(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 082 801**

(21) Número de solicitud: 202530304

(51) Int. CI.:

G01N 33/53 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

10.04.2025

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

26.10.2026

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE MURCIA (100,00%)
Avda. Teniente Flomesta 5
30003 Murcia (Murcia) ES

(72) Inventor/es:

GUTIÉRREZ MONTES, Ana María y
IBÁÑEZ LÓPEZ, Francisco Javier

(74) Agente/Representante:

GONZALEZ IZQUIERDO, José Manuel

(54) Título: **PROCEDIMIENTO NO INVASIVO PARA DETECTAR GANADO PORCINO ENFERMO**

(57) Resumen:

Procedimiento no invasivo para detectar ganado porcino enfermo.

Procedimiento para diferenciar cerdos enfermos de cerdos sanos que comprende determinar un conjunto de valores en una muestra de saliva de ensayo que comprende los valores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva, o valores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo y actividad de α-amilasa; introducir dicho conjunto de valores en un modelo que clasifica dicho conjunto de valores en la categoría de cerdo enfermo o en la de cerdo sano. Procedimiento para categorizar cerdos enfermos en cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y cerdos con afecciones sistémicas. Sistema y programa informático, relacionados con los procedimientos descritos.

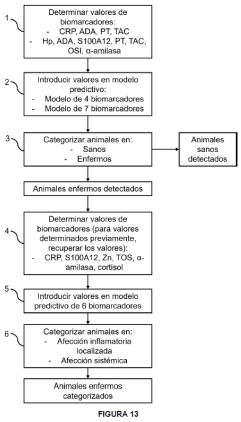


FIGURA 13

ES 3 082 801 A1

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO NO INVASIVO PARA DETECTAR GANADO PORCINO ENFERMO

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con modelos de aprendizaje supervisado para diferenciar entre cerdos enfermos y cerdos sanos que utilizan combinaciones de valores de varios biomarcadores, cuantificados en muestras de saliva, como datos de entrada.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El diagnóstico de animales enfermos en el ganado porcino es complejo e incluye una serie de intervenciones como son la descripción del problema por parte del ganadero, recogida de datos de la granja incluyendo medidas de bioseguridad y medio ambiente y las condiciones de manejo de los animales; toma de datos del propio animal sospechoso tales como observación del comportamiento, exploración física del animal y de los demás animales de la cuadra, requiriendo en ocasiones la realización de análisis clínicos o incluso examen post mortem para confirmar el diagnóstico. La toma de muestras para la realización de análisis clínicos asi como el examen postmortem se realiza necesariamente por el personal veterinario y en caso de necesitar toma de muestras sanguíneas implica la inmovilización del animal esta práctica lo que no solo genera estrés en el propio animal inmovilizado, sino que debido a los sonidos emitidos por estos animales se produce un disconfort acústico o sonoro que estresa en mayor o menor medida al resto de los animales de la nave.

Debido al tedioso procedimiento para el diagnóstico de enfermedades ganaderas, el desarrollo de procedimientos novedosos para monitorización del estado de salud de los animales en la granja, sin la necesidad de involucrar al personal veterinario en la toma de muestras y examen clínico de los animales, es de gran valor. Además, podría suponer el desarrollo de mejores métodos de control, asegurando la idoneidad de la industria ganadera y protegiendo la salud humana.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “modelo de aprendizaje supervisado” se refiere a un algoritmo con el que una máquina, sistema informático u ordenador, analiza datos, construye un modelo basado en esos datos y utiliza ese modelo como una herramienta que resuelve problemas. El modelo de aprendizaje supervisado utiliza un conjunto de datos de

entrenamiento que enseña al modelo a resolver el problema. Los modelos de aprendizaje supervisado pertenecen al campo de la inteligencia artificial.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “modelo clasificador” se refiere a un modelo de aprendizaje supervisado que usa las características de un objeto para identificar a qué clase (o grupo) pertenece. Un clasificador logra esto tomando una decisión de clasificación basada en el valor de una combinación de sus características. Ejemplos de modelos clasificadores son: red neuronal artificial, clasificador Naive Bayes, regresión lineal, regresión logística, máquina de vectores de soporte, K vecinos más cercanos y árboles de decisión aleatorios.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “red neuronal artificial” se refiere a un modelo clasificador inspirado en la estructura y función de las redes neuronales biológicas. Una red neuronal artificial consta de unidades o nodos conectados llamados neuronas artificiales, que simulan las neuronas del cerebro. Las neuronas artificiales están conectadas por bordes, que simulan las sinapsis del cerebro. Cada neurona artificial recibe señales de las neuronas conectadas, luego las procesa y envía una señal a otras neuronas conectadas. Las señales son valores y la salida de cada neurona se calcula mediante una función no lineal de la suma de sus entradas, llamada función de activación. La fuerza de la señal en cada conexión está determinada por un peso, que se ajusta durante el proceso de aprendizaje.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “clasificador Naive Bayes” es un modelo clasificador probabilístico que asume que la información sobre la clase proporcionada por cada variable no está relacionada con la información de las otras, sin información compartida entre los predictores. La naturaleza poco realista de esta hipótesis es por lo que recibe la denominación de naive, es decir, ingenuo. El modelo clasificador Naive Bayes es un modelo de redes bayesianas basado en el teorema de Bayes.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “regresión lineal” se refiere a un modelo matemático que aproxima la relación de dependencia entre una variable dependiente y unas variables independientes Este método se utiliza para estudiar la relación entre dos o más variables o para predecir un comportamiento.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “regresión logística” se refiere a un modelo clasificador utilizado para predecir el resultado de una variable categórica (una variable que puede adoptar un número limitado de categorías) en función de las variables independientes o predictoras. La regresión logística binomial es la clasificación en dos clases por regresión logística.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “máquina de vectores de soporte (SVM)” se refiere a un modelo clasificador en el que, dado un conjunto de muestras, se etiquetan las clases y se forma una máquina de vectores de soporte para construir un modelo que prediga la clase de una nueva muestra. Una máquina de vectores de soporte es un modelo que representa a los puntos de muestra en el espacio, separando las clases a 2 espacios lo más amplios posibles mediante un hiperplano de separación definido como el vector entre los 2 puntos, de las 2 clases, más cercanos al llamado vector soporte. Cuando las nuevas muestras se ponen en correspondencia con dicho modelo, en función de los espacios a los que pertenezcan, pueden ser clasificadas en una u otra clase.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “K vecinos más cercanos” se refiere a un modelo clasificador en el que se asigna un elemento a la clase más común entre sus k vecinos más cercanos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “árboles de decisión aleatorios” se refieren a un modelo clasificador que utiliza un árbol de decisión como modelo predictivo para pasar de observaciones sobre un elemento (representado en las ramas) a conclusiones sobre el valor objetivo del elemento (representado en las hojas). Cuando se aplica la regresión a los árboles de decisión aleatorios, se construyen múltiples árboles de decisión y se promedian sus predicciones para mejorar la precisión. Cada árbol de decisión se entrena, por ejemplo, con datos aleatorios del conjunto de entrenamiento. Esta selección aleatoria para el entrenamiento permite al modelo reducir el sesgo de las predicciones y aumentar la precisión.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “prueba de Shapiro-Wilk” se refiere a una prueba estadística que se usa para contrastar la normalidad de un conjunto de datos. La prueba de Shapiro-Wilk establece como como hipótesis nula que la población está distribuida normalmente. Si el p-valor es menor a un cierto nivel de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada (se concluye que los datos no vienen de una distribución normal). Si el p-valor es mayor a cierto nivel de significación, se concluye que no se puede rechazar dicha hipótesis.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “prueba de Levene” se refiere a una prueba estadística que evalúa la igualdad de las varianzas para una variable calculada para dos o más grupos. La prueba de Levene establece como hipótesis nula que las varianzas poblacionales son iguales. Si el p-valor resultante es inferior a un cierto nivel de significación, es poco probable que las diferencias obtenidas en las variaciones de la muestra se hayan producido sobre la base de un muestreo aleatorio de una población con varianzas iguales.

Por lo tanto, la hipótesis nula de igualdad de varianzas se rechaza y se concluye que hay una diferencia entre las variaciones en la población.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “prueba t de Welch” se refiere a una prueba estadística que se utiliza para probar la hipótesis nula de que dos poblaciones tienen medias iguales. Es una adaptación de la prueba t de Student. La prueba t de Student asume que las medias de las muestras que se comparan para dos poblaciones se distribuyen normalmente y que las poblaciones tienen varianzas iguales. La prueba t de Welch está diseñada para varianzas de población desiguales, pero se mantiene el supuesto de normalidad.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “prueba de Mann-Whitney” se refiere a una prueba estadística no paramétrica aplicada a dos muestras independientes. Es la versión no paramétrica de la prueba t de Student. El planteamiento de partida es que las observaciones de ambos grupos son independientes y las observaciones son variables ordinales o continuas. Bajo la hipótesis nula, la distribución de partida de ambos grupos es la misma y bajo la hipótesis alternativa, los valores de una de las muestras tienden a exceder a los de la otra.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “d de Cohen” se refiere a una medida del tamaño del efecto. El tamaño del efecto es una medida de la fuerza de un fenómeno (por ejemplo, el cambio en el resultado después de una intervención experimental). El tamaño del efecto calculado a partir de datos es una estadística descriptiva que transmite la magnitud estimada de una relación sin hacer ninguna declaración acerca de si la relación aparente en los datos refleja una verdadera relación en la población.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “curva Característica Operativa del Receptor (ROC, del inglés *Receiver Operating Characteristic*)”, se refiere a un gráfico que ilustra la precisión de un modelo clasificador binario con distintos valores de corte. La curva ROC es el gráfico de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) frente a la tasa de falsos positivos en cada valor de corte (1- especificidad).

Tal y como se utiliza en la presente memoria, “análisis de componentes principales (PCA)” se refiere a una técnica estadística utilizada para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables (componentes) no correlacionadas. Los componentes se ordenan por la cantidad de varianza original que describen, por lo que la técnica es útil para reducir la dimensionalidad de un conjunto de datos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "χ^2" se refiere a la distribución de la suma del cuadrado del número de variables aleatorias independientes con distribución normal estándar.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "razón de probabilidades (*odds ratio* en inglés)" se refiere a la probabilidad de que una condición de salud o enfermedad se presente en un grupo expuesto a un agente, sobre la probabilidad de que ocurra en otro grupo sin exposición al agente.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, "factor de inflación de la varianza (VIF, del inglés *Variance Inflation Factor*)" cuantifica la intensidad de la multicolinealidad en un análisis de regresión normal de mínimos cuadrados. Proporciona un índice que mide hasta qué punto la varianza (el cuadrado de la desviación estándar estimada) de un coeficiente de regresión estimado se incrementa a causa de la colinealidad.

En la presente invención se ha determinado el valor de los 13 biomarcadores siguientes en muestras de saliva de cerdos:

- concentración de proteína C reactiva (también denominada "CRP" a largo de la presente memoria),
- concentración de la proteína haptoglobina (también denominada "Hp" a lo largo de la presente memoria),
- concentración de la proteína de fase aguda principal del cerdo (también denominada "Pig-MAP" a lo largo de la presente memoria),
- actividad de la enzima adenosina desaminasa (también denominada "ADA" a lo largo de la presente memoria),
- concentración de la proteína S100A12,
- concentración de Cu,
- concentración de Zn,
- concentración total de proteínas (también denominada "PT" a lo largo de la presente memoria),
- capacidad antioxidante total (también denominada "TAC" a lo largo de la presente memoria),
- estado oxidante (también denominado "TOS" a lo largo de la presente memoria),
- índice de estrés oxidativo (también denominado "OSI" a lo largo de la presente memoria),
- actividad de la enzima α-amilasa, y
- concentración de cortisol.

Dichos biomarcadores incluyen proteínas de fase aguda (proteína C reactiva, haptoglobina y proteína Pig-MAP), la enzima adenosina desaminasa (involucrada en el desarrollo y diferenciación de linfocitos), la proteína inflamatoria S100A12, la enzima α-amilasa (relacionada con el estado de activación del sistema simpático), dos oligoelementos relacionados con la respuesta inmunitaria (Cu y Zn), el cortisol (relacionado con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, el estado oxidante total (TOS), la capacidad antioxidante total (TAC), el índice de estrés oxidativo (relación TOS/TAC) y la cantidad de proteínas totales (PT).

El problema técnico a resolver consiste en proporcionar un procedimiento que diferencie los cerdos sanos de los enfermos en función de combinaciones de valores de biomarcadores que ofrece una elevada precisión diagnóstica y que utiliza ensayos analíticos asequibles y de coste reducido.

La presente invención soluciona dicho problema técnico con un procedimiento tal y como se detalla en las reivindicaciones, que ofrece más de un 96% de probabilidad de detección de estado patológico en cerdos usando muestras de saliva.

La presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para diferenciar cerdos enfermos de cerdos sanos, que comprende:

(a) determinar un primer conjunto de valores de ensayo en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra de saliva de cerdo y en el que dicho primer conjunto de valores de ensayo comprende:
    (i) valores de 4 biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva, o
    (ii) valores de 7 biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo y actividad de α-amilasa,
(b) introducir dicho primer conjunto de valores de ensayo determinado en la etapa anterior en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados

en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos,

(c) en el que dicho primer modelo clasifica dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo enfermo, y

(ii) categoría de cerdo sano, e

(d) identificar el cerdo:

(i) como un cerdo enfermo cuando el conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo enfermo, o

(ii) como un cerdo sano cuando el conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo sano.

La presente invención puede ser utilizada en los sistemas de control de la salud y la trazabilidad del ganado porcino gracias a su elevado nivel de predicción.

El modelo predictivo de los 4 biomarcadores definidos en la etapa (a)(i) del procedimiento de la invención ofrece un 96% de probabilidad de detección de estado patológico en cerdos usando muestras de saliva. La ventaja de este modelo predictivo es que solo requiere determinar el valor de 4 biomarcadores y ello supone un coste aún más reducido que modelos basados en más biomarcadores.

El modelo predictivo de los 7 biomarcadores definidos en la etapa (a)(ii) del procedimiento de la invención ofrece un 99% de probabilidad de detección de estado patológico en cerdos usando muestras de saliva.

En una realización, el procedimiento de la invención comprende además las siguientes etapas adicionales después de la etapa (d):

(e) cuando el primer conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la categoría (c)(i) de cerdo enfermo del procedimiento de la invención, determinar un segundo conjunto de valores de ensayo en dicha muestra de ensayo, en el que dicho segundo conjunto de valores de ensayo comprende los valores de 6 biomarcadores: concentración de proteína C reactiva, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, actividad de α-amilasa, concentración de Zn, valor de estado oxidante y concentración de cortisol,

(f) introducir dicho segundo conjunto de valores de ensayo determinado en la etapa anterior en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados en unas segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas,

(g) en el que dicho segundo modelo clasifica dicho segundo conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(ii) categoría de cerdo con afección sistémica, e

(h) identificar el cerdo:

(i) como un cerdo con afección inflamatoria localizada cuando dicho segundo conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, o

(ii) como un cerdo con afección sistémica cuando dicho segundo conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo con afección sistémica.

En otra realización del procedimiento de la invención, el primer o segundo modelo clasificador es un modelo seleccionado del grupo que consiste en red neuronal artificial, clasificador Naive Bayes, regresión lineal, regresión logística, máquina de vectores de soporte, K vecinos más cercanos y árboles de decisión aleatorios.

En otra realización del procedimiento de la invención, los valores de los biomarcadores se determinan por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: inmunoensayo, ensayo enzimático cinético, espectrofotometría de absorción atómica de llama, método de Bradford, ensayo de poder antioxidante férrico reducido y ensayo cuantitativo de peróxido.

En dicha realización del procedimiento de la invención, el inmunoensayo se selecciona del grupo que consiste en: inmunoensayo tipo sándwich con detección por fluorometría a tiempo resuelto e inmunoensayo con detección enzimática (ELISA).

En realizaciones del procedimiento de la invención, la actividad de adenosina desaminasa se determina por ensayo enzimático cinético.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de proteínas totales se determina por el método de Bradford.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la capacidad antioxidante total se determina por ensayo de poder antioxidante férrico reducido.

En realizaciones del procedimiento de la invención, el estado oxidante total se determina por ensayo cuantitativo de peróxido.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de proteína C reactiva se determina por inmunoensayo y, preferentemente, por inmunoensayo tipo sándwich con detección por fluorometría a tiempo resuelto.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de haptoglobina se determina por inmunoensayo y, preferentemente, por inmunoensayo tipo sándwich con detección por fluorometría a tiempo resuelto.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de Pig-MAP se determina por inmunoensayo y, preferentemente, por inmunoensayo tipo sándwich con detección por fluorometría a tiempo resuelto.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de proteína S100A12 se determina por inmunoensayo y, preferentemente, inmunoensayo tipo sándwich enzimático no competitivo (ELISA).

En realizaciones del procedimiento de la invención, el índice de estrés oxidativo se calcula como la relación TOS/TAC, siendo TOS el estado oxidante y TAC la capacidad antioxidante total y donde el estado oxidante se determina por el ensayo cuantitativo de peróxido y TAC por el ensayo de poder antioxidante férrico reducido.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la actividad de α-amilasa se determina por ensayo enzimático cinético.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de Zn se determina por espectrofotometría de absorción atómica de llama.

En realizaciones del procedimiento de la invención, la concentración de cortisol se determina por inmunoensayo y, preferentemente, por inmunoensayo ELISA competitivo.

En otra realización del procedimiento de la invención, entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) o (e) del procedimiento de la invención, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de 4ºC o inferior, durante un máximo de 48 horas.

En otra realización del procedimiento de la invención, entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) o (e) del procedimiento de la invención, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de -20ºC o inferior, durante un máximo de 72 horas.

En otra realización del procedimiento de la invención, entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) o (e) del procedimiento de la invención, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de -80ºC o inferior.

La presente invención también proporciona un sistema que comprende:

(a) medios para determinar un primer conjunto de valores de ensayo en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra de saliva de cerdo y en el que dicho primer conjunto de valores de ensayo comprende:
    (i) valores de 4 biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva, o
    (ii) valores de 7 biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, y actividad de α-amilasa,

    en el que dichos medios se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpos específicos frente a la proteína C reactiva, anticuerpos específicos frente a haptoglobina, anticuerpos específicos frente a la proteína S100A12, 2-oxoglutarato,

adenosina, glutamato deshidrogenasa, NADH, azida sódica, complejo férrico piridil triazina, sultato ferroso (II) de amonio, ácido sulfúrico, sorbitol, naranja de xilenol, 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa y lector de microplacas,

(b) medios para introducir dicho primer conjunto de valores de ensayo en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende los valores de los biomarcadores definidos en los medios (a), determinados en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos, y

(c) medios para clasificar dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo enfermo, y

(ii) categoría de cerdo sano,

en el que dichos medios (b) o (c) se seleccionan del grupo que consiste en: unidad central de procesamiento o procesador, unidad de memoria de acceso aleatorio, unidad de almacenamiento de datos, unidad de memoria de solo lectura y unidad de memoria externa.

En una realización, el sistema de la invención comprende además los siguientes medios adicionales:

(d) medios para determinar, cuando dicho primer conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la categoría (c)(i) de cerdo enfermo del sistema de la invención, un segundo conjunto de valores de ensayo en dicha muestra de ensayo, en el que dicho segundo conjunto de valores de ensayo comprende los valores de 6 biomarcadores: concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, y actividad de α-amilasa, concentración de proteína C reactiva, concentración de Zn, valor de estado oxidante y concentración de cortisol, en el que dichos medios se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpos específicos frente a la proteína S100A12, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, sultato ferroso (II) de amonio, ácido sulfúrico, sorbitol, naranja de xilenol, peroxidasa de rábano, tetrametilbencidina, 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa, lector de microplacas y espectrofotómetro de absorción atómica de llama,

(e) medios para introducir dicho segundo conjunto de valores de ensayo en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados en unas

segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas, y

(f) medios para clasificar dicho segundo conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(iii) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(iv) categoría de cerdo con afección sistémica,

en el que dichos medios (e) o (f) se seleccionan del grupo que consiste en: una unidad central de procesamiento o procesador, unidad de memoria de acceso aleatorio, unidad de almacenamiento de datos, unidad de memoria de solo lectura y unidad de memoria externa.

La presente invención proporciona un programa informático que comprende instrucciones que causan, cuando dicho programa informático es ejecutado por un sistema informático, que dicho sistema informático realice las siguientes etapas:

(a) introducir dicho primer conjunto de valores de ensayo que comprende los valores de los biomarcadores determinados en la etapa (a) del procedimiento de la invención en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) del procedimiento de la invención, determinados en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos, y

(b) en el que dicho primer modelo clasifica dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo enfermo, y

(ii) categoría de cerdo sano.

En una realización, el programa informático de la invención además comprende instrucciones que causan, cuando dicho programa informático es ejecutado en dicho sistema informático, que dicho sistema informático realice las siguientes etapas adicionales después de la etapa (b):

(c) introducir un segundo conjunto de valores de ensayo que comprende los valores de los biomarcadores determinados en la etapa (e) del procedimiento de la invención en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido

previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa (e) del procedimiento de la invención, determinados en unas segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas,

(d) en el que dicho segundo modelo clasifica dicho segundo conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(v) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(vi) categoría de cerdo con afección sistémica.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, el término “comprende”, “que comprende” y sus variantes no son de naturaleza limitativa y, por lo tanto, no pretenden excluir otras características técnicas. El término “comprende”, “que comprende” y sus variantes, a lo largo de la descripción y las reivindicaciones, incluye, específicamente, el término “consiste en”, “que consiste en” y sus variantes.

Como se usa en esta descripción y en las reivindicaciones, las formas singulares “el”, “la” incluyen referencias a las formas plurales a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Valores de los biomarcadores en muestras de saliva de animales sanos y enfermos: (A) concentración de la proteína Pig-MAP, (B) actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA), (C) concentración de proteína C reactiva (CRP), (D) concentración de la proteína S100A12, (E) concentración de la proteína haptoglobina (Hp), (F) concentración de Cu, (G) concentración total de proteínas (PT), (H) concentración de Zn, (I) capacidad antioxidante total (TAC), (J) actividad de la enzima α-amilasa, (K) estado oxidante total (TOS), (L) concentración de cortisol, (M) índice de estrés oxidativo (OSI). La línea horizontal dentro de la caja representa la media, los bordes superior e inferior de la caja representan los percentiles 25 y 75 y los bigotes verticales representan los percentiles 9 y 95. Las diferencias estadísticamente significativas se muestran con un bigote horizontal y el nivel de significación se especifica sobre el mismo.

Figura 2. Valores de la sensibilidad (triángulos) y la especificidad (círculos) para cada valor de corte en cada biomarcador: (A) concentración de la proteína Pig-MAP, (B) actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA), (C) concentración de proteína C reactiva (CRP), (D)

concentración de la proteína S100A12, (E) concentración de la proteína haptoglobina (Hp), (F) concentración de Cu, (G) concentración total de proteínas (PT), (H) concentración de Zn, (I) capacidad antioxidante total (TAC), (J) actividad de la enzima α-amilasa, (K) estado oxidante total (TOS), (L) concentración de cortisol, (M) índice de estrés oxidativo (OSI). Los valores del área bajo la curva (AUC), el punto de corte con el que se obtienen los mejores valores de sensibilidad y especificidad, así como dichos mejores valores de sensibilidad y especificidad son, para cada biomarcador, los siguientes: concentración de la proteína Pig-MAP (AUC = 0,86; valor de corte = 24,3; sensibilidad = 79,95; especificidad = 80,14), actividad de la enzima adenosina desaminasa (ADA) (AUC = 0,59; valor de corte = 5,05; sensibilidad = 61,84; especificidad = 53,11), concentración de proteína C reactiva (CRP) (AUC = 0,93; valor de corte = 14,1; sensibilidad = 88,92; especificidad = 87,30), concentración de la proteína S100A12 (AUC = 0,62; valor de corte = 24,57; sensibilidad = 63,44; especificidad = 62,50), concentración de la proteína haptoglobina (Hp) (AUC = 0,80; valor de corte = 1,15; sensibilidad = 74,07; especificidad = 74,09), concentración de Cu (AUC = 0,84; valor de corte = 0,915; sensibilidad = 77,78; especificidad = 77,74), concentración total de proteínas (PT) (AUC = 0,54; valor de corte = 1,17; sensibilidad = 53,01; especificidad = 53,04), concentración de Zn (AUC = 0,67; valor de corte = 1,83; sensibilidad = 65,86; especificidad = 62,07), capacidad antioxidante total (TAC) (AUC = 0,77; valor de corte = 12,79; sensibilidad = 70,87; especificidad = 70,82), actividad de la enzima α-amilasa (AUC = 0,82; valor de corte = 547,6; sensibilidad = 74,46; especificidad = 75,42), estado oxidante total (TOS) (AUC = 0,54; valor de corte = 13,22; sensibilidad = 54,36; especificidad = 55,52), concentración de cortisol (AUC = 0,57; valor de corte = 0,105; sensibilidad = 57,07; especificidad = 51,99), índice de estrés oxidativo (OSI) (AUC = 0,88; valor de corte = 1,065; sensibilidad = 81,25; especificidad = 81,25).

Figura 3. Proporción de varianza explicada por cada dimensión del análisis de componentes principales para la diferenciación entre animales sanos y animales enfermos.

Figura 4. Representación de la intensidad de cada variable en las primeras 5 dimensiones del análisis de componentes principales para la diferenciación entre animales sanos y animales enfermos.

Figura 5. Representación de los componentes principales de la dimensión 1 y 2 para animales sanos (círculos) y animales enfermos (triángulos). El porcentaje total de varianza explicada por la dimensión 1 es 29% y para la dimensión 2 es 20%.

Figura 6. Valores de la sensibilidad (curva 1) y la especificidad (curva 2) para cada valor de corte para el modelo de detección de enfermedad de 7 biomarcadores. Se indica el valor del punto de corte que muestra el mejor nivel de sensibilidad y la especificidad en cada caso.

Figura 7. Curva de calibración (línea negra) del modelo de detección de enfermedad de 7 biomarcadores tras la validación cruzada del modelo. La línea gris es una línea recta que representa un ajuste perfecto del 100% y la banda sombreada indica la dispersión del ajuste.

Figura 8. Valores de la sensibilidad (curva 1) y la especificidad (curva 2) para cada valor de corte para el modelo de detección de enfermedad de 4 biomarcadores. Se indica el valor del punto de corte que muestra el mejor nivel de sensibilidad y la especificidad en cada caso.

Figura 9. Curva de calibración (línea negra) del modelo de detección de enfermedad de 4 biomarcadores tras la validación cruzada del modelo. La línea gris es una línea recta que representa un ajuste perfecto del 100% y la banda sombreada indica la dispersión del ajuste.

Figura 10. Representación de los componentes principales de la dimensión 1 y 2 para animales con afección gastrointestinal (círculos), mordedura de cola (triángulos), inflamación local (cuadrados negros), combinación de afecciones (símbolo “más”) y enfermedad respiratoria (cuadrados grises). El porcentaje total de varianza explicada por la dimensión 1 es 31% y para la dimensión 2 es 14%.

Figura 11. Valores de la sensibilidad (curva 1) y la especificidad (curva 2) para cada valor de corte para el modelo de diferenciación entre afecciones inflamatorias localizadas y afecciones sistémicas de 6 biomarcadores. Se indica el valor del punto de corte que muestra el mejor nivel de sensibilidad y especificidad en cada caso.

Figura 12. Curva de calibración (línea negra) del modelo de diferenciación entre afecciones inflamatorias localizadas y afecciones sistémicas de 6 biomarcadores tras la validación cruzada del modelo. La línea gris es una línea recta que representa un ajuste perfecto del 100% y la banda sombreada indica la dispersión del ajuste.

Figura 13. Diagrama de procesos que ilustra el procedimiento no invasivo para detectar ganado porcino enfermo según una realización de la invención.

DESCRIPCIÓN DE MODOS DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1. Animales y muestras

Se han utilizado un total de 415 cerdos sanos y 371 cerdos enfermos con patologías variadas incluyendo: afección gastrointestinal (n = 87); enfermedades respiratorias (n = 91); procesos inflamatorios locales (n = 77); animales con mordedura de cola (n = 74); y animales con una combinación de patologías (n = 42).

Para la inclusión de los animales en el grupo de sanos, se comprobó que los animales presentaran una buena condición corporal para su edad y estado productivo y que no presentaban ningún signo clínico.

En el caso de los animales enfermos, se incluyeron todos aquellos animales que presentaban cualquier sintomatología clasificándolos entre los siguientes cinco grupos: 1) afecciones gastrointestinales, cuando los animales presentaban signos clínicos tales como diarrea, vómitos y/o prolapsos rectales con o sin retraso en el crecimiento; 2) afecciones respiratorias, para animales con disnea, dificultad respiratoria, tos y/o moqueo con o sin caquexia; 3) afecciones inflamatorias localizadas, cuando se observaba cojera, artritis o artrosis, abscesos superficiales o heridas en orejas en los animales; 4) mordeduras de cola, incluyendo animales con mordeduras de cola sangrantes o inflamadas; 5) combinación de afecciones, animales que presentaban signos de más de un grupo de entre los anteriores.

Se tomaron muestras de saliva de los animales. Se usaron esponjas de un tamaño de 2x2x3 cm sujetas a una varilla de metal delgada resistente, que no impedía la masticación y a la vez no causaba heridas en la boca de los animales. La esponja se le acercó individualmente a la boca del animal y se permitió que la mordiera entre 1 y 2 minutos. Una vez transcurrido el tiempo y comprobando que la esponja estuviera completamente empapada, se insertó en tubos específicos para la recolección de saliva (tubos Salivette, Sarstedt, Numbrecht, Alemania). Para obtener saliva de los animales en ningún caso se inmovilizó al animal y el procedimiento se llevó a cabo por una sola persona. Una vez acabado el muestreo y con las esponjas en los tubos Salivette correctamente rotulados, se mantuvieron en refrigeración, utilizando acumuladores de frío, hasta su llegada al laboratorio para su procesamiento en un máximo de 4 horas. Una vez que los tubos de saliva llegaron al laboratorio se centrifugaron a 3000g durante 10 minutos para obtener la saliva de las esponjas y eliminar los restos de

alimentos o células que quedaban en el fondo del tubo. Las muestras de saliva centrifugadas se depositaron en tubos de 1,5 mL y se almacenaron a -80ºC hasta su posterior análisis.

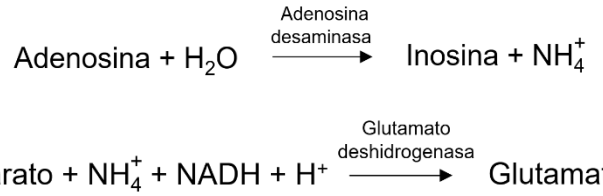
Ejemplo 2. Determinación del valor de los biomarcadores en muestras de saliva

En las muestras de saliva de los animales se ha determinado el valor de 13 biomarcadores: concentración de proteína C reactiva, concentración de la proteína haptoglobina, concentración de la proteína Pig-MAP, actividad de la enzima adenosina desaminasa, concentración de la proteína S100A12, concentración de Cu, concentración de Zn, concentración total de proteínas, capacidad antioxidante total, estado oxidante, índice de estrés oxidativo, actividad de la enzima α-amilasa y concentración de cortisol.

Las concentraciones de CRP, Hp y Pig-MAP se cuantificaron mediante inmunoensayos tipo sándwich con detección por fluorometría a tiempo resuelto (TR-IFMA, del inglés *time-resolved immunofluorometric assay*). Dichos inmunoensayos consisten en el uso de anticuerpos monoclonales de ratón específicos para cada proteína porcina, anticuerpos de captura y anticuerpos de detección marcados con europio. El marcaje con europio incrementa la señal y reduce el ruido de fondo del ensayo ofreciendo una mayor sensibilidad. Se utilizaron curvas estándar de concentraciones de proteína conocidas para extrapolar los resultados obtenidos. En las mediciones de las concentraciones de CRP y Pig-MAP, las muestras de saliva se utilizaron sin diluir. En las mediciones de las concentraciones de Hp, se utilizó una dilución 1:10 de las muestras de saliva. La lectura de las cuentas de europio se realizó utilizando un lector de microplacas (*Victor Nivo Multimode Microplate Reader*; Revvity, Massachusetts, EE. UU.), con tecnología TR-IFMA, excitando las partículas de europio utilizadas en los ensayos a 340 nm y captando la fluorescencia emitida por ellas a una longitud de onda de 613 nm. Las concentraciones de CRP y Pig-MAP se expresaron en ng/mL y las de Hp en µg/mL.

La actividad de la enzima adenosina desaminasa se cuantificó mediante un ensayo enzimático cinético (Ensayo Adenosina Desaminasa (ADA); número de referencia 12754; BioSystems S.A., Barcelona, España), con detección por espectrofotometría, modificado para realización en microplacas. Se hizo reaccionar 50 µL de saliva porcina a dilución 1:16 con 200 µL de reactivo ADA comercial que contiene Tris 100 mM pH 6,8, 2-oxoglutarato 0,88 mM, adenosina 5,2 mM, glutamato deshidrogenasa 80 U/L, NADH 0,3 mM y azida sódica 2,66 g/L (BioSystems S.A., Barcelona, España). En el ensayo, la adenosina desaminasa cataliza la desaminación de la adenosina, formando inosina e ion amonio. La concentración de la adenosina desaminasa se determina, empleando una reacción acoplada catalizada por la

glumatato deshigrogenasa, a partir de la velocidad de desaparición del NADH, medida a 340 nm:



La actividad de la adenosina desaminasa es proporcional a la reducción de la absorbancia por minuto medida a 340 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España). La actividad de la adenosina desaminasa se expresó en U/mL.

La concentración de la proteína S100A12 se cuantificó mediante un inmunoensayo enzimático tipo sándwich desarrollado por los inventores que utiliza como anticuerpo de captura un anticuerpo policlonal desarrollado en cabra frente a la proteína S100A12 humana (goat anti-human S100A12, número de referencia Invitrogen PA547056 Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Se utilizó, además, un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo fabricado frente a la proteína porcina (GenScript Biotech, Leiden, Netherlands) como anticuerpo de detección y un anticuerpo secundario frente a la inmunoglobulina G de conejo marcado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Las muestras de saliva se diluyeron 1:1000. La detección de la señal de las muestras y de la curva estándar desarrollada usando una proteína recombinante frente a la proteína porcina (GenScript Biotech, Leiden, Netherlands) se realizó mediante la incorporación de ácido 2,2-azino-di-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfonato. Tras 25 minutos de incubación, se midió la absorbancia a 405 nm con un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España). Las concentraciones de la proteína S100A12 se expresaron en µg/mL.

Se cuantificaron las concentraciones de Cu y Zn mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama. Antes de dicha cuantificación, las muestras se sometieron a digestión ácida. La digestión ácida consistió en incubar 0,5 mL de cada muestra a temperatura ambiente durante 24 h con 0,5 mL de ácido nítrico al 65% (Merck, Darmstadt, Alemania), seguido de una incubación de 1 hora a 120º C. A continuación, se añadieron a la mezcla 0,5 mL de peróxido de hidrógeno al 30% (Appli-Chem, Darmstadt, Alemania) y, tras otra incubación de 1 h a 120º C, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente y se llenaron hasta 2,5 mL con agua. Para las mediciones de absorción atómica se utilizó un espectrómetro Varian modelo SpectrAA 55BSe. Los niveles de Cu y Zn se midieron a las longitudes de onda de

324,7 nm y 213,8 nm mediante espectrofotometría de absorción atómica de llama utilizando lámparas de cátodo hueco (Agilent Technologies Spain, Madrid, España) y una llama de aire/acetileno. Para la calibración se utilizaron soluciones patrón certificadas de Cu y Zn en un rango entre 1 y 4 µg/mL (Agilent Technologies, Madrid, España). Las concentraciones de Cu y Zn se expresaron en µg/mL.

La concentración total de proteínas (PT) se determinó por el método de Bradford. Se utilizó como patrón una curva de albumina de cinco puntos en un rango entre 5 y 100 µg/mL. Las muestras de saliva se diluyeron 1:40. Se mezclaron 50 µL de patrón o de muestras con 200 µL de reactivo de Bradford y se cuantificó la absorbancia a 595 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España). La concentración total de proteínas se expresó en mg/mL.

La cuantificación de la capacidad antioxidante total (TAC) se realizó mediante un ensayo de poder antioxidante férrico reducido (ensayo FRAP, del inglés *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Dicho ensayo consiste en la reducción del complejo férrico tripiridil triazina (Fe^{3+}-tripiridil triazina) para formar Fe^{2+} en medio ácido. Se mezclaron 36 µL de saliva con 270 µL de reactivo FRAP que contiene 25 mL de tampón acetato 300 mM, pH = 3,6; 2,5mL de tripiridil triazina 10 mM y 2,5mL de $FeCl_3$ 20mM. Se midió la absorbancia de la reacción de manera inmediata a una longitud de onda de 593 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Cientifica S.L., Madrid, España). Para calcular la capacidad antioxidante total de las muestras se utilizó como calibrador concentraciones entre 1,5 y 100 µM/L del antioxidante del ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox; análogo soluble en agua de la vitamina E empleado como agente antioxidante de control para la calibración del ensayo). La capacidad antioxidante total se expresó en µM/L de equivalentes de Trolox.

El estado oxidante (TOS) se cuantificó utilizando un ensayo cuantitativo de peróxido (kit de ensayo cuantitativo de peróxido (formulación compatible con agua); Pierce™, Thermo Scientific). Se hizo reaccionar 150 µL de saliva diluida 1:2 con 70 µL de reactivo que contiene sulfato ferroso (II) de amonio 0,25 mM, ácido sulfúrico 25 mM, sorbitol 99 mM y naranja de xilenol 124 µM. En este ensayo, los peróxidos convierten el Fe^{2+} a Fe^{3+} a pH ácido. El peróxido reacciona primero con el sorbitol, convirtiéndolo en un radical peroxil, que, a su vez, inicia la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+}. En una solución de ácido sulfúrico, el Fe^{3+} forma un complejo con el colorante naranja de xilenol, para producir un producto coloreado. El estado oxidante se

cuantificó mediante la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España), tras 15 minutos de reacción, utilizando una curva patrón de peróxido de hidrógeno en el rango entre 31,25-0,97 µM/L de equivalentes de peróxido. El estado oxidante se expresó en µM/L de equivalentes de peróxido.

El Índice de Estrés Oxidativo (OSI) se calculó como la relación TOS/TAC.

La concentración de cortisol en las muestras de saliva se midió utilizando un inmunoensayo ELISA competitivo de alta sensibilidad de rango extendido (*Expanded range High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit*; número de referencia 1-3002; Salimetrics, EE. UU.). En el ensayo, el cortisol en patrones y muestras compite con el cortisol conjugado con peroxidasa de rábano por los sitios de unión de anticuerpos en una microplaca. Tras la incubación, se lavan los componentes no unidos. La concentración del conjugado enzimático de cortisol unido a los anticuerpos se cuantifica mediante la reacción de la enzima peroxidasa de rábano con el sustrato tetrametilbencidina. La absorbancia de las muestras y patrones se cuantificaron a 450 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España). La cantidad de conjugado enzimático de cortisol detectada es inversamente proporcional a la cantidad de cortisol presente en la muestra. La concentración de cortisol se expresó en µg/dL.

La actividad de α-amilasa se cuantificó mediante un ensayo enzimático cinético de α-amilasa (*Salivary Alpha-amylase Kinetic Enzyme Assay Kit*; número de referencia 1-1902; Salimetrics, USA). La acción enzimática de la α-amilasa sobre este 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa produce 2-cloro-p-nitrofenol y la concentración de este producto de reacción se midió espectrofotométricamente a 405 nm. La cantidad de actividad α-amilasa presente en la muestra es directamente proporcional al aumento de absorbancia a 405 nm. A 37ºC, se hizo reaccionar 8 µL de saliva de cerdo con 320 µL de reactivo que contiene 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa y 0,01% azida sódica. Se determinó el incremento de la absorbancia a 405 nm en un espectrómetro de microplacas (SPECTROstar Nano, BMG Labtech, Biogen Científica S.L., Madrid, España) entre el minuto 0 y el minuto 5 a 37°C. La actividad de α-amilasa se expresó en U/L.

Ejemplo 3. Análisis estadístico de las diferencias entre los valores de los biomarcadores en animales enfermos y en animales sanos

Los rangos de valores de referencia de cada biomarcador de animales sanos utilizados en la presente invención, determinados por los inventores, se muestran en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Biomarcador	N	Media	Mediana	Desviación estándar	Min-max
CRP (ng/mL)	406	9.605	8.090	6.159	3.211-55.26
Hp (µg/mL)	405	0.951	0.715	0.827	0.010-6.59
Pig-MAP (ng/mL)	414	21.298	13.037	32.768	1.236-345.47
ADA (U/mL)	414	5.265	4.330	3.633	0.863-28.98
S100A12 (µg/mL)	413	35.975	29.936	25.425	0.154-172.03
Cu (µg/mL)	369	2.021	1.598	1.445	0.000-7.81
Zn (µg/mL)	372	2.848	2.390	1.881	0.079-11.40
PT (mg/mL)	415	1.284	1.135	0.734	0.021-5.53
TAC (µM/mL)	412	24.015	18.690	18.617	1.924-106.53
TOS (µM/mL)	401	19.074	12.012	18.934	1.708-133.40
OSI (TOS/TAC)	400	0.819	0.7106	0.467	0.180-5.76
α-amilasa (U/L)	415	415.095	228.595	432.844	18.995-1685.32
Cortisol (µg/dL)	410	0.121	0.091	0.117	0.000-1.31

Se analizó estadísticamente la posible diferencia entre las concentraciones observadas en animales sanos y en animales enfermos obteniéndose diferencias estadísticamente significativas para todos los biomarcadores con la excepción de S100A12 y TOS (**Figura 1**). Para realizar esta comparativa se estudió la distribución de los datos para cada grupo y biomarcador utilizando la prueba de Shapiro-Wilk y se estudió la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cuando los resultados no presentaban normalidad y/o no presentaban homogeneidad de varianzas, las diferencias entre grupos se indagaron utilizando una prueba t de Welch (CRP, Hp, Pig-MAP, ADA, S100A12, Cu, Zn, PT, TAC, OSI, α-amilasa y cortisol) mientras que para aquellas muestras que no presentaban normalidad, pero sí homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba de Mann-Whitney (TOS) y los resultados se muestran en la **Tabla 2**. Para cada comparativa se calculó el tamaño del efecto mediante el cálculo de la d de Cohen en la **Tabla 2** (en la segunda columna). La **Tabla 2** (en la tercera, cuarta y quinta columna) muestra los resultados de las diferencias entre las concentraciones de CRP, Hp, Pig-MAP, ADA, S100A12, Cu, Zn, PT, TAC, TOS, OSI, α-amilasa y cortisol

cuantificadas en muestras de saliva obtenidas de cerdos sanos (n = 415) y cerdos enfermos (n = 371).

Tabla 2

Biomarcador	**Tamaño del efecto (d Cohen)**	**Valor del estadístico (χ^2)**	**Grados de libertad**	**Nivel de significación (p-valor)**
CRP	0,949	12,9	370	< 0,001
Hp	1,09	14,8	455	< 0,001
Pig-MAP	0,613	8,15	353	< 0,001
ADA	0,4637	6,385	603	< 0,001
S100A12	-0,0634	-0,870	613	0,385
Cu	-1,0603	-14,3	608	< 0,001
Zn	-0,21	-2,797	584	0,005
PT	0,2486	3,418	634	< 0,001
TAC	-0,8696	-12,297	640	< 0,001
TOS	-0,0234	-0,318	720	0,751
OSI	0,9134	11,962	364	< 0,001
α-amilasa	0,7654	10,298	374	< 0,001
cortisol	0,2138	2,913	528	0,004

Posteriormente, se analizó el poder diagnóstico de cada uno de los biomarcadores cuantificados de forma individual mediante análisis Característica Operativa del Receptor (ROC, del inglés *Receiver Operating Characteristic*), obteniéndose valores de precisión para la detección del estado de salud, o poder diagnóstico, entre el 52% y el 92% (**Figura 2**) dependiendo del biomarcador, en base a los valores del área bajo la curva (AUC). Para los biomarcadores TOS y PT, no se observó un poder diagnóstico significativo.

La **Tabla 3** muestra los resultados del análisis ROC de los valores de CRP, Hp, Pig-MAP, ADA, S100A12, Cu, Zn, PT, TAC, TOS, OSI, α-amilasa y cortisol cuantificados en muestras de saliva obtenidas de cerdos sanos (n = 415) y cerdos enfermos (n = 371).

Tabla 3

Biomarcador	Área bajo la curva (AUC)	Sensibilidad	Especificidad	Punto de corte
CRP	0,92	87,68	86,14	13,73 ng/mL
Hp	0,81	75,31	74,25	1,20 µg/mL
Pig-MAP	0,85	79,71	78,19	24,2 ng/mL
ADA	0,62	59,18	58,58	4,89 U/mL
S100A12	0,61	62,71	62,62	24,82 µg/mL
Cu	0,82	76,69	76,29	0,955 µg/mL
Zn	0,67	65,86	62,07	1,83 µg/mL
PT	0,54	53,01	53,04	1,17 µg/mL
TAC	0,77	70,87	70,44	12,79 M/L
TOS	0,52	54,36	53,96	13,22 M/L
OSI	0,88	80,75	80,35	1,05 ratio
α-amilasa	0,83	76,87	75,90	600,6 U/L
cortisol	0,57	57,07	51,93	0,105 µg/mL

Ejemplo 4. Modelo predictivo de 7 biomarcadores para diferenciar animales enfermos de animales sanos

Se realizó un análisis para conocer cuáles eran los biomarcadores que más peso tenían en la diferenciación entre las dos condiciones analizadas: salud y enfermedad. Para ello, se realizó un análisis de componentes principales (PCA), técnica de ordenación de datos que simplifica el número de variables o biomarcadores objeto de estudio agrupándolas en dimensiones para conocer cuáles son los biomarcadores que más peso tienen en la diferencia entre las categorías estudiadas, en este caso, la categoría de animales sanos y de animales enfermos. De este modo se obtuvo un conjunto de dos dimensiones que explicaban el 49,2% de las diferencias entre grupos de animales (**Figura 3**). Al interpretar las dimensiones 1 y 2 (**Figura 4**), se deduce que los biomarcadores incluidos en la dimensión 1 tienen valores menores, en su mayoría, tanto para los animales sanos como para los enfermos, pero los biomarcadores de la dimensión 2 tienen mayores valores para los animales enfermos y menores valores para los animales sanos, lo que permite la distinción entre ellos (**Figura 5**).

Se ajustó una regresión logística binomial a partir de un modelo lineal generalizado mediante el paquete informático estadístico R, para conocer la relación entre la variable dependiente cualitativa (sano o enfermo) y las variables explicativas independientes (covariables o biomarcadores). Así, en el modelo inicial, se incluyeron todos los biomarcadores y se ajustó la regresión logística. Los valores de los biomarcadores se estimaron utilizando el método de máxima verosimilitud que selecciona los coeficientes que hacen más probable que los valores observados ocurran. Se observaron los p-valores de los coeficientes de la regresión logística

de los biomarcadores y se fueron eliminando, uno a uno, los que no eran significativos y tenían mayor valor, para ajustar nuevamente los resultados de la regresión logística cada vez que se eliminaba uno de los biomarcadores.

De esta forma se generó un primer modelo predictivo de 7 biomarcadores con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Dichos 7 biomarcadores son los siguientes: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo y actividad de α-amilasa. La ecuación del modelo de regresión logística final para la probabilidad de que un caso sea enfermo con estos 7 biomarcadores fue la siguiente:

$$P(enfermo) = \frac{1}{1 + e^{-(-5.667 + 2.039Hp + 0.623ADA - 0.105S100A12 + 3.328PT - 0.381TAC + 1.565OSI + 0.003amilasa)}}$$

Dicho modelo predictivo presentó un valor de χ^2 de 768,44 y un valor de significación p de 0, que indicaba que es un modelo mejor para diferenciar entre animales sanos y animales enfermos que el modelo constituido únicamente por el intercepto. La **Tabla 4** muestra las razones de probabilidades (*odds ratio* en inglés) obtenidas a partir de los coeficientes ajustados por el modelo (probabilidad de que una condición de sano o enfermo se presente en los individuos expuestos a un biomarcador en concreto, sobre la probabilidad de que se presente en otro grupo sin exposición al biomarcador) y sus intervalos de confianza al 95%.

Tabla 4

	Odds ratio	**Percentil 2,5%**	**Percentil 97,5%**
Intercepto	0,00	0,00	0,02
Hp	7,68	4,26	15,69
ADA	1,87	1,54	2,33
S100A12	0,90	0,87	0,93
PT	27,89	7,02	130,27
TAC	0,68	0,60	0,76
OSI	4,78	2,29	11,75
α-amilasa	1,00	1,00	1,00

Sobre este modelo se comprobaron los supuestos de linealidad (incluido en su construcción), la independencia de los errores y la multicolinealidad de las variables predictoras. Para ello, se calculó el valor del factor de inflación de la varianza (VIF, del inglés *Variance Inflation*

Factor), que cuantifica la intensidad de la multicolinealidad en un análisis de regresión. Todas las variables incluidas en el modelo no presentaron multicolinealidad puesto que su valor VIF era menor de 10 (**Tabla 5**).

Tabla 5

Biomarcador	VIF
Hp	1,883
ADA	3,385
S100A12	7,242
PT	5,543
TAC	7,971
OSI	1,103
α-amilasa	1,586

Posteriormente, se generó un modelo clasificador de máquina de vectores de soporte (SVM, del inglés *Support Vector Machine*) con los 7 biomarcadores significativos detectados empleando cuatro funciones elaboradas por los inventores con el paquete informático estadístico R. Con la primera función, se controló que la variable respuesta era binaria y se obtuvieron los p-valores de los coeficientes de la regresión logística. Con la segunda función, se definió y refinó la máquina de vectores de soporte. Con la tercera función, se calculó el error y con la cuarta función se calculó la precisión de la regresión logística. Mediante estas funciones, se evaluó la tasa de error inicial y la precisión del modelo construido, obteniendo un valor de 0,0365 y de 99,40% respectivamente. El punto de corte del modelo con mejores valores de sensibilidad y especificidad, en concreto superiores a 95% en ambos casos, fue de 0,40 (**Figura 6**). En la **Tabla 6** se muestra la clasificación de animales realizada por el modelo generado con SVM para el punto de corte definido.

Tabla 6

	Predicción		
Observado	**Sano**	**Enfermo**	**% Correcto**
Sano	374	17	97,5
Enfermo	13	314	96,0

Se realizó la validación del modelo generado con SVM, creando para ello cinco particiones con 526 animales para el entrenamiento del modelo y 131 para su verificación, seleccionados de forma aleatoria para cada una de las particiones y los resultados se muestran en la **Figura 7**. Se obtuvo una tasa final de error (media de las cinco particiones) de 0,0395 y una precisión (media de las cinco particiones) del 99,31% para diferenciar entre estado de salud sano y enfermo.

Ejemplo 5. Modelo predictivo de 4 biomarcadores para diferenciar animales enfermos de animales sanos

Se generó un segundo modelo predictivo de 4 biomarcadores, resultante de la regresión logística binomial descrita en el Ejemplo 4, con valores de sensibilidad y especificidad superiores al 90%. Dichos 4 biomarcadores son los siguientes: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva. La ecuación del modelo de regresión logística final para la probabilidad de que un caso sea enfermo con estos 4 biomarcadores fue la siguiente:

$$P(enfermo) = \frac{1}{1 + e^{-(-2.722 + 0.151CRP + 0.242ADA + 1.424PT - 0.235TAC)}}$$

Este modelo predictivo presentó un valor de χ^2 de 610,011 y un valor de significación p de 0 para diferenciar animales sanos de animales enfermos con un total de 4 biomarcadores o variables. La **Tabla 7** muestra las razones de probabilidades obtenidas (probabilidad de que una condición de sano o enfermo se presente en los individuos expuestos a un biomarcador en concreto, sobre la probabilidad de que se presente en otro grupo sin exposición al biomarcador) y sus intervalos de confianza al 95%.

Tabla 7

	Odds ratio	**Percentil 2,5%**	**Percentil 97,5%**
Intercepto	0,06	0,03	0,13
CRP	1,16	1,13	1,20
ADA	1,37	1,21	1,58
PT	5,21	2,59	11,16
TAC	0,77	0,72	0,81

Se calculó el valor del factor de inflación de la varianza VIF para comprobar que las variables incluidas en el modelo no presentaban multicolinealidad. La **Tabla 8** presenta los valores obtenidos del estadístico VIF para los biomarcadores del modelo predictivo de 4 biomarcadores. Todas las variables incluidas en el modelo no presentaron multicolinealidad puesto que su valor VIF era menor de 10.

Tabla 8

Biomarcador	VIF
CRP	1,051
ADA	1,397
PT	1,736
TAC	2,168

Posteriormente, se generó un modelo clasificador de máquina de vectores de soporte SVM siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 4 con los 4 biomarcadores significativos detectados y se calculó la tasa de error inicial y su precisión. Se obtuvo una tasa de error de 0,0867 y una precisión del 96,81%. El punto de corte del modelo con mejores valores de sensibilidad y especificidad, en concreto superiores a 91% en ambos casos, fue de 0,38 (**Figura 8**). En la **Tabla 9** se especifica la clasificación de animales realizada por el modelo segundo modelo generado con SVM para el punto de corte definido.

Tabla 9

	Predicción		
Observado	**Sano**	**Enfermo**	**% Correcto**
Sano	369	36	91,1
Enfermo	31	331	91,4

Se realizó la validación del modelo generado con SVM, creando para ello cinco particiones siguiendo el mismo procedimiento descrito en el Ejemplo 4 y los resultados se muestran en la **Figura 9**. Se obtuvo una tasa final de error (media de las cinco particiones) de 0,0944 y una precisión (media de las cinco particiones) del 96,37% para diferenciar entre estado de salud sano y enfermo.

Ejemplo 6. Modelo predictivo de 6 biomarcadores para diferenciar animales con afecciones inflamatorias localizadas de animales con afecciones sistémicas

En primer lugar, se clasificaron los animales entre sanos y enfermos con el modelo predictivo de 4 biomarcadores descrito en el Ejemplo 5. Después, se analizaron los animales clasificados como animales enfermos según dicho modelo para diferenciarlos por el tipo de enfermedad que cursaban.

Para ello, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para conocer cómo de parecidos eran los comportamientos de los biomarcadores en los distintos grupos de enfermedad. El análisis PCA mostró que las afecciones de mordeduras de cola y las

inflamaciones locales se comportaban de forma muy similar y que las afecciones gastrointestinales y respiratorias también tenían un comportamiento similar (**Figura 10**).

Atendiendo a estos últimos resultados, se realizó una diferenciación entre animales que presentaban una afección inflamatoria localizada y animales que presentaban afecciones sistémicas, componiéndose de 146 y 122 animales cada una de estas agrupaciones, respectivamente.

Los animales con afecciones inflamatorias localizadas fueron los animales que presentaban signos clínicos como cojera, artritis o artrosis, abscesos superficiales, heridas en orejas o mordeduras de cola sangrantes o inflamadas. Los animales con afecciones sistémicas fueron los animales que presentaban afecciones gastrointestinales o respiratorias con signos clínicos como diarrea, vómitos, prolapsos rectales, disnea, dificultad respiratoria, tos y/o moqueo con o sin caquexia o retraso en el crecimiento.

Se generó un modelo predictivo resultante de la regresión logística binomial con 6 biomarcadores significativos, que presentó un valor de χ^2 de 155,691 y un valor de significación p de 0. Dichos 6 biomarcadores son los siguientes: concentración de proteína C reactiva, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, actividad de α-amilasa, concentración de Zn, valor de estado oxidante y concentración de cortisol. La ecuación del modelo de regresión logística final para la probabilidad de que un caso sea animal con afección inflamatoria localizada con estos 6 biomarcadores fue la siguiente:

$$P(afección\ inflamatoria) = \frac{1}{1 + e^{-(1.288 + 0.029CRP - 0.037S100A12 - 0.268Zn + 0.037TOS - 0.001\propto amilasa - 2.088cortisol)}}$$

La **Tabla 10** muestra las razones de probabilidades obtenidas y sus intervalos de confianza al 95%.

Tabla 10

	Odds ratio	Percentil 2,5%	Percentil 97,5%
Intercepto	3,63	1,86	7,46
CRP	1,03	1,02	1,04
S100A12	0,96	0,94	0,98
Zn	0,77	0,63	0,91
TOS	1,04	1,01	1,07
α-amilasa	1,00	1,00	1,00
cortisol	0,12	0,02	0,44

Se calculó el valor del factor de inflación de la varianza VIF para comprobar que las variables incluidas en el modelo no presentaban multicolinealidad. La **Tabla 11** presenta los valores obtenidos del valor VIF para los biomarcadores de este modelo predictivo de 6 biomarcadores. Todas las variables incluidas en el modelo no presentaron multicolinealidad puesto que su valor VIF era menor de 10.

Tabla 11

Biomarcador	VIF
CRP	1,906
S100A12	1,780
Zn	1,278
TOS	1,468
α-amilasa	1,140
cortisol	1,212

Posteriormente, se generó un modelo clasificador de máquina de vectores de soporte SVM con los 6 biomarcadores significativos detectados siguiendo el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 4 y se calculó la tasa de error inicial y su precisión. Se obtuvo una tasa de error inicial de 0,216 y una precisión del 88,4%. El punto de corte del modelo con mejores valores de sensibilidad y especificidad, en concreto superiores a 76% en ambos casos, fue de 0,59 (**Figura 11**). En la **Tabla 12** se muestra la clasificación de animales realizada por el modelo de clasificación de enfermedades generado con SVM para el punto de corte definido.

Tabla 12

	Predicción		
Observado	**Afecciones sistémicas**	**Afecciones inflamatorias localizadas**	**% Correcto**
Afecciones sistémicas	97	30	76,4
Afecciones inflamatorias localizadas	35	119	77,3

Se realizó la validación del modelo generado con SVM, creando para ello cinco particiones y los resultados se muestran en la **Figura 12**. Las particiones estaban formadas por 215 animales para el entrenamiento del modelo y 53 para su verificación, seleccionados de forma aleatoria para cada una. La validación arrojó una tasa final de error de 0,232 y una precisión del 85,7% para diferenciar entre afecciones inflamatorias localizadas y afecciones sistémicas.

Puesto que las afecciones sistémicas suelen estar causadas por patógenos que pueden contagiarse de unos animales a otros y de unas explotaciones a otras, el modelo predictivo descrito en este ejemplo permite determinar riesgos de contagio entre animales y así establecer medidas de bioseguridad más o menos intensas en función de los resultados obtenidos para mejorar las medidas de prevención y transmisión de enfermedades.

Ejemplo 7. Categorización en animales sanos y enfermos. Categorización en animales enfermos con afecciones inflamatorias localizadas y con afecciones sistémicas

La Figura 13 muestra un diagrama de procesos que ilustra el procedimiento no invasivo para detectar ganado porcino enfermo según una realización de la invención.

En la etapa 1 de la Figura 13, se determinan los valores de los biomarcadores indicados en el cuadro de la etapa 1 de la Figura 13, en una muestra de saliva de un cerdo sujeto. En la etapa 2 de la Figura 13, se introducen los valores de los biomarcadores en el modelo predictivo: el modelo de 4 biomarcadores descrito en el Ejemplo 4 o el modelo predictivo de 7 biomarcadores descrito en el Ejemplo 5. En la etapa 3 de la Figura 13, se categoriza el animal en animal sano o enfermo.

Cuando en la etapa 3 de la Figura 13 el animal es identificado como un animal enfermo, se continúa con la etapa 4 de la Figura 13, en la que se determinan los valores de los biomarcadores indicados en el cuadro de la etapa 4 de la de la Figura 13. Si dichos valores ya habían sido determinados previamente en la muestra de saliva, se recuperan dichos valores. En la etapa 5 de la Figura 13, se introducen los valores de los biomarcadores en el modelo predictivo de 6 biomarcadores descrito en el Ejemplo 6. En la etapa 6 de la Figura 13, se categoriza el animal enfermo como animal con afección inflamatoria localizadas o animal con afección sistémica.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para diferenciar cerdos enfermos de cerdos sanos, que comprende:
   (a) determinar un primer conjunto de valores de ensayo en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra de saliva de cerdo y en el que dicho primer conjunto de valores de ensayo comprende:
      (i) valores de los biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva, o
      (ii) valores de los biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo y actividad de α-amilasa,
   (b) introducir dicho primer conjunto de valores de ensayo determinado en la etapa anterior en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos,
   (c) en el que dicho primer modelo clasifica dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:
      (i) categoría de cerdo enfermo, y
      (ii) categoría de cerdo sano, e
   (d) identificar el cerdo:
      (i) como un cerdo enfermo cuando el conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo enfermo, o
      (ii) como un cerdo sano cuando el conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo sano.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, que además comprende las siguientes etapas adicionales después de la etapa (d):
   (e) cuando el primer conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la categoría (c)(i) de cerdo enfermo de la reivindicación 1, determinar un segundo conjunto de valores de ensayo en dicha muestra de ensayo, en el que dicho segundo conjunto de valores de ensayo comprende los valores de los biomarcadores: concentración de

proteína C reactiva, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, actividad de α-amilasa, concentración de Zn, valor de estado oxidante y concentración de cortisol,

(f) introducir dicho segundo conjunto de valores de ensayo determinado en la etapa anterior en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados en unas segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas,

(g) en el que dicho segundo modelo, clasifica dicho segundo conjunto de valores de ensayo, en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(ii) categoría de cerdo con afección sistémica, e

(h) identificar el cerdo:

(i) como un cerdo con afección inflamatoria localizada cuando dicho segundo conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, o

(ii) como un cerdo con afección sistémica cuando dicho segundo conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la etapa anterior en la categoría de cerdo con afección sistémica.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el primer o segundo modelo clasificador es un modelo seleccionado del grupo que consiste en red neuronal artificial, clasificador Naive Bayes, regresión lineal, regresión logística, máquina de vectores de soporte, K vecinos más cercanos y árboles de decisión aleatorios.

4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los valores de los biomarcadores se determinan por una técnica seleccionada del grupo que consiste en: inmunoensayo, ensayo enzimático cinético, espectrofotometría de absorción atómica de llama, método de Bradford, ensayo de poder antioxidante férrico reducido y ensayo cuantitativo de peróxido.

5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores

definidos en la etapa (a) de la reivindicación 1 o en la etapa (e) de la reivindicación 2, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de 4ºC o inferior, durante un máximo de 48 horas.

6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) de la reivindicación 1 o en la etapa (e) de la reivindicación 2, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de -20ºC o inferior, durante un máximo de 72 horas.

7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que entre la toma de dicha muestra de ensayo y la determinación de los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) de la reivindicación 1 o en la etapa (e) de la reivindicación 2, dicha muestra de ensayo ha sido conservada a una temperatura de -80ºC o inferior.

8. Un sistema que comprende:
   (a) medios para determinar un primer conjunto de valores de ensayo en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra de ensayo es una muestra de saliva de cerdo y en el que dicho primer conjunto de valores de ensayo comprende:
      (i) valores de los biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total y concentración de proteína C reactiva, o
      (ii) valores de los biomarcadores: actividad de adenosina desaminasa, concentración de proteínas totales, capacidad antioxidante total, concentración de haptoglobina, concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, y actividad de α-amilasa,

   en el que dichos medios se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpos específicos frente a la proteína C reactiva, anticuerpos específicos frente a haptoglobina, anticuerpos específicos frente a la proteína S100A12, 2-oxoglutarato, adenosina, glutamato deshidrogenasa, NADH, azida sódica, complejo férrico piridil triazina, sultato ferroso (II) de amonio, ácido sulfúrico, sorbitol, naranja de xilenol, 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa y lector de microplacas,
   (b) medios para introducir dicho primer conjunto de valores de ensayo en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende los

valores de los biomarcadores definidos en (a), determinados en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos, y

(c) medios para clasificar dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo enfermo, y

(ii) categoría de cerdo sano,

en el que dichos medios (b) o (c) se seleccionan del grupo que consiste en: unidad central de procesamiento o procesador, unidad de memoria de acceso aleatorio, unidad de almacenamiento de datos, unidad de memoria de solo lectura y unidad de memoria externa.

9. El sistema según la reivindicación 8, que comprende además los siguientes medios adicionales:

(d) medios para determinar, cuando dicho primer conjunto de valores de ensayo ha sido clasificado en la categoría (c)(i) de cerdo enfermo de la reivindicación 8, un segundo conjunto de valores de ensayo en dicha muestra de ensayo, en el que dicho segundo conjunto de valores de ensayo comprende los valores de los biomarcadores: concentración de proteína S100A12, índice de estrés oxidativo, y actividad de α-amilasa, concentración de proteína C reactiva, concentración de Zn, valor de estado oxidante y concentración de cortisol, en el que dichos medios se seleccionan del grupo que consiste en: anticuerpos específicos frente a la proteína S100A12, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, sultato ferroso (II) de amonio, ácido sulfúrico, sorbitol, naranja de xilenol, peroxidasa de rábano, tetrametilbencidina, 2-cloro-p-nitrofenol unido a maltotriosa, lector de microplacas y espectrofotómetro de absorción atómica de llama,

(e) medios para introducir dicho segundo conjunto de valores de ensayo en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa anterior, determinados en unas segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas, y

(f) medios para clasificar dicho segundo conjunto de valores de ensayo, en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(ii) categoría de cerdo con afección sistémica,

en el que dichos medios (e) o (f) se seleccionan del grupo que consiste en: unidad central de procesamiento o procesador, unidad de memoria de acceso aleatorio, unidad de almacenamiento de datos, unidad de memoria de solo lectura y unidad de memoria externa.

10. Un programa informático que comprende instrucciones que causan, cuando dicho programa informático es ejecutado por un sistema informático, que dicho sistema informático realice las siguientes etapas:

(a) introducir un primer conjunto de valores de ensayo que comprende los valores de los biomarcadores determinados en la etapa (a) de la reivindicación 1 en un primer modelo clasificador, en el que dicho primer modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un primer conjunto de valores de entrenamiento que comprende los valores de los biomarcadores definidos en la etapa (a) de la reivindicación 1, determinados en unas primeras muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos sanos y muestras de saliva de cerdos enfermos, y

(b) en el que dicho primer modelo clasifica dicho primer conjunto de valores de ensayo en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo enfermo, y

(ii) categoría de cerdo sano.

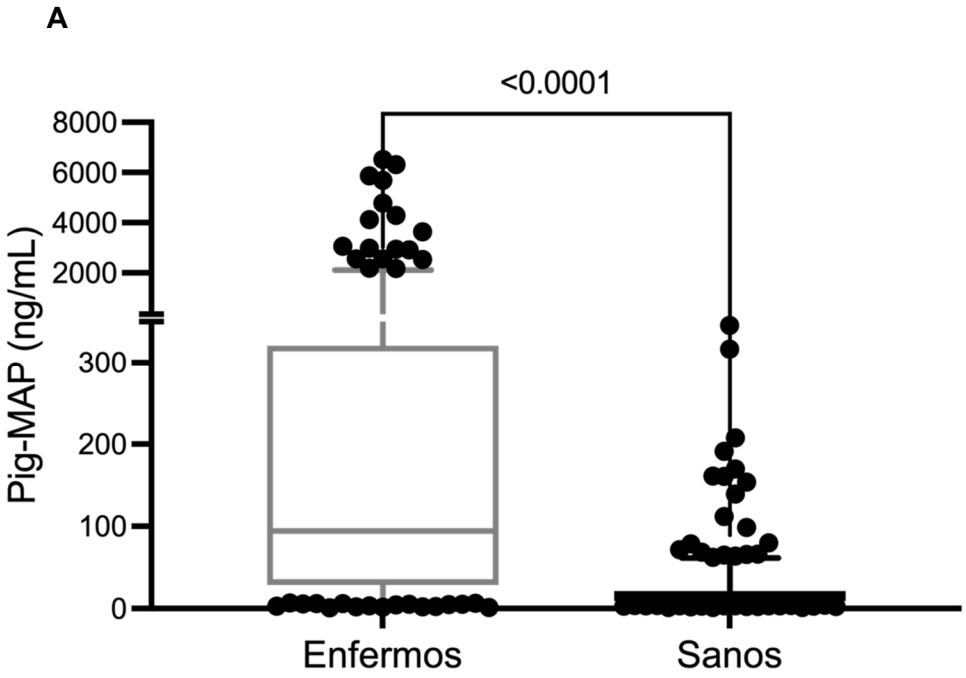
11. El programa informático según la reivindicación 10, que además comprende instrucciones que causan, cuando dicho programa informático es ejecutado en dicho sistema informático, que dicho sistema informático realice las siguientes etapas adicionales después de la etapa (b):

(c) introducir un segundo conjunto de valores de ensayo que comprende los valores de los biomarcadores determinados en la etapa (e) de la reivindicación 2 en un segundo modelo clasificador, en el que dicho segundo modelo clasificador ha sido previamente entrenado con un segundo conjunto de valores de entrenamiento que comprende valores de los biomarcadores definidos en la etapa (e) de la reivindicación 2, determinados en unas segundas muestras de entrenamiento que comprenden muestras de saliva de cerdos con afecciones inflamatorias localizadas y muestras de saliva de cerdos con afecciones sistémicas,

(d) en el que dicho segundo modelo clasifica dicho segundo conjunto de valores de ensayo, en una de las dos categorías siguientes:

(i) categoría de cerdo con afección inflamatoria localizada, y

(ii) categoría de cerdo con afección sistémica.


A
<0.0001
8000
6000
4000
2000
300
200
100
0
Pig-MAP (ng/mL)
Enfermos
Sanos

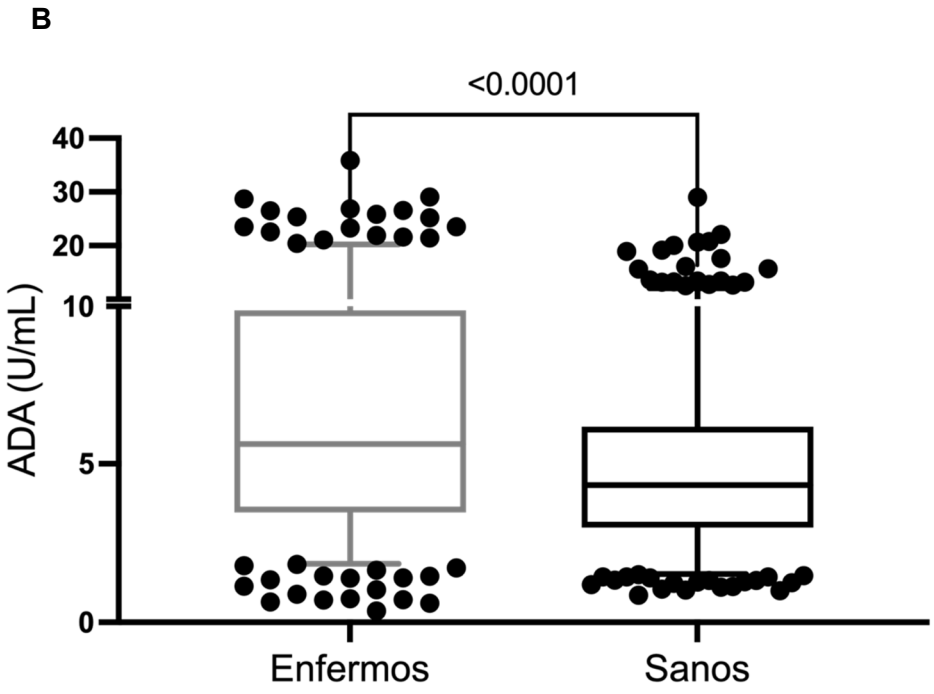

B
<0.0001
40
30
20
10
5
0
ADA (U/mL)
Enfermos
Sanos

FIGURA 1

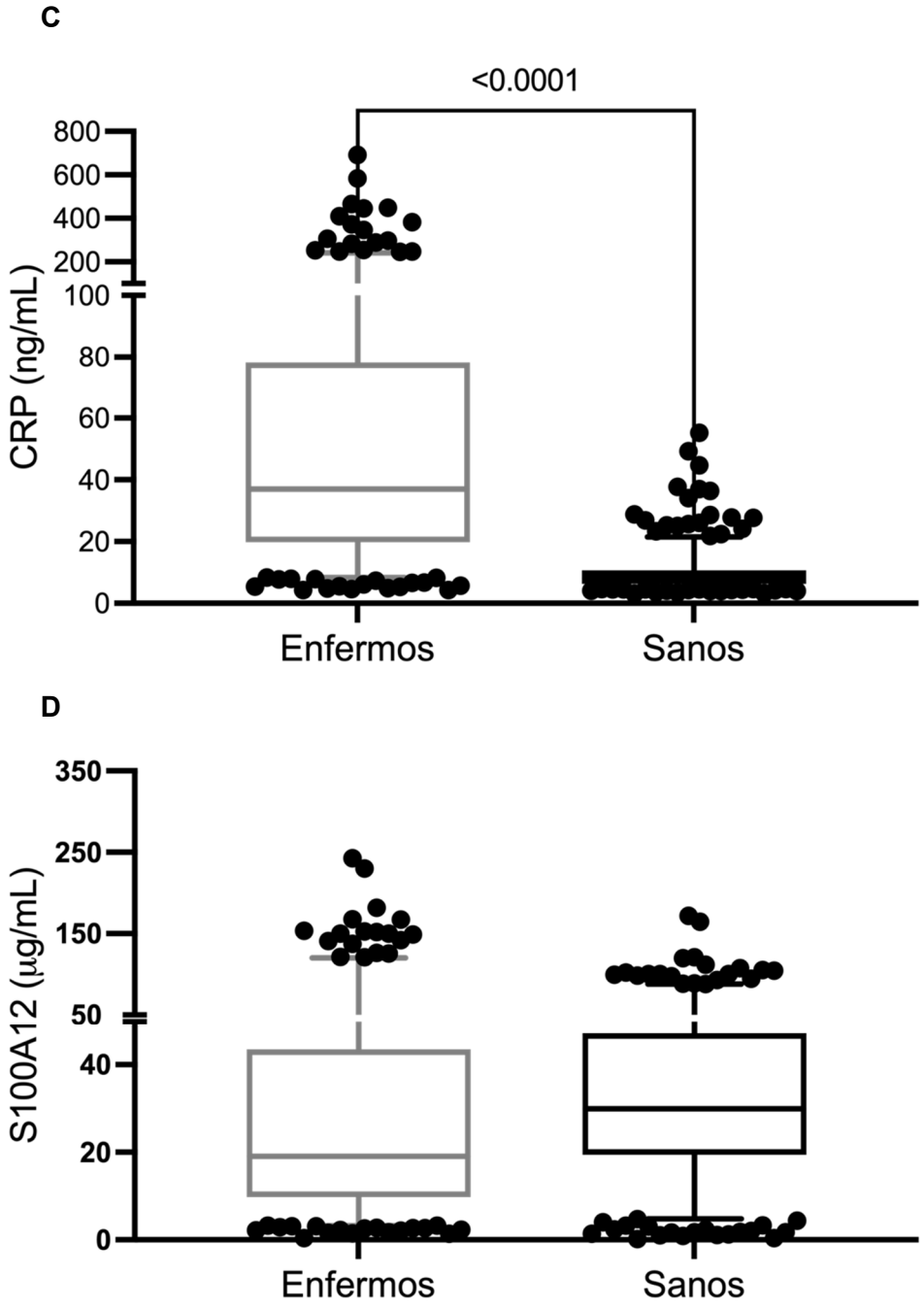


FIGURA 1 (CONT.)

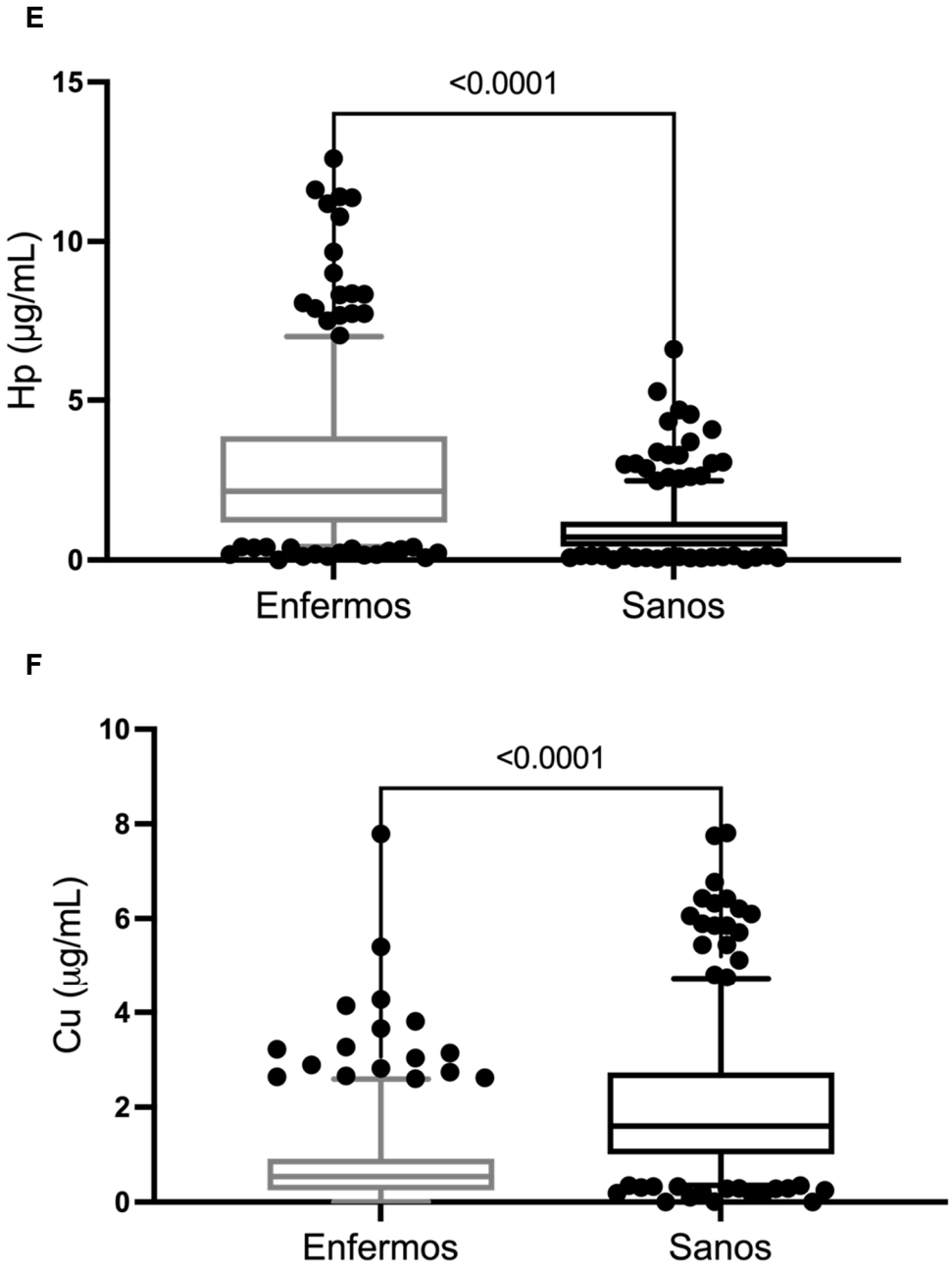
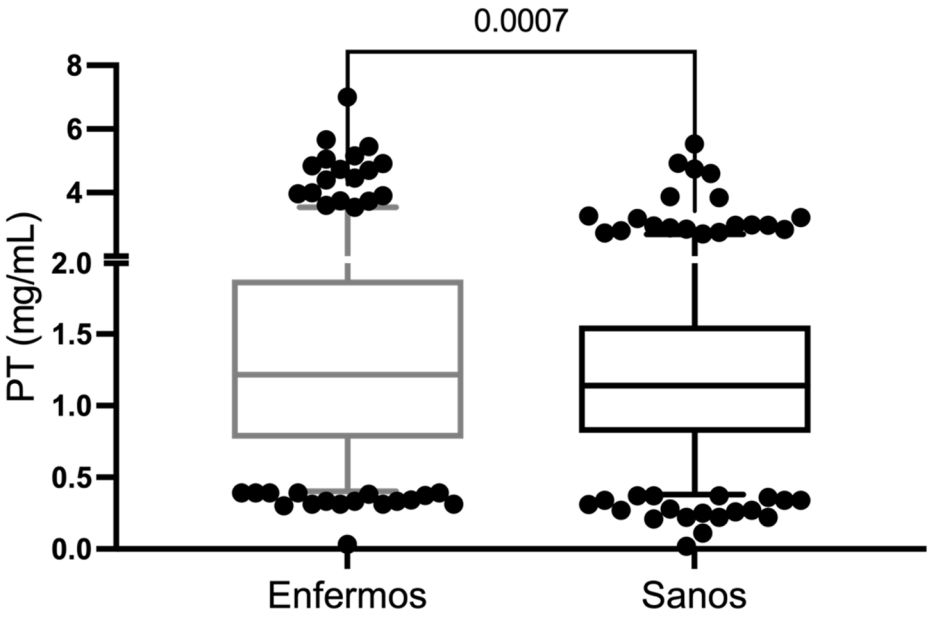


FIGURA 1 (CONT.)

G



H

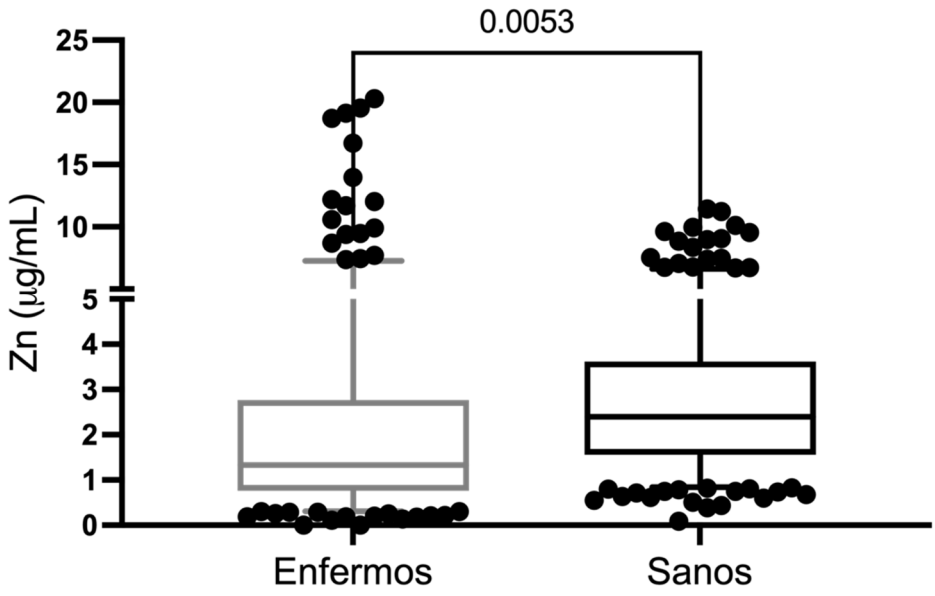
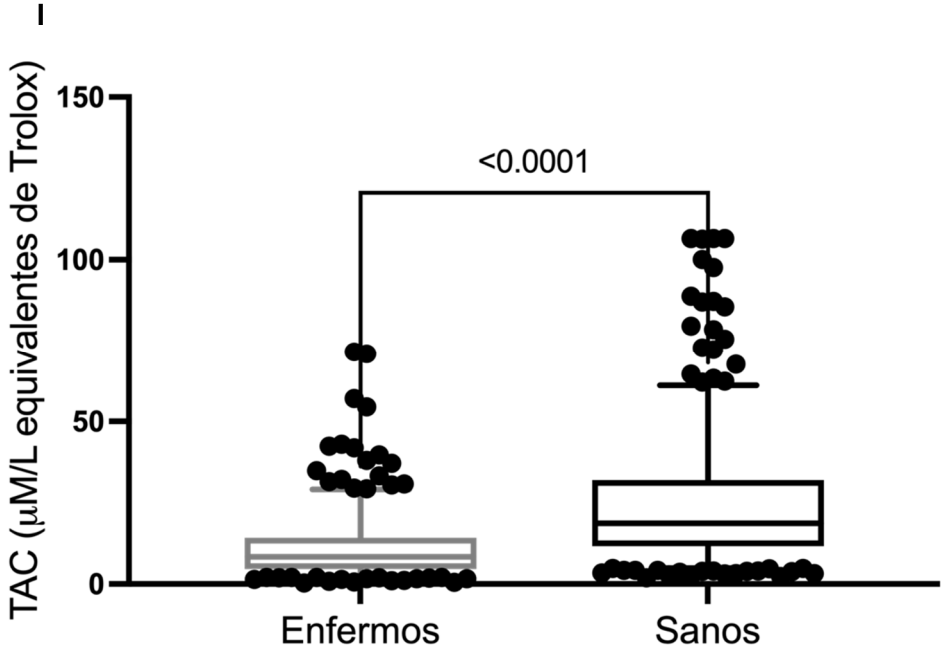


FIGURA 1 (CONT.)



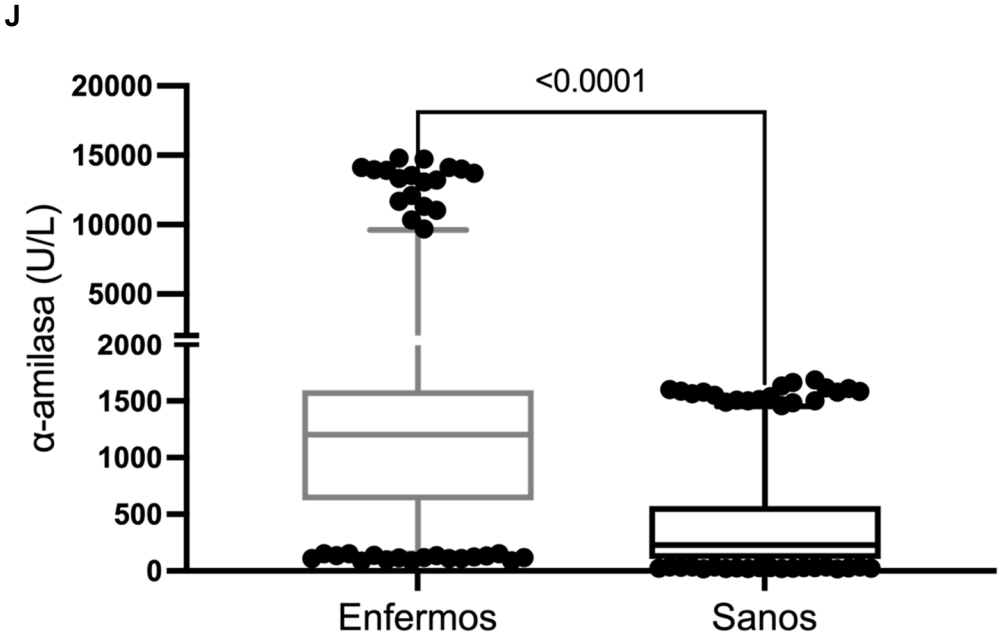
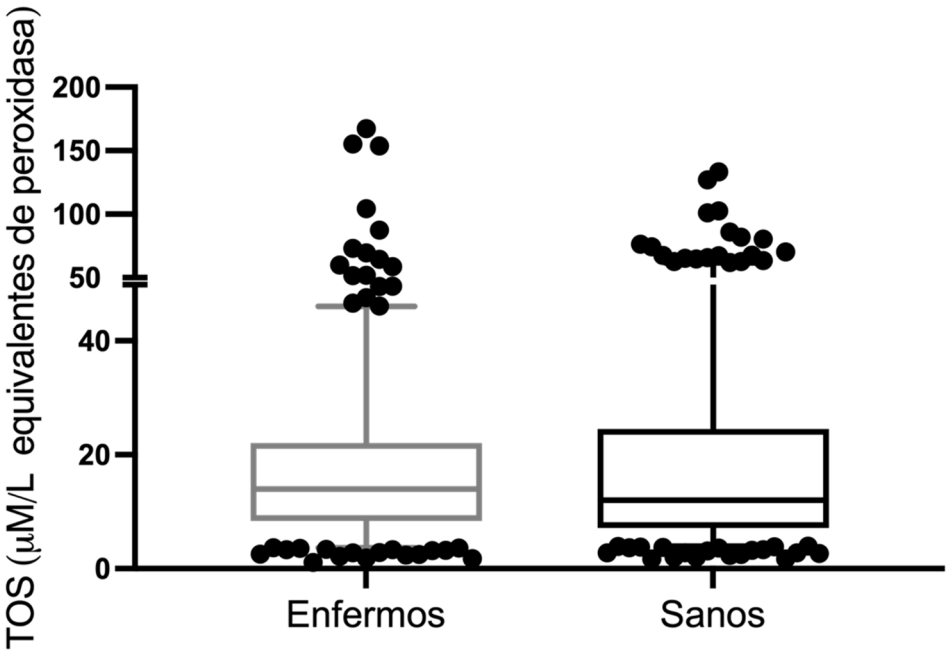


FIGURA 1 (CONT.)

K



L

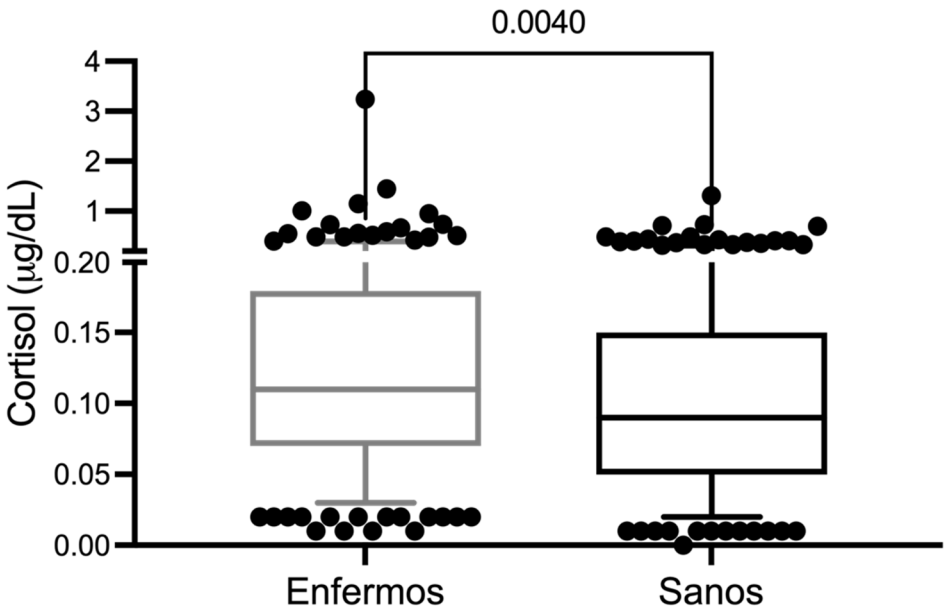


FIGURA 1 (CONT.)

M

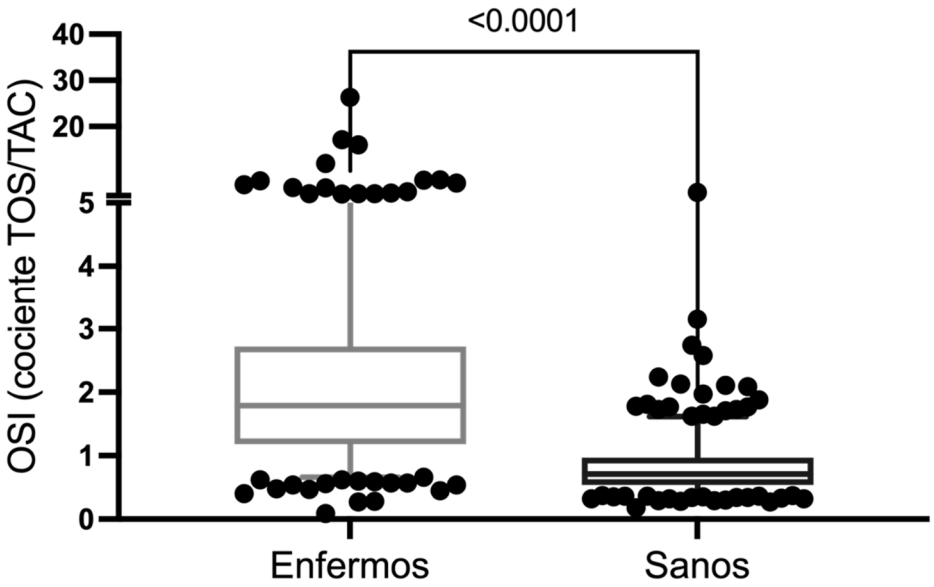
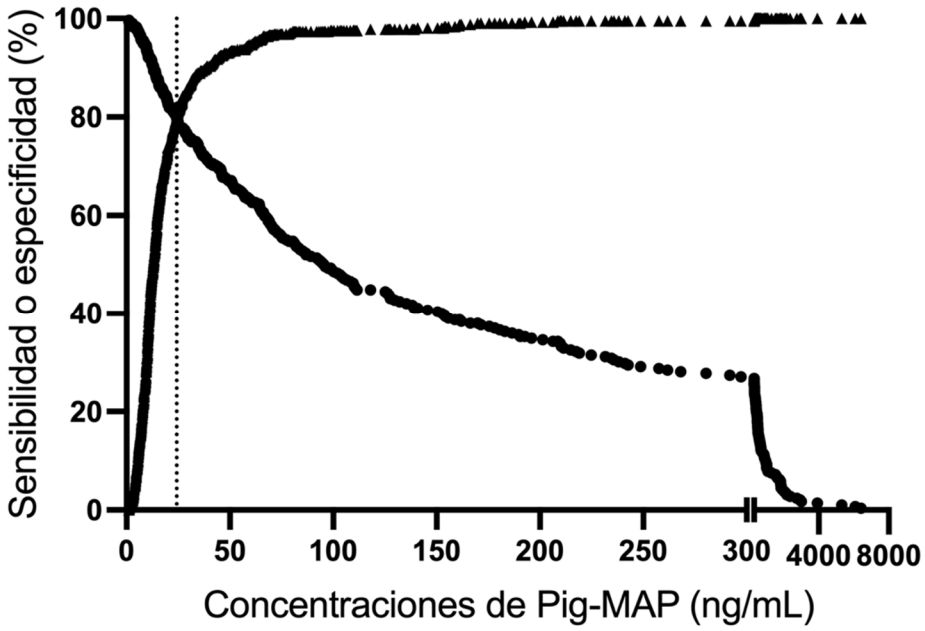


FIGURA 1 (CONT.)

A


Sensibilidad o especificidad (%)
100
80
60
40
20
0
0
50
100
150
200
250
300
4000
8000
Concentraciones de Pig-MAP (ng/mL)

B

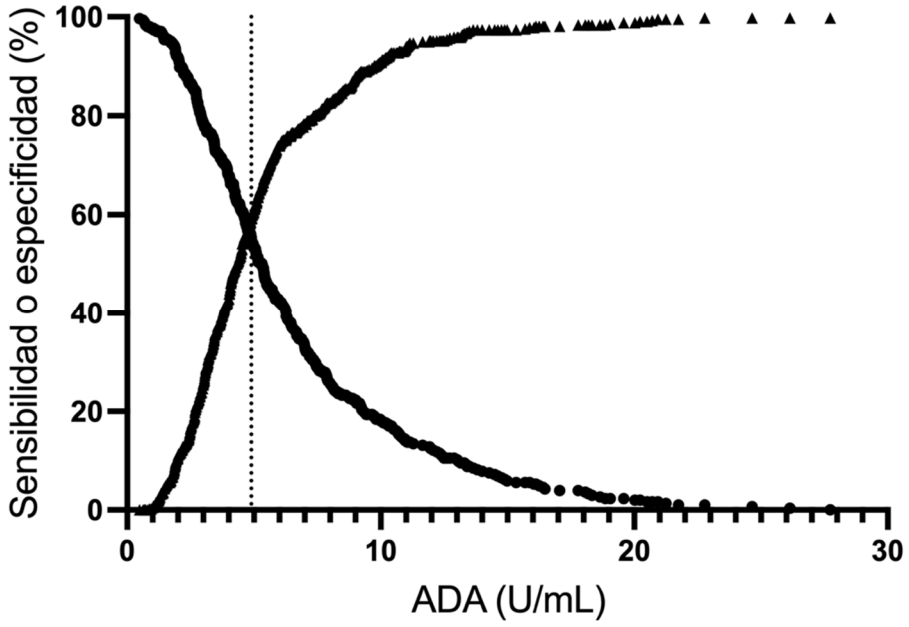
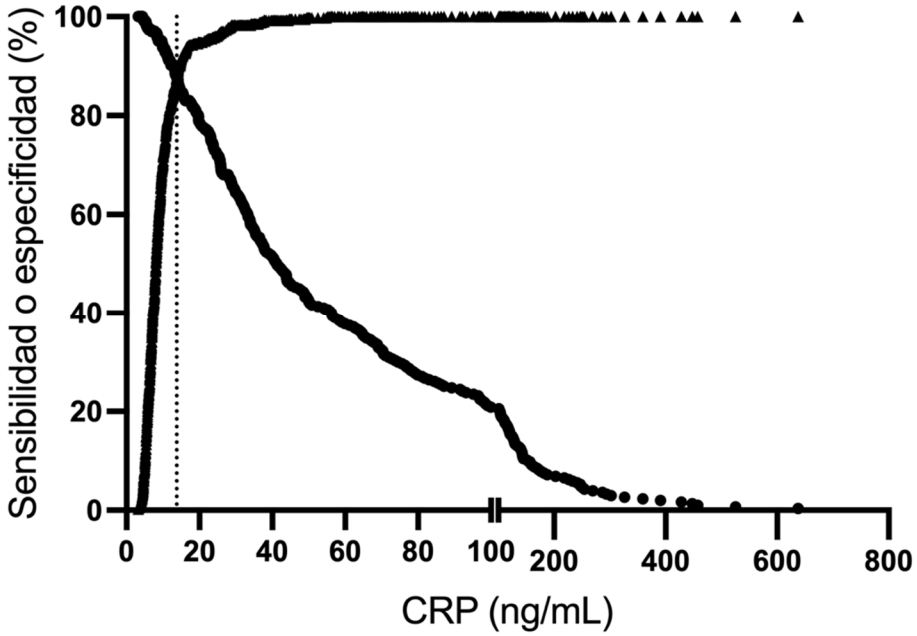

Sensibilidad o especificidad (%)
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
ADA (U/mL)

FIGURA 2

C



D

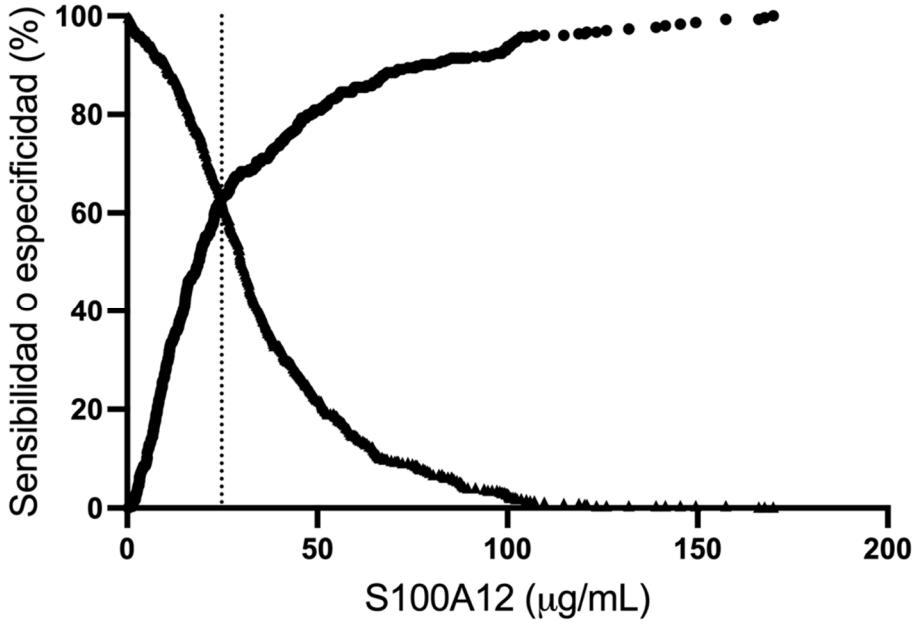
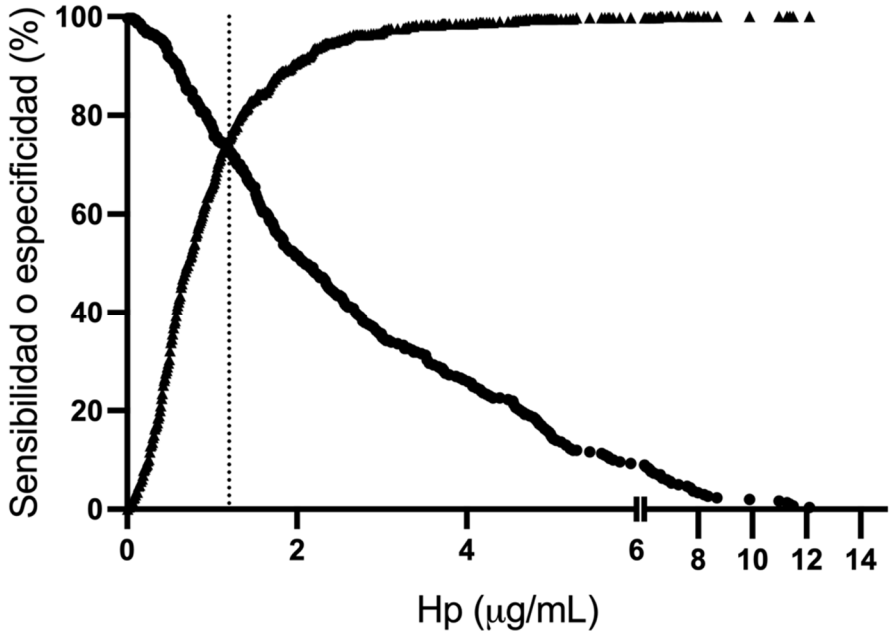


FIGURA 2 (CONT.)

E



F

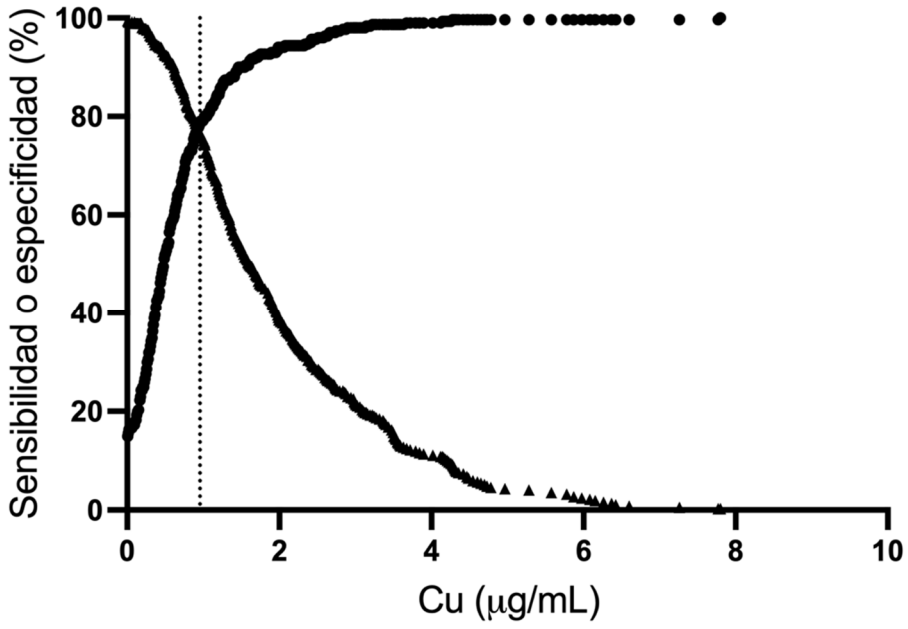
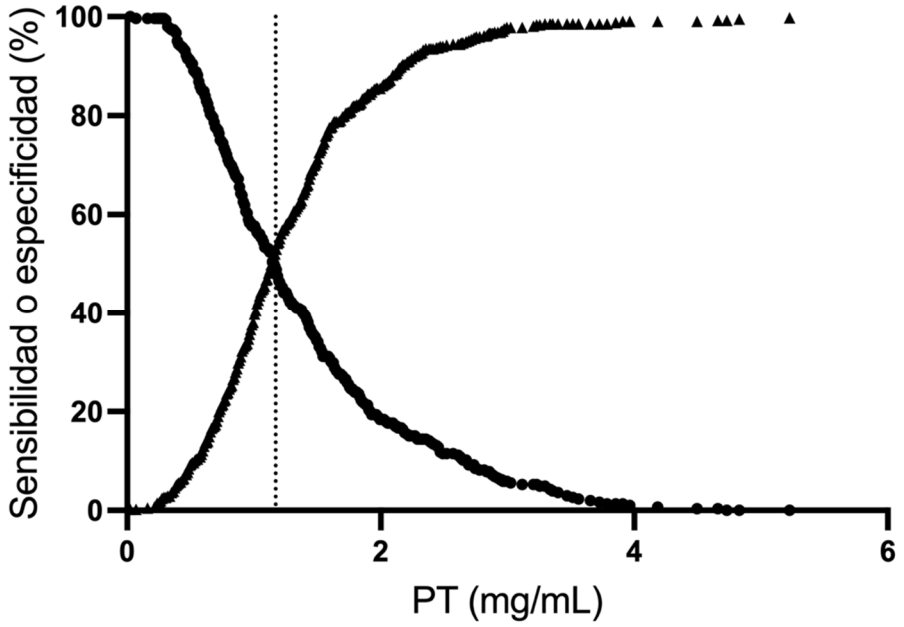


FIGURA 2 (CONT.)

G



H

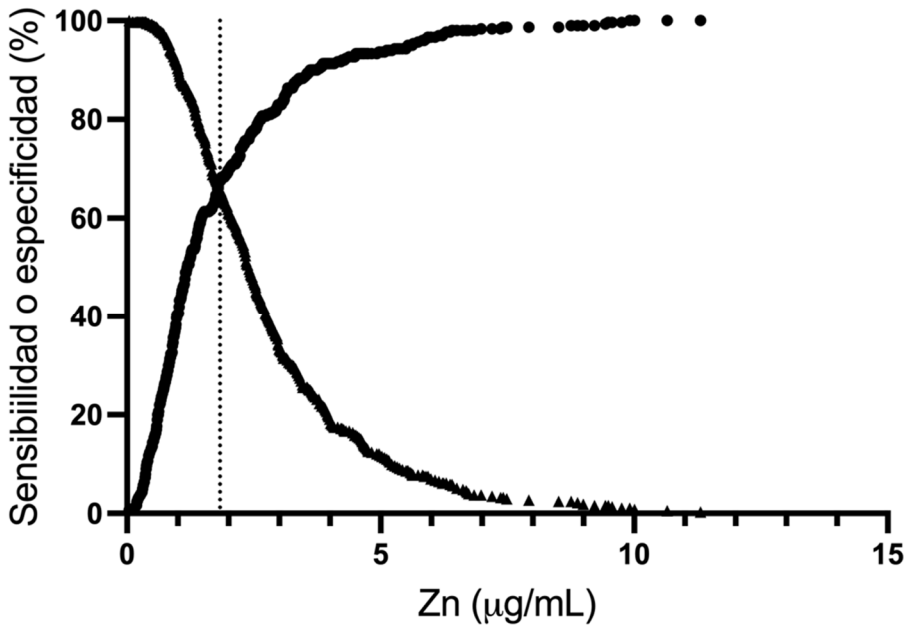
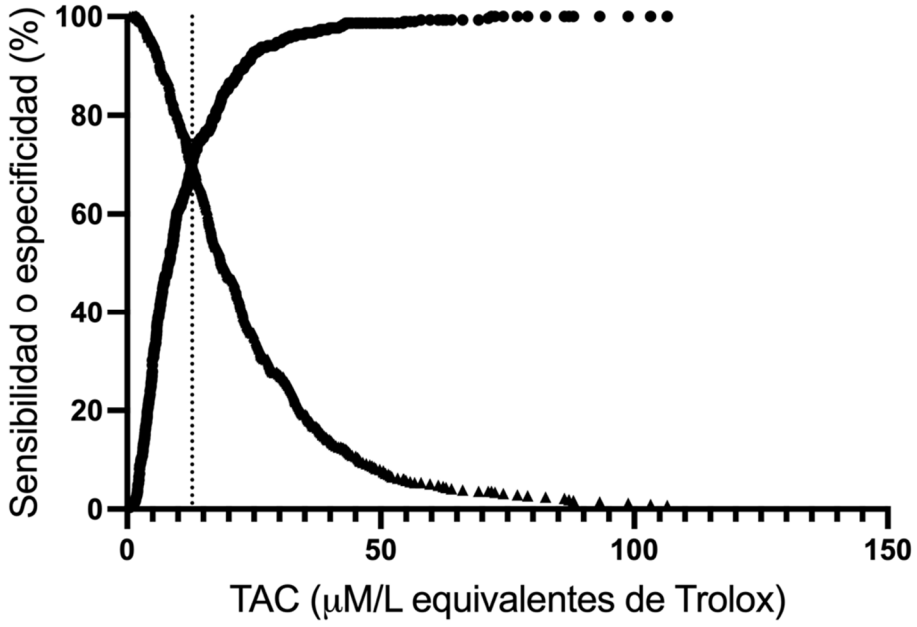


FIGURA 2 (CONT.)

I



J

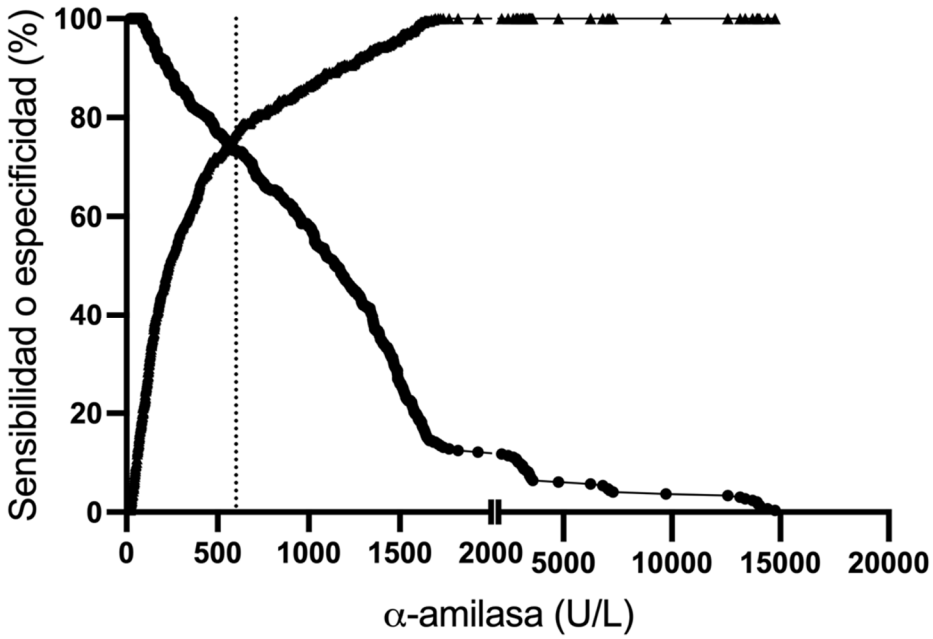
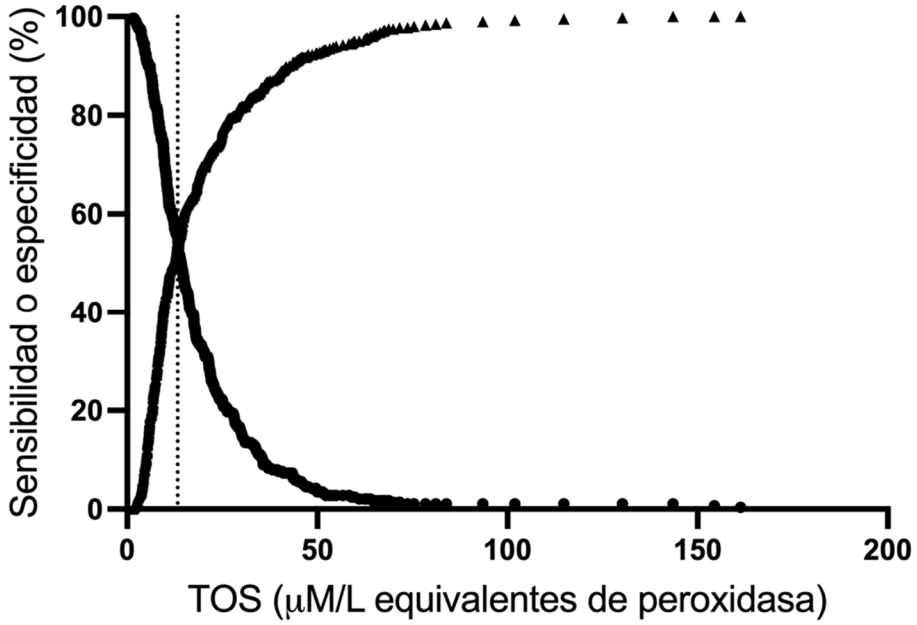


FIGURA 2 (CONT.)

K



L

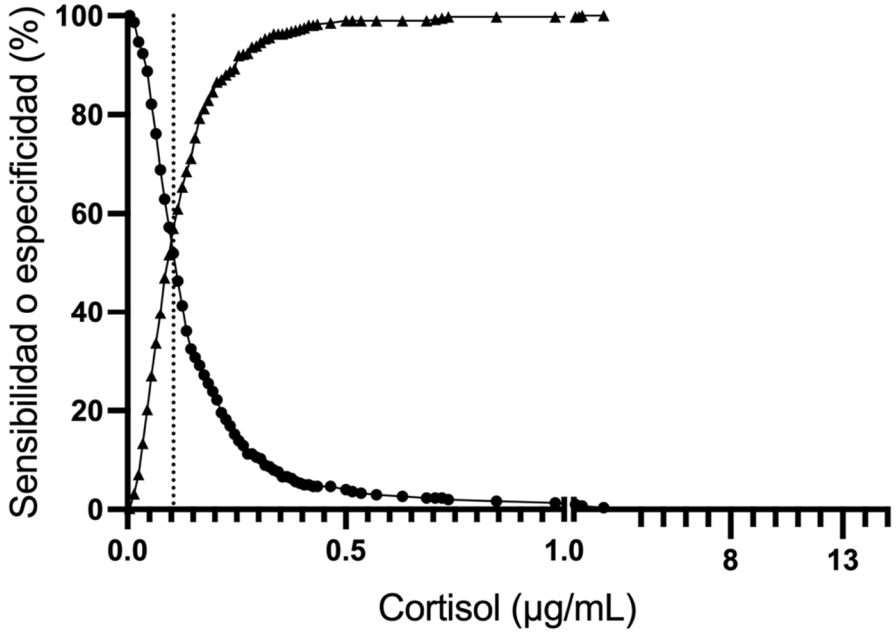


FIGURA 2 (CONT.)

M

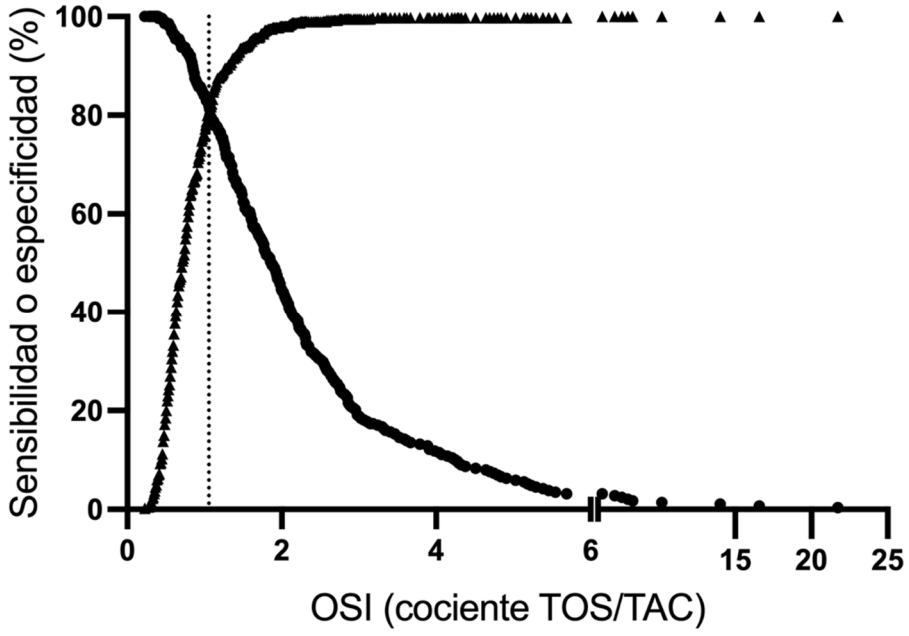


FIGURA 2 (CONT.)

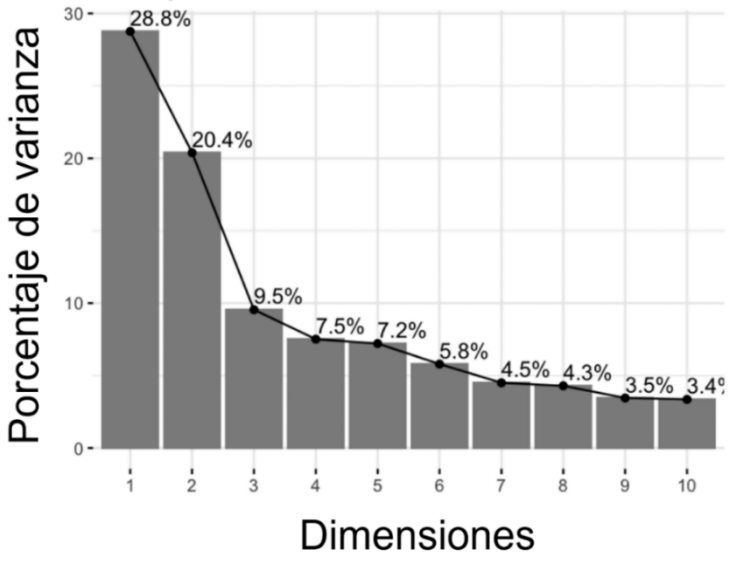


FIGURA 3

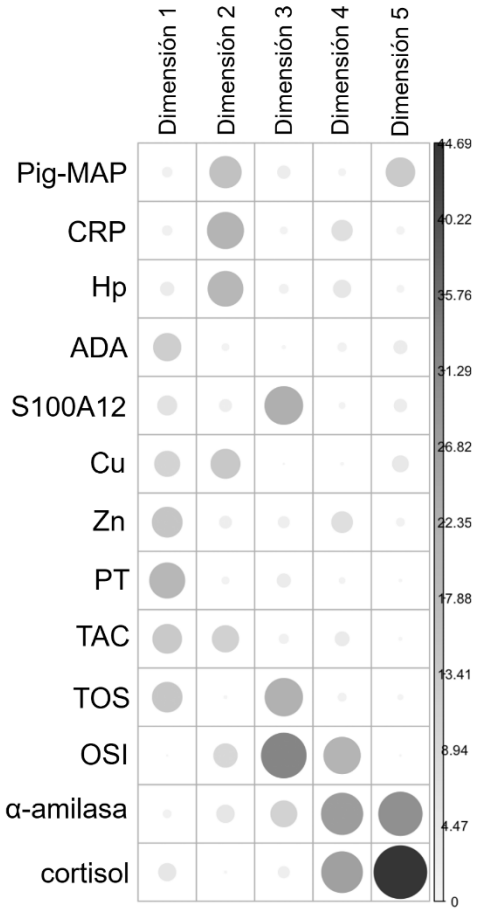


FIGURA 4

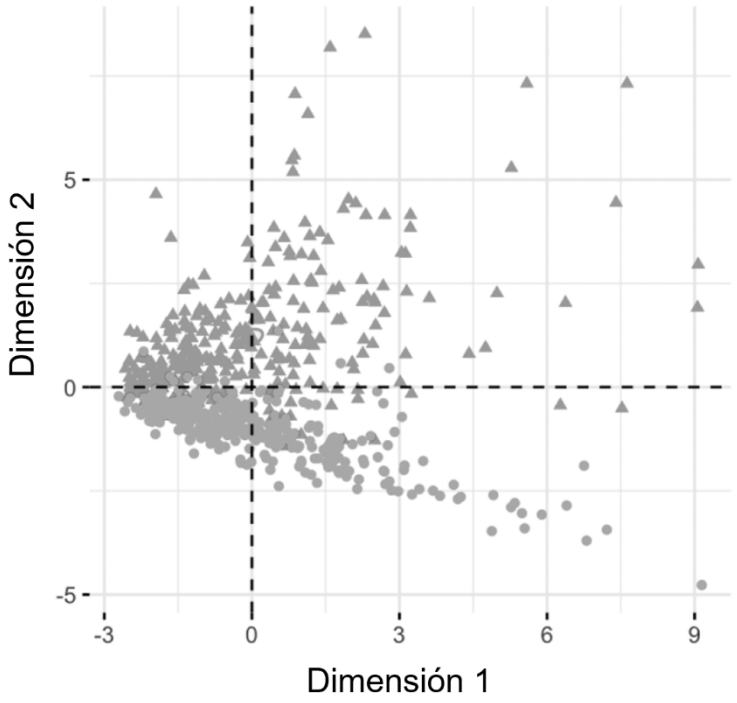


FIGURA 5

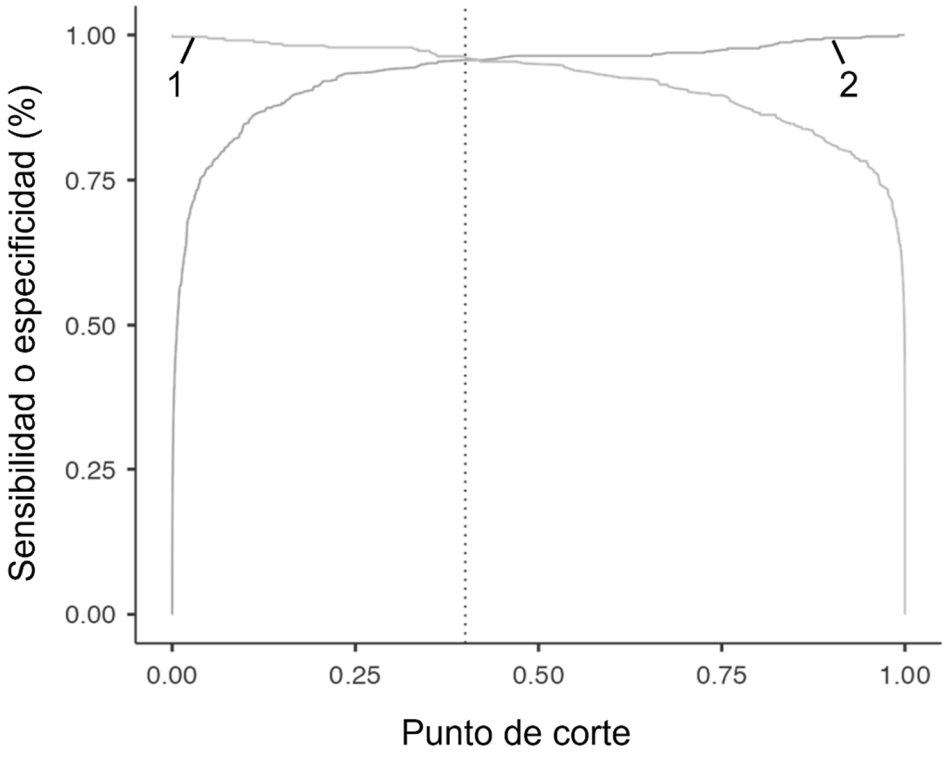


FIGURA 6

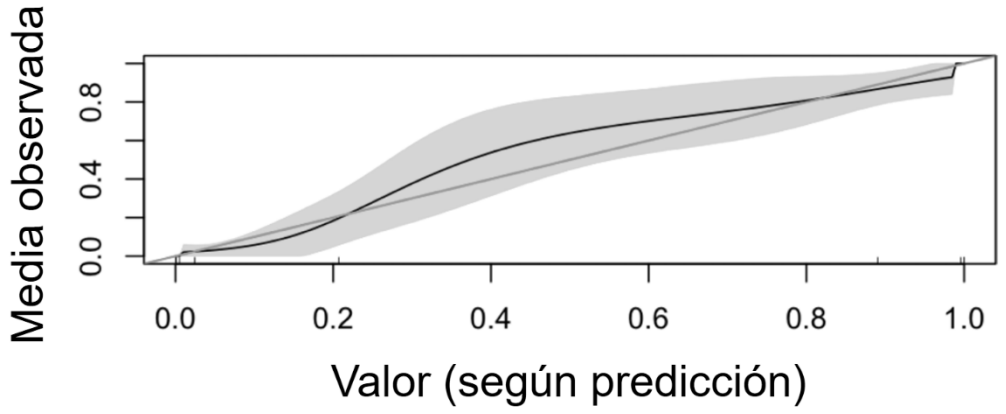


FIGURA 7

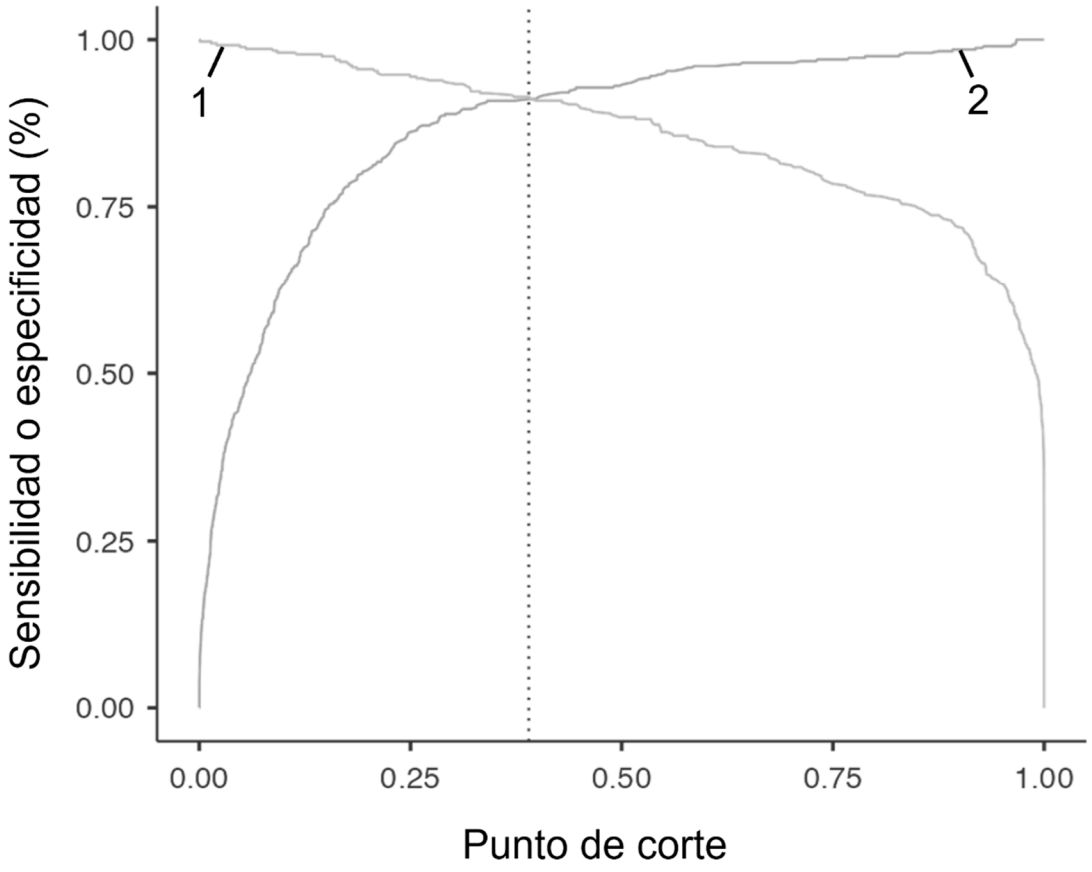


FIGURA 8

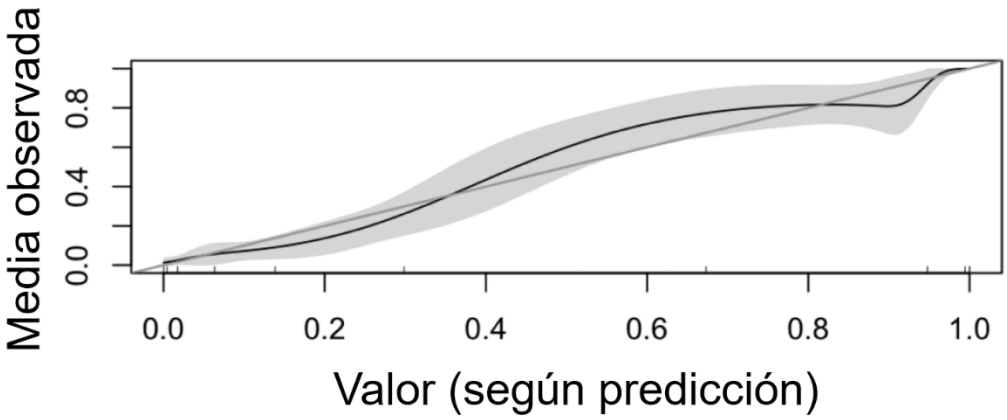


FIGURA 9

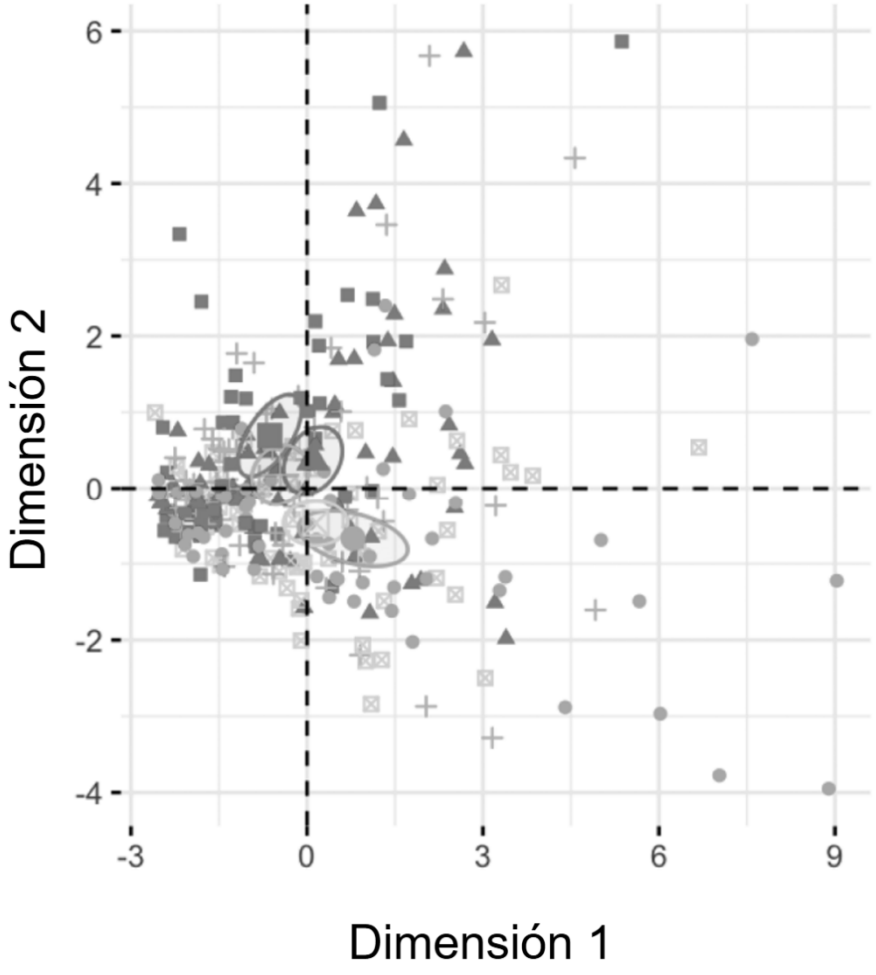


FIGURA 10

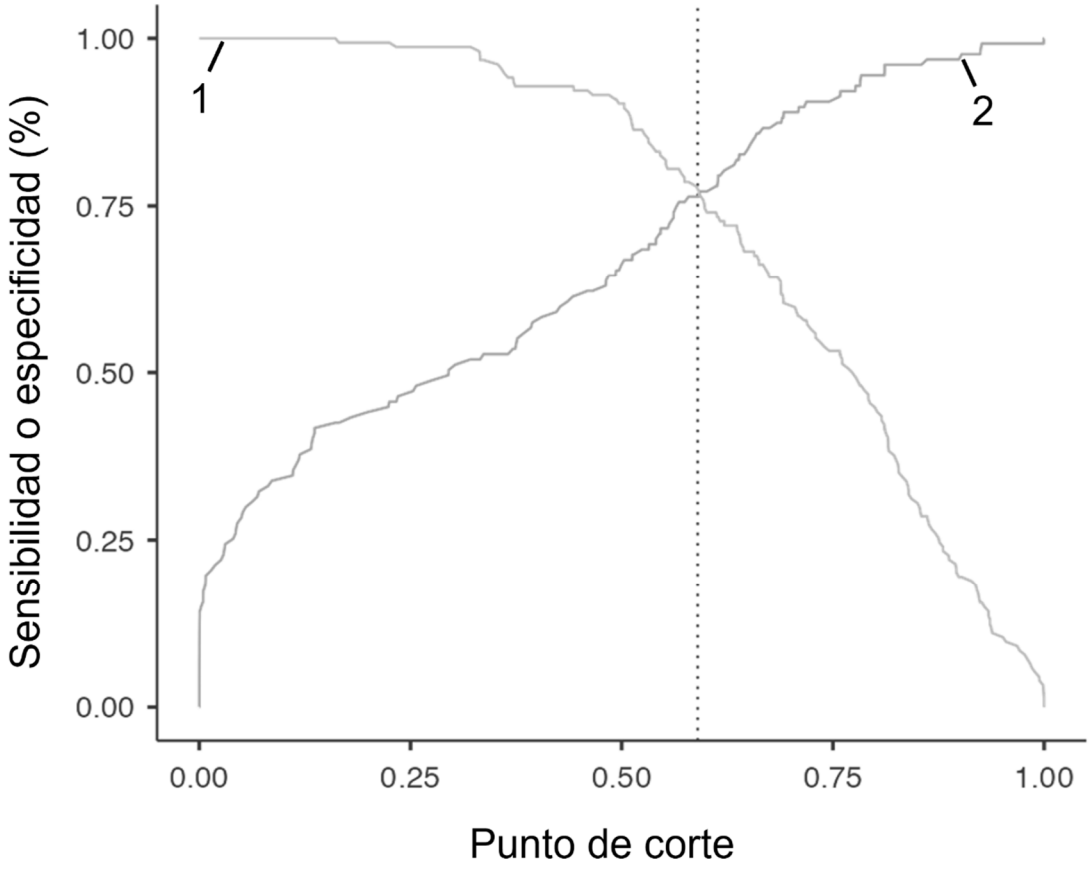


FIGURA 11

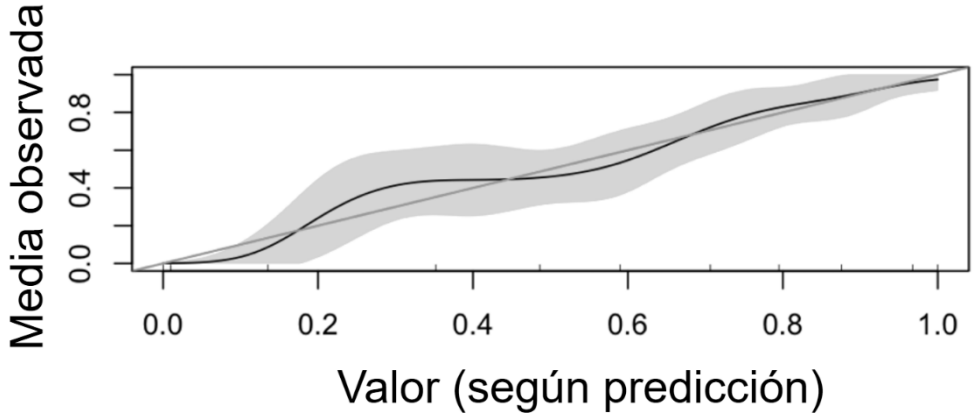


FIGURA 12

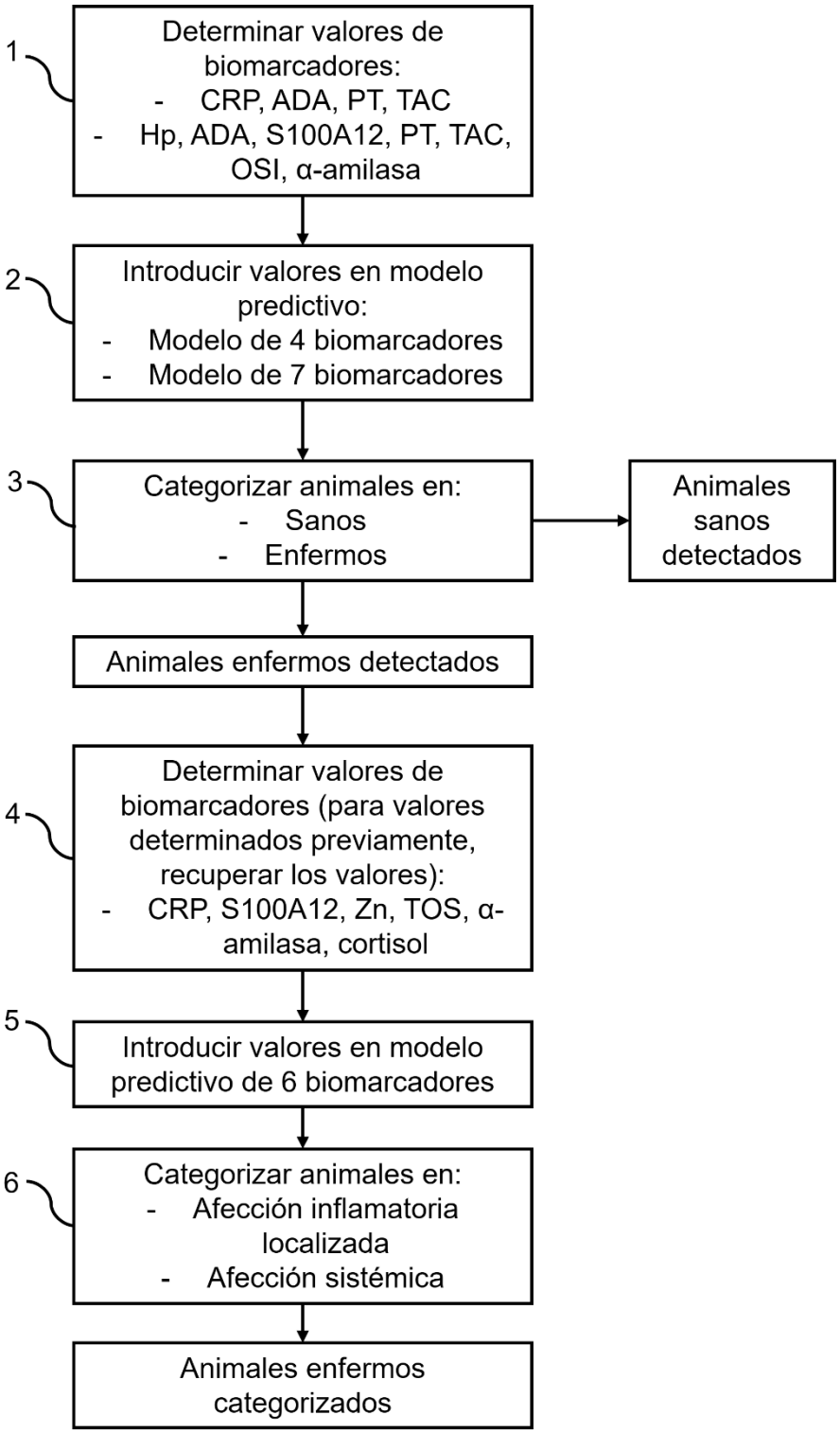

1
Determinar valores de biomarcadores:
- CRP, ADA, PT, TAC
- Hp, ADA, S100A12, PT, TAC, OSI, α-amilasa
2
Introducir valores en modelo predictivo:
- Modelo de 4 biomarcadores
- Modelo de 7 biomarcadores
3
Categorizar animales en:
- Sanos
- Enfermos
Animales sanos detectados
Animales enfermos detectados
4
Determinar valores de biomarcadores (para valores determinados previamente, recuperar los valores):
- CRP, S100A12, Zn, TOS, α-amilasa, cortisol
5
Introducir valores en modelo predictivo de 6 biomarcadores
6
Categorizar animales en:
- Afección inflamatoria localizada
- Afección sistémica
Animales enfermos categorizados

FIGURA 13

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202530304

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 10.04.2025

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) Int. CI.: ***G01N33/53*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SÁNCHEZ, J., MATAS, M. et al. The connection between stress and immune status in pigs: a first salivary analytical panel for disease differentiation. Frontiers in Veterinary Science, 16/06/2022, Vol. 22, artículo nº 881435 [en línea][recuperado el 02/02/2026] <DOI: 10.3389/fvets.2022.881435.>. figura 1, tabla 1, página 10, párrafo 2; columna 2,	1-11
A	CN 118777605 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY) 15/10/2024, todo el documento	1-11
A	CN 116008448 A (LUO JING) 25/04/2023, todo el documento	1-11
A	PIÑEIRO, M. et al. A sensitive immunoassay for the quantitation of Pig-MAP in pig saliva samples. Research in Veterinary Science, 05/10/2024, Vol. 180, artículo nº 105432 [en línea][recuperado el 02/02/2026]. , <DOI: 10.1016/j.rvsc.2024.105432>. todo el documento	1-11

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
02.03.2026	M. Rodríguez Venegas	1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET