revaccination. Experimental infection of pigs with Aujeszky virus also showed a more sensitive response of haptoglobin compared to Pig-MAP.¹⁸ In our case, the increase is lower than the described for these authors, but this difference may be explained because the virulence of a MLV is always lower than the wild virus.¹⁹ The increase in Pig-MAP and haptoglobin concentration at 12 weeks of age described by Piñeiro et al.,¹⁷ might be explained by the administration of standard vaccines although no information on this aspect is provided by the authors.

Viral (PRRSV and SIV) and bacterial infections (*M. hyopneumoniae*) are highly prevalent in most of the Spanish farms.²⁰ Nevertheless, little information is available on the use of APPs as markers of enzootic infections in the field, particularly in subclinical cases where clinical symptoms are barely observed. Haptoglobin, Pig-MAP and CRP serum concentrations did not increase between weeks 8, 9 and 10 when the PRRSV recirculation took place, indicating that this subclinical condition was not affecting APP serum concentrations. Therefore, our results suggest that APPs are not appropriate biomarkers for subclinical PRRSV infection in pigs, similarly Segalès et al., could not find significant differences in haptoglobin and Pig-MAP concentrations in pigs subclinically infected with porcine circovirus (PCV2).^{3,4}

The utility of APPs as biomarkers in respiratory diseases with clear clinical signs has been widely described.²¹⁻²³ In the farm included in the present study, a clinical outbreak with serious respiratory problems (PRDC) was clearly observed at 23 weeks of age, with 16% of the animals showing mild respiratory symptoms at 21 weeks of age. All three APPs showed significant increases in their serum concentration the last sampling time, as expected. Our results suggest that haptoglobin may be the best indicator for these clinical problems (comparing weeks 23 and 19) and that haptoglobin and CRP may be the most sensitive at the beginning of a respiratory outbreak (comparing weeks 21 and 19).

The association between each pair of proteins, measured as the coefficient of correlation was variable depending on the studied week and the specific protein. The strongest correlation was found between haptoglobin and Pig-MAP during the clinical outbreak, when proinflammatory cytokines are released after infection. The milder correlation between CRP and the other two APPs could be due to the fact that haptoglobin and Pig-MAP have been described as being mainly induced by IL-6, whereas CRP would be predominantly regulated by IL-1.²⁴ The kinetics of haptoglobin and Pig-MAP have also been found quite similar in different studies.^{21,25,26}

Furthermore, we have observed differences in the kinetic profile of haptoglobin, Pig-MAP and CRP throughout time. Haptoglobin is less dependent on age and it has a good sensitivity for vaccination and as biomarker for infection. Moreover, this protein has been shown also to be a good biomarker for productive parameters.^{8,9,27} Pig-MAP concentration is not as sensitive to challenges as Aujeszky vaccination and it may need a longer period of reaction time to increase its concentration after infection. Nevertheless, it may have specific interest since it has been proposed as a good biomarker for lung problems in slaughterhouse-aged pigs²⁸⁻³¹ and also as a sensitive biomarker for stress.^{6,32} CRP has shown to be a sensitive indicator for disease and vaccination and this is an interesting finding due to the scarce information available for this protein. In conclusion, although APPs are usually considered as biomarkers with similar meanings, the present preliminary results suggest that differences exist that may recommend one particular APP determination depending on the event to be monitored (vaccination, infection, etc...).

Implications

Haptoglobin and CRP have shown to be sensitive biomarkers for disease and Aujeszky vaccination.

Pig-MAP is not very sensitive to Aujeszky vaccination and it may need a longer period of reaction time to increase after infection.

This knowledge may spread the use of APPs under field conditions to monitorize not only health status but also management procedures such as vaccination.

Acknowledgements: This work was supported by grant AGL2006-02365 and AGL2010-21578 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnologia, and grant 2009 SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya.

References

1. Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 2004;35:163-187.
2. Carrol, JA, Fangman TJ, Hambach AK, Wiedmeyer CE. The acute phase response in pigs experimentally infected with *Escherichia coli* and treated with systemic bactericidal antibiotics. *Livestock Production Science* 2004;85:35-44.
3. Segales J, Pineiro C, Lampreave F, Nofrarias M, Mateu E, Calsamiglia M, Andres M, Morales J, Pineiro M, Domingo M. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Research* 2004;35:275-282.
4. Grau-Roma L, Heegaard PM, Hjulsager CK, Sibila M, Kristensen CS, Allepuz A, Pineiro M, Larsen LE, Segales J, Fraile L. Pig-major acute phase protein and haptoglobin serum concentrations correlate with PCV2 viremia and the clinical course of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Microbiology* 2009;138:53-61.
5. Saco Y, Docampo MJ, Fabrega E, Manteca X, Diestre A, Lampreave F, Bassols A. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare* 2003;12:403-409.
6. Pineiro C, Pineiro M, Morales J, Carpintero R, Campbell FM, Eckersall PD, Toussaint MJM, Alava MA, Lampreave F. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 2007;1:133-139.
7. Salamano G, Mellia E, Candiani D, Ingravalle F, Bruno R, Ru G, Doglione L. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Veterinary Journal* 2008;177:110-115.

8. Clapperton M, Bishop SC and Cameron ND, Glass EJ. Associations of acute phase protein levels with growth performance and with selection for growth performance in Large White pigs. *Animal Science* 2005;81:213-220.
9. Saco Y, Fraile LJ, Gimenez M, Pato R, Montoya M, Bassols A. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal* 2010;4:1561-1567.
10. Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In Straw BE, Dállaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, eds. *Disease of Swine*. 8th edition. Ames, Iowa: Iowa State University Press;1999:913-940.
11. Subcommittee on Swine Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council. Nutrient Requirements of Swine: 10th rev ed. Washington, DC: National Academy Press; 1998.
12. Saco Y, Fraile L, Gimenez M, Canalias F, Bassols A. Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein. *Research in Veterinary Science* 2010;89:159-162.
13. CLSI C28-A3, Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory. Clinical Laboratory and Standards Institute. 2008.
14. Kothalawala H, Toussaint MJ, Gruys E. An overview of swine influenza. *The Veterinary Quarterly* 2006;28:46-53.
15. Fano E, Pijoan C, Dee S. Infection dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous-flow population of pigs also infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *The Veterinary Record* 2007;161:515-520.
16. Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segales J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Journal* 2009;181:221-231.
17. Pineiro C, Pineiro M, Morales J, Andres M, Lorenzo E, Pozo MD, Alava MA, Lampreave F. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *Veterinary Journal* 2009;179:78-84.
18. Carpintero R, Alonso C, Pineiro M, Iturralde M, Andres M, Le Potier MF, Madec F, Alava MA, Pineiro A, Lampreave F. 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. *Veterinary Research* 2007;38:741-753.
19. Shams H. Recent developments in veterinary vaccinology. *Veterinary Journal* 2005;170:289-299.

20. Fraile L, Alegre A, Lopez-Jimenez R, Nofrarias M, Segales J. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary Journal* 2010;184:326-333.
21. Heegaard PM, Klausen J, Nielsen JP, Gonzalez-Ramon N, Pineiro M, Lampreave F, Alava MA. 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 1998;119:365-373.
22. Magnusson U, Wilkie B, Artursson K, Mallard B. Interferon-alpha and haptoglobin in pigs selectively bred for high and low immune response and infected with *Mycoplasma hyorhinis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1999;68:131-137.
23. Gomez-Laguna J, Salguero FJ, Pallares FJ, Fernandez de Marco M, Barranco I, Cerón JJ, Martinez-Subiela S, Van Reeth K, Carrasco L. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2010;33:51-58.
24. Gonzalez-Ramon N, Hoebe K, Alava MA, Van Leengoed L, Pineiro M, Carmona S, Iturralde M, Lampreave F, Pineiro A. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:1878-1885.
25. Sorensen NS, Tegtmeier C, Andresen LO, Pineiro M, Toussaint MJ, Campbell FM, Lampreave F, Heegaard PM. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006;113:157-168.
26. Clapperton M, Bishop SC, Pineiro M, Campbell FM, Glass EJ. The association between plasma levels of acute phase proteins, haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2007;119:303-309.
27. Eurell TE, Bane DP, Hall WF, Schaeffer DJ. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 1992;56:6-9.
28. Petersen HH, Dideriksen D, Christiansen BM, Nielsen JP. Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs. *The Veterinary Record* 2002;151:85-89.

29. Amory JR, Mackenzie AM, Eckersall PD, Stear MJ, Pearce GP. Influence of rearing conditions and respiratory disease on haptoglobin levels in the pig at slaughter. *Research in Veterinary Science* 2007;83:428-435.
30. Pallares FJ, Martinez-Subiela S, Seva J, Ramis G, Fuentes P, Bernabe A, Munoz A, Ceron JJ. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Veterinary Journal* 2008;177:369-373.
31. Saco Y, Fraile L, Gimenez M, Alegre A, Lopez-Jimenez R, Cortey M, Segales J, Bassols A. Serum acute phase proteins as biomarkers of pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Research in Veterinary Science* 2011;91:52-57.
32. Marco-Ramell A, Pato R, Pena R, Saco Y, Manteca X, Ruiz de la Torre JL, Bassols A. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Veterinary Journal* 2011; 190: 66-71.

Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs



Y. Saco, L. Fraile, M. Giménez, R. Pato, M. Montoya and A. Bassols.

Animal 2010; 4:1561-7

Abstract

Levels of haptoglobin and Pig-major acute phase protein (Pig-MAP) were analysed in animals from a commercial herd receiving or not a diet enriched with an additive. The group receiving the additive exhibited a decrease in haptoglobin after three weeks, suggesting that a better health status has been established, together with an improvement in total body weight and average daily gain. In contrast, Pig-MAP does not significantly change under these conditions. Aujeszky live modified vaccination, which is compulsory in Spain, did cause a significant increment in haptoglobin serum concentration although it did not affect Pig-MAP. The response of acute phase proteins to vaccination was similar in both control and additive-treated groups. Interleukins IL-1 β and IL-6 were below the detection limits in most of the animals. In conclusion, this study shows that haptoglobin serum concentration, but not Pig-MAP, is a good biomarker to monitorize production parameters and for monitoring Aujeszky MLV in pigs reared under standard commercial conditions.

Keywords: Acute Phase Proteins feed additive, Aujeszky vaccine, Swine.

Implications

The goal of using immunomodulators as food additives for pigs is to improve their immune system and, hopefully, the production parameters. It has been suggested that serum acute phase proteins (APPs), which are well known markers for infection and inflammation, may be used as an index for monitoring productive performance. Our results show that the use of a feed additive with immunomodulatory properties was able to improve the production parameters and that serum haptoglobin decreases concomitantly, suggesting an improved health status of the animals. Furthermore, haptoglobin serum concentration could be considered a good biomarker to monitor production parameters and for monitoring Aujeszky MLV in animals reared under standard commercial conditions.

Introduction

Acute phase proteins (APPs) are a group of blood proteins that change its concentration in animals subjected to external or internal challenges such as infection, inflammation, surgical trauma or stress (Murata et al., 2004). After the challenge, there is an increase in the plasma concentration of some APPs, such as haptoglobin (Hp), Pig-MAP, serum amyloid A (SAA) and C-reactive protein (CRP); those are named positive APPs. On the other hand, other proteins decrease, such as albumin, which represent the negative APPs. Positive APPs are synthesized in the liver under the stimulus of proinflammatory cytokines, such as interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) (Murata et al., 2004).

Concentrations of serum APPs have been related to the severity of underlying disease and therefore they may act as markers for the presence and extent of disease processes (Eckersall et al., 1999; Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004). Thus, increased serum levels of APPs have been reported in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus, porcine circovirus type 2 (PCV2), different serotypes of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Streptococcus suis* (Heegaard et al., 1998; Asai et al., 1999; Hulten et al., 2003; Diaz et al., 2005; Sorensen et al., 2006; Stevenson et al., 2006). Serum APPs also increase in pigs naturally infected with *A. pleuropneumoniae* (Hall et al., 1992) and in field cases of postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex (Segales et al., 2004; Parra et al., 2006).

It has been also suggested that serum APPs may be used as an index for monitoring productive performance. In particular, low serum APPs have been correlated with better production parameters in pigs (Eurell et al., 1992; Clapperton et al., 2005; Pineiro et al., 2007a).

Nutraceutical is a food that provides medical or health benefits, including prevention or treatment of disease. Nutraceuticals are the fastest growing category of immunomodulators today (Hardy, 2000; Blecha, 2001). The goal of using immunomodulators as food additives for pigs is to enhance immune responses after vaccination or to overcome infectious diseases in swine and, indirectly, to improve

production parameters. The immunomodulator used in the present study, Inmunicin MAYMO, is based on plant foods phytosterols, and it is authorized in Spain as a complementary feed for pigs. This additive targets specific T-helper lymphocytes by increasing the Th1 activity and resulting in improved T-lymphocyte and natural killer cell activity (Fraile et al., 2009).

Finally, Aujeszky modified live vaccination (MLV) is widely used in Spain because of the compulsory national eradication program in course. To our knowledge, there is information available about the acute phase protein response after challenge with wild type Aujeszky virus (Carpintero et al., 2007) but there is a paucity of information about the serum APPs profile in pigs undergoing standard vaccination programs under field conditions.

The main goal of this work was to study whether or not any correlation between serum levels of two APPs (Hp and Pig-MAP) and production parameters could be established in animals receiving or not receiving a feed additive with immunomodulatory properties. Secondly, we studied the relationship between APP concentrations and standard vaccination programs (Aujeszky vaccination) under field conditions.

Materials and Methods

Experimental design and production parameters

A total of 360 piglets [(Landrace x Duroc) x Pietrain]; mixed males and females from a commercial herd were used. The animals were weaned at 18 to 22 days of age and housed in a weaning room equipped with automatic heating and forced ventilation. At six weeks of age (three weeks after being in this facility), the animals were allocated into 14 pens (7 pens per treatment) following a complete randomized design to get a similar starting weight at the beginning of the trial. 180 animals were treated with immunomodulator mixed with its feed as previously described (Fraile et al., 2009) (2 Kg of Inmunicin MAYMO per tonne) from 6 to 14 weeks of age. The exact composition of Inmunicin MAYMO (immunomodulator, Laboratorios Maymó, S.A., Barcelona, Spain), is protected under a Spanish patent (Tracking number: P200603091/4). The rest of the animals (180 pigs) were fed with standard feed according to the Institut National de la Recherche Agronomique (I.N.R.A., France) recommendations. At 8 weeks of age, they were moved to a finishing facility (30 min road transport) and distributed into 26 pens

(13 pens per treatment). Moreover, animals were vaccinated with an Aujeszky MLV European vaccine (Auskipra GN, Hipra Laboratories, Amer, Girona, Spain) at 11 and 15 weeks of age. The piglets had free access to feed and water. All the animals were weighed at 6, 10 and 14 weeks of age and pen feed consumption was registered daily.

Blood samples were drawn in a fixed subpopulation of 30 animals by experimental group at 6, 8, 9, 10, 11, 13, and 15 weeks of age throughout the trial in tubes without anticoagulant. Moreover, sample collection at 8 weeks of age was carried out 24 hours after transportation and sample collection at 11 and 15 weeks of age was performed 24 hours after Aujeszky MLV. A schematic diagram of the experiment is shown in Figure 1.

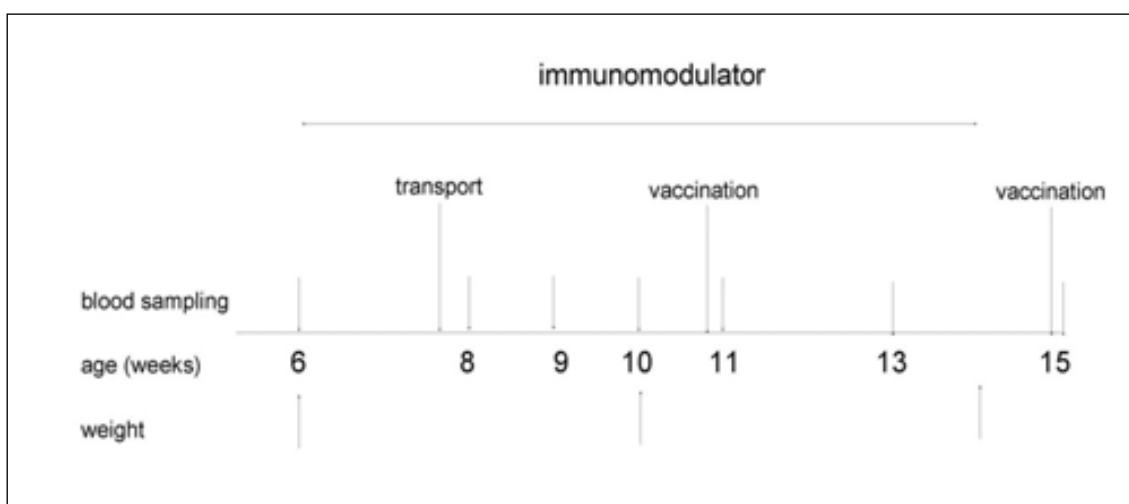


Figure 1: Experimental design of blood sampling, immunomodulator supplementation, and Aujeszky modified live vaccine vaccination.

The experiment received prior approval from the Local Ethical Committee for Animal Experimentation of the Institution. The treatment, housing, husbandry, and slaughtering conditions conformed to the European Union Guidelines (Council Directive 91/630/EEC).

Determination of acute phase proteins and interleukins

Serum was collected by centrifugation and frozen at -20°C until assay. Haptoglobin was quantified by using a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) with commercial reagent from Tridelta Development Limited (Bray, Ireland) and performed on

an automated analyzer (Olympus AU400, Hamburg, Germany). Pig-MAP levels were assessed with an ELISA kit (PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain). Calibrators for both assays were supplied by the reagent manufacturer. The intra-assay and inter-assay coefficient of variations were determined by measuring haptoglobin and Pig-MAP concentrations on high (1.35 mg/ml for haptoglobin and 1.61 mg/ml for Pig-MAP) and low concentration (0.31 mg/ml for haptoglobin and 0.46 mg/ml for Pig-MAP) serum samples according to the guideline EP15-A2 (User Verification of performance for Precision and Trueness) of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Results were the following for high and low concentration serum: haptoglobin (intra-assay: 0.8% and 3.2%; inter-assay: 6.6% and 13.8%) and Pig-MAP (intra-assay: 8.2% and 11%; inter-assay: 12% and 25%). Results of haptoglobin were consistent with the manufacturer's claim and results of Pig-MAP precision study were similar to those described by other authors (Tecles et al., 2007). Detection limits were 0.05 mg/ml for haptoglobin and 0.0002 mg/ml for Pig-MAP as indicated by the manufacturer.

IL-6 and IL-1 β were determined using an ELISA kit specific for porcine samples (Quantikine R&D Systems, MN, USA). Detection limit was 10 pg/ml for both cytokines.

Enzootic diseases diagnosis

In order to describe the infection dynamics of PRRSV, swine influenza virus (SIV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), antibodies to Mhyo, SIV and PRRSV were determined using HerdChek® Mhyo (Idexx Laboratories, Westbrook, ME, USA) antibody test, CIVTEST Suis Influenza (Hipra Laboratories, Amer, Girona, Spain) and HerdChek® Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (Idexx Laboratories) antibody test ELISA kits, respectively, following manufacturer's instructions in both subpopulations selected for blood sampling times (30 animals in each experimental group) at 6, 8, 9, 10 and 15 week-old pigs.

Data Analyses

Average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR) was calculated as follows:

ADG: It was calculated at 10 and 14 weeks of age as the difference between each individual final weight (10 and 14 weeks of age) and each individual initial weight (6 weeks of age) divided by 28 or 56, respectively.

FCR: It was calculated at 10 and 14 weeks of age as the feed consumption (pen level) during the study period (6 to 10 or 6 to 14 weeks of age) / (final weight - initial weight of all pigs belonging to each pen at the study period).

A non-parametric test (Mann-Whitney) was used to compare the concentrations of serum APPs between immunodulator-treated and control group at each sampling time. Thereafter, a similar statistical analysis was carried out between APPs serum concentrations observed at 10, 11, 13 and 15 weeks of age taking into account the Aujeszky MLV as classification factor each sampling time. On the other hand, data on productive performance (ADG and FCR) were subjected to one-way ANOVA with immunodulator treatment as the classification factor, using the program NCLLS (Kaysville, Utah, USA). To carry out the statistical analysis, pen was used as the experimental unit for feed efficiency and pig was used as the experimental unit for acute phase proteins and average daily gain. The alpha level used for determination of significance for all analyses was $P < 0.05$, with statistical tendencies reported when $P < 0.10$.

Results

Clinical examination and enzootic disease diagnosis

None of the groups had any relevant clinical sign at any time point during IM oral treatment or during the vaccination period. Treatment with IM did not cause any adverse reaction during the entire experiment period.

Serum antibodies against PRRSV, Mhyo and SIV were observed at the beginning of the trial (6 weeks of age) in 21 (35%), 30 (50%) and 48 (80%) out of 60 animals of the subpopulation selected for blood sampling respectively, which were attributable to colostral antibodies (Kothalawala et al., 2006, Fano et al., 2007, Sibila et al., 2009). This percentage of positive animals, determined by serum antibodies, decreased progressively for Mhyo and SIV until all animals were serologically negative for these pathogens at 15 weeks of age. However, a sudden increase in the percentage of positive animals to PRRS virus was observed between 8 (35% positive animals) and 9 weeks (77% positive animals) of age indicating that this virus recirculated during this period of time in the pig population although clinical symptoms were absent. The recirculation pattern was similar between immunomodulator treated and control groups (not shown).

Productive performance

Data on growth performance are shown in Table 1 and 2. At the beginning of the experiment (6 weeks of age), control and immunomodulator groups showed similar initial body weights (basal homogeneity). However, total body weight was progressively different between both groups throughout the experiment (Table 1). In fact, mean body weight in the immunomodulator treated group was higher (1.43 Kg) than the control group at 14 weeks of age, showing a tendency towards significance ($P=0.07$). Average daily gain in the immunomodulator treated group was 13.8 g/d higher than the control group during the period 6 to 10 weeks of age (322.8 versus 309 g/d, $P=0.10$) and 23.2 g/d higher than the control group during the period 6 to 14 weeks (524.8 versus 501.6, $P=0.04$). On the other hand, feed efficiency was always better in the immunomodulator treated group (lower numerical values) throughout the trial (Table 2) although significant differences were not observed ($P>0.05$).

Table 1. Total body weight of the pigs fed with control or IM supplemented diets.

Age (weeks)	Control group (kg)	IM group (with immunomodulator) (kg)	P^{\dagger}
6	8.7 \pm 1.6	8.8 \pm 2.1	0.54
10	17.4 \pm 3.3	17.9 \pm 3.6	0.20
14	36.8 \pm 6.4	38.2 \pm 7.1	0.07

\dagger Variables were compared using one-way ANOVA.

Table 2. Growth performance of the pigs fed with control or IM supplemented diets. Results are expressed as arithmetic mean \pm standard deviation.

Parameter	Control group	IM group (with immunodulator)	<i>P</i> [†]
6 to 10 weeks of age			
Average daily gain‡ (g/day)	309 \pm 75.4	322.8 \pm 67.8	0.10
Feed efficiency§ (kg feed / kg weight increase)	2.20 \pm 0.55	2.16 \pm 0.49	0.55
6 to 14 weeks of age			
Average daily gain‡ (g/day)	501.6 \pm 94.6	524.8 \pm 98.3	0.04
Feed efficiency§ (kg feed / kg weight increase)	2.25 \pm 0.4	2.20 \pm 0.36	0.22

† Variables compared using one-way ANOVA.

‡ Average daily gain (ADG) = (body weight of each pig at week 10 or 14 - initial weight of each pig at the beginning of the trial) / length of the study period (28 or 56 days, respectively).

§ Feed efficiency at pen level = feed consumption during the study period (pen level) at week 10 or 14 / (final weight of all pigs belonging to each pen at the study period - initial weight of all pigs belonging to each pen at the study period).

Acute phase proteins and interleukin determinations

Given the differences in productive performance observed in both groups, APP concentrations were studied to assess whether or not there was a correlation between both parameters. Hp and Pig-MAP serum concentrations along the study are shown in Figures 2 and 4. At the beginning of the trial (6 weeks of age), control and immunomodulator treated groups showed similar Hp and Pig-MAP serum concentration profiles (basal homogeneity). Three weeks after immunomodulator treatment (week 9), Hp serum concentrations were significantly lower in pigs treated with this product compared to control pigs ($P < 0.01$). This observation was confirmed in two consecutive sampling points (9 and 10 weeks of age) (Fig. 2). Hp serum concentration showed a bimodal distribution at week 8 in both control and immunomodulator-treated groups (Fig. 3A, B). However, at week 9, the control group showed a bimodal distribution of Hp values whereas the immunomodulator treated group showed a skewed distribution towards low Hp values (Fig. 3D, E). A similar pattern was observed at week 10 (not shown). Figure 3C and 3F clearly showed that Hp means in control and immunomodulator treated groups were similar at week 8, but clearly different at week 9.

At 11 weeks of age (24h after receiving an Aujeszky MLV), Hp serum concentrations significantly increased compared with the previous sampling time ($P < 0.001$). Afterwards, this value decreased in the following sampling time (two weeks later) reaching the pre-vaccination values (Figure 2). A similar haptoglobin response was observed after the second Aujeszky MLV (15 weeks of age). The Hp response to vaccination was similar in both control and immunomodulator treated pigs.

In contrast, no significant differences ($P > 0.05$) were observed in Pig-MAP serum concentrations between immunomodulator treated and non-treated pigs or Aujeszky MLV vaccinated or non-vaccinated animals throughout the trial (Figure 4).

IL-6 and IL-1 β serum concentrations were below the quantification limit of the technique in most of the individuals (data not shown).

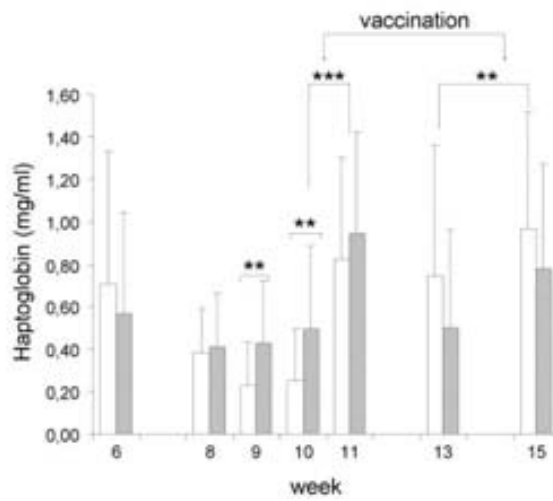


Figure 2: Haptoglobin concentration in the serum of pigs from 6 to 15 weeks of age in groups treated (open bars) or not with the immunomodulator (dashed bars). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

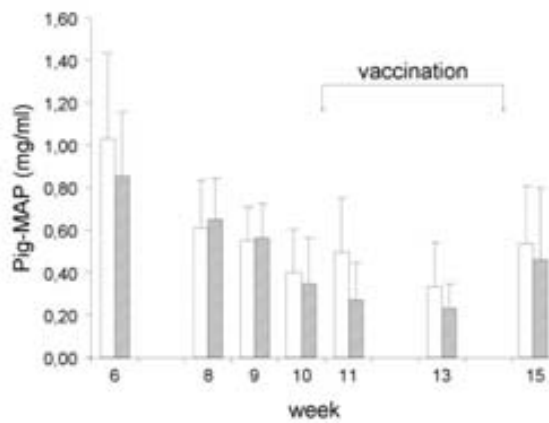


Figure 4: Pig-MAP concentration in the serum of pigs from 6 to 15 weeks of age in groups treated (open bars) or not with the immunomodulator (dashed bars).

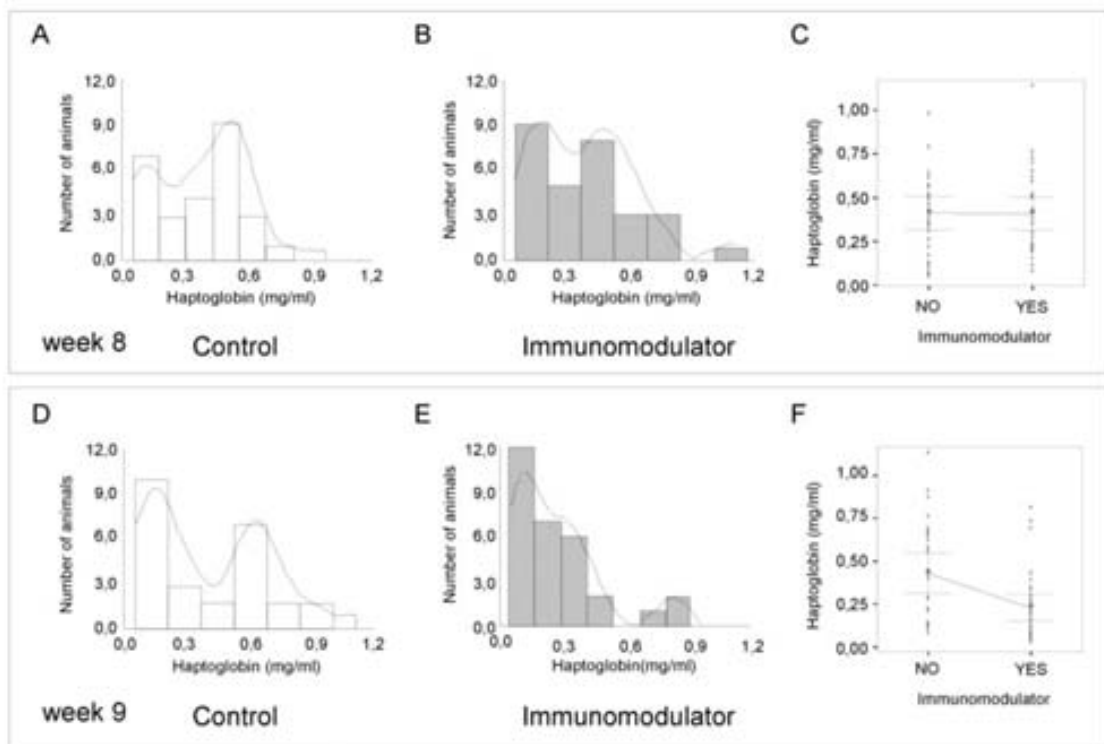


Figure 3: Distribution of haptoglobin concentration in the serum of all studied pigs in groups treated or not with the immunomodulator at 8 and 9 weeks of age.

Discussion

To test the assumption that APP measurement may be an indicator of productive performance in porcine farms, we have used an immunomodulator which is able to improve the production parameters and mortality in commercial conditions (Fraile et al., 2009) for assessing whether it was also able to lower APP levels in apparently healthy pigs. Our results indicated that this was indeed the case since lower haptoglobin levels together with improved production parameters were observed in immunomodulator-treated animals. These findings suggested that the immunomodulator may actually enhance the immune status in the animals, in agreement with former results of our group (Fraile et al., 2009). The higher values of serum haptoglobin in control animals would probably be a consequence of APPs being released by the liver as a result of the acute phase response to subclinical infection, which would cause an infection-induced reduction in productivity. These results are in agreement with published data indicating a relationship between haptoglobin serum levels and productive performance in pigs younger than 13 weeks old (Eurell et al., 1992, Grellner et al., 2002) and also during the critical phase of post-weaning growth and adult pigs (Clapperton et al., 2005, Pineiro et al.,

2007a). Moreover, haptoglobin was also found to be negatively correlated to growth rate in pigs fed a diet supplemented with β -glucans as growth promoter (Hiss and Sauerwein, 2003). In contrast, the present results showed that Pig-MAP serum levels were not significantly altered during immunomodulator administration.

The APP response itself may contribute to the differences in growth performance between control and immunomodulator-treated pigs, since it has been suggested that, in diseased animals or even after vaccination, aminoacids may be diverted from muscle protein synthesis to APPs synthesis (Gruys et al., 2005). Noticeably, if the concentration of acute phase protein is diminished in immunomodulator-treated pigs, a higher amount of aminoacids could be available for muscle protein synthesis providing a partial explanation for better production parameters observed in the immunomodulator treated group.

On the other hand, Aujeszky MLV as well as revaccination did cause a significant increment in haptoglobin serum concentration but it did not seem to affect Pig-MAP. This result agrees with those obtained in pigs clinically affected after experimental infection with Aujeszky virus and Aujeszky field cases, where a more sensitive response of haptoglobin changes is observed compared to Pig-MAP (Parra et al., 2006, Carpintero et al., 2007), although, in our case, the magnitude of the increase is lower than the described for these authors. These results are foreseeable because the virulence of a MLV is always lower than the wild virus (Shams, 2005).

Finally, it is worth highlighting the different kinetic profile of the haptoglobin and Pig-MAP response to the immunomodulator-treatment and to Aujeszky vaccination. Although these results suggest that Pig-MAP may not be a good biomarker for productive performance or response to AD vaccination, it is worth mentioning that Pig-MAP seems to be a better marker than haptoglobin for other conditions, such as transport stress (Pineiro et al., 2007b) or as a screening tool for enzootic pneumonia or cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs (Saco et al., submitted).

Furthermore, despite the fact that haptoglobin and Pig-MAP seem to correlate in several diseases (Sorensen et al., 2006, Martin de la Fuente et al., 2008), differences in both proteins have been described in viremic pigs subjected to experimental infections with African Swine Fever (ASFV) and Aujeszky disease (Carpintero et al., 2007), or in PRRS

and Aujeszky disease field cases (Parra et al., 2006). Our results clearly show that haptoglobin and Pig-MAP also display a different profile in pigs after an Aujeszky MLV or after receiving an immunomodulator that might improve their health status. These data show that some difference should exist in the fine regulation of both proteins, as already proposed (Clapperton et al., 2007). Both APPs have been described as being IL-6-dependent (Marinkovic and Baumann, 1990; Gonzalez-Ramon et al., 1995). Unfortunately, serum IL-6 and IL-1 β values were not detectable in most of the individuals and it did not give any information about the biochemical regulation of these proteins in pigs. Additional studies are clearly needed to clarify this question.

All together, haptoglobin is shown to be a better biomarker than inflammatory cytokines, since serum IL-6 and IL-1 β values were below the quantification limit of the technique in most of the individuals in the present study. It has been already reported that quantification of the systemic cytokine response is difficult due to low circulating concentrations, short half-life and the presence of inhibitors and antagonist, whereas the APPs are produced in significant amounts in response to these pro-inflammatory cytokines (Eckersall et al., 2001, Gruys et al., 2005).

In conclusion, our results show that the use of a feed additive with immunomodulatory properties was able to improve the production parameters and that serum haptoglobin decreases concomitantly. Hence, haptoglobin serum concentration could be considered a good biomarker to monitor production parameters and for monitoring Aujeszky MLV in animals reared under standard commercial conditions.

Acknowledgements

This work was funded by a research contract of Laboratorios MAYMO with CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal) and by the following grants: AGL2006-13809-C02-01 and AGL2006-02364/GAN from the Spanish "Ministerio de Educacion y Ciencia". The authors are extremely grateful to Lorenzo Mendoza, (Veterinarian of PICBER S.A), Josep Solé and Ramón Ribau for their collaboration to this work.

References

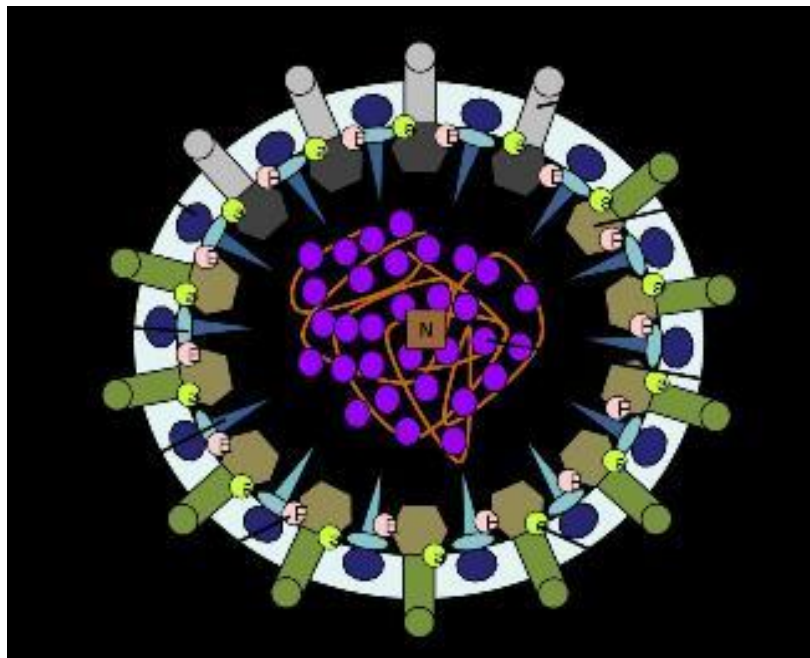
- Asai T, Mor, M, Okada M, Uruno K, Yazawa S and Shibata I 1999. Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70, 143-148.
- Blecha F 2001. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice* 17, 621-33, viii.
- Carpintero R, Alonso C, Pineiro M, Iturralde M, Andres M, Le Potier MF, Madec F, Alava MA, Pineiro A and 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. *Veterinary Research* 38, 741-753.
- Clapperton M, Bishop SC and Glass EJ 2005. Innate immune traits differ between Meishan and Large White pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104, 131-144.
- Clapperton M, Bishop SC, Pineiro M, Campbell FM and Glass EJ 2007. The association between plasma levels of acute phase proteins, haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), Pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119, 303-309.
- CLSI, 2005. EP15-A2: User Verification of Performance for Precision and Trueness.
- Diaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J and Mateu E 2005. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *The Journal of General Virology* 86, 1943-1951.
- Eckersall PD, Gow JW, McComb C, Bradley B, Rodgers J, Murray M and Kennedy PG, 2001. Cytokines and the acute phase response in post-treatment reactive encephalopathy of *Trypanosoma brucei brucei* infected mice. *Parasitology International* 50, 15-26.
- Eckersall PD, Duthie S, Toussaint MJ, Gruys E, Heegaard P, Alava M, Lipperheide C and Madec F 1999. Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Advances in Veterinary Medicine* 41, 643-655.

- Eurell TE, Bane DP, Hall WF and Schaeffer DJ 1992. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 6-9.
- Fano E, Pijoan C and Dee S, 2007. Infection dynamics of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a continuous-flow population of pigs also infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record* 161, 515-520.
- Fraile LJ, Crisci E, Weenberg J, Armadans M, Mendoza L, Ruiz L, Bernaus S and Montoya M 2009. Effect of treatment with phytosterols in three herds with porcine respiratory disease complex. *Journal Swine Health and Production* 17, 298-307.
- Gonzalez-Ramon N, Alava MA, Sarsa JA, Pineiro M, Escartin A, Garcia-Gil A, Lampreave F and Pineiro A 1995. The major acute phase serum protein in pigs is homologous to human plasma kallikrein sensitive PK-120. *FEBS Letters* 371, 227-230.
- Grellner GF, Fangman TJ, Carroll JA and Wiedmeyer CE 2002. Using serology in combination with acute phase proteins and cortisol to determine stress and immune function of early-weaned pigs. *Journal of Swine Health and Production* 10, 199-204.
- Gruys E, Toussaint MJ, Upragarin N, Van EA, Adewuyi AA, Candiani D, Nguyen TK and Sabeckiene J 2005. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *Journal of Zhejiang University Science B* 6, 941-947.
- Hall WF, Eurell TE, Hansen RD and Herr LG 1992. Serum haptoglobin concentration in swine naturally or experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201, 1730-1733.
- Hardy G. 2000. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. *Nutrition* 16, 688-689.
- Heegaard PM, Klausen J, Nielsen JP, Gonzalez-Ramon N, Pineiro M, Lampreave F and Alava MA 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. *Comparative Biochemistry and Physiology* 119, 365-373.
- Hiss S and Sauerwein H, 2003. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87, 2-11.

- Hulten C, Johansson E, Fossum C and Wallgren P 2003. Interleukin 6, serum amyloid A and haptoglobin as markers of treatment efficacy in pigs experimentally infected with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 95, 75-89.
- Kothalawala H, Toussaint MJ and Gruys E 2006. An overview of swine influenza. *Veterinary Quarterly* 28, 46-53.
- Marinkovic S and Baumann H 1990. Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. *Molecular and Cellular Biology* 10, 1573-1583.
- Martin de la Fuente AJ, Carpintero R, Rodriguez Ferri EF, Alava MA, Lampreave F and Gutierrez Martin CB 2008. Acute-phase protein response in pigs experimentally infected with *Haemophilus parasuis*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious diseases* (in press, doi:10.1016/j.cimid.2008.11.001).
- Murata H, Shimada N and Yoshioka M 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal* 168, 28-40.
- Parra MD, Fuentes P, Tecles F, Martinez-Subiela S, Martinez JS, Munoz A and Ceron JJ 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *Journal of Veterinary Medicine B* 53, 488-493.
- Petersen HH, Nielsen JP and Heegaard PM 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Pineiro C, Pineiro M, Morales J, Carpintero R, Campbell FM, Eckersall PD, Toussaint MJM, Alava MA and Lampreave F 2007a. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133-139.
- Pineiro M, Pineiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell FM, Eckersall PD, Toussaint MJ and Lampreave F 2007b. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Veterinary Journal* 173, 669-674.
- Segales J, Pineiro C, Lampreave F, Nofrarias M, Mateu E, Calsamiglia M, Andres M, Morales J, Pineiro M and Domingo M 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Research* 35, 275-282.
- Shams H 2005. Recent developments in veterinary vaccinology. *Veterinary Journal* 170, 289-299.

- Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F and Segales J 2009. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Veterinary Journal* 181, 221-231.
- Sorensen NS, Tegtmeier C, Andresen LO, Pineiro M, Toussaint MJ, Campbell FM, Lampreave F and Heegaard PM, 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 157-168.
- Stevenson LS, McCullough K, Vincent I, Gilpin DF, Summerfield A, Nielsen J, McNeilly F, Adair BM and Allan GM 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunology* 19, 189-195.
- Tecles F, Fuentes P, Martinez Subiela S, Parra MD, Munoz A and Ceron JJ 2007. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in Veterinary Science* 83, 133-139.

The acute phase response induced by porcine reproductive and respiratory syndrome virus varies between different isolates



Y. Saco, F. Martínez-Lobo, M. Cortey, R. Pato, R. Peña, J. Segalés,
C. Prieto and A. Bassols.

(Manuscrito en fase de redacción)

2013

Introduction

The porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is a major swine pathogen that emerged by the end of the eighties in Europe and North America. PRRSV is the etiologic agent of the so-called porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), which is still one of the most economically significant diseases of swine worldwide. PRRSV belongs to the genus *Arterivirus* within the family *Arteriviridae* and the order *Nidovirales* (Lunney et al., 2010).

PRRSV isolates are classified into type 1 and type 2 genotypes. Furthermore, multiple genetic lineages are described in type 1 and nine diverse lineages have been defined in the phylogeny of type 2 (Zimmerman et al., 2012). It is accepted that type 2 isolates induce more severe respiratory disease than type 1 strains, although no clear differences exist between genotypes and systemic clinical signs (Martinez-Lobo et al., 2011).

PRRSV replicates mainly in porcine alveolar macrophages (PAMs), intravascular macrophages, monocytes and dendritic cells. Clinical presentation of PRRS varies greatly between herds, ranging from asymptomatic to severe devastating respiratory and reproductive clinical signs. The clinical signs are influenced by virus strain, host immune status, host susceptibility and other management factors (Zimmerman et al., 2012). Clinical disease in a herd is primarily the consequence of acute viremia in individuals and transplacental transmission resulting in reproductive failure (Zimmerman et al., 2012). PRRS is clinically characterized by reproductive losses in late gestational sows, manifested as abortions and increased number of weak-born piglets, stillbirths and mummified foetuses. The syndrome in growing pigs includes systemic symptoms, as fever and anorexia, and respiratory disease characterized by dyspnoea and tachypnoea. (Cho et al., 2006; Mateu et al., 2008; Lunney et al., 2010; Yoo et al., 2010).

Virus heterogeneity is accompanied by a very complex immune response against PRRSV. The innate immune response against the virus is weak (Subramaniam et al., 2010). In fact, one of the mechanisms exploited by PRRSV to actively suppress the induction of immune response is the suppression of several key immune-regulatory cytokines such as interleukin (IL)-6 and tumour necrosis factor alpha (TNF- α). Inhibition of the nuclear factor (NF- κ B) pathway has been described by some authors as the

mechanism by which the virus reduces TNF- α production (Subramaniam et al., 2010). On the other hand, adaptive immune response against the virus, measured as development of total and neutralizing antibodies and cell-mediated immunity, has shown to be unusual and delayed (Darwich et al., 2010). Such unusual adaptive immune response varies among viral strains or isolates (Díaz et al., 2012).

One of the components of the innate immune system is the acute phase protein (APP) response. APPs are a group of plasma proteins that change their concentration in animals subjected to external or internal challenges such as infection, inflammation, surgical trauma or stress, and contribute to the organism response to an external agent through different mechanisms (Murata et al., 2004). After experimental challenges with a variety of pathogens, there is an increase in the plasma concentration of the so-called positive APPs, such as haptoglobin (Hp), pig major acute-phase protein (Pig-MAP) and C-reactive protein (CRP) (Eckersall, 2004; Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004; Eckersall, 2010a).

APPs are synthesized mainly in the liver under the stimulus of pro-inflammatory cytokines: IL-1 β , IL-6 and TNF- α (Petersen et al., 2004, Eckersall, 2010a). Plasma concentrations of cytokines have been studied to describe innate immune response after infection with PRRSV (Gomez Laguna et al., 2013) but quantitation of cytokines displays several problems, mainly associated to their short plasma half-lives (Cerón et al., 2005). APPs may be easily measured in plasma as a reflection of cytokine plasma variation and, therefore, can be considered potential markers to help deciphering the immune response against PRRSV (Petersen et al., 2004; Eckersall et al., 2010b).

APPs serum concentrations have been evaluated in experimental and field PRRSV infections. Thus, Hp, CRP, Pig-MAP have been described as serum biomarkers in experimentally infected pigs (Díaz et al., 2005; Gómez-Laguna et al., 2010; Heegaard et al., 2011), although only some of them, and particularly CRP, have been significantly increased in some of the studies (Heegaard et al., 2011). Nonetheless, increased serum concentrations of Hp and CRP have been reported in naturally PRRSV infected pigs and herds (Parra et al., 2006; Gutiérrez et al., 2009).

Although APPs have been previously described as biomarkers for PRRSV infection, most of the studies have focused on acute phase responses against type 1 PRRS viruses and very scarce information is available in relation to response against type 2 isolates. Therefore, to extend the current knowledge on the innate immune responses during PRRSV infection, the acute phase response of pigs experimentally infected with 6 different strains of PRRSV (four type 1 and two type 2 isolates) was analyzed by means of the three main APP in swine (Hp, Pig-MAP and CRP). The studied groups represented a sub-sample of a larger study on PRRSV infection that used the nursery pig model (Martínez-Lobo et al., unpublished data).

Material and methods

Animals and viral infection

The animals used for the present study corresponded to a subset of a larger study carried out at *Universidad Complutense de Madrid* (Martínez-Lobo et al., unpublished data). A total of 105 3-week-old, cross-bred piglets were randomly divided into seven groups and housed in pens with concrete floor and an automatic watering system. All experimental procedures were approved by the Animal Ethics Committee of *Universidad Complutense de Madrid*.

After an acclimatizing period of 6 days, pigs of groups 1 to 6 were challenged by the intranasal route with 5×10^5 tissue culture infectious doses 50 (TCID₅₀) of one of the selected PRRSV isolates. Pigs of the seventh group were sham-inoculated using an uninfected PAM culture lysate and were used as negative controls. PRRSV strains used to inoculate pigs of groups 1 to 4 belong to type 1 and those used to inoculate groups 5 and 6 belong to type 2.

Experimental design and sampling

Details of the experimental design are given in Martínez-Lobo et al. (unpublished data). Briefly, on days 7, 14 and 21 post-inoculation (p.i.), five piglets of each group were euthanized by an overdose of sodium pentobarbital (Dolethal, Vétoquinol, France) dosed by intravenous route, and a complete necropsy was performed. Clinical signs were recorded everyday following a previously published score (Martínez-Lobo et al., 2011). The scores obtained for each parameter evaluated were summed up and a single numerical value was given for systemic and respiratory signs to each individual pig in

each day of the experiment. Finally, clinical signs recorded for each animal during three different periods (i.e. from day 0 to day 7 p.i., from day 8 to day 14 p.i. and from day 15 to the end of the experiment) were converted to an approximate area under the curve (AUC) using the trapezoidal rule (Hennen, 2003). Blood samples were collected in serum clot vacuum tubes on days 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 and 21 p.i. Sera were obtained on the corresponding day and stored at -80 °C until used. Only data and samples from piglets that reached the day 21 p.i. were used in the present study.

Acute phase protein measurement

Hp was quantified in serum by a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) using a commercial reagent from Tridelta Development Ltd. (Ireland) and performed on an automated analyzer (Olympus AU400, Hamburg, Germany). Pig-MAP concentrations were assessed with an ELISA kit (PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain). Intra-assay and inter-assay coefficients of variation of both techniques have been reported previously (Saco et al., 2010a). Serum CRP concentration was determined using a commercial immunoturbidimetric method (Olympus System Reagent, OSR 6147) and the assay was performed in the above mentioned Olympus AU400 analyzer following a protocol validated for porcine samples (Saco et al., 2010b).

Statistical analyses

The normality of the dataset was evaluated with the Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wilk tests, while the Levene statistic was used to test the homocedasticity (evaluation of variance homogeneity). The Mann-Whitney test was performed to investigate a) the differences between the PRRSV infected animals (all six strains together) and the control non-infected one, and b) the differences between the observed serum concentrations of APP at each time point after inoculation with the corresponding PRRSV strain, and the concentrations of those APPs on day 0.

Results

Pigs inoculated with PRRSV independently of the isolate and viral genotype had higher overall serum APP concentrations than control animals. Globally, during the course of the study, serum Hp values ranged from 0.71 ± 0.54 mg/mL to 1.20 ± 1.0 mg/mL; those of Pig-MAP from 0.88 ± 0.42 mg/mL to 1.01 ± 0.65 mg/mL; and, finally, those of CRP from 6.27

$\pm 6.29 \mu\text{g/mL}$ to $17.91 \pm 12.58 \mu\text{g/mL}$. Hp and CRP were significantly discriminatory between infected and control pigs ($P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively), but not Pig-MAP ($P = 0.446$).

APP serum concentration after infection differed depending on the tested protein and PRRSV isolate (Figure 1). Among genotype 1 strains, pigs inoculated with isolate No. 1 had the highest acute phase response, but only serum concentration of Hp showed a significant increase; this strain also caused the most important clinical signs throughout the experiment (Figure 1). Isolate No. 2 triggered a mild increase of serum Hp concentration and clinical signs were only relevant during the second week, whereas isolate No. 3 induced a slight increase in Hp that was significant only on day 12 p.i. This latter strain caused less severe clinical signs. Isolate No. 4 caused a rapid increase but a rapid normalization in Hp and CRP serum concentrations, coinciding with the clinical signs that were striking during the first week.

Among genotype 2 strains, isolate No. 5 induced an increase of all three APP and caused significant clinical signs in the animals during the whole experiment. Finally, pigs infected with isolate No. 6 showed higher APP levels at the beginning of the experiment (day 0) for unknown reasons, but there was no significant increase in any of the proteins. Moreover, a significant decrease in Pig-MAP could be observed compared to day 0 of the experiment. Clinical signs elicited by isolate No. 6 were also mild.

Control pigs showed normal APP serum values during the whole experiment, but a mild and significant decrease in Pig-MAP concentration was noticed on days 18 and 21 p.i.

In general, less severe clinical signs and a milder acute phase response were observed in pigs inoculated with isolates No. 3 and No. 6. In contrast, animals exposed to isolates No. 1 and No. 5 showed moderate to severe clinical signs that coincided with a higher APP response. Pigs inoculated with isolates No. 2 and No. 4 exhibited more pronounced clinical signs coinciding when APP concentrations were higher.

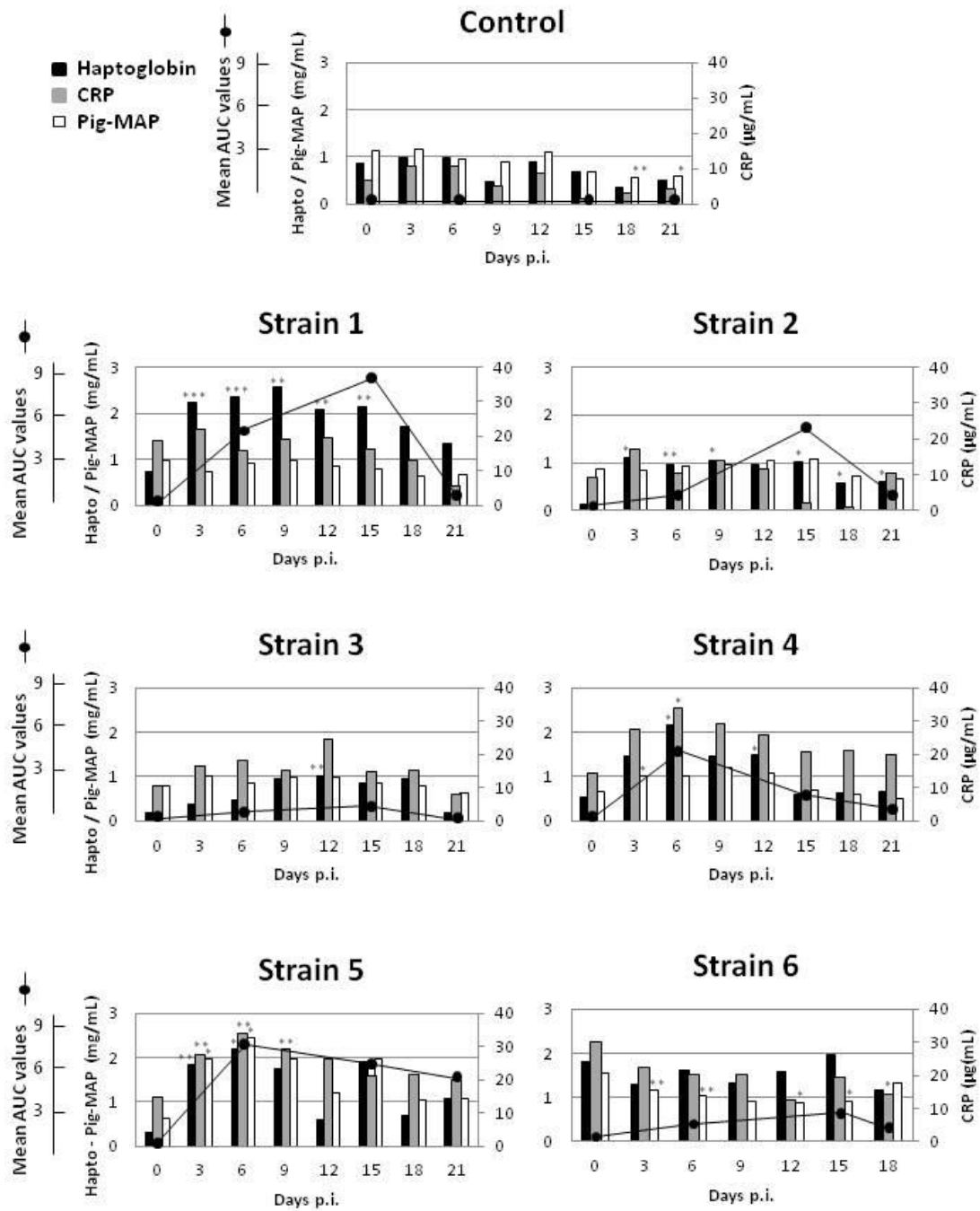


Figure 1. Haptoglobin (mg/mL), CRP (µg/mL) and Pig-MAP (mg/mL) serum concentrations in pigs inoculated with type 1 (1-4) and type 2 (5-6) strains of PRRSV. Mean AUC values are also included. * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001. Strain 6 data on day 21 p.i. are not available.

Discussion

This is the first report on the APP response induced after infection with several PRRSV strains from both genotypes and their side by side comparison. The present study indicates that an acute phase response exists in PRRSV infected pigs but there might be highly variable depending on the causative strain. Although in general type 2 strains caused higher APP levels than type 1 strains, some strains caused no significant changes, regardless the genotype they belong to. Therefore, although type 2 strains are believed to be more pathogenic than type 1 strains (Martínez-Lobo et al., 2011), the results obtained in this thesis suggest that such variation is strain-dependent, since it is possible to find high and low APP responses within both genotypes of PRRSV.

In general, and among the different APPs, Hp was the most sensitive biomarker for PRRSV infection, CRP behaved in general as moderate (lower increases in serum concentration) and Pig-MAP was the less responsive to PRRSV experimental infection. Among type 1 isolates, isolate No.1 was the one with a stronger acute phase response, isolates No. 2 and 4 resulted in a moderate response and isolate No. 3 did not elicit a significant response. On the other hand, among type 2 strains, isolate No. 5 developed a higher APP response than isolate No. 6. Importantly, a parallelism between APP responses and clinical signs could be established, being isolates No.1 and 5 the ones that induced the more severe clinical signs, whereas isolates No. 2 and 4 provoked moderate clinical signs and isolates No.3 and 6 mild symptoms. Although these results seems to contradict the general belief of type 2 strains being more pathogenic than type 1 strains, they should be considered with precaution since only four type 1 and two type 2 isolates have been included in this study. The heterogeneity of both responses is possibly related to the high genetic heterogeneity within each genotype, and also to their different abilities to induce interferons and cytokines (Mateu et al., 2008; Gimeno et al., 2011; Díaz et al., 2012). A more detailed study should be needed to confirm whether there is a direct relationship between the ability to induce cytokines, the APP response and the intensity of clinical signs in the different strains.

In general, the chapter of this thesis shows a most significant increase of APP on days 6-9 p.i., which is fairly similar to another study in which pigs were experimentally infected with a type 1 PRRSV isolate by intramuscular route (Gómez-Laguna et al., 2010). In such

study, the most significant APP increase was observed at 10 days p.i., just when the highest titre of viraemia was detected.

Obtained results are in agreement with others reported in the literature about APPs in PRRSV infection. The first experimental study with this virus was performed with a Japanese isolate that induced an increase of Hp, but not of alpha-1-acid glycoprotein (AGP) (Asai et al., 1999). Hp and Pig-MAP have been described as the earliest APP synthesized in pigs experimentally infected with a type 1 PRRSV strain 2982; an increase of these APPs was demonstrated at 10 d.p.i., although the increase of Pig-MAP was less significant (Gómez-Laguna et al., 2010). In the same study, CRP showed a delayed increase until 17d.p.i. In another experimental study using only one type 1 isolate and three animals, CRP protein was the only clearly increased APP in serum, whereas Hp and Pig-MAP did not change (Heegaard et al., 2011) (Heegaard et al., 2011). In field studies, pigs infected with PRRSV (5 week-old pigs with slow growth and respiratory clinical signs) displayed higher values for Hp and CRP, whereas Pig-MAP concentrations did not differ statistically from non-infected controls (Parra et al., 2006). Also, (Parra et al., 2006) in conventional herds with chronic PRRSV infection (slow growth and respiratory symptoms), pigs showed elevated Hp and CRP serum concentrations (Gutiérrez et al., 2009).

Taken experimental and field data together, and in agreement with the results reported in the present thesis, the APP response during PRRSV infection is variable depending on the specific strain used. In general, however, Hp is the most generally increased APP by this viral infection.

It is accepted that the immune response induced by the PRRSV, as translated into cytokine production, is mild, and this phenomenon is also reflected by a mild and variable APP production and their release into the plasma. In those strains in which there is a significant APP production, Hp seems to be the most indicative one and thus, the present results suggest that Hp may have a role in the pathogenesis of the disease and the modulation of the immune response, as also suggested by other authors (Gómez-Laguna et al., 2010).

References

- Asai T, Mori M, Okada M, Uruno K, Yazawa S, Shibata I. Elevated serum haptoglobin in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 70: 143-8.
- Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol* 2005; 34: 85- 99.
- Cho JG, Dee SA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Theriogenology* 2006; 66: 655-62.
- Díaz I, Darwich L, Pappaterra G, Pujols J, Mateu E. Immune responses of pigs after experimental infection with a European strain of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol* 2005; 86:1943-51.
- Díaz I, Gimeno M, Darwich L, Navarro N, Kuzemtseva L, Lopez S, Galindo I, Segales J, Martín M, Pujols J, Mateu E. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Vet Res* 2012; 43:30.
- Darwich L, Diaz I, Mateu E. Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunobiology. *Virus Res* 2010; 154:123-32.
- Eckersall PD. The time is right for acute phase protein assays. *Vet J* 2004; 168: 3-5.
- Eckersall PD. Acute phase proteins: from research laboratory to clinic. *Vet Clin Pathol* 2010a; 39:1-2.
- Eckersall PD, Bell R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J* 2010b; 185: 23-7.
- Gimeno M, Darwich L, Díaz I, de la Torre E, Pujols J, Martín M, Inumaru S, Cano E, Domingo M, Montoya M, Mateu E. Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory síndrome virus isolates. *Vet Res* 2011; 42:9.
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallares FJ, Fernander de Marco M, Barranco I, Ceron JJ, Martinez-Subiela S, Van Reeth K, Carrasco L. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory síndrome virus infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2010; 33: e51-8.

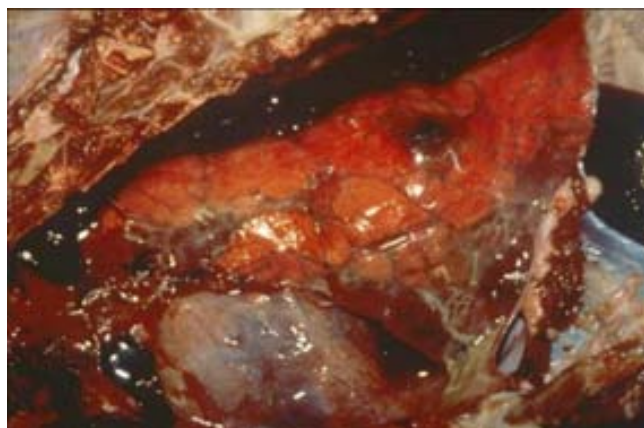
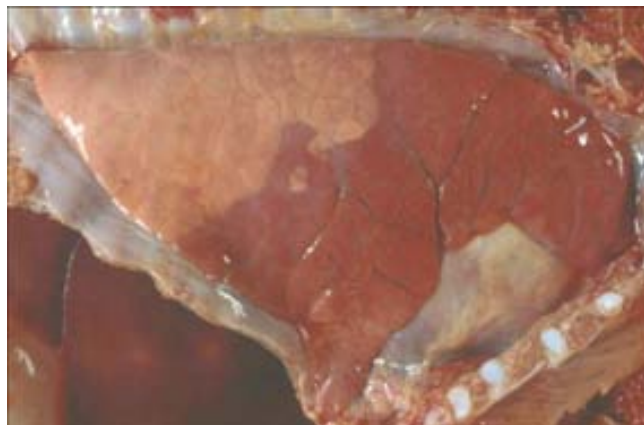
- Gómez-Laguna J, Salguero FJ, Pallares FJ, Carrasco L. Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *Vet J* 2013; 195: 148-55.
- Gutiérrez AM, Martínez-Subiela S, Soler L, Pallares FJ, Ceron JJ. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Vet Immunol Immunopathol* 2009; 132: 218-23.
- Heegaard PM, Stockmarr A, Pineiro M, Carpintero R, Lampreave F, Campbell FM, Eckersall PD, Toussaint MJ, Gruys E, Sorensen NS. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Vet Res* 2011; 42:50.
- Hennen J. Statistical methods for longitudinal research on bipolar disorders. *Bipolar Disord* 2003; 5: 156-68.
- Lunney JK, Benfield DA, Rowland RR. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: an update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Res* 2010; 154:1-6.
- Martínez-Lobo FJ, Díez-Fuertes F, Segales J, García-Artiga C, Simarro I, Castro JM, Prieto C. Comparative pathogenicity of type 1 and type 2 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a young pig infection model. *Vet Microbiol* 2011; 154: 58-68.
- Mateu E, Díaz I. The challenge of PRRS immunology. *Vet J* 2008; 177: 345-51.
- Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 2004; 168:28-40.
- Parra MD, Fuentes P, Tecles F, Martínez-Subiela S, Martínez JS, Muñoz A, Ceron JJ. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 2006; 53: 488-93.
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004; 35: 163-87.
- Saco Y, Fraile LJ, Gimenez M, Pato R, Montoya M, Bassols A. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal* 2010a; 4:1561-7.
- Saco Y, Fraile L, Gimenez M, Canalias F, Bassols A. Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein. *Res Vet Sci* 2010b; 89:159-62.

Subramaniam S, Kwon B, Beura LK, Kuszynski CA, Pattnaik AK, Osorio FA. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus non-structural protein 1 suppresses tumor necrosis factor-alpha promoter activation by inhibiting NF-kB and Sp1. *Virology* 2010; 406: 270-279.

Zimmerman JJ, Benfield DA, Dee SA, Murtaugh MP, Stadejek T, Stevenson GW, Torremorrell M. Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus). *Diseases of Swine* 2012 10th edition; 461-86.

Yoo D, Song C, Sun Y, Du Y, Kim O, Liu HC. Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virus Res* 2010; 154: 48-60.

Serum acute phase proteins as biomarkers of pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs



Yolanda Saco, Lorenzo Fraile, Mercè Giménez, Ana Alegre, Rosa López-Jimenez, Martí Cortey, Joaquim Segalés and Anna Bassols.

Research in Veterinary Science 2011; 91: 52-57.

Abstract

The purpose of this study was to investigate the relationship between the existence of lung lesions in pigs at slaughter and the concentration of the serum acute phase proteins (APP), haptoglobin (Hp), pig-major acute protein (Pig-MAP) and C-reactive protein (CRP). A total of 24 pig farms were selected out of a larger farm database previously screened to study risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation (CVPC) lesions at slaughter-aged pigs in Spain. The farms were classified as “*pleuritis negative (P-) or positive (P+)*” and as “*CVPC negative (M-) or positive (M+)*” and divided into four groups according to a 2X2 factorial design (P-M-, P-M+, P+M-, P+M+). Also at slaughter, blood from 20 randomly selected pigs from each farm was collected. Obtained serum samples were used to measure acute phase proteins. All APP concentrations were significantly higher for M+ farms than for M- ones. However, only Hp and Pig-MAP showed significantly higher concentrations for P+ farms than for P- ones. Pig-MAP was the most sensitive biomarker since it was able to clearly discriminate between P-/P+ and M-/M+ groups ($p < 0.001$ in both cases). Hp was an excellent marker for pleuritis and good for CVPC lesions. CRP was able to discriminate for CVPC lesions but not for pleuritis. The present results indicate that Pig-MAP and, possibly Hp, may be used as potential markers to characterise and discriminate respiratory lesions in swine herds at slaughter.

Keywords: acute phase protein; haptoglobin; Pig-MAP; pleuritis; cranio-ventral pulmonary consolidation; pig.

Introduction

Pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation (CVPC) are the most frequent pathological findings in pig lungs at slaughter (Grest et al., 1997; Martinez et al., 2007). These lesions are associated with significant economic losses for the pig producer, primarily due to reduction in growth performance and feed efficiency. Moreover, according to the regulations of the European Union, lung lesions of CVPC can result in rejection of the animals for the human consumption (European Union Regulation 2004).

Several environmental factors and infectious agents have been associated with the occurrence of lung lesions in swine. *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* and *Actinobacillus (A.) pleuropneumoniae* are considered to be the most important primary bacterial respiratory pathogens (Enoe et al., 2002; Sorensen et al., 2006; Ostanello et al., 2007). Lesions caused by *A. pleuropneumoniae* usually involve the mid and caudal lobes or

display a disseminated pattern (pleuritis). On the other hand, *M. hyopneumoniae* produces enzootic pneumonia whose lesions are usually restricted to the cranial and ventral regions of the lungs (Liljegren et al., 2003).

The acute phase protein (APP) response plays an important role in pigs after lung infection (Toussant et al., 1997; Petersen et al., 2004) and different studies have focused specifically on the APP response to *A. pleuropneumoniae* and *M. hyopneumoniae*. In a first study, it was described that experimentally induced or naturally occurring infections with *A. pleuropneumoniae* are accompanied by increased haptoglobin (Hp) serum concentration (Hall et al., 1992). In more recent reports, acute phase proteins C-reactive protein (CRP), Hp and pig-major acute protein (Pig-MAP) serum concentrations were found to be dramatically increased as a result of experimental infection with *A. pleuropneumoniae* (Heegaard et al., 1998), with an extrahepatic APP response occurring concomitantly with the hepatic response (Skovgaard et al., 2009). Hp has also been demonstrated in lung tissue of pigs suffering from acute and chronic bronchopneumonia using immunohistochemistry although no detectable differences were seen between acute and chronic lesions (Hiss et al., 2008). The APPs have also been found increased in the serum of pigs naturally infected with *M. Hyopneumoniae* (Parra et al., 2006) and identification of interleukin-1 and -6, well known APP response mediators, has been described in lungs from pigs naturally infected with *M. Hyopneumoniae* (Ahn et al., 2009).

The inflammatory response in the chronic phase of disease is not well understood although Hp has been shown to be increased in plasma after non-infectious chronic lung inflammation in pigs (Melchior et al., 2003). Furthermore, differences between serum APP profiles in the acute and chronic phase of infections have been reported in cattle and ovine, suggesting that some specific APP may better discriminate between acute and chronic conditions in each species (Horadagoda et al., 1999; Eckersall et al., 2007). In human medicine, the systemic increase of CRP is a representative biomarker for chronic inflammation, which is directly associated with the progression of chronic obstructive pulmonary disease (Torres-Ramos et al., 2009) and in patients with cystic fibrosis lung disease (Levy et al., 2007). Due to the important role of APP as biomarkers for inflammation and infection, several authors have proposed that they should be determined at slaughter to evaluate herd health (Petersen et al., 2002; Chen et al., 2003; Yamane et al., 2006; van den Berg et al., 2007). Specifically, it has been described that they may be useful to demonstrate the presence of pathological chronic lung lesions (Amory et al., 2007; Pallares et al., 2008).

The aim of the present work was to establish, at the herd level, relationships between serum concentrations of three APPs (Hp, Pig-MAP and CRP) and the appearance and severity of lung lesions in pigs at slaughter.

Materials and methods

Slaughterhouse and lung examinations

Finishing pigs from 107 randomly selected slaughter batches were screened to study risk factors associated with pleuritis and CVPC at slaughter-aged pigs in Spain (Fraile et al., 2010). A batch was defined as a group of pigs belonging to the same farm that were sacrificed on the same day at the slaughterhouse. Pigs were clinically healthy when they were sacrificed as established by the European slaughterhouse legislation (European Union Regulation 2004). A total of 100 pigs per batch were examined by the same trained veterinarian for pleural adhesions and CVPC (Fraile et al., 2010). Briefly, pleuritis lesions were assessed based on the Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System (SPES score), which considers five different scores depending on the extension and location of pleural adhesions. A SPES score >2 is considered to be mostly associated to *A. pleuropneumoniae* infection. An *A. pleuropneumoniae* index (APPI) was defined to provide information on the prevalence and severity of pleuritis lesions presumably associated to *A. pleuropneumoniae* infection in a given farm applying the following mathematical formula:

$$\text{APPI} = [\text{Frequency of pleuritis lesions with score } \geq 2 \text{ in a batch}] \times [\text{Mean pleuritis lesion score of animals with SPES } \geq 2]$$

CVPC lesions were evaluated using a previously described method (Madec and Kobisch, 1982), which considers individual examination of each of the seven pulmonary lobes. Each lobe was scored from 0 to 4, with a maximum score possible of 28.

Taking into account these data, all studied herds were classified according to the APPI and the percentage of lungs with CVPC at batch level. Farms were classified as “pleuritis negative (P-) or positive (P+)” if they were included in the first (APPI $< 0,135$) or the fourth (APPI $> 0,58$) APPI quartiles within the 107 previously studied farms, respectively. Moreover, farms were also classified as “CVPC negative (M-) or positive (M+)” if the percentage of lungs with CVPC lesions at farm level were lower or higher than 60%, respectively. This percentage was established as threshold value since it corresponded to

the mean percentage of affected lungs in the 107 screened farms. A total 24 batches corresponding to 24 farms were conveniently selected according to a 2x2 factorial design (P-M-, P--M+, P+M- and P+M+), representing the most extreme (high and low) APPI values and CVPC percentages. A total of 6 farms were included in each studied category.

Blood samples from 20 randomly selected pigs from each batch were collected at the slaughterhouse and blinded in relation to lung evaluation. Blood was allowed clotting for 30 min at room temperature and, subsequently, serum was separated by centrifugation before 24 hours frozen into aliquots at -80°C until testing of acute phase proteins. A total of 120 samples per group (480 samples analyzed in total) would allow having sufficient statistical power to observe differences close to the 6% in the serum acute phase protein concentrations between groups with a potency and confidence of 80 and 95%, respectively.

Acute phase protein assays

Hp was quantified by a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) with commercial reagents from Tridelta Development Limited (Ireland) and performed on an automated analyzer (Olympus AU400, Hamburg, Germany). Pig-MAP concentration was assessed with an ELISA kit (PigCHAMP ProEuropa, Segovia, Spain). The intra-assay and inter-assay coefficient of variations were determined by measuring Hp and Pig-MAP concentrations on high (1.35 g/L for Hp and 1.61 g/L for Pig-MAP) and low concentration (0.31 g/L for Hp and 0.46 g/L for Pig-MAP) serum samples according to the CLSI guideline EP15-A2 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI 2005). Results for high and low concentration sera were: Hp (intra-assay: 0.8% and 3.2%; inter-assay: 6.6% and 13.8%) and Pig-MAP (intra-assay: 8.2% and 11%; inter-assay: 12% and 25%). Results for Hp were consistent with the manufacturer's claim and results for the Pig-MAP precision study were similar to those described by other authors (Tecles et al., 2007). Serum concentrations of CRP were determined using a commercial immunoturbidimetric method (Olympus System Reagent, OSR 6147). The assay was performed in the abovementioned Olympus AU400 analyzer following the manufacturer recommendations (Saco et al., 2010). A porcine species-specific internal quality control was included to monitor the performance of the cross-reactivity and a traceable human CRP calibrator was used.

Statistical analyses

A non-parametric test (Mann-Whitney) was used to evaluate the effect of pleuritis (P- or P+) or CVPC lesions (M- or M+) on the concentration of APPs (Hp, Pig-MAP and CRP). On the other hand, a Kruskal-Wallis test was used to evaluate the effect of the combined effect of pleuritis and CVPC lesions according to a 2x2 factorial design (groups P-M, P-M+, P+M- and P+M+) on the concentration of these serum proteins. The SPSS 15.0 software was used (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) to carry out statistical analyses.

Finally, a Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis was carried out using Statsdirect (version 2.7.2, CamCode, Ashwell, UK) to determine the capacity of discrimination (sensitivity (Sn) and specificity (Sp), 95% confidence intervals and predicted cut-off values) of APP observed in farms classified as P- or P+ and M- or M+. Sensitivity measured the proportion of positive individuals which were correctly identified as positives by the model; specificity measured the proportion of negatives which were correctly identified as negatives. Moreover, the same analysis was carried out to determine the capacity of discrimination of APP when the four designed groups were taken into account (P-M-, P-M+, P+M-, P+M+).

The level of significance for all analyses (α) was set to $P < 0.05$.

Results

Lung lesions

The mean APPI value of the 24 selected batches was 0.55, ranging from 0 to 1.45 and the mean APPI values for the 12 P- and the 12 P+ farms were 0.05 and 1.04, respectively. On the other hand, 51.2% of the lungs from these 24 batches had CVPC lesions. The mean percentage of lungs with CVPC lesions for the 12 M- and the 12 M+ farms was 22% and 80.5%, respectively. Lesional scores of the different studied farms are summarised in Table 1.

Acute phase protein results

Hp, Pig-MAP and CRP serum concentration values are displayed in Table 2. All APP concentrations were significantly higher for M+ farms than for M- ones. However, only Hp and Pig-MAP showed significant higher values for P+ farms than for P- ones. On the

other hand, Pig-MAP was the most sensitive lung lesion indicator since it was able to discriminate between P-/P+ and M-/M+ groups ($P < 0.001$ in both cases). Hp was an excellent marker for pleuritis ($P = 0.001$) and good for CVPC ($P = 0.033$). Finally, CRP was able to discriminate for CVPC ($P = 0.004$) but not for pleuritis ($P = 0.388$).

Table 1. Summary of the characteristics of the studied batches regarding lung lesions at slaughter (pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation, CVPC).

Group	Batch number	APPI value	APPI quartile	% of lungs with CVPC lesions
P-M-	1	0	First	17
	2	0	First	10
	3	0.02	First	9
	4	0.07	First	18
	5	0.07	First	7
	6	0.13	First	23
P-M+	7	0.1	First	87
	8	0	First	67
	9	0.08	First	63
	10	0.09	First	95
	11	0.06	First	76
	12	0	First	93
P+M-	13	0.77	Fourth	29
	14	0.88	Fourth	13
	15	1.45	Fourth	15
	16	1.2	Fourth	33
	17	0.94	Fourth	45
	18	1.38	Fourth	43
P+M+	19	0.66	Fourth	81
	20	0.77	Fourth	80
	21	0.8	Fourth	93
	22	1.36	Fourth	70
	23	1.26	Fourth	71
	24	0.99	Fourth	90

Table 2. Mean values and intervals in which 95% of the individual values were located for the three proteins assayed and the different categories of farms considered. P values lower than 0.05 are considered significant (Kruskal-Wallis and Mann-Whitney U tests).

	Haptoglobin (g/L)		Pig-MAP (g/L)		CRP (mg/L)	
	Mean	Interval	Mean	Interval	Mean	Interval
P-M-	1.31 ^a	± 0.19	0.63 ^a	± 0.09	14.92 ^a	± 1.78
P+M-	1.59 ^a	± 0.25	0.81 ^b	± 0.11	15.28 ^a	± 2.54
P-M+	1.45 ^a	± 0.23	0.90 ^b	± 0.12	17.33 ^{a,b}	± 2.47
P+M+	1.91 ^b	± 0.23	1.04 ^c	± 0.13	19.50 ^b	± 2.30
Kruskal- Wallis test	14.99 (<i>P</i> =0.002)		56.775 (<i>P</i> =0.000)		12.613 (<i>P</i> =0.006)	
P-	1.38	± 0.15	0.77	± 0.08	16.13	± 1.53
P+	1.76	± 0.17	0.93	± 0.08	17.47	± 1.72
Mann- Whitney's <i>U</i>	22333.0 (<i>P</i> =0.001)		20987.5 (<i>P</i> =0.000)		25653.0 (<i>P</i> =0.388)	
M-	1.45	± 0.16	0.72	± 0.07	15.09	± 1.53
M+	1.68	± 0.16	0.97	± 0.04	18.41	± 1.69
Mann- Whitney's <i>U</i>	23051.5 (<i>P</i> =0.033)		15928.5 (<i>P</i> =0.000)		21801.5 (<i>P</i> =0.004)	

Groups with different letter showed significant differences (Kruskal-Wallis test)

When taking into account the combined presence of pleuritis and/or CVPC in the farms, Hp, Pig-MAP and CRP serum concentration values were always lower for double negative (P-M-) farms than for single positive (P-M+ or P+M-) or double positive ones (P+M+). Moreover, the serum concentration in P+M+ farms for these three APPs was significantly higher than for P-M- farms. Pig-MAP was again the most sensitive indicator since it was able to discriminate between P-M-, P+M+ and P+M- farms but it was not able to discriminate between P+M- and P-M+ ones.

ROC analysis

Optimal cut-off values for the studied APPs maximizing sensitivity (S_n) and specificity (S_p) to discriminate between P-/P+ and M-/M+ groups are displayed in Table 3. The cut-off value to discriminate for pleuritis was 0.73 g/L for Pig-MAP, 1.44 g/L for Hp and 30.5 mg/L for CRP. On the other hand, the cut-off value to discriminate for CVPC was 0.74 g/L for Pig-MAP, 1.32 g/L for Hp and 19.5 mg/L for CRP.

The ROC analysis was also carried out taking into account the combination of the APPI index and the percentage of lungs with CVPC (P-M-, P-M+, P+M-, P+M+). All analyses were carried out but only the result of double negative (P-M-) and double positive (P+M+) farms is shown in Table 3. In all cases, S_n and S_p were lower than 0.67 and 0.89, respectively, for all the studied proteins, but Pig-MAP showed the highest S_n (67.8 %) and S_p (78.8%), to discriminate between P-M- and P+M+ farms; Hp and CRP had decreasing values of S_n and S_p compared to Pig-MAP. The ability of the tests to make this differentiation was also illustrated by the relative operating characteristic curves of each analyte, but only the result for Pig-MAP is shown (Figure 1). The curves demonstrate that Pig-MAP is the most reliable APP for differentiating farms with or without both types of lung lesions.

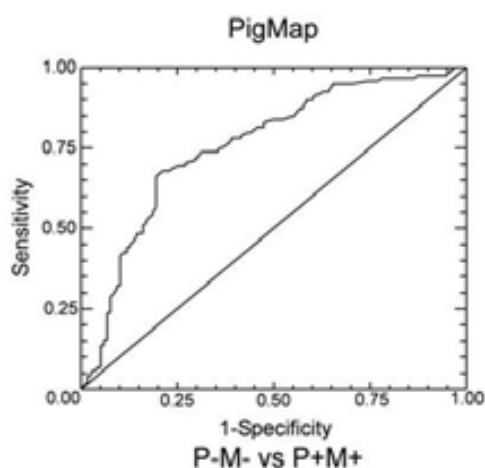


Figure 1. Relative operating characteristic (ROC) curve for Pig-MAP to discriminate P-M- and P+M+ farms.

Table 3. ROC analyses results including cut-off thresholds, and associated sensitivity and specificity values for each acute phase protein and each comparison among farm types (95% confidence intervals for sensitivity and specificity are reported between brackets).

	Haptoglobin (g/L)			Pig-MAP (g/L)			CRP (mg/L)		
	Cut-off	Sn	Sp	Cut-off	Sn	Sp	Cut-off	Sn	Sp
P-M-									
P+M+	1.31	0.65	0.62	0.74	0.67	0.78	18.8	0.47	0.71
		(0.56-0.74)	(0.53-0.71)		(0.59-0.76)	(0.7-0.86)		(0.38-0.57)	(0.62-0.79)
P-									
P+	1.44	0.53	0.63	0.73	0.55	0.67	30.5	0.19	0.89
		(0.47-0.60)	(0.57-0.69)		(0.49-0.62)	(0.61-0.73)		(0.14-0.25)	(0.85-0.93)
M-									
M+	1.32	0.54	0.57	0.74	0.55	0.70	19.5	0.40	0.72
		(0.48-0.61)	(0.51-0.64)		(0.48-0.61)	(0.64-0.77)		(0.34-0.47)	(0.66-0.78)

Discussion

The present study, of exploratory nature, was undertaken to analyze whether APP serum concentrations (Hp, Pig-MAP and CRP) were associated to the appearance and severity of lung lesions and be potentially useful as biomarkers at slaughter-aged pigs. Therefore, a 2x2 factorial design was selected, in which one factor was the absence or presence of pleuritis and the other factor was the absence or presence of CVPC in regards to establish threshold values for each pathological condition.

It must be said that most of the studies performed on APPs in slaughter pigs have taken into account the individual correlation between the lesion and the measurement (Amory et al., 2007; Pallares et al., 2008). A relevant point of the present study was that a sub-sample of pigs was analysed, independently of their individual lesions, and significant differences were found between herds classified according to two types of lung lesions.

Overall, there is little information in the literature about the relationship between serum APPs and the degree of lung lesions of pigs at slaughter (Amory et al., 2007; Pallares et al., 2008). The present study shows that both Pig-MAP and Hp can be used as unspecific markers for the presence of pleuritis and CVPC at slaughter. Nevertheless, Pig-MAP was

considered a better biomarker since it was able to differentiate both lesion types respect their absence with a very high statistical significance. On the other hand, CRP concentration was altered only in case of CVPC. Neither protein was able to discriminate both types of lesions, according to their unspecific role in the inflammatory response. It is very important to note that the pigs involved in the present study did not show clinical signs of disease at slaughter, and lesions were identified in a retrospective evaluation by abattoir surveillance. Pigs coming from farms with low prevalence of pleuritis and CVPC lesions had lower concentrations for Pig-MAP, Hp and CRP, whereas the concentration of all three APPs, but more specifically those of Pig-MAP and Hp, were increased in animals from farms with a high percentage of animals with these lesions. Therefore, it seems that the random selection of 20 pig sera from a particular farm batch might be useful to estimate, in an unspecific way, the existence of severe, chronic respiratory lesions in pigs.

The present study reported an association between type of lung lesion at slaughter and different APPs at a population level. Therefore, such situation makes difficult to compare it with other studies in which the correlation between lesion and APPs has been demonstrated on individual animals (Amory et al., 2007; Pallares et al., 2008). In any case, obtained results partially agree with those described by Amory et al. (Amory et al., 2007). These authors showed that serum concentration of Hp in pigs with CVPC lesions was significantly higher than in pigs without clinical signs and lesions of this disease, but Hp concentrations levels were not associated with prevalence of *A. pleuropneumoniae*. Other APPs were not analyzed by these authors. In another study, significant differences were described for Hp and CRP in a comparison between a group of pigs without clinical signs but showing lesions (80% of animals with CVPC and 20% of animals with chronic pleuritis) with another group showing no gross lesions at slaughter (Pallares et al., 2008). A group of pigs with clinical signs was also analyzed in the same study, and pigs in this group had higher serum concentrations of Hp and CRP than healthy pigs or pigs without clinical signs.

The high concentrations of APP found at slaughter in the apparently clinically healthy pigs included in the present study should be related to chronic stages of disease. This is rather evident with pleuritis lesions, usually associated to *A. pleuropneumoniae* infection (Gottschalk and Taylor, 2006; Fraile et al., 2010), since they were almost exclusively of fibrous type, indicating that pigs survived the acute phase of the bacterial infection and they were able to finally reach the slaughterhouse. Very little is known about the long term kinetics of the acute phase response against *A. pleuropneumoniae*. Nevertheless, in an experimental infection model mimicking infection by aerosol inoculation with *A.*

pleuropneumoniae, Hp, CRP and Pig-MAP responded with large increases in serum concentrations at the acute phase of disease, although the increase, kinetics of induction and normalization were different between these proteins. Thus, Hp and Pig-MAP did show the most prolonged response after the challenge whereas CRP normalized quickly (Heegaard et al., 1998). This latter finding may be related to the higher concentrations of Hp and Pig-MAP described in the present work, which deals with the chronic consequences of this disease in theoretically clinically healthy pigs. Serum Hp also showed a prolonged response after intranasal infection with *A. Pleuropneumoniae* (Hulten et al., 2003), and this protein was also found to be increased in a herd with a history of chronic infection with this pathogen (Hall et al., 1992).

Less information is available about APP kinetics after infection with *M. hyopneumoniae*, the main pathogen responsible for CVPC lesions found at slaughter (Fraile et al., 2010). Thus, a significant increase in the serum concentrations of these three APPs were found in pigs infected with this pathogen under field conditions (Parra et al., 2006). It is interesting to note that these authors described CRP as the best marker for *M. hyopneumoniae* infection, increasing 71-fold compared to SPF animals, whereas other diseases did not induce CRP so markedly. This fact may be related to the present finding that CRP seemed to be a good indicator for CVPC, even it was not as good for pleuritis. To the authors' knowledge, no other studies have been reported on the acute phase response to *M. hyopneumoniae* although it has been described that another swine *Mycoplasma* experimental infection (by *M. hyorhinis*) caused an increase in serum Hp concentration (Magnusson et al., 1999).

The utility of APPs as potential indicators of lung lesions at slaughter was investigated by means of a ROC analysis. This statistical approach should not be interpreted as an assessment of the potential diagnostic capability of APPs to be used in respiratory diseases of pigs. ROC analysis was performed to assess the potential use of APPs as biomarkers able to discriminate between P-M- and P+M+ farms. Specifically, under the conditions of the present study, Pig-MAP resulted in the most reliable analyte, with a 67.8 % Sn and 78.8% Sp, followed by Hp and CRP.

Finally, serum concentration of APPs are affected by age, breed, housing, management conditions, disease and prolonged transportation (Saco et al., 2003; Pineiro et al., 2007; Pineiro et al., 2009). All pigs included in the present study were of the same age and corresponded to different commercial cross-bred pigs. Data about housing, management conditions and transport distance to slaughterhouse (ranging from 8 to 468 km) were

carefully collected as reported in (Fraile et al., 2010) and no statistically significant association between APPs and any of these conditions was found (data not shown). Therefore, it is assumed that differences in serum concentrations of APPs in the present study were mainly a consequence of the pathological conditions affecting the animals. It could be argued that other disease conditions such as bleeding tails and lameness could increase at least Hp serum concentration in slaughterhouse pigs (Van den Berg et al 2007). Nevertheless, it is improbable that many animals had other concomitant lesions that could have contributed to increase the APP serum concentrations. Moreover, it is highly probable that animals with other “potential lesions” would have been distributed homogeneously in the four study groups and this “potential” biased effect would not have affected the differences observed in this study.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was partially funded by a research contract of Intervet and Schering-Plough Animal Health with CReSA (Centre de Recerca en Sanitat Animal), grant AGL2006-02364/GAN from the Spanish “Ministerio de Educación y Ciencia” and grant 2009 SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya (to A.B.). Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union. M. Cortey holds a Beatriu de Pinós grant from the Government of Catalonia.

References

- Ahn, K.K., Kwon, D., Jung, K., Ha, Y., Seo, M.J., Kim, S.H., Kim, M.Y., Cho, K.D., Lee, B.H., Chae, C., 2009. Identification of interleukin-1, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 expression in lungs from pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by in situ hybridization. *Journal of Veterinary Medical Science* 71, 441-445.
- 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 concentration in the pig at slaughter. *research in Veterinary Science* 83, 428-435.
- Chen, H.H., Lin, J.H., Fung, H.P., Ho, L.L., Yang, P.C., Lee, W.C., Lee, Y.P., Chu, R.M., 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Canadian Journal of Veterinary Research* 67, 283-290.
- CLSI EP15-A2, 2005. User Verification of Performance for Precision and Trueness.
- Eckersall, P.D., Lawson, F.P., Bence, L., Waterston, M.M., Lang, T.L., Donachie, W., Fontaine, M.C., 2007. Acute phase protein response in an experimental model of ovine caseous lymphadenitis. *BMC Veterinary Research* 3, 35-40.
- Enoe, C., Mousing, J., Schirmer, A.L., Willeberg, P., 2002. Infectious and rearing-system related risk factors for chronic pleuritis in slaughter pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 337-349.
- European Union. 2004. Regulation No. 854/2004 . Section II. URL : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0206:0320:EN:PDF>
- Fraile, L., Alegre, A., Lopez-Jimenez, R., Nofrarias, M., Segales, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Vet. J.* 184, 326-333.
- Gottschalk, M., Taylor, D.J.. 2006. *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire and D. J. Taylor. (Eds.), *Diseases of swine*. 9th edition. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 563-576.
- Grest, P., Keller, H., Sydler, T., Pospischil, A., 1997. The prevalence of lung lesions in pigs at slaughter in Switzerland. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde Schw. Archiv. Tierheilkunde* 139, 500-506.
- 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*. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201, 1730-1733.

- Heegaard, P.M., Klausen, J., Nielsen, J.P., Gonzalez-Ramon, N., Pineiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A., 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. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 119, 365-373.
- Hiss, S., Willbrenning, G.S., Suntz, M., Reinacher, M., Sauerwein, H., 2008. Immunohistochemical localization of haptoglobin in porcine lungs. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 37, 196-199.
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M., Gibbs, H.A., Reid, S.W., Horadagoda, A., Edwards, S.E., Eckersall, P.D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *The Veterinary Record* 144, 437-441.
- Hulten, 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*. *Veterinary Microbiology* 95, 75-89.
- Levy, H., Kalish, L.A., Huntington, I., Weller, N., Gerard, C., Silverman, E.K., Celedon, J.C., Pier, G.B., Weiss, S.T., 2007. Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 42, 256-262.
- Liljegren, C.H., Aalbaek, B., Nielsen, O.L., Jensen, H.E., 2003. Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. *APMIS* 111, 531-538.
- Madec, F., Kobisch, M., 1982. Bilan lésionnel des pumons de porcs charcutiers a l'abattoir. *Journées de la Recherche Porcine en France* 14, 405-412.
- 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 hyorhinis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68, 131-137.
- Martinez, J., Jaro, P.J., Aduriz, G., Gomez, E.A., Peris, B., Corpa, J.M., 2007. Carcass condemnation causes of growth retarded pigs at slaughter. *The Veterinary Journal* 174, 160-164.
- Melchior, D., Le Floc'h, N., Seve, B., 2003. Effects of chronic lung inflammation on tryptophan metabolism in piglets. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 527, 359-362.
- Ostanello, F., Dottori, M., Gusmara, C., Leotti, G., Sala, V., 2007. Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *The Journal of Veterinary Medicine A*, 54, 70-75.

- Pallares, F.J., Martinez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabe, A., Munoz, A., Ceron, J.J., 2008. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *The Veterinary Journal* 177, 369-373.
- Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martinez-Subiela, S., Martinez, J.S., Munoz, A., Ceron, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *The Journal of Veterinary Medicine B* 53, 488-493.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.
- Petersen, H.H., Dideriksen, D., Christiansen, B.M., Nielsen, J.P., 2002. Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs. *The Veterinary Record* 151, 85-89.
- Pineiro, C., Pineiro, M., Morales, J., Andres, M., Lorenzo, E., Pozo, M.D., Alava, M.A., Lampreave, F., 2009. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *The Veterinary Journal*. 179, 78-84.
- Pineiro, M., Pineiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal* 173, 669-674.
- Saco, Y., Docampo, M.J., Fabrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., Bassols, A., 2003. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare* 12, 403-409.
- Saco, Y., Fraile, L., Giménez, M., Canalias, F., Bassols, A. 2010. Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein. *Research in Veterinary Science* 89, 159-162.
- Skovgaard, K., Mortensen, S., Boye, M., Poulsen, K.T., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Heegaard, P.M., 2009. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Veterinary Research* 40, 23.
- Sorensen, V., Jorsal, S.E., Mousing, J. 2006. Diseases of the respiratory system. In: B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire and D. J. Taylor. (Eds.), *Diseases of swine*. 9th edition. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 149-177.
- Tecles, F., Fuentes, P., Martinez Subiela, S., Parra, M.D., Munoz, A., Ceron, J.J., 2007. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in Veterinary Science* 83, 133-139.
- Torres-Ramos, Y.D., Garcia-Guillen, M.L., Olivares-Corichi, I.M., Hicks, J.J., 2009. Correlation of plasma protein carbonyls and C-reactive protein with GOLD stage progression in COPD Patients. *Open Respiratory Medicine J.* 3, 61-66.

- Toussaint, M.J.M., van Ederen, A.M., Hulskamp-Koch, C.A.M., Gruys, E., 1997. Measurement of acute phase proteins in porcine blood as a tool for clinical pathology in pigs. *Comparative Haematology International* 7, 182-188.
- van den Berg, A., Danuser, J., Frey, J., Regula, G., 2007. Evaluation of the acute phase protein haptoglobin as an indicator of herd health in slaughter pigs. *Animal Welfare* 16, 157-159.
- Yamane, H., Kanouchi, H., Arimizu, G., Obi, T., Oka, T., 2006. Increases in pig major acute-phase protein in wasting pigs brought to the abattoir. *Journal of Veterinary Medical Science* 68, 511-513.

5. DISCUSIÓN

El rendimiento productivo, las enfermedades clínicas y las infecciones subclínicas que afectan a la especie porcina son algunos de los aspectos que más preocupan al ganadero de este sector. En este sentido aquellos indicadores que puedan ayudar a evaluar el estado sanitario y el nivel productivo de las explotaciones porcinas van a tener un amplio abanico de aplicaciones y pueden suponer una mejora substancial en la calidad de la producción en su conjunto.

La determinación de la concentración de PFAs en plasma es uno de estos potenciales indicadores y en esta tesis doctoral se amplía la información relacionada con estas proteínas en la especie porcina. Una de las ventajas de estos parámetros es que son estables en el suero o plasma congelados y que su determinación puede realizarse con relativa facilidad en los laboratorios de análisis.

Las PFAs que se han analizado en los estudios presentados en esta tesis doctoral son CRP, Hp y Pig-MAP, descritas como PFAs mayoritarias o moderadas en la especie porcina.

Los métodos que se han empleado para la determinación de Hp y Pig-MAP están ampliamente descritos en la bibliografía y son los que se han ido estableciendo como los procedimientos de rutina más utilizados hasta el momento para medir estas proteínas. Esto no supone que estén exentos de problemas, ya que no están aceptados como métodos de referencia y presentan ciertos inconvenientes como es la interferencia debida a la hemólisis en el caso de la Hp y la elevada pre-dilución de la muestra que se debe hacer en el ELISA específico para la Pig-MAP.

El procedimiento descrito para la determinación de CRP no está tan implantado. Existe un ELISA específico comercial para CRP porcina (Tridelta®) que también presenta el inconveniente de que requiere pre-dilución de la muestra y además tiene un rango de linealidad poco amplio. Aprovechando la reactividad cruzada que presentan los anticuerpos anti-CRP humana frente a la CRP porcina se han realizado algunos estudios en donde se evalúan métodos inmunturbidimétricos diseñados para la especie humana en la determinación de CRP porcina (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). En esta tesis doctoral se ha utilizado un reactivo de CRP humana para la validación y determinación de la CRP en muestras porcinas (estudio 1). En concreto, se trata de un método inmunturbidimétrico desarrollado por *Olympus Life and Material Science Europa GmbH* (Irlanda).

No cabe duda de que preferiblemente deben emplearse reactivos específicos de especie para la determinación de PFAs, pero determinados métodos utilizados en la especie humana se pueden validar para el ámbito veterinario, sobre todo cuando conviene obtener una mejor aplicabilidad del procedimiento analítico. Por ejemplo, los métodos inmunturbidimétricos son fácilmente automatizables, robustos y más precisos que las técnicas de ELISA. Además, al no existir métodos estandarizados para la determinación de PFAs en la especie porcina ni materiales de referencia específicos que sirvan para asignar valores a los calibradores de los métodos, la validación de métodos de la especie humana para muestras veterinarias puede ir resolviendo esta situación de falta de estandarización y trazabilidad. En estos casos se debe demostrar que el método validado para la especie humana funciona como se espera y alcanza el resultado deseado en muestras animales.

Los resultados obtenidos con el método evaluado para la determinación de CRP porcina se compararon con los obtenidos mediante el reactivo ELISA específico de Tridelta®, detectándose error sistemático de tipo constante y proporcional debido a que ambos métodos presentan diferente especificidad. Aunque la correlación fue bastante buena, los valores obtenidos con el reactivo de la especie humana fueron más bajos en comparación con los valores que se obtienen con el ELISA y similares a los valores que obtienen otros autores que también han evaluado métodos inmunturbidimétricos para la especie humana con muestras porcinas (Kjelgaard-Hansen et al., 2007). El método puesto a punto para la especie humana discrimina claramente entre individuos sanos y enfermos, pero para poder utilizar estos reactivos en la especie porcina se deberían establecer nuevos valores de referencia para este procedimiento.

Un problema general en el ámbito de las PFAs y en otros parámetros analíticos es la variabilidad en cuanto a los valores absolutos de las concentraciones de PFAs que se encuentra al comparar resultados entre estudios similares. Esto se debe en parte a la falta de estandarización de los procedimientos de medida que se utilizan, por lo que es esencial tener muy en consideración los métodos de determinación al comparar resultados. En esta tesis doctoral, al comparar nuestros valores de PFAs con los obtenidos por otros autores se observan algunas diferencias. Por ejemplo, la concentración que obtiene Piñeiro et al. (Pineiro et al., 2009a) de Pig-MAP entre las semanas 4 y 12 de vida es de 1 mg/mL pasando a ser de 0.7-0.8 mg/mL al final del período de engorde. En el estudio 2, las concentraciones al inicio del período (0.89 mg/mL a las 6 semanas de edad) y hasta la semana 19 de vida (0.54 mg/mL) fueron algo más bajas que las descritas por Piñeiro et al. (Pineiro et al., 2009a). Al tratarse de

animales del mismo origen genético, sexo y edad, la diferencia puede deberse al distinto método empleado ya que estos autores utilizaron inmunodifusión radial para determinar la concentración de Pig-MAP.

La comparación entre valores absolutos de PFAs entre distintos estudios es siempre una cuestión delicada ya que, aparte de los aspectos metodológicos mencionados, pueden variar, en animales presuntamente sanos, según el estado sanitario general de las granjas. Así, se ha descrito que los niveles de Pig-MAP obtenidos en animales pertenecientes a una granja con un elevado grado de salud (0.83 ± 0.18 mg/mL) son inferiores a los de una granja con bajo nivel de salud animal (1.68 ± 0.74 mg/mL) (Pineiro et al., 2009a) (Pineiro et al., 2009b).

Aparte de las cuestiones metodológicas, es bien conocido que a lo largo del ciclo productivo de la especie porcina se pueden producir alteraciones en la concentración plasmática de las PFAs. Ello ya se encuentra descrito durante el destete, el transporte o la administración de vacunas (Salamano et al., 2008) (Pineiro et al., 2007a) (Pie et al., 2004). Además está documentado que el sexo, la raza y la edad también influyen en los valores de las PFAs (Clapperton et al., 2005b). Por tanto, el análisis de estas fluctuaciones en los niveles séricos de PFAs es un paso previo y necesario para así poder utilizar estos parámetros como biomarcadores.

Este análisis se realizó evaluando la cinética de los cambios en la concentración sérica de Hp, CRP y Pig-MAP a lo largo de las diferentes etapas productivas del cerdo: transición, engorde y finalización. Se trabajó sólo con una granja y con 30 animales, por lo que los intervalos de concentraciones obtenidos no se pudieron definir como intervalos de referencia. Éste es un aspecto que aún faltaría desarrollar de forma completa, ya que disponemos de los valores de los animales control utilizados en otros estudios.

Sin embargo, el estudio 2 es un estudio de campo en el que los animales utilizados recibieron el mismo tipo de alimentación y manejo a lo largo de las diferentes etapas productivas analizadas. Los cerdos fueron sometidos a un estricto control de su estado de salud y a las 11 y 15 semanas de vida recibieron vacunación y revacunación con una vacuna viva modificada frente al ADV, tal como establece la legislación española. Al tratarse de animales jóvenes que todavía no se habían desarrollado sexualmente no se detectaron cambios en la concentración sérica de las PFAs debidas al sexo, pero la concentración de Pig-MAP mostró variaciones en función de la edad, tal y como describen otros autores (Pineiro et al., 2009a). Asimismo, se detectó un incremento en la

concentración de las PFA (sobre todo Hp y CRP) tras la vacunación, indicando que son indicadores sensibles de la vacunación frente al ADV.

Los estudios de correlación realizados entre las diferentes proteínas a lo largo de las diferentes semanas de vida reflejaron que las PFAs que están más relacionadas entre sí son la Hp y la Pig-MAP; estos resultados concuerdan con la bibliografía existente (Gonzalez-Ramon et al., 2000) (Clapperton et al., 2007). De todas formas, estas dos proteínas no se comportan de manera idéntica ya que la Hp parece ser menos dependiente de la edad que la Pig-MAP (aspecto descrito también por Clapperton et al. (Clapperton et al., 2005b) y su concentración incrementa de forma más destacada que la de la Pig-MAP después de la vacunación frente al ADV. Esta diferencia en la cinética de respuesta de estas dos PFAs había sido también descrita en infecciones experimentales producidas con el ASFV y el virus ADV (Carpintero et al., 2007). Por tanto, esto sugiere que, a pesar de que la síntesis de Pig-MAP y Hp está inducida principalmente por IL-6 (Gonzalez-Ramon et al., 2000), deben de existir además otros mecanismos (otras citoquinas o factores hormonales, por ejemplo) que regulen su síntesis.

Está descrito que la especie porcina es muy susceptible al estrés y que el transporte es uno de los aspectos más estresantes del manejo de los animales. De hecho, se ha descrito que las PFAs pueden considerarse como posibles indicadores de estrés en esta situación (Pineiro et al., 2007a). En nuestro caso, el transporte de los animales desde la granja de transición a la granja de engorde fue corto (30 minutos) y no se observaron diferencias en la concentración de PFAs.

Las PFAs también se han estudiado en relación con los parámetros productivos, de manera que se ha postulado que existe una correlación negativa entre la concentración de PFAs (concretamente Hp) y la tasa de crecimiento de los animales (Eurell et al., 1992) (Clapperton et al., 2005a). El mecanismo bioquímico subyacente sería que, en un animal sano, los aminoácidos podrían ser dirigidos a la síntesis de proteínas musculares, en lugar de a la síntesis hepática de PFAs (Gruys et al., 2005). Siguiendo esta hipótesis, para estudiar la posible relación entre la concentración de PFAs y los parámetros productivos se trabajó con los animales de la misma granja utilizada para monitorizar la concentración de PFA a lo largo del ciclo productivo, distribuidos en dos grupos, uno control y otro al cual se le había suplementado la dieta con un inmunomodulador. La función principal de este tipo de aditivos es mejorar la respuesta inmune frente a las enfermedades infecciosas, el mecanismo de acción se conoce, al menos parcialmente, ya que se ha descrito que la célula diana es el linfocito *T-helper*, de modo que incrementa

la actividad Th1 mejorando la actividad de los linfocitos T y las *natural killer cells* (Fraile et al., 2009). Además, recientemente se ha demostrado que esta acción se realiza tras la unión de estos fitosteroles a los TLR2 que están presentes en diversas células del sistema inmune (Brull et al., 2010). Por tanto, la consecuencia directa de una mejor respuesta frente a las enfermedades es una mejora de los parámetros productivos.

Se realizó un seguimiento de estos parámetros durante el período comprendido entre la semana 6 y la semana 14 de vida. Se observó como animales a los que se les había administrado el inmunomodulador en la dieta presentaron mejores parámetros productivos y concentraciones de Hp más bajas cuando se compararon con las observadas en el grupo control. De ello se deduciría que los animales tratados probablemente tenían un mejor estado de salud. En este caso los niveles bajos de Hp, pero no los de Pig-MAP, se asociaron a los animales que presentaron un mejor rendimiento productivo. Este sería otro caso en que estas dos proteínas se comportarían de modo distinto, sugiriendo de nuevo que los mecanismos de control de ambas deben ser, al menos parcialmente, distintos. La validez de la Hp como biomarcador de rendimiento productivo se ha propuesto también recientemente en un estudio de vacunación frente a PCV2 (Fraile et al., remitido para publicación).

En cuanto al comportamiento de las PFAs durante patologías infecciosas, en los estudios 2, 3, 4 y 5 se evaluaron en cuatro escenarios diferentes: infección subclínica, brote clínico agudo, infección experimental e inflamación crónica.

Las infecciones subclínicas afectan de forma bastante habitual a los cerdos durante la fase de cría, con consecuencias negativas en el rendimiento productivo de los animales. Uno de los agentes infecciosos más comunes que las produce es el virus del PRRSV. En la granja de engorde utilizada para nuestros estudios se produjo un incremento del porcentaje de animales sero-positivos frente a PRRSV en la semana 8 de vida, sin sintomatología clínica y que por tanto identificó este proceso como una infección subclínica. Este hecho es relativamente habitual en las granjas de engorde (Blaha, 2000). Los niveles de las PFAs no incrementaron coincidiendo con la recirculación del PRRSV.

Estos resultados son similares a los descritos por Segalés et al. (Segales et al., 2004) y Grau-Roma et al. (Grau-Roma et al., 2009) en cerdos infectados subclínicamente con PCV2, donde no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de Hp y Pig-MAP, en cambio en otros estudios experimentales descritos en la bibliografía se observan niveles altos de PFAs antes de que se desarrolle la respuesta inmune

específica frente a diferentes tipos de enfermedades infecciosas y aparezca una sintomatología evidente de enfermedad (Heegaard et al., 1998) (Houdijk et al., 2007) (Pomorska-Mol et al., 2012b). El hecho de que en la infección subclínica producida por el PRRSV no se incrementen las PFA puede ser debido a la atípica respuesta inmune que genera este virus y que se caracteriza, entre otras cosas, por una respuesta de fase aguda débil (Subramaniam et al., 2011). En cualquier caso, el papel de las PFAs en las infecciones subclínicas no está lo suficientemente claro, aunque es seguro que dependerá del agente infeccioso así como de la susceptibilidad del animal.

En cambio, en este mismo estudio, sí que detectamos un incremento claro de las tres PFAs a las 23 semanas de edad, al sufrir los animales un brote clínico con problemas respiratorios graves cuyo diagnóstico anatomo-patológico fue bronconeumonía catarral-purulenta (se aislaron por métodos bacteriológicos *M. hyopneumoniae* y *P. multocida*). Este resultado fue el esperado al tratarse de enfermedades respiratorias con signos clínicos claros, de acuerdo con varios estudios publicados (Heegaard et al., 1998) (Magnusson et al., 1999). En nuestro caso la Hp resultó ser el indicador más sensible al incrementar más su concentración en los animales enfermos.

Dada la importancia que tiene la enfermedad producida por el PRRSV, en el estudio 4 se evaluó el comportamiento de las PFAs en infecciones experimentales con diferentes cepas víricas de genotipo tipo 1 y genotipo tipo 2, donde sí que se desarrolló sintomatología clínica, de intensidad variada según la cepa. Nuestros resultados mostraron una gran variabilidad de la respuesta de fase aguda en función del tipo de cepa inoculada a los animales, tanto en el genotipo tipo 1 como en el genotipo tipo 2. De hecho en la bibliografía ya se describe que el PRRSV se caracteriza por presentar una respuesta innata inmune que varía en función del tipo de cepa (Diaz et al., 2012).

La Hp fue la PFA que más incrementó en respuesta a la infección por el PRRSV y así también lo describen otros autores que han desarrollado infecciones experimentales con cepas europeas de PRRSV (Asai et al., 1999) (Gomez-Laguna et al., 2010a). En cambio, en un estudio reciente en el que se describe una infección experimental con una cepa europea de PRRSV, la CRP fue la PFA que más claramente incrementó, mientras que Hp y Pig-MAP no se alteraron (Heegaard et al., 2011). No obstante, estas diferencias se pueden explicar probablemente por la variabilidad intrínseca de la virulencia de las distintas cepas del PRRSV, así como por la línea genética porcina utilizada en el estudio. Se conoce desde hace años que las consecuencias clínicas de la infección por el PRRSV está modulada por la genética de los animales (Arceo et al., 2012).

En infecciones de campo y al igual que lo observado en el estudio 4, la Pig-MAP no permite diferenciar entre el grupo control y el infectado, mientras que sí se incrementaron las concentraciones de CRP y Hp (Parra et al., 2006) (Gutierrez et al., 2009). En cuanto a la clínica, no se observó correlación entre las lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas y la concentración de PFAs, de modo similar a lo descrito por Gómez-Laguna et al. (Gomez-Laguna et al., 2010b). En cambio, los signos clínicos que observamos correlacionaron parcialmente con los niveles de las PFAs.

La aplicación de la determinación de PFAs en el matadero se ha empezado a estudiar más recientemente, principalmente relacionando la concentración de las PFAs con las principales lesiones de tipo crónico que se observan en el examen post-mortem en el matadero. Los pulmones son algunos de los órganos que habitualmente presentan lesiones crónicas. Entre los agentes infecciosos más importantes que causan este tipo de lesiones son *M. hyopneumoniae* (consolidación pulmonar cráneo-ventral, CVPC) y *A. pleuropneumoniae* (pleuritis), así como otros agentes considerados concomitantes. En el estudio 5 se estudiaron animales que procedían de granjas clasificadas en base al grado de afectación de pleuritis (P+) y CVPC (M+), con las siguientes combinaciones: P-M-, P-M+, P+M-, P+M+ (Fraile et al., 2010). Analizando sólo una sub-muestra de un lote de animales que llegaba a matadero, se observó que aquellos animales que procedían de granjas clasificadas como P-M+, P+M+ y P+M- mostraron niveles más altos de Hp, CRP y Pig-MAP en comparación con los animales procedentes de granjas P-M-. En este estudio se demostró que las PFAs incrementan en animales aparentemente sanos pero con lesiones pulmonares de tipo crónico. Por tanto, disponer de los valores de PFAs de un grupo de animales seleccionados al azar en la granja antes de que se destinen al matadero permite tener una idea aproximada de la existencia de lesiones pulmonares crónicas presentes en los animales de esa granja.

Además se definió la Pig-MAP como el biomarcador más adecuado al diferenciar mejor entre P-/P+ y M-/M+, siendo la PFA que presentó la mejor sensibilidad y especificidad para diferenciar entre granjas P-M- y P+M+. CRP no mostró cambios en aquellos animales procedentes de granjas sólo con pleuritis, en cambio sí que incrementó en los animales procedentes de granjas con casuística de CVPC. De hecho en estudios de campo se describe la CRP como la PFA que más se incrementa en animales afectados por *M. hyopneumoniae* (Parra et al., 2006). Nuestros resultados también estuvieron en consonancia con los obtenidos en infecciones experimentales de *A. pleuropneumoniae*, en los cuales se incrementaron las concentraciones plasmáticas de Hp, Pig-MAP y CRP (Heegaard et al., 1998) (Sjolund et al., 2011). En cambio otros autores no han descrito

cambios en la concentración de Hp en cerdos que llegan a matadero con lesiones características de *A. pleuropneumoniae*, pero sí que describen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de Hp y CRP cuando comparan animales sanos con animales que presentan principalmente lesiones de CVPC (Amory et al., 2007) (Pallares et al., 2008).

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral indican que la PFA más adecuada para evaluar la presencia de determinado tipo de lesiones pulmonares en matadero es la Pig-MAP. Pero en cambio, en las etapas productivas previas al matadero es la Hp la más apropiada para monitorizar los parámetros productivos así como determinadas enfermedades que se presentan de forma frecuente en estas etapas. Por tanto, los trabajos presentados en esta memoria indican que sería importante una selección adecuada del tipo de PFA a utilizar en una potencial monitorización de la situación productiva y sanitaria en granjas porcinas.

6. CONCLUSIONES

1.- El método inmunoturbidimétrico de *Olympus System Reagent* (OSR 6147) utilizado para la determinación de CRP humana es adecuado para su uso con muestras porcinas, presentado una buena precisión y una buena correlación con el método ELISA cuando se utiliza un calibrador porcino. El uso de un calibrador humano mejora la trazabilidad pero deberían establecerse nuevos valores de referencia.

2.- En animales sanos mantenidos en una explotación de engorde comercial estándar:

a) No hay diferencias en las concentraciones de Hp, Pig-MAP y CRP debidas al sexo entre la semana 6 y la 23 de vida.

b) Entre la semana 6 y la 13 de vida la concentración plasmática de Pig-MAP disminuye, en cambio Hp y CRP no muestran diferencias durante este período. A lo largo de las semanas 15 a 21 no se observan cambios de concentración en ninguna de las tres PFAs determinadas.

c) La concentración sérica de Hp y CRP se incrementan tras la administración de una vacuna de Aujeszky a las 11 y 15 semanas de edad. Sin embargo, la concentración sérica de Pig-MAP sólo se incrementa después de la revacunación.

d) La recirculación del PRRSV no conllevó un incremento en las concentraciones plasmáticas de Hp, Pig-MAP y CRP, sugiriendo que estas PFAs no son unos buenos biomarcadores para las infecciones subclínicas producidas por este virus.

3.- La Hp es un biomarcador adecuado para monitorizar los parámetros productivos en animales que reciben un aditivo alimentario con funciones inmunomoduladoras y que mejoran la productividad de los animales.

4.- La respuesta de fase aguda presenta diferentes cinéticas en animales infectados experimentalmente con distintos aislados del PRRSV, dependiendo tanto del genotipo como del aislado específico empleado.

5.- La Hp es la PFA que incrementa más su concentración plasmática en respuesta a la infección experimental producida por el PRRSV. Por otra parte CRP y Pig-MAP son indicadores menos sensibles de la infección.

6.- El análisis de PFAs en una submuestra de animales obtenida en matadero permite obtener información acerca del grado de prevalencia de lesiones pulmonares que afectan a las explotaciones porcinas.

7.- Pig-MAP es un buen biomarcador indicativo de la presencia de pleuritis y consolidación craneo-ventral. La concentración de Hp incrementa significativamente en animales con lesiones de pleuritis pero presenta una capacidad de discriminación inferior a la Pig-MAP en el caso de consolidación pulmonar-cráneo ventral. Finalmente, la CRP no permite discriminar en el caso de lesiones pleurales.

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

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 the pig at slaughter. *Research in Veterinary Science* 83, 428-435.

Arceo, M.E., Ernst, C.W., Lunney, J.K., Choi, I., Raney, N.E., Huang, T., Tuggle, C.K., Rowland, R.R., Steibel, J.P., 2012. Characterizing differential individual response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection through statistical and functional analysis of gene expression. *Frontiers in Genetics* 3, 321.

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. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 70, 143-148.

Barbe, F., Atanasova, K., Van Reeth, K., 2011. Cytokines and acute phase proteins associated with acute swine influenza infection in pigs. *Veterinary Journal* 187, 48-53.

Blaha, T., 2000. The "colorful" epidemiology of PRRS. *Veterinary Research* 31, 77-83.

Borghetti, P., Saleri, R., Mocchegiani, E., Corradi, A., Martelli, P., 2009. Infection, immunity and the neuroendocrine response. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 130, 141-162.

Brull, F., Mensink, R.P., van den Hurk, K., Duijvestijn, A., Plat, J., 2010. TLR2 activation is essential to induce a Th1 shift in human peripheral blood mononuclear cells by plant stanols and plant sterols. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 2951-2958.

Canalias, F., 2003. Comisión de Metrología. SEQC. Recomendaciones para el estudio de la precisión de los procedimientos de medida en el laboratorio clínico. *Química Clínica* 22, 63-65.

Carpintero, R., Alonso, C., Pineiro, M., Iturralde, M., Andres, M., Le Potier, M.F., Madec, F., Alava, M.A., Pineiro, 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. *Veterinary Research* 38, 741-753.

Ceciliani, F., Giordano, A., Spagnolo, V., 2002. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. *Protein and Peptide Letters* 9, 211-223.

Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H., 2012. Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics* 75, 4207-4231.

Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martynez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology* 34, 85-99.

Clapperton, M., Bishop, S.C., Cameron, N.D., Glass, E.J., 2005a. Associations of acute phase protein levels with growth performance and with selection for growth performance in Large White pigs. *Animal Science* 81, 213-220.

Clapperton, M., Bishop, S.C., Glass, E.J., 2005b. Innate immune traits differ between Meishan and Large White pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 104, 131-144.

Clapperton, M., Bishop, S.C., Pineiro, M., Campbell, F.M., Glass, E.J., 2007. The association between plasma levels of acute phase proteins, haptoglobin, alpha-1 acid glycoprotein (AGP), pig-MAP, transthyretin and serum amyloid A (SAA) in Large White and Meishan pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 119, 303-309.

Clapperton, M., Diack, A.B., Matika, O., Glass, E.J., Gladney, C.D., Mellencamp, M.A., Hoste, A., Bishop, S.C., 2009. Traits associated with innate and adaptive immunity in pigs: heritability and associations with performance under different health status conditions. *Genetics, Selection, Evolution : GSE* 41, 54-9686-41-54.

Diack, A.B., Gladney, C.D., Mellencamp, M.A., Stear, M.J., Eckersall, P.D., 2008. Associations between polymorphisms in the porcine haptoglobin gene and baseline levels of serum haptoglobin. *Developments in Biologicals* 132, 255-259.

Diack, A.B., Gladney, C.D., Mellencamp, M.A., Stear, M.J., Eckersall, P.D., 2011. Characterisation of plasma acute phase protein concentrations in a high health boar herd. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 139, 107-112.

Diaz, 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. *The Journal of General Virology* 86, 1943-1951.

Diaz, I., Gimeno, M., Darwich, L., Navarro, N., Kuzemtseva, L., Lopez, S., Galindo, I., Segales, J., Martin, M., Pujols, J., Mateu, E., 2012. Characterization of homologous and heterologous adaptive immune responses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary Research* 43, 30.

Eckersall, P.D., 2004. The time is right for acute phase protein assays. *Veterinary Journal* 168, 3-5.

Eckersall, P.D., 2008. Proteins, Proteomics and the Dysproteinemias, in Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M.L. (Eds.), *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Academic Press, San Diego, USA, pp. 117-155.

Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Veterinary Journal* 185, 23-27.

Eurell, T.E., Bane, D.P., Hall, W.F., Schaeffer, D.J., 1992. Serum haptoglobin concentration as an indicator of weight gain in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 56, 6-9.

Foury, A., Lebreton, B., Chevillon, P., Vautier, A., Terlouw, C., Mormede, P., 2011. Alternative rearing systems in pigs: consequences on stress indicators at slaughter and meat quality. *Animal* 5, 1620-1625.

Fraile, L., Alegre, A., Lopez-Jimenez, R., Nofrarias, M., Segales, J., 2010. Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter-aged pigs. *Veterinary Journal* 184, 326-333.

Fraile, L.J., Crisci, E., Weenberg, J., Armadans, M., Mendoza, L., Ruiz, L., Bernaus, S., Montoya, M., 2009. Effect of treatment with phytosterols in three herds with porcine respiratory disease complex. *Journal of Swine Health and Production* 17, 32-41.

Fraile L, Saco Y, Grau-Roma L, Nofrarias M, Lopez-Gimenez R, Lopez-Soria S, Sibila M, Callen A, Bassols A, Segales J. Serum haptoglobin dynamics in porcine circovirus type 2 vaccinated and non-vaccinated piglets. *Veterinary Record*, enviado (2013).

Gabay, C., 2006. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Research & Therapy* 8(Suppl 2):S3.

Gabay, C., Kushner, I., 2001. Acute-phase proteins. *Encyclopedia of Life Science* , 1-6.

García de Lorenzo y Mateos, A., López Martínez, J., Sánchez Castilla, M., 2000. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Medicina Intensiva* 24, 353-360.

Gomez-Laguna, J., Salguero, F.J., Pallares, F.J., Fernandez de Marco, M., Barranco, I., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Van Reeth, K., Carrasco, L., 2010a. Acute phase response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 33, e51-e58.

Gomez-Laguna, J., Gutierrez, A., Pallares, F.J., Salguero, F.J., Ceron, J.J., Carrasco, L., 2010b. Haptoglobin and C-reactive protein as biomarkers in the serum, saliva and meat juice of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Veterinary Journal* 185, 83-87.

Gonzalez-Ramon, N., Hoebe, K., Alava, M.A., Van Leengoed, L., Pineiro, M., Carmona, S., Iturralde, M., Lampreave, F., Pineiro, A., 2000. Pig MAP/ITIH4 and haptoglobin are interleukin-6-dependent acute-phase plasma proteins in porcine primary cultured hepatocytes. *European Journal of Biochemistry / FEBS* 267, 1878-1885.

Grau-Roma, L., Heegaard, P.M., Hjulsgaard, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., Allepuz, A., Pineiro, M., Larsen, L.E., Segales, J., Fraile, L., 2009. Pig-major acute phase protein and haptoglobin serum concentrations correlate with PCV2 viremia and the clinical course of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Veterinary Microbiology* 138, 53-61.

Gruys, E., Toussaint, M.J., Upragarin, N., Van, E.A., Adewuyi, A.A., Candiani, D., Nguyen, T.K., Sabeckiene, J., 2005. Acute phase reactants, challenge in the near future of animal production and veterinary medicine. *Journal of Zhejiang University. Science. B* 6, 941-947.

Gutierrez, A.M., Martínez-Subiela, S., Soler, L., Pallares, F.J., Ceron, J.J., 2009. Use of saliva for haptoglobin and C-reactive protein quantifications in porcine respiratory and reproductive syndrome affected pigs in field conditions. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 132, 218-223.

Heegaard, P.M., Klausen, J., Nielsen, J.P., Gonzalez-Ramon, N., Pineiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A., 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. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 119, 365-373.

Heegaard, P.M., Stockmarr, A., Pineiro, M., Carpintero, R., Lampreave, F., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Gruys, E., Sorensen, N.S., 2011. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Veterinary Research* 42, 50.

Hiss, S., Sauerwein, H., 2003. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and haptoglobin plasma concentrations in pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 87, 2-11.

Hiss, S., Willbrenning, G.S., Suntz, M., Reinacher, M., Sauerwein, H., 2008. Immunohistochemical localization of haptoglobin in porcine lungs. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 37, 196-199.

Houdijk, J.G.M., Campbell, F.M., Fortomaris, P.D., Eckersall, P.D., Kyriazakis, I., 2007. Effects of sub-clinical post-weaning colibacillosis and dietary protein on acute phase proteins in weaner pigs. *Livestock Sciences* 108, 182-185.

Jacobsen, S., Andersen, P.H., 2007. The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker on inflammation in horses. *Equine Veterinary Education* 19, 18 - 36.

Jensen, A.L., Kjelgaard-Hansen, M., 2006. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 35, 276-286.

Johnson, A.M., 2006. Amino Acids, Peptides, and Proteins, in Anonymous Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition ed. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, pp. 533 - 595.

Kjelgaard-Hansen, M., Martinez-Subiela, S., Petersen, H.H., Jensen, A.L., Ceron, J.J., 2007. Evaluation and comparison of two immunoturbidimetric assays for the heterologous determination of porcine serum C-reactive protein. *Veterinary Journal* 173, 571-577.

Kyriazakis, I., 2008. ¿Cómo afectan las infecciones subclínicas a la productividad? *SUIS* 48, 18-24.

Lampreave, F., Gonzalez-Ramon, N., Martinez-Ayensa, S., Hernandez, M.A., Lorenzo, H.K., Garcia-Gil, A., Pineiro, A., 1994. Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis* 15, 672-676.

Levy, H., Kalish, L.A., Huntington, I., Weller, N., Gerard, C., Silverman, E.K., Celedon, J.C., Pier, G.B., Weiss, S.T., 2007. Inflammatory markers of lung disease in adult patients with cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* 42, 256-262.

Liljegren, C.H., Aalbaek, B., Nielsen, O.L., Jensen, H.E., 2003. Some new aspects of the pathology, pathogenesis, and aetiology of disseminated lung lesions in slaughter pigs. *APMIS : Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 111, 531-538.

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 hyorhinis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 68, 131-137.

Marco-Ramell, A., Pato, R., Pena, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J.L., Bassols, A., 2011. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Veterinary Journal* 190, e66-e71.

Martínez, E., Gella, F.J., Alonso, N., Boned, B., Canalias, F., Izquierdo, S., Serrat, N., 2011. Comisión de Metrología. SEQC. Recomendaciones para el estudio de la veracidad en el laboratorio clínico mediante la comparación de procedimientos de medida. Documentos de la SEQC. 3.

Martinez-Martinez, S., Frandoloso, R., Gutierrez-Martin, C.B., Lampreave, F., Garcia-Iglesias, M.J., Perez-Martinez, C., Rodriguez-Ferri, E.F., 2011. Acute phase protein concentrations in colostrum-deprived pigs immunized with subunit and commercial vaccines against Glasser's disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 61-67.

Matthay, M.A., Ware, L.B., 2004. Can nicotine treat sepsis? *Nature medicine* 10, 1161-1162.

Melchior, D., Seve, B., Le Floc'h, N., 2004. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. *Journal of Animal Science* 82, 1091-1099.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Veterinary Journal* 168, 28-40.

Pallares, F.J., Martinez-Subiela, S., Seva, J., Ramis, G., Fuentes, P., Bernabe, A., Munoz, A., Ceron, J.J., 2008. Relationship between serum acute phase protein concentrations and lesions in finishing pigs. *Veterinary Journal* 177, 369-373.

Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martinez-Subiela, S., Martinez, J.S., Munoz, A., Ceron, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *Journal of Veterinary Medicine B* 53, 488-493.

Passing, H., Bablok, 1983. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*. *Zeitschrift fur klinische Chemie und klinische Biochemie* 21, 709-720.

Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163-187.

Petersen, H.H., Ersboll, A.K., Jensen, C.S., Nielsen, J.P., 2002a. Serum-haptoglobin concentration in Danish slaughter pigs of different health status. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 325-335.

Petersen, H.H., Dideriksen, D., Christiansen, B.M., Nielsen, J.P., 2002b. Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs. *The Veterinary Record* 151, 85-89.

Pie, S., Lalles, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Seve, B., Oswald, I.P., 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition* 134, 641-647.

Pineiro, M., Pineiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Lampreave, F., 2007a. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Veterinary Journal* 173, 669-674.

Pineiro, C., Pineiro, C., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2007b. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133-139.

Pineiro, C., Pineiro, M., Morales, J., Andres, M., Lorenzo, E., Pozo, M.D., Alava, M.A., Lampreave, F., 2009a. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *Veterinary Journal* 179, 78-84.

Pineiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A., 2009b. Development and validation of an ELISA for the quantification of pig major acute phase protein (Pig-MAP). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 228-234.

Platt-Samoraj, A., Szweda, W., Procajlo, Z., 2009. The influence of experimental *Yersinia enterocolitica* infection on the pregnancy course in sows--preliminary studies. II. Antibodies, C-reactive proteins and haptoglobin as an immunological response. *Polish Journal of Veterinary Sciences* 12, 491-498.

Pomorska-Mol, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., Stepniewska, K., Pejsak, Z., 2011. Kinetics of the response of four positive acute phase proteins in pigs experimentally infected with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 152, 429-435.

Pomorska-Mol, M., Markowska-Daniel, I., Kwit, K., 2012a. Immune and acute phase response in pigs experimentally infected with H1N2 swine influenza virus. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 66, 334-342.

Pomorska-Mol, M., Markowska-Daniel, I., Pejsak, Z., 2012b. Acute phase protein response during subclinical infection of pigs with H1N1 swine influenza virus. *Veterinary Microbiology* 159, 499-503.

Quereda, J.J., Gomez, S., Seva, J., Ramis, G., Ceron, J.J., Munoz, A., Pallares, F.J., 2012. Acute phase proteins as a tool for differential diagnosis of wasting diseases in growing pigs. *The Veterinary Record* 170, 21.

Saco, Y., Docampo, M.J., Fabrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., Bassols, A., 2003. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare* 12, 403-409.

Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., Doglione, L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Veterinary Journal* 177, 110-115.

Sanchez-Cordon, P.J., Ceron, J.J., Nunez, A., Martinez-Subiela, S., Pedrera, M., Romero-Trevejo, J.L., Garrido, M.R., Gomez-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. *American Journal of Veterinary Research* 68, 772-777.

Segales, J., Pineiro, C., Lampreave, F., Nofrarias, M., Mateu, E., Calsamiglia, M., Andres, M., Morales, J., Pineiro, M., Domingo, M., 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Veterinary Research* 35, 275-282.

Sjolund, M., Fossum, C., Martin de la Fuente, A.J., Alava, M., Juul-Madsen, H.R., Lampreave, F., Wallgren, P., 2011. Effects of different antimicrobial treatments on serum acute phase responses and leucocyte counts in pigs after a primary and a secondary challenge infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *The Veterinary Record* 169, 70.

Skovgaard, K., Mortensen, S., Boye, M., Poulsen, K.T., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Heegaard, P.M., 2009. Rapid and widely disseminated acute phase protein response after experimental bacterial infection of pigs. *Veterinary research* 40, 23.

Sorensen, N.S., Tegtmeier, C., Andresen, L.O., Pineiro, M., Toussaint, M.J., Campbell, F.M., Lampreave, F., Heegaard, P.M., 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113, 157-168.

Sorrells, S.F., Sapolsky, R.M., 2007. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. *Brain, behavior, and immunity* 21, 259-272.

Sternberg, E.M., 2006. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nature reviews.Immunology* 6, 318-328.

Stevenson, L.S., McCullough, K., Vincent, I., Gilpin, D.F., Summerfield, A., Nielsen, J., McNeilly, F., Adair, B.M., Allan, G.M., 2006. Cytokine and C-reactive protein profiles induced by porcine circovirus type 2 experimental infection in 3-week-old piglets. *Viral Immunology* 19, 189-195.

Subramaniam, S., Sur, J.H., Kwon, B., Pattnaik, A.K., Osorio, F.A., 2011. A virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not up-regulate interleukin-10 levels in vitro or in vivo. *Virus Research* 155, 415-422.

Tecles, F., Fuentes, P., Martinez Subiela, S., Parra, M.D., Munoz, A., Ceron, J.J., 2007. Analytical validation of commercially available methods for acute phase proteins quantification in pigs. *Research in Veterinary Science* 83, 133-139.

Torres-Ramos, Y.D., Garcia-Guillen, M.L., Olivares-Corichi, I.M., Hicks, J.J., 2009. Correlation of Plasma Protein Carbonyls and C-Reactive Protein with GOLD Stage Progression in COPD Patients. *The Open Respiratory Medicine Journal* 3, 61-66.

van den Berg, A., Danuser, J., Frey, J., Regula, G., 2007. Evaluation of the acute phase protein haptoglobin as an indicator of herd health in slaughter pigs. *Animal Welfare* 16, 157-159.

Weschenfelder, A.V., Torrey, S., Devillers, N., Crowe, T., Bassols, A., Saco, Y., Pineiro, M., Saucier, L., Faucitano, L., 2012. Effects of trailer design on animal welfare parameters and carcass and meat quality of three Pietrain crosses being transported over a long distance. *Journal of Animal Science* 90, 3220-3231.