UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Avances en biomarcadores no invasivos de salud y bienestar en el ganado porcino

Advances in non-invasive biomarkers of health and welfare in swine

AUTOR/A Alba Ortín Bustillo

DIRECTOR/ES Silvia Martínez Subiela
Alberto Muñoz Prieto
Asta Tvarijonaviciute

2025

UNIVERSIDAD DE MURCIA

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL

Avances en biomarcadores no invasivos de salud y bienestar en el ganado porcino

Advances in non-invasive biomarkers of health and welfare in swine

AUTOR/A Alba Ortín Bustillo

DIRECTOR/ES Silvia Martínez Subiela
Alberto Muñoz Prieto
Asta Tvarijonaviciute

2025

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR/A

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19 de octubre de 2022.

Yo, Dña Alba Ortín Bustillo, habiendo cursado el Programa de Doctorado Ciencias Veterinarias de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad de Murcia (EIDUM), como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a titulada:

Advances in non-invasive biomarkers of health and welfare in swine / Avances en biomarcadores no invasivos de salud y bienestar en el ganado porcino

y dirigida por:

Dª.: Silvia Martínez Subiela
D.: Alberto Muñoz Prieto
Dª.: Asta Tvarijonaviciute

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

Murcia, a 7 de noviembre de 2025

(firma)

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados:	
Responsable	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la quinta hoja, después de la portada de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor/a.

Firmante: ALBA ORTIN BUSTILLO; Fecha-hora: 07/11/2025 15:05:58; Emisor del certificado: C=ES,O=ACCV,OU=PKIACCV,CN=ACCVCA-120;

@dministración electrónica

Código seguro de verificación: RUxFMu4S-x6lg1rc5-hXFeUEyv-aM3lXEtA

COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 1 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: https://sede.um.es/validador/

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quisiera dar las gracias a mis directores de tesis, Silvia Martínez Subiela, Alberto Muñoz Prieto y Asta Tvarijonaviciute, por su guía y apoyo durante estos años de trabajo. A José Joaquín Cerón Madrigal que ha sido como otro director más para poder cumplir con los objetivos de esta tesis.

A todos mis compañeros del laboratorio que siempre me han ayudado y animado a seguir: Lorena, Camila, Damián, Adrián, Luis Pardo, Fernando, Mariló, María, Eva, Franky, Marina García, Carmen, Fran y Pablo. A todos mis compañeros que aunque ya no estén ahora en el laboratorio estuvieron presentes en este largo proceso Mery, Belén, Marina López Arjona, Luis González y Susana.

De todos he aprendido sobre técnicas de laboratorio y estadística, a cómo escribir un artículo científico (y enviarlo a las revistas) y a cómo seguir adelante a pesar de los fallos y la desesperación cuando lamentablemente las cosas no salen, a pesar del esfuerzo y los numerosos intentos. No sé qué será de mi vida profesional después de esta etapa pero he disfrutado y he tenido el placer de conocer este mundo de la investigación junto a todos ellos.

Agradecer a la Fundación Séneca haberme concedido esta beca y poder realizar esta tesis en la Universidad de Murcia. También al personal de la Granja por su trabajo y ayuda cuando hemos tenido que hacer muestreos.

A mis amistades que he conocido durante la carrera y el doctorado Lidia, Belén, Valeria y Maite que me han dado ánimos, buenos momentos y salidas divertidas que han regulado mis niveles de estrés.

Por último, a mi familia que siempre me ha animado a que yo hiciese lo que quisiera en la vida: estudiar biología, dejarlo, estudiar magisterio, dejarlo, estudiar técnico de laboratorio, volver a la universidad y estudiar veterinaria, y finalmente matricularme en el programa de Ciencias Veterinarias y poder hoy depositar esta tesis. Puede que ellos no estén en los artículos o comunicaciones científicas pero han estado en cada paso, en cada experimento y resultado, en cada queja, alegría, enfado, risa y llanto que he tenido. Mi madre Lidia y mi padre Suel que han estado en primera línea. Mi hermano Bruno, que espero que, después de esto, le quede claro qué he estado haciendo en Murcia, con mi cuñada Lorena y mi sobrino Oliver que han venido a verme a Murcia cuando yo no podía ir a verles y siempre han estado ahí para cualquier cosa que necesitase.

Mi más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han hecho posible la realización de esta tesis. Sin su apoyo, guía y motivación, este trabajo no habría sido posible.

“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina al mundo” (Louis Pasteur).

Quiero dedicar este trabajo a todos aquellos que creen en el saber, en el conocimiento como arma de lucha para el cambio social, como herramienta de desafío contra la opresión y transforman el mundo mediante la palabra y el pensamiento crítico. "Cada día que vives lo que haces marca la diferencia y tiene un impacto sobre el mundo. Tú decides qué diferencia quieres hacer, qué mundo quieres dejar." (Jane Goodall).

INDEX

INDEX

DOCTORAL THESIS AS COMPENDIUM OF PUBLICATIONS 1

ABBREVIATIONS 5

INTRODUCTION 9

OBJECTIVES 13

EXTENDED SUMMARY 17

GENERAL MATERIAL AND METHODOLOGY 19

SPECIFIC METHODOLOGY AND EXPERIMENTAL DESIGN OF THE DIFFERENT OBJECTIVES 23

RESULTS OF THE DIFFERENT OBJECTIVES 42

CONCLUSIONS 59

RESUMEN 63

INTRODUCCIÓN 65

OBJETIVOS 67

MATERIAL Y METODOLOGÍA GENERAL 68

METODOLOGÍA ESPECÍFICA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS DIFERENTES OBJETIVOS 72

RESULTADOS DE LOS DIFERENTES OBJETIVOS 91

CONCLUSIONES 107

ARTICLES 109

Article 1 111

Article 2 115

Article 3 119

Article 4 123

Article 5 127

Article 6 131

Article 7 135

Article 8 139

Article 9 143

BIBLIOGRAPHY 147

ANNEX 153

DOCTORAL THESIS AS COMPENDIUM OF PUBLICATIONS

In accordance with the authorization of the directors of the doctoral thesis and the Academic Commission responsible for the Veterinary Sciences PhD Program, this PhD thesis is presented as a compendium of nine studies previously published. Therefore, the doctoral thesis is composed of the following references:

1. Ortín-Bustillo, A., Vidal, G. R., Tortosa, D. E., López-Arjona, M., Rubio, C. P., Cerón, J. J., Muñoz-Prieto, A., Pardo-Marín, L., López-Martínez, M. J., Botia, M., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Tecles, F. (2022). Automated assays for trace elements and ferritin measurement in saliva of pigs: Analytical validation and a pilot application to evaluate different iron status. *Research in veterinary science*, *152*, 410-416. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.007

2. Ortín-Bustillo, A., Escribano, D., López-Arjona, M., Botia, M., Fuentes, P., Martínez-Miró, S., Rubio, C. P., García-Manzanilla, E., Franco-Martínez, L., Pardo–Marín, L., Cerón, J. J., Llonch, P., & Tecles, F. (2022). Changes in a Comprehensive Profile of Saliva Analytes in Fattening Pigs during a Complete Productive Cycle: A Longitudinal Study. *Animals*, *12*(14), 1865. https://doi.org/10.3390/ani12141865

3. Ortín-Bustillo, A., Contreras-Aguilar, M. D., Rubio, C. P., Botia, M., Cerón, J. J., López-Arjona, M., Martínez-Subiela, S., Escribano, D., & Tecles, F. (2022). Evaluation of the Effect of Sampling Time on Biomarkers of Stress, Immune System, Redox Status and Other Biochemistry Analytes in Saliva of Finishing Pigs. *Animals, 12*(16), 2127. https://doi.org/10.3390/ani12162127

4. Franco-Martínez, L., Ortín-Bustillo, A., Rubio, C. P., Escribano, D., López-Arjona, M., García-Manzanilla, E., Cerón, J. J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., & Tecles, F. (2022). Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs. *Research in veterinary science*, *152*, 403-409. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.003

5. Ortín-Bustillo, A., Escribano, D., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Muñoz-Prieto, A., López-Arjona, M., Cerón, J. J., & Tecles, F. (2023). Trace Elements and Ferritin in Pig Saliva: Variations during Fattening, Time of

Sampling, Effect of Dirtiness and Stability under Different Storage Conditions. *Antioxidants*, *12*(3), 649. https://doi.org/10.3390/antiox12030649

6. Ortín-Bustillo, A., Botía, M., López-Arjona, M., Pardo-Marín, L., Cerón, J. J., Martínez-Subiela, S., López-Martínez, M. J., Tvarijonaviciute, A., Muñoz-Prieto, A., Rubio, C. P., Martínez-Miró, S., Escribano, D., & Tecles, F. (2023). Saliva Sampling Material Matters: Effects on the Results of Saliva Analysis in Pigs. *Animals*, *13*(24), 3757. https://doi.org/10.3390/ani13243757

7. Ortín-Bustillo, A., Botía, M., López-Martínez, M. J., Martínez-Subiela, S., Cerón, J. J., González-Bulnes, A., Manzanilla, E. G., Goyena, E., Tecles, F., & Muñoz-Prieto, A. (2023). Changes in S100A8/A9 and S100A12 and Their Comparison with Other Analytes in the Saliva of Pigs with Diarrhea Due to *E. coli*. *Animals*, *13*(16), 2556. https://doi.org/10.3390/ani13162556

8. Ortín-Bustillo, A., Goyena, E., Martínez-Martínez, A., Cerón, J. J., Martínez-Subiela, S., López-Martínez, M.J., Manzanilla, E.G., Tvarijonaviciute, A., González-Bulnes, A., Muñoz-Prieto, A. (2025). Changes in immunity- and stress- biomarkers in saliva following treatment of pigs with meningitis due to *Streptococcus suis*. *Veterinary Journal, 314*, 106458. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2025.106458

9. Ortín-Bustillo A, Martínez-Subiela S, Cerón JJ, González-Bulnes A, Tvarijonaviciute A, Muñoz-Prieto A (2025) Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) in saliva of pigs: evaluation of two commercially available ELISA kits for its measurement and distribution of its main components. *PLOS One 20*(10), e0335133. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0335133

In addition, it is considered appropriate to include additional information in the PhD Thesis Annex about information and impact factor of the journals where articles were accepted and published.

ABBREVIATIONS

ADA: Adenosine deaminase/ Adenosina deaminasa

ALP: Alkaline phosphatase/ Fosfatasa alcalina

AlphaLISA: Amplified luminescent proximity homogeneous assays/ Ensayos homogéneos de proximidad luminiscente amplificados

ALT: Alanine aminotransferase/ Alanina aminotransferasa

AOPP: Advanced oxidation protein products/ Productos avanzados de oxidación proteica

AST: Aspartate aminotransferase/ Aspartato aminotransferasa

AUC: Area under the curve/ Área bajo la curva

BChE: Butyrylcholinesterase/ Butirilcolinesterasa

BF: Back fat thickness/ Espesor de grasa dorsal

Ca: Calcium/ Calcio

CgA: Chromogranin A/ Cromogranina A

CK: Creatine kinase/ Creatina quinasa

CRP: C-reactive protein/ Proteína C reactiva

Cu: Copper/ Cobre

CUPRAC: Cupric reducing antioxidant capacity/ Capacidad antioxidante reductora cúprica

CV: Coefficient of variation/ Coeficiente de variación

d-ROMs: Reactive oxygen-derived compounds/ Compuestos reactivos derivados del oxígeno

E. coli: *Escherichia coli*

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay/ Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

Fe: Iron/ Hierro

FRAS: Ferric reducing ability of saliva/ Habilidad reductora férrica de la saliva

GGT: ɣ-glutamyl transferase/ ɣ-glutamil transferasa

GLMs: Repeated-measures general linear models/ Modelos lineales generales de medidas repetidas

GPOX: Glutathione peroxidase-like/ Similar a la glutatión peroxidasa

ICP-MS: Inductively coupled plasma-mass spectrometry/ Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

ITIH4: Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4/ Inhibidor de inter-alfa-tripsina cadena pesada 4

Hp: Haptoglobin/ Haptoglobina

LDH: Lactate dehydrogenase/ Lactato deshidrogenasa

Lip: Lipase/ Lipasa

LoD: Limit of detection/ Límite de detección

P: Phosphorous/ Fósforo

PigMAP: Pig major acute protein/ Proteína de inflamación mayor en el cerdo

r: Spearman correlation coefficient/ Coeficiente de correlación Spearman

R^2: Coefficient of determination/ Coeficiente de determinación

ROC: Receiver operating characteristic/ Curva característica de funcionamiento del receptor

sAA: Alpha-amylase/ Alpha-amilasa

SCL: Significant Change limit/ Límite de cambio significativo

SD: Standard deviation/ Desviación estándar

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio

SOD: Superoxide dismutase/ Superóxido dismutasa

S. suis: *Streptococcus suis*

TEA: Total esterase activity/ Actividad total esterasa

TP: Total protein/ Proteinas totales

UA: Uric acid/ Ácido úrico

WB: Western blot/ Western blotting

Zn: Zinc/ Zinc

INTRODUCTION

Animal health and welfare in livestock are topics that have been gaining interest due to the high demand from the population (Nienhaus et al., 2020). In this way, research activities to improve methods for assessing health and welfare status have also risen in pig farms (Czycholl et al., 2015).

Recently, many researchers have highlighted the importance of controlling infectious diseases in porcine farms due to the large size of their population, the quantity of animals transported, and the goods produced (Henao-Diaz et al., 2020). Nevertheless, biomarkers are not commonly and routinely used on farms to assess the animal health and welfare with the objective of detecting alterations and pathologies early and reliably to prevent them. In this way, the analyses are based on performing serologies to detect specific diseases, mainly infectious illnesses such as porcine circovirus type 2 (Truong et al., 2001) or *Mycoplasma suis* (Hoelzle et al., 2007), but not to evaluate the general condition of the animal. They also commonly use blood samples whose extraction produces a high level of stress in this species (Muneta et al., 2010).

Collecting blood samples is considered a routine practice in the daily veterinary clinic, although this type of sampling requires specialized personnel and materials, good hygiene conditions, especially in rural areas where there is a higher degree of dirt and risk of infection (Pfaffe et al., 2011). In case of porcine species, it is particularly difficult due to its thick layer of body fat, lack of easily accessible superficial vessels, and susceptibility to easily develop a state of stress (Tecles et al., 2017).

The applications of saliva as a non-invasive biological sample for laboratory analysis have been researched in recent years (Lamy and Mau, 2012) due to the benefits of using saliva in the laboratory (Cerón et al., 2022). Saliva has a wide spectrum of components (Lima et al., 2010), many of them derived from the blood and with diagnostic utility in clinical pathology as biomarkers to assess health status (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017). The collection of saliva samples is an accessible, non–invasive practice, and its method of obtaining them is simple (Yoshizawa et al., 2013) to perform without the need to acquire specialized skills (Kaufman and Lamster, 2002). Under field conditions, obtaining saliva samples allows for easier sampling, in less time, and also enables more efficient sampling of a larger number of animals (Pfaffe et al., 2011).

In this line the concept of sialochemistry appears, which is defined as a panel of analytes that can be measured in saliva (Giri et al., 2018), and that currently involves several biomarkers of different biochemical profiles such as stress, inflammation, immune system status, reduction-oxidation state, sepsis, metabolism and analytes related to the state of tissues and organs.

This thesis will present advances in the knowledge and application of salivary biomarkers in pigs, including the development of new assays for their measurement, the study of pre-analytical influences and their applications in different physiological and pathological conditions.

OBJECTIVES

The specific objectives of this PhD Thesis are to provide an advance in the knowledge of salivary biomarkers in pigs, and the influence of pre-analytical factors and disease on their concentrations:

- Objective 1. Validation of new assays to measure biomarkers in porcine saliva:
    - Trace elements and ferritin.
    - Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4).

  The results of this objective are published in the papers nº1 and nº9 (indicated in the Articles section).

- Objective 2. Evaluation of the effect of pre-analytical factors on selected salivary biomarkers. These factors include the effect of sampling time, productive phase, material of sampling, contaminants and storage conditions. The results of this objective are published in the papers nº2, nº3, nº4, nº5 and nº6 (indicated in the Articles section).

- Objective 3. Evaluation of the response of selected salivary biomarkers to naturally occurring pathologies and their treatment. This includes two conditions:
    - Diarrhea due to *Escherichia coli* (*E. coli).*
    - Meningitis due to *Streptococcus suis* (*S. suis)*.

  The results of this objective are published in the papers nº7 and nº8 (indicated in the Articles section).

EXTENDED SUMMARY

GENERAL MATERIAL AND METHODOLOGY

1. Animals and ethical considerations

Groups of different pigs (*Sus scrofa domesticus*) at specific ages and productive phases were sampled from the Veterinary Teaching Farm of the University of Murcia, Spain, and other commercial farms. All experimental animal procedures were conducted according to the Three Rs principle of Animal Experimentation following Spanish (RD53/2013) and European (Directive 2010/63/EU) legislation. Animals were placed and fed according to European legislation (Council Directive 2001/88/CE of 23 October 2001 amending Directive 91/630/CEE concerning minimum standards for the protection of pigs) and Spanish legislation (RD 1135/2002, Concerning Minimum Standards for the Protection of Pigs).

The experiments that required animal handling were approved by Bioethical Committee of Animal Experimentation from the University of Murcia (Comité Ético de Experimentación Animal, CEEA), under the protocol numbers CEEA 235/2016, 780/2022, and 937/2024. The studies complied with ARRIVE guidelines for the care and use of animals. Informed consent was obtained from the farm owners where samples of pig saliva were collected.

2. Saliva and plasma sampling

Saliva samples were collected using saliva collection tubes (Salivette, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Germany) and synthetic sponges, as previously reported (Contreras-Aguilar et al., 2019). In brief, each animal was allowed to gently chew a sponge (size 5 cm long; 2.5 cm wide), which was attached to a thin, flexible metal rod, until the sponge was thoroughly moistened, around 1-2 min. Each sponge was introduced into a Salivette tube and transported on ice to the laboratory. Once in the laboratory, tubes were centrifuged (3000 g, 10 min, 4 ºC), and saliva was transferred to 1.5 mL tubes (Eppendorf Ibérica, Spain) and stored at –80 ºC until analysis. The average time from collection until centrifugation was around 2 hours.

Blood samples were collected by jugular vein-puncture using a vacutainer, heparin tubes (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) and needles 25 mm × 0.8 mm (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). Plasma was separated by centrifugation at

the laboratory (2000 g, 15 min, 4 ºC), transferred to 1.5 mL tubes (Eppendorf Ibérica, Spain) and stored at –80 ◦C until its use.

3. Method validation

Analytical validation was developed in most of the articles presented in this thesis to prove the reliability of the newly developed assays in the laboratory. Therefore, to cover that, reproducibility, accuracy, and sensitivity were assessed following general concepts.

Reproducibility: was evaluated by intra- and inter-assay imprecision using saliva samples from different pigs with varying analyte concentrations.

Intra-assay imprecision was calculated by measuring each sample five times in a single analytical run. Inter-assay imprecision was established by measuring the same samples five times in separate runs on different days.

The possible effect of repetitive thawing and freezing was mitigated by storing the samples in separate vials (aliquots) and using a new one for each measurement. The level of imprecision was calculated as the coefficient of variation (CV), being the standard deviation (SD) of the replicates divided by the mean and expressed as a percentage (CV% =SD/mean*100).

Accuracy: was estimated indirectly by linearity under dilution and/or recovery experiments.

To evaluate linearity under dilution, saliva samples with a high concentration of each analyte were serially diluted with ultrapure water or sample buffer of the method. Each one was analysed to perform linear regression equations with determination coefficients (R^2) and graphic representation of the expected and observed concentrations.

For recovery testing, two samples with low and high analyte concentrations were mixed in known proportions: 50%-50%, 25%-75% and 75%-25% (high-low respectively). The percentages of recovery were calculated according to the following formula: observed results/expected results×100.

Sensitivity: was determined by the detection limit (LoD) that is defined as the lowest concentration of analyte that could be detected in a sample from a specimen of zero value. It was calculated by measuring ultrapure water or sample buffer twenty

times and expressed as the mean plus three SD of the results (LoD =mean+3×SD). In some assays, the LoD was determined by measuring 10 replicates of a low concentration sample and 20 replicates of a blank and calculated based on the following equations: LoD =LoB + 1.645 x SD of low concentration sample, where LoB =mean blank+1.645 x SD of blank (Shrivastava and Gupta, 2011). The functional sensitivity, defined as the lowest concentration of a substance that a method can reliably measure within established precision and accuracy conditions, was evaluated in some articles by serially diluting a porcine saliva sample with the assay buffer and analysing five replicates of each dilution. Then, CVs of each dilution were calculated, and functional sensitivity was set at the lowest concentration that could be measured accurately and repeatedly with a 20% CV or lower (Armbruster and Pry, 2008).

4. Statistical analysis

Data analyses were performed using spreadsheet software (Excel Version 10, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), a statistics package (GraphPad Prism 6 and 8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) and the SPSS statistics package (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. IBM Corp., Armonk, NY, USA).

D'Agostino and Pearson normality test was applied to evaluate the distribution of the data. Descriptive parameters (mean, SD, CV or median and range), linear regression, and R^2 were calculated using routine statistical procedures. The significance level for the *t*-test results was set at $p < 0.05$.

Correlation studies between the different biomarkers analysed were performed using the Spearman test for non-parametric data. The degree of correlation was evaluated using the Rule of Thumb (Hinkle et al., 2003).

SPECIFIC METHODOLOGY AND EXPERIMENTAL DESIGN OF THE DIFFERENT OBJECTIVES

Objective 1. Validation of new assays to measure biomarkers in porcine saliva

The articles nº1 and nº9 are related to objective 1 where new available commercial methods were analytically validated and tested in order to detect changes under different conditions:

– Trace elements and ferritin (Article nº1).
– ITIH4 (Article nº9).

Article nº1: Automated assays for trace elements and ferritin measurement in saliva of pigs: Analytical validation and a pilot application to evaluate different iron status

In this report, automated assays for measuring of iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu) and ferritin in the saliva of pigs were analytically evaluated. Additionally, the potential changes of these analytes in saliva of pigs with different iron status induced by hexogen Fe supplementation, leading to differences in red blood cell indices and plasma Fe and ferritin, were studied.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

Porcine saliva samples were collected from pigs in order to perform the analytical validation. The methods used in this article were:

- Fe was analysed using a colorimetric method (Iron-Ferrozine, 11,509, BioSystems S.A., Barcelona, Spain).
- Zn was measured using a colorimetric assay (Zinc, ZN2341, Randox Laboratories Ltd., United Kingdom).
- Cu was measured with a colorimetric method (Copper, CU2340, Randox Laboratories Ltd., United Kingdom).
- Ferritin in plasma and saliva samples was measured using an automated immunoturbidimetric assay (Ferritin latex, 31935, Biosystems S.A., Barcelona, Spain) commercially available for measuring ferritin in human serum.

Measurements were made on the automated chemistry analysers (Olympus AU 400 for ferritin, Zn and Cu; Olympus AU 600 for Fe, Olympus Diagnostica GmbH1, Hamburg, Germany).

To complete the analytical validation, a comparison with a gold-standard method, ICP-MS (Agilent 7900 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) was used for Fe, Zn and Cu measurements where 25 saliva samples were analysed by the automated assay and with the ICP-MS method which is a highly sensitive and accurate technique that uses sample treatment deproteinization (Montaño et al., 2016). Linear regression analysis was employed to compare the outcomes in the automated assay after measuring Fe, Zn and Cu of the 25 saliva samples from swine compared to ICP-MS gold standard method.

A laser-based hematology analyser (Siemens ADVIA 120 Healthcare Diagnostics) was used to measure red blood cell routine parameters for the performance test.

2. Experimental design

2.1 Changes in saliva and plasma of piglets with different Fe supplementation

A total of 42 crossbred growing pigs (aged 4 weeks, weight of 7 ± 1 kg) were selected randomly in this experimental study. Two groups of piglets were studied:

- Group A (*n* =22): Piglets were injected intramuscularly with a commercial hexogen Fe (Gleptoferron Labiana 200 mg/mL, 3575 ESP, LABIANA Life Sciences, S.A.) at the age of 3 days to prevent anemia according to the recommendations of piglet management on farms (Sutherland, 2015).
- Group B (*n* =20): Piglets received no Fe supplementation. Saliva samples were collected at the age of 4 weeks to compare levels of trace elements and ferritin.

Blood and plasma samples were used to measure and compare hematological biomarkers, Fe and ferritin between groups. After the end of the experiment, piglets from group B were supplemented with Fe to avoid any health alterations related to Fe deficiency and to accomplish with animal welfare. A non-parametric Mann-Whitney test was performed in order to detect significant levels of the biomarkers studied.

***Article nº9*: Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) in saliva of pigs: evaluation of two commercially available ELISA kits for its measurement and distribution of its main components**

The present research aimed to provide knowledge about the presence and possibilities to measure ITIH4 protein in saliva of pigs, also known as pig major acute phase protein (Pig MAP), using different commercially available porcine enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for the determination of serum ITIH4. The article also described the different forms of ITIH4 in porcine saliva, evaluated by western blotting (WB) and its comparison to plasma samples using a commercial antibody anti-human ITIH4 and an in-house polyclonal antibody anti-porcine ITIH4.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

Four commercially available ELISA kits to analyse ITIH4 in porcine plasma were evaluated to see if there was reactivity using porcine saliva:

- Kit A: Fine test Pig MAP.
- Kit B: Acuvet ELISA pig-MAP.
- Kit C: Cusabio Pig major acute phase protein (MAP).
- Kit D: Elabscience Porcine ITIH4.

1.2 Purification of native ITIH4 from porcine plasma

The purification of the native porcine protein was performed by an automated liquid chromatography system (AKTA pure, GE Healthcare Life Sciences) using an affinity column coated with the commercial recombinant polyclonal antibody anti-human ITIH4 (Cloud-Clone Corp, Ref: PAH776Hu01). The column (HiTrap NHS-activated HP 1 ml, cytiva.com/hitrap, GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany) was coated following the manufacturer's instructions and the native protein was subsequently purified from processed and treated porcine plasma.

1.3 Immunization and antibody production

To produce the in-house polyclonal antibody in sheep, a protocol previously described was followed (Leenaars and Hendriksen, 2005). A young female sheep around 9 months of age was selected to be immunized with the purified native protein mixed with incomplete Freund's adjuvant in 1:1 proportion (Freund's adjuvant, Incomplete; Sigma-Aldrich; Ref: F5506). The sheep was immunized initially three times (2 weeks between each inoculation), and a plasma sample was collected from the jugular vein of the sheep and tested in a common ELISA screening to determine if the immunization was adequate and to evaluate the antibody titration. To maintain the production, the sheep was inoculated once a month.

HiTrap protein G HP affinity column was used to purify the polyclonal antibody from plasma of sheep previously processed and obtained after blood extractions according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Germany).

2. Experimental design

2.1 Assessment of commercial ELISA kits to differentiate salivary ITIH4 levels in pigs with inflammation from healthy pigs

After the analytical validation, the ELISA kits reliable for measuring ITIH4 in porcine saliva were evaluated in order to observe their ability to detect an inflammatory condition such as tail biting (Valros et al., 2022).

- Group TB (n= 13): Pigs in the group with inflammation had signs of fresh tail biting.
- Group C (n=14): Pigs from the control group had no tail lesions.

Pigs were of similar age (8-9 weeks old) and were allocated to a growing unit of a commercial piglet producing farm in Southwest Finland. To confirm the presence of inflammation in these animals and also to compare and study its correlation with ITIH4, values of haptoglobin (Hp) were used, which is also a moderate APP in pigs, as ITIH4 (Eckersall and Bell, 2010). For comparison between groups the non-parametric Mann-Whitney test was used and besides a correlation study between ITIH4 and Hp was performed using Spearman's test.

2.2 SDS-PAGE and western blotting procedures

Purified in-house native protein, plasma proteins, and saliva proteins from pigs were separated through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 12 % acrylamide pre-cast gels (SurePAGE™, Bis-Tris, 10x8, 12%, 12 wells; Ref: M00668, Genescript, NJ, USA).

One of the gels was employed for purified protein identification distribution by Coomassie-stained protein gel (Coomassie Brilliant Blue R-250). Purified porcine ITIH4 for the stained gel was also denatured with 4% dithiothreitol (GE Healthcare Life Sciences PlusOne DTT; Ref: 17-1318-02), and heated at 95º for 5 and 20 minutes.

The other two gels were transferred to two membranes by electroblotting using polyvinylidene difluoride membranes (PB9220, Power Blotter Pre-cut Membranes and Filters, PVDF mini, 0.45 µm pore, Invitrogen™). Then, one of the membranes was incubated with the commercial anti-ITIH4 antibody and the other membrane was incubated with the in-house polyclonal being both previously labelled with HRP kit according to the manufacturer's instructions (Abcam, HRP Conjugation Kit - Lightning-Link®; Ref: ab102890). Protein and porcine samples were analysed with the commercial antibody and the in-house antibody.

Objective 2. Effect of pre- analytical factors on selected salivary biomarkers

The articles nº2, nº3, nº4, nº5 and nº6 are related to objective 2. The effect of sampling time, productive phase, material of sampling and storage conditions of various biomarkers from different biochemical profiles:

– The effect of productive phase in a panel of salivary biomarkers (Article nº2).
– The effect of sampling time in a panel of salivary biomarkers (Article nº3).
–The effects of the presence of pen faeces and feed on the measurement of a panel of biomarkers in porcine oral fluid (Article nº4)
– Effect of pre-analytical factors in salivary trace elements and ferritin (Article nº5).
– The effect of type of material for sampling saliva in different salivary biomarkers (Article nº6).

Article nº2: Changes in a comprehensive profile of saliva analytes in fattening pigs during a complete productive cycle: a longitudinal study

This article focuses on possible physiological influences in the porcine sialochemistry profile in healthy fattening pigs over their productive cycle from suckling to growing-finishing phase. Besides, the possible influence of gender and productive parameters such as weight at birth, weight gain, and back fat thickness (BF) on variation in these salivary biomarkers was studied.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

A total of 29 biomarkers of stress, inflammation, immune system, oxidative stress and other biomarkers of metabolism and tissue/organs function were measured in saliva of pigs included in the study using different techniques:

- Automated analyzer Olympus AU600.
- The AlphaLISA (amplified luminescent proximity homogeneous assays) technology (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA).

- Time-Resolved Immunofluorometric Assay.

2. Experimental design

Saliva samples were collected from Large-White pigs (25 males and 25 females) from 5 litters (average litter size of 10.0 ± 0.7). The birth weight of the piglets was 1.93 ± 0.59 kg (1.83 ± 0.49 for females, 2.02 ± 0.66 for males). Sampling was performed as follows:

- T1: in the sucking phase at 24 days of age (weight data).
- T2: in the nursery phase, one week after weaning at 35 days of age (weight data and saliva samples).
- T3: at the end of nursery at 88 days of age (weight data and saliva samples).
- T4: at the beginning of the growing-finishing phase after one week for acclimatization at 99 days of age (weight data and saliva samples).
- T5: at the end of the phase at 193 days of age (weight data, saliva samples and BF data).

The changes in the different measurements over time were assessed using a Repeated-measures general linear models (GLMs) in which time and sex were considered as fixed factors, and birth weight, weight gain and BF were used as covariates. Those analytes found as being significantly influenced by covariates were further studied by linear regression analysis in order to know whether the analytical results can be used for prediction of performance parameters. Statistical analyses were performed using the SPSS statistics package.

***Article nº3*: Evaluation of the effect of sampling time on biomarkers of stress, immune system, redox status and other biochemistry analytes in saliva of finishing pigs**

This research assessed if the values from a panel of salivary analytes can change when measured in samples collected at different times of the day in pigs (8.00, 12.00, 16.00 and 20.00) and if these changes could be related to sex.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

A panel of 26 salivary analytes was measured including biomarkers of stress, biomarkers of the immune system, biomarkers related to redox status and other analytes related to metabolism and physiological status of different tissues and organs. The techniques used were:

- Automated analyzer Olympus AU600.
- The AlphaLISA technology (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA).

2. Experimental design

A total of 40 pigs were randomly selected for inclusion in the experimental procedure (20 males and 20 females; age of 21 weeks approximately).

Saliva was sampled from the pigs within the same day at four times:

- 08:00 h
- 12:00 h
- 16:00 h
- 20:00 h

Significant daily changes in the salivary biomarkers measured were evaluated by GLMs considering fixed factors of time (from 08.00 h to 20.00 h) and gender. When any of the fixed factors was significant, it was further evaluated with a univariate analysis and Bonferroni post-hoc test.

Article nº4: Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs

Clean porcine oral fluid was mixed with two different concentrations of pen faeces or feed representing a high or low level of contamination to see the effect on measurements of different salivary biomarkers. Afterward, samples were treated with centrifugation, filtration or chemical clarification to evaluate if these techniques could revert the effects of those contaminants in biomarker evaluation.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

A total of 21 salivary biomarkers were measured to evaluate the effect of dirtiness and the effects of different contaminant removal methods. Analytes were from biochemical profiles of stress, inflammation, immunity, redox status, muscle damage and function of other organs.

- Automated analyzer Olympus AU600.
- The AlphaLISA technology.
- A commercial solid-phase, competitive chemiluminescence enzyme immunoassay.

2. Experimental design

2.1 Effects of pen faeces and feed

Samples were collected from 60 apparently healthy finishing pigs and mixed into n =9 pools. Three main groups were formed for the experiment:

- C group: clean oral fluid samples.
- D group: adding pen faeces in two different proportions: high pen faeces (HD group), consisting of 250 mg of pen faeces mixed with 1 mL of clean oral fluid, and low pen faeces (LD group), consisting of 25 mg of pen faeces mixed with 1 mL of clean oral fluid.
- F group: adding commercial porcine feed which was used at the farm in two different proportions: high feed (HF group), that was prepared by adding 250 mg

of feed to 1 mL of clean oral fluid; and low feed (LF group), which was prepared by adding 25 mg of feed to 1 mL of clean oral fluid.

2.3 Effects of procedures to remove oral fluid's contaminants

Three aliquots from each of the four groups (HD, LD, HF, LF) described above were treated as follows:

- Centrifugation: aliquots were centrifuged at 20000 *g*, 4 ◦C for 60 min, retrieving the supernatant in Eppendorf tubes.
- Filtration: aliquots were filtered through 1.2 µm commercial filters (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA) were used.
- Chemical cleaning: aliquots were treated with addition of chitosan (Sigma Aldrich) in a final proportion of 10 mg/mL followed by centrifugation at 10000 *g* × 10 min × 4 ◦C and retrieving the supernatant in Eppendorf tubes.

Data were logarithmically transformed (Ln + 1). One-way ANOVA (mixed effect analysis for multiple comparisons) was performed to evaluate the possible effect of different treatments on oral fluid biomarkers. Dunnett test was then applied to correct for multiple comparisons.

***Article nº5*: Trace Elements and Ferritin in Pig Saliva: Variations during Fattening, Time of Sampling, Effect of Dirtiness and Stability under Different Storage Conditions**

In this study Fe, Zn, Cu and ferritin were evaluated under different physiological conditions and other pre-analytical variables in order to assess possible variations in the measurements due to these factors.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

The assays used were the same previously described above in point 1.1 of the article nº1. These methods were validated to measure them in porcine saliva with average of intra- and inter-assay imprecision <12%, and average of percentage of variation of observed values compared with the expected values in the recovery tests was <9%.

1. Experimental design

1.1 Evaluation of changes of Zn, Cu, Fe and ferritin in fattening pigs during a complete productive cycle (longitudinal study)

Porcine saliva samples of 45 pigs from a previous study were used (Large-White, 24 males and 21 females). This experiment is described above in point 2 of article nº2.

1.2 Evaluation of changes of Zn, Cu, Fe and ferritin according to the time of sampling (diurnal variations study)

Porcine saliva samples from a previous study were used (20 males and 20 females). This experiment is described above in point 2 of article nº3.

For the longitudinal and diurnal variation studies, a GLMs was used in which time and sex were fixed factors. Univariate analysis and Bonferroni post hoc test were further performed for any of those fixed factors considered as significant.

1.3 Influence of fecal and feed contamination of saliva samples in the measurements of Zn, Cu and Fe

Clean saliva samples were collected from apparently healthy finishing pigs (approximately 110 kg body weight and 5 months of age) and mixed to form pools (n =16). The experimental assay was performed based on a previous study (Franco-Martínez et al., 2022). Feed and faeces were collected from the same farm.

Five aliquots of each saliva pool were prepared and treated as follows:

- C group (n =16): with 3.5 mL of saliva without any treatment.
- HD group (n =8) effect of high pen faeces by adding 875 mg of pen faeces to 3.5 mL of clean pig saliva.
- LD group (n =8): effect of low pen faeces by adding 87.5 mg of pen faeces to 3.5 mL of clean saliva.
- HF group (n =8): effect of high feed contamination by adding 875 mg of feed to a 3.5 mL of clean saliva.
- LF group (n =8): effect of low feed contamination by adding 87.5 mg of feed to 3.5 mL of clean pig saliva.

The trace element concentration of those mixtures was analysed by the colorimetric methods, and also with ICP-MS, to assess the possible effect of the method of measurement in the interferences.

The results obtained after the addition of faeces or feed to the sample were analyzed by GLMs, followed by a Bonferroni post hoc test for pairwise comparisons.

1.4 Storage stability of Zn, Cu, Fe and ferritin

The effect of different storage temperature conditions over time was evaluated for Zn, Cu, Fe and ferritin measurement in saliva of pigs. Ten saliva samples were collected from the Teaching Farm of the University of Murcia and were measured after collection (T0) and then, each sample was aliquoted into three subsamples:

- One was refrigerated at 4 ºC.
- One frozen at –20 ºC.
- One frozen at –80 ºC.

The samples were measured at different moments of the experiment:

- T0: before storage.
- TW: after 1 week of storage at different temperatures.
- T6: 6 months of storage at different temperatures.

Percentages of loss and recovery of markers after each point of measurement were calculated as percentages from initial analysis (T0 as 100% of each analyte concentration of saliva sample). Measurements were calculated according to the following formula: (T – T0) x 100/T0 (Escribano et al., 2018). The biomarkers of this study were considered stable when changes observed in the stored samples did not exceed the significant change limit (SCL) acceptable for the assay, which was defined as SCL =100% ± 2 x Intra-CV (Gröschl et al., 2001). Changes outside the SCL and with significant differences (ANOVA test of repeated measures, followed by Dunnett's multiple comparison test) from T0 were considered to have unacceptable stability for those storage conditions.

***Article nº6*: Saliva sampling material matters: effects on the results of saliva analysis in pigs**

This work describes a comparison of measurements of biomarkers in different collection materials in saliva sampling in order to see if they could differently affect the levels of salivary biomarkers.

1. Specific material and methodology

1.1 Sampling

Saliva was collected using two different materials:

- Cotton rolls (Salivette®, Sarstedt, Aktiengesellschaft and Company, D-51588 Nümbrecht, Germany).
- Polypropylene sponges manually cut (Esponja Marina, La Griega E. Koronis, Madrid, Spain).

Each collection material was clipped to a flexible thin metal rod. This system allows the pig to chew two devices at the same time by introducing both into the same side of the pig's mouth.

1.2 Assays

A panel of 13 salivary analytes was measured including biomarkers of stress, inflammation, biomarkers of immune system, sepsis, biomarkers related to redox status and other analytes related to metabolism and physiological status of different tissues and organs. The technics used were:

- Automated analyzer Olympus AU600.
- The AlphaLISA technology.

2. Experimental design

A total of 41 pigs in their growing-finishing phase (100 days, 60 kg mean body weight, 20 males, 21 females) were used in this study.

2.1 Validation of the sampling procedure used for the comparison of the materials

Ten healthy pigs for each validation were used. Two equal pieces of both materials were introduced in the pigs' mouths at the same time for one minute in order to obtain two different samples from each animal:

- C1 and C2: two equal pieces of cotton (cotton-cotton combination)
- P1 and P2: two equal pieces of polypropylene sponge (sponge-sponge combination)

The results obtained with a similar material (sponge-sponge and cotton-cotton combinations) were compared using the Wilcoxon test. Once it was demonstrated there were no significant differences between the biomarkers analysed, between the two samples obtained from each pig, using this double collection system, therefore, two different materials could be tested at the same time with this procedure.

2.2 Comparison between Cotton versus Polypropylene for Saliva Collection

The effect of different sampling materials on the salivary results was evaluated; one device with cotton and another with a polypropylene sponge (cotton-sponge combination), were used simultaneously for sampling a total of 21 pigs.

Those animals were subdivided into two different groups:

- Group 1 (n =10): pigs with no clinical signs of disease at farm inspection, so they were considered healthy.
- Group 2 (n =11): pigs with lameness when they achieved a score >1 for their lameness score (Main et al., 2000).

Two–way ANOVAs of repeated measures followed by Sidak's pairwise comparisons were performed after logarithmic transformation of data, in which the results obtained were compared considering the different materials and health status of the animals as fixed factors. Each pair of data was also plotted and analyzed by linear regression analysis, and Bland-Altman plots were constructed (Bland and Altman, 1999; Giavarina, 2015).

Objective 3. Response of selected salivary biomarkers to different pathologies and their treatment

The articles nº7 and nº8 are related to objective 3. Changes of biomarkers related to inflammation, immunity, redox status, stress and tissue damage in porcine saliva from pigs suffering from two conditions:

–Diarrhoea due to *E. coli* (Article nº 7).
–Meningitis due to *S. suis* (Article nº 8).

Article nº 7. Changes in S100A8/A9 and S100A12 and their comparison with other analytes in the saliva of pigs with diarrhea due to E. coli

This article showed changes of selected calgranulins, S100A8/A9 (also known as calprotectin) and S100A12, in a clinical condition consisting of pigs with diarrhea due to *E. coli*. This data was compared with other analytes in order to explore the possible causes or mechanisms involved in these changes. Following these results, the ability of the different analytes to differentiate between the diseased animals and healthy individuals was analysed, and the correlations between these analytes and calgranulins were studied.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

A total of 12 methods were used in this article using porcine saliva as a sample. Calgranulins S100A8/A9 and S100A12, biomarkers of inflammation, stress, immune system, tissue damage, sepsis and redox status, were measured using different techniques:

- Automated analyzer Olympus AU600.
- The AlphaLISA technology.
- Porcine species-specific commercially available ELISA kit.

2. Experimental design

A total of 72 crossbred weaning pigs (Pietrain x Large White x Landrace, age 4 to 8 weeks) from a commercial farm located in Spain were included. Pigs were divided into two groups:

- *E.coli* group (n =34, 18 males and 16 females): a group of pigs with naturally occurring diarrhea caused by *E. coli*.
- Healthy group (n =38, 17 males and 21 females): a group of clinically healthy pigs that did not show any clinical signs upon external examination.

For group comparison, the Mann-Whitney test was used to assess the differences in each variable. Each variable's receiver operating characteristic (ROC) curve was calculated to determine the cut–off that distinguished between groups. Those analytes showing a significant area under the curve (AUC) were selected to calculate the cut–off values by the point on the ROC curve with the minimum distance from the left-upper corner of the unit square as previously described (Perkins and Schisterman, 2006). A correlation study between the different analytes evaluated was performed through the Spearman test.

***Article nº 8*: Changes in immunity- and stress- biomarkers in saliva following treatment of pigs with meningitis due to Streptococcus suis**

The objective of this research was to assess changes in biomarker levels of acute phase proteins, immune system analytes and stress biomarkers in porcine saliva after treatment for meningitis caused by *S. suis*. In addition, this research also provides data on the analytical validation of two new methods to quantify C-reactive protein (CRP) and Hp in pig saliva. These new methods were developed using AlphaLISA technology and offer the advantages of low sample volumes and the avoidance of washes in their procedure.

1. Specific material and methodology

1.1 Assays

A total of six salivary biomarkers were measured in porcine samples:

- Hp and CRP were validated in pig saliva by newly developed sandwich immunoassays using AlphaLISA (PerkinElmer, MA) technology.
- Adenosine deaminase (ADA), calprotectin, total protein (TP) and alpha-amylase (sAA) were measured on automated chemistry analysers (Olympus AU 400 Olympus Diagnostica GmbH1, Hamburg, Germany).

2. Experimental design

A total of 28 piglets (Landrace x Large-White, age 7-8 weeks and weight of 12-15 kg), from a commercial farm in Southern Spain were included in the trial. Pigs were enrolled based on clinical signs compatible with *S. suis* meningitis (circling, seizures, paddling in lateral position, head tilts, nystagmus, arthritis, and hyperthermia) (Werinder et al., 2020) and classified from mild to severe disease based on a severity scale previously published (López-Martínez et al., 2023).

Three samples were taken from pigs included in the study:

- D0: before treatment.
- D3: three days after treatment.
- D7: one week after starting treatment.

The treatment was the standard treatment at the farm and started immediately after the onset of clinical signs, consisting of a protocol based on antibiotics and corticosteroid anti–inflammatory (MacInnes and Desrosiers, 1999; Neila-Ibáñez et al., 2023). The antibiotic was selected based on previous antibiograms where the pathogen was sensitive to antibiotics from D group, specifically amoxicillin and aminopenicillins.

During follow–up, the animals were visited at least twice a day, in the morning and afternoon, by the operator and were offered water and food. Animals were classified as:

- Recovery group, Group A: piglets that responded well to treatment without clinical signs of disease with a grade of severity 1.
- Non–recovery group, Group B: piglets that did not recover completely after treatment and still showed signs such as chronic arthritis or head lateralization with a grade of severity 2 to 4.

The selected farm had a history of recurrent *S. suis* outbreaks and the pathogen was isolated by culture and serotyped by Multiplex PCR from different samples of the pigs included in the study. Piglets that died during the study presented *S. suis* serotypes 1 and 2 (1/2), one of the most common virulent serotypes in European farms (Segura et al., 2020; Neila-Ibáñez et al., 2023).

GLMs were initially used to evaluate the main effects of time, group, and their interaction independently for each biomarker, in which time and groups were considered as fixed factors, with the individual considered as a random factor. Statistical analyses of GLMs were conducted using the IBM SPSS Statistics package (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Changes over time were assessed by the non-parametric Friedman's test followed by Dunn's multiple comparison tests using GraphPad Prism 6. A correlation study between the different biomarkers analysed was also performed.

RESULTS OF THE DIFFERENT OBJECTIVES

Objective 1. Validation of new assays to measure biomarkers in porcine saliva

Results of the articles nº1 and nº9 related to objective 1 are described below.

***Article nº1*: Automated assays for trace elements and ferritin measurement in saliva of pigs: Analytical validation and a pilot application to evaluate different iron status**

1. Analytical validation results for the measurement of Fe, Zn, Cu and ferritin in the saliva of pigs

For reproducibility, the averages of the CVs obtained in the intra- and inter-assay study from the saliva samples with high, medium, and low Fe, Zn and Cu and ferritin concentrations were in all cases <12%.

For accuracy, the results of the R^2 from serial dilutions of two different porcine saliva samples with high and medium Fe, Zn and Cu and ferritin concentrations were R^2 >0.99 in all cases. The variation percentage in the recovery tests for Fe, Zn, Cu and ferritin was <9% regarding the expected concentration.

For sensitivity, the detection limits of the assay for Fe, Zn, Cu and ferritin were 13.84 µg/dL, 6.32 µg/dL, 0 µg/dL, and 1.49 µg/L, respectively.

The linear regression analysis results between the ICP-MS method and the automated assays for Fe, Zn and Cu showed R^2 >0.86, R^2 >0.94 and R^2 >0.92, respectively. The slope was significantly different from zero in all cases (p <0.001).

2. Changes in piglets with different Fe supplementation conditions

2.1 Hematology analytes

Several red blood cell indices such as hemoglobin and hematocrit were statistically higher in group A (supplemented with iron) than in group B. Conversely, other parameters of blood count such as reticulocyte cell count and percentage were statistically lower in group A than in group B.

2.2 Plasma analytes

At the age of 4 weeks, median ferritin levels in plasma were significantly higher in group A as compared with group B (p <0.001). Although Fe in plasma showed a higher mean value in the group A than in group B, it was not statistically significant.

2.3 Saliva analytes

Median salivary ferritin levels were statistically significantly higher in group A as compared to group B (p <0.001). Salivary Fe showed higher median values in group A but not significantly different compared to the group B. Zn was significantly higher in group A than in group B (p <0.01). There were no statistically significant differences for Cu between the experimental groups.

***Article nº9*: Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) in saliva of pigs: evaluation of two commercially available ELISA kits for its measurement and distribution of its main components**

1. Reactivity of the assays with porcine saliva, analytical validation and changes in tail biting

Only the ELISA kits C and D were analytically validated since assay A did not show linearity in the measurements made in serial dilutions of saliva samples and kit B did not show values higher than its limit LoD.

For ELISA kits C and D imprecision, the CV (%) was below 14% in all cases. Both kits showed R^2 close to 1 after serial dilutions of pig saliva.

For kit D, pigs with tail biting showed higher levels of ITIH4 than the control group (p <0.05). However, no differences were shown between the two groups when kit C was used. A moderate correlation between ITIH4 values of kit D and Hp values was found (r =0.58, p <0.001).

2. ITIH4 components distribution in saliva

The purified protein showed four main bands under denaturing conditions using SDS:

- (1) around 200 kDa.
- (2) around 120 kDa.
- (3) around 80 kDa.
- (4) around 60 kDa.

After denaturation using DTT and heating at 95ºC, bands 3 and 4 were maintained, and an additional band was seen:

- (5) around 30 kDa.

In WB, the commercial and the antibody developed in our report showed for purified ITIH4 one band around 200 kDa and another around 80 kDa. However, the antibody developed in our report showed a higher intensity of the bands and also a band around 120 kDa that did not appear with the commercial antibody.

In porcine plasma samples, when the commercial antibody was used, bands around 200 and 120 kDa were detected. The polyclonal antibody developed in our

report showed the same two bands as the commercial antibody and also bands around 80 kDa and 60 kDa.

In porcine saliva samples, when the commercial antibody was used, bands at 200, 60 and 30 kDa were detected. With the antibody developed in our laboratory there were bands at around 200 kDa and 120 kDa, and also bands between 60 and 30 kDa in some samples.

Objective 2. Effect of pre- analytical factors on selected salivary biomarkers

The following results of the articles nº2, nº3, nº4, nº5, and nº6 are related to objective 2.

Article nº2: Changes in a comprehensive profile of saliva analytes in fattening pigs during a complete productive cycle: a longitudinal study

According to the results, 28 of 29 biomarkers analysed showed statistically significant changes in the study performed with the exception of hydrogen peroxide. Biomarkers were divided into those whose concentrations increase or decrease throughout productive cycle of the animals.

In the group of salivary biomarkers that decrease, they could be divided into two subgroups:

- Analytes that started to decrease their concentration at the end of the growing phase: sAA, total esterase activity (TEA), butyrylcholinesterase (BChE), oxytocin, Hp, ferric reducing ability of saliva (FRAS), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), ɣ-glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), calcium (Ca) and TP.
- Analytes that started to decrease their concentration at nursery, being also divided into two other groups:
    - Analytes that increased later at growing phase, but did not reach the values at lactation: ADA1, ADA2, advanced oxidation protein products (AOPP) and aspartate aminotransferase (AST).
    - Analytes that returned to initial values at the end of the growing phase: chromogranin A (CgA), lipase (Lip), cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), uric acid (UA) and urea.

In the group of salivary analytes that showed significant increases over time in their concentration, they could also be subdivided into three groups:

- Analytes that increased and remained high at the end of the growing phase: creatinine.
- Analytes that increased during the nursery period, then returned to values similar to those at lactation at the end of the growing phase: reactive oxygen–derived compounds (d-ROMs) and glucose.

- Analytes that increased at nursery followed by a decrease below lactation values by the end of the growing phase: cortisol, lactate and phosphorous (P).

Different values between sexes were observed in some analytes. Females showed higher values of TEA, Lip, CUPRAC, FRAS, UA, AOPP, ALT, AST, GGT, CK, urea, glucose, P and TP. Those differences were mainly seen by the end of nursery and growing phases.

Performance parameters, such as weight at birth, weight gain, and BF, were measured from each animal. Linear regression analyses results performed with those covariates that significantly affected the salivary biomarkers in these conditions showed that GGT and LDH had a weak relationship with the birth weight of the piglets and with BF, respectively. Nevertheless, B-coefficients were close to 0, so that only a scarce percentage of the variability of the dependent variables could be predicted by salivary biomarkers.

***Article nº3*: Evaluation of the effect of sampling time on biomarkers of stress, immune system, redox status and other biochemistry analytes in saliva of finishing pigs**

A total of 29 salivary analytes were measured in this article during different moments of the day. The biomarkers that showed significant changes compared to other sampling times were the following:

- Higher values at 08:00 h: LDH and lactate.
- Higher values at 16:00 h: cortisol, sAA, TEA, ADA1 isoenzyme only in females, BChE, SOD only in females, ALT, AST, ALP, CK and triglycerides.
- Higher values at 20:00 h: Lip, ADA2 isoenzyme only in females and UA.

No significant effects were observed between the different hours of the day in most of the redox status biomarkers, for urea, creatinine, glucose, Ca and P.

***Article nº4*: Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs**

1. Effects of pen faeces and feed

Regarding pen faeces:

- High levels addition did not change the values of cortisol measured by chemiluminescence, Hp, CK, LDH, ADA, and SOD.
- Low levels addition did not change the values of cortisol, Hp, oxytocin, CK, ADA, SOD, sAA, UA, TP, glutathione peroxidase-like (GPOX) and Reactive oxygen-derived compounds (d-ROMs).

Regarding pen feed:

- After high levels addition, all biomarkers except CK, LDH, ADA, UA and hydrogen peroxide were affected.
- Low levels addition did not change statistically significant levels of CK, oxytocin, LDH, ADA, UA, hydrogen peroxide, cortisol measured by AlphaLISA, SOD, GPOX, d-ROMs, and GGT.

2. Effects of procedures (centrifugation, filtration, and chemical clarification with chitosan) to remove oral fluid's contaminants

In general, the results of biomarkers affected by sample contamination did not improve after the treatments, with the exception of TP and d-ROMs, in HD; AOPP in LD and LF, or hydrogen peroxide in all treatments that retrieved the levels of biomarkers with a median deviation ≤ ±15% compared to analyses in clean aliquots (100%).

Centrifugation was the method that caused the most improvements in comparison to untreated aliquots:

- Reduction of effect of pen faeces: TP, hydrogen peroxide, d-ROMs, GGT and AOPP.
- Reduction of effect of pen feed: CK, hydrogen peroxide, GGT and AOPP.

***Article nº5*: Trace Elements and Ferritin in Pig Saliva: Variations during Fattening, Time of Sampling, Effect of Dirtiness and Stability under Different Storage Conditions**

1. Evaluation of changes in Zn, Cu, Fe and ferritin in fattening pigs during a complete productive cycle (longitudinal study)

Variations in selected salivary trace elements and ferritin were found in pigs during the productive fattening phases:

- Zn concentrations reached the highest values at the beginning of nursery. Then a progressive decrease was observed until the end of the growing phase.
- Cu concentrations were lower at lactation and then significantly increased, reaching their peak at the beginning of nursery. Then Cu decreased in the growing phase.
- Fe concentrations were higher at lactation and the beginning of nursery; then, they decreased by the end of nursery and values remained stable since then.
- Ferritin concentrations were higher at lactation, showing a strong decrease at the beginning of nursery. By the end of nursery, the ferritin concentrations achieved stable values until the end of the growing phase.

Besides, in females, significantly higher Cu and Fe concentrations were detected than in males at the end of the nursery and growing periods. Nevertheless, the evolution of salivary biomarker concentrations was similar in both sexes since time-gender interaction was not significant in any case.

2. Evaluation of changes in Zn, Cu, Fe and ferritin according to the time of sampling (diurnal variations study)

The results of time effect were significant for Zn and Cu salivary concentrations.

- Zn concentrations were significantly lower at 16:00 h compared to 12:00 h.
- Cu concentrations were significantly lower at 16:00 h and 20:00 h compared to 08:00 h.

No gender effect was observed in Zn and Cu throughout the hours of the day. Fe and ferritin salivary concentrations remained stable throughout the day, with no significant changes due to time or gender.

3. Influence of faecal and feed contamination of saliva samples in the measurements of Zn, Cu and Fe

The following results were seen after adding different quantities of faecal and feed to saliva samples, comparing the automated assays previously validated and the gold standard method ICP-MS:

- The addition of high concentrations of faeces or feed to the saliva samples significantly increased Zn, Cu and Fe values in both colorimetric and ICP methods (GLM $p < 0.001$ in all cases).
- No statistically significant changes were found in the colorimetric assays for Zn and Fe after the addition of low concentrations of feces or feed, whereas Cu was affected when the concentration of dirtiness was low.
- In the case of ICP assays, the presence of feces or feed at any concentration significantly increased the results in all analytes.

4. Storage Stability of Zn, Cu, Fe and ferritin

Aliquots from different saliva samples were stored under different temperature conditions to compare the stability of the analytes after long-term conservation:

- Zn showed no significant differences between the different storage conditions were observed after six months, but mean concentrations from samples stored at 4 ºC were higher and showed higher variability than the frozen ones at this time, and saliva stored at –20 ºC showed median levels out of SCL.
- Cu values were stable after one week at –20 ºC and –80 ºC. After six months, samples stored at –80 ºC showed median values more similar to controls and within SCL.
- Fe was stable until six months of storage at –80 ºC, with most of the values kept inside the SCL with no statistically significant changes at any time point.

- Ferritin showed a significant increase after six months of refrigeration with results out of SCL; whereas the values of frozen samples were maintained inside the SCL or nearby, with no statistically significant variation at any time point.

***Article nº6**: Saliva sampling material matters: effects on the results of saliva analysis in pigs*

1. Validation of saliva sampling collection system

The results obtained from the 14 salivary biomarkers in the validation of the sampling procedure (cotton-cotton and sponge-sponge) showed no statistically significant differences between the results obtained with either of the two saliva samples collected with cotton or with the two samples collected with the polypropylene sponge.

2. Comparison of the cotton-polypropylene combination for saliva collection in both healthy and diseased animals

Median (25th-75th percentiles) saliva volumes obtained were corrected with the grams of material used for collection, being for the cotton roll 2.50 (2.10-2.93) mL/mg, and for the polypropylene sponge 3.26 (2.40-4.09) mL/mg, being significantly higher with the sponge (p =0.010).

The material used for saliva collection had no significant effect on salivary biomarkers, except for CK, Hp and TP, which yielded lower values in the samples collected with the cotton roll.

When healthy and diseased animals were compared, all analytes showed a similar difference between groups with both cotton rolls and polypropylene sponges.

Linear regressions and Bland-Altman plots constructed using the values obtained with the cotton–sponge combination showed that the slopes were not significantly close to zero for all analytes. Bland-Altman plots indicated a bias significantly distant from zero (outside the 95% confidence interval) for CK, Hp and TP analyses, with a significant proportional bias for CK and Hp in favour of polypropylene. The rest of the analytes showed a bias within the 95% confidence interval, although proportionality was observed for oxytocin and PCT in favour of cotton.

Objective 3. Response of selected salivary biomarkers to naturally occurring pathologies and their treatment

The following results of the articles nº7 and nº8 are related to objective 3.

Article nº 7: Changes in S100A8/A9 and S100A12 and their comparison with other analytes in the saliva of pigs with diarrhea due to E. coli

1. **Variations of S100A8/A9 and S100A12 in the saliva of pigs with diarrhea due to *E. coli***

The concentrations of S100A8/A9 were significantly higher in the group of pigs with diarrhea due to *E. coli* (median =0.60 mg/L; range =0.12-3.2) compared with the group of healthy pigs (median = 0.18 mg/L; range =0.01-0.78) (p <0.001). In the case of S100A12, it was also increased in the saliva of pigs with diarrhea (median =1.4 mg/L; range =0.4-7.5) compared with healthy pigs (median =0.3 mg/L; range =0.1-1.9) (p <0.001).

2. **Changes of other salivary analytes in pigs with diarrhea due to *E. coli***

The other analytes measured in this article also increased in the group of pigs with diarrhea compared with healthy pigs:

- Biomarkers related to inflammation: Hp, ITIH4, and TP concentrations increased 3.08, 2.87, and 2.11-fold, respectively.
- Biomarkers related to immune system: ADA, showed increments of 5.46-fold.
- Biomarkers related to stress: salivary sAA was 4.93-fold higher.
- Biomarkers related to tissue damage: lactate and LDH, showed an increase of 3.83 and 2.86-fold.
- Biomarkers of sepsis: aldolase, an increase of 3.36-fold was observed.
- Biomarkers related to redox status: FRAS and AOPP, also exhibited changes 1.85 and 2.31–fold increase.

The ROC curve analyses showed AUCs of 0.88 and 0.81 for S100A12 and S100A8/A9, respectively. Additionally, AUCs higher than 0.8 were observed for ADA (AUC =0.87), aldolase (AUC =0.87), TP (AUC =0.87), ITIH4 (AUC =0.85), and Hp (AUC =0.84).

3. Correlation of salivary analytes

Spearman correlation analysis indicated a moderate positive correlation of S100A8/A9 with ADA (r =0.61; p <0.001) and ITIH4 (r =0.50; p =0.002). The S100A12 showed a high positive correlation with TP (r =0.81; p <0.001), and AOPP (r =0.75; p <0.001), and a moderate positive correlation with FRAS (r =0.69; p <0.001), LDH (0.63; p <0.001), ITIH4 (r =0.65; p <0.001), ADA (r =0.58; p <0.001), and lactate (r =0.54; p <0.001). A significant moderate correlation (r =0.65; p <0.001) was found between the two S100 proteins (S100A8/A9 and S100A12).

***Article nº 8*: Changes in immunity- and stress- biomarkers in saliva following treatment of pigs with meningitis due to Streptococcus suis**

1. Analytical validation of CRP and Hp AlphaLISA assays

The averages of the CVs obtained in the intra- and inter-assay imprecision from porcine saliva with high, medium, and low CRP and Hp concentrations were, in all cases, <12%.

The results of the R^2 from serial dilutions of two different porcine saliva samples with high and medium CRP and Hp levels were close to 1 (R^2 >0.99) in all cases. The mean of recovery percentage and standard deviation for CRP and Hp were 100.34 ± 8.15% and 94.48 ± 2.01%, respectively.

The LoD and the functional sensitivity of the methods were 0.32 and 0.86 µg/L for CRP and, 1.37 and 1.67 µg/L levels for Hp in pig saliva, respectively.

2. Changes in pigs with meningitis after treatment

Regarding CRP, the repeated measures analysis did not show a significant effect of time, effect of group, or interaction between time and group, indicating that CRP levels did not significantly change across the different time points and that the pattern of change over time did not differ between groups. However, Friedman test showed significant differences for CRP in group A (p <0.001). Dunn's post–hoc test in group A, revealed CRP concentrations being significantly lower at D3 (p =0.011) and D7 (p <0.001) compared to D0. No differences in CRP were detected in group B which did not respond adequately to the treatment.

In case of Hp levels, the repeated measures analysis revealed a significant effect of time [F(1,18) =7.07, p =0.016]. No significant interaction was observed between time and group or effect of group, suggesting that Hp levels were similar between groups. In case of post–hoc comparisons, Dunn's test showed concentrations of the Hp lower at D7 (p <0.001) compared to D0 and at D7 (p =0.021) compared to D3. No differences in Hp were detected in group B.

Regarding ADA, the repeated measures analysis showed a significant effect of time [F(1,18) =6.13, p =0.023], indicating a consistent downward trend across time points, and no significant interaction was found between time and group or effect of

group. Friedman test showed differences for ADA (p =0.018) in group A. Lower activity of ADA was found in group A at D7 compared to D0. In group B, no differences were found at any sampling time.

Regarding calprotectin levels, the repeated measures analysis showed a significant effect of time (F(1,18) =19.86, p <0.001), indicating a consistent decrease over time and did not show significant interaction between time and group or effect of group. Friedman test showed differences for calprotectin (p <0.001) in group A. Lower concentrations of calprotectin were found in group A at D7 compared to D0. In group B, no differences were found at any sampling time.

In case of TP, the repeated measures analysis revealed a significant effect of time (F(1,18) =5.69, p =0.028) and did not show significant interaction between time and group, and the effect of group on TP levels was also non-significant. Friedman test showed differences for TP (p =0.018) in group A. Lower concentrations of TP were found in group A at D7 compared to D0. In group B, no differences were found at any sampling time.

Regarding sAA, the repeated measures analysis showed a significant effect of time (F(1,18) =16.64, p <0.001), the interaction between time and group and the effect of group was not significant, suggesting similar temporal patterns in both groups. Friedman test showed differences for sAA in group A (p <0.001). Lower activity of sAA was detected at D3 and D7 as compared with D0 in group A. However, no differences in the activity of this enzyme were detected in group B.

3. Correlation analysis

In group A, Spearman correlation analysis showed a high positive correlation of CRP with Hp (r =0.77; p <0.001) and moderate positive correlation of CRP with calprotectin (r =0.56; p =0.001), with TP (r =0.50; p =0.005) and low correlation with sAA (r =0.43; p =0.018). In addition, there was a moderate positive correlation of Hp with calprotectin (r =0.69; p <0.001) and with TP (r =0.67; p <0.001). In group B, a similar correlation was found between CRP and Hp (r =0.75; p <0.001), and between CRP and calprotectin (r =0.60; p <0.001) and TP (r =0.56; p =0.001). Besides, a similar correlation was observed between Hp and calprotectin (r =0.69; p <0.001). In addition, Hp was highly correlated with TP (r =0.70; p <0.001), and there was a low correlation between ADA and CRP (r =0.47; p =0.009) and between ADA and Hp (r =0.48; p

=0.008). Correlation analysis of the biomarkers was also performed on all the data generated from both groups, showing a high positive correlation between Hp and CRP (r =0.73; p <0.001). There was a moderate correlation of Hp with TP (r =0.67; p <0.001), and also of calprotectin with CRP (r =0.56; p <0.001), with Hp (r =0.68; p <0.001) and TP (r =0.51; p <0.001). Finally, a low correlation was found between CRP and TP (r =0.48; p <0.001) and between ADA and calprotectin (r =0.49; p <0.001).

CONCLUSIONS

1. The new methods validated in pig saliva for measuring Zn, Cu, Fe and ferritin have the advantages of being automated, fast and easy to perform, and in case of trace elements, and there is no need for a deproteinization pre-treatment. Salivary porcine ITIH4 can also be measured by a commercial ELISA kit for porcine ITIH4 in a reliable way. Besides, CRP, Hp and S100A12 can be measured in saliva of pigs with AlphaLISA technology with a high sensitivity.

2. The analytes validated in the conclusion 1 detect changes in salivary biomarkers in different physiological and pathological situations: Zn and ferritin showed significant reductions in concentrations in pigs with deficit of Fe. Additionally, ITIH4, CRP, Hp, and S100A12 levels increased during inflammatory conditions.

3. Pre-analytical factors can affect the concentrations of salivary markers, particularly the stage of the production cycle, the timing of sample collection, and sex. Therefore, it is important to consider these factors when studies are performed or when results from other research are compared.

4. The degree and type of contamination in saliva samples, type of material for collecting saliva or conditions of storage until analysis are additional pre-analytical factors to consider. Ideally, special care should be taken during sampling to obtain clean oral fluid samples in order to avoid interferences in the analyses. Moreover, using the same type collection material would be desirable during the same study. In addition, measurements should be performed as soon as possible, or at least the saliva samples should be stored at –80ºC until the analyses.

5. Salivary analytes can change their concentrations in diseases such as diarrhea by *E. coli* and meningitis resulting from *S. suis* infection. Saliva can be used for monitoring the treatment of *S. suis* infection, with an effective response to the treatment associated with a decrease in Hp, CRP, TP, ADA, calprotectin and sAA.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La salud y el bienestar animal en el ganado son temas que han cobrado creciente interés debido a la alta demanda de la población (Nienhaus et al., 2020). En este sentido, las actividades de investigación para mejorar los métodos de evaluación del estado de salud y bienestar también han aumentado en las granjas porcinas (Czycholl et al., 2015).

Recientemente, investigadores han destacado la importancia de controlar las enfermedades infecciosas en las granjas porcinas, debido al gran tamaño de su población, la cantidad de animales transportados y los productos producidos (Henao–Diaz et al., 2020). Sin embargo, los biomarcadores no se utilizan de forma habitual en las granjas para evaluar la salud y el bienestar animal, ni con el objetivo de detectar alteraciones y patologías de forma temprana y fiable para prevenirlas. De esta manera, los análisis se basan en la realización de serologías para detectar enfermedades específicas, principalmente infecciosas como el circovirus porcino tipo 2 (Truong et al., 2001) o *Mycoplasma suis* (Hoelzle et al., 2007) pero no para evaluar el estado general del animal. Además, suelen utilizar muestras de sangre, cuya extracción produce un alto nivel de estrés en esta especie (Muneta et al., 2010).

La toma de muestras de sangre se considera una práctica rutinaria en la clínica veterinaria diaria, aunque este tipo de muestreo requiere personal y material especializado, así como buenas condiciones de higiene, especialmente en zonas rurales donde existe un mayor grado de suciedad y riesgo de infección (Pfaffe et al., 2011), En el caso de la especie porcina, resulta particularmente difícil debido a su gruesa capa de grasa corporal, la falta de vasos superficiales de fácil acceso y la susceptibilidad a desarrollar fácilmente estados de estrés (Tecles et al., 2017).

Las aplicaciones de la saliva como muestra biológica no invasiva para análisis de laboratorio se han investigado en los últimos años (Lamy and Mau, 2012) debido a los beneficios de su uso en el laboratorio (Cerón et al., 2022). La saliva posee un amplio espectro de componentes (Lima et al., 2010), muchos de ellos provenientes de la sangre y con utilidad diagnóstica en patología clínica como biomarcadores para evaluar el estado de salud (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017). La recolección de muestras de saliva es una práctica accesible y no invasiva, cuyo método de obtención es sencillo (Yoshizawa et al., 2013) y se puede realizar sin necesidad de adquirir habilidades especializadas (Kaufman and Lamster, 2002). En condiciones de campo, la obtención de

muestras de saliva permite un muestreo más sencillo, en menos tiempo, y también permite un muestreo más eficiente de un mayor número de animales (Pfaffe et al., 2011).

En esta línea surge el concepto de sialoquímica, que se define como un conjunto de analitos que pueden medirse en la saliva (Giri et al., 2018) y que actualmente involucra varios biomarcadores de diferentes perfiles bioquímicos, como estrés, inflamación, sistema inmunitario, estado de reducción-oxidación, sepsis, metabolismo y analitos relacionados con el estado de tejidos y órganos.

Esta tesis presentará avances en el conocimiento y aplicación de biomarcadores de saliva en cerdos, incluyendo el desarrollo de nuevos ensayos para su medición, el estudio de influencias preanalíticas y sus aplicaciones en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas.

OBJETIVOS

Los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral son avanzar en el conocimiento de los biomarcadores salivales porcinos y la influencia de factores preanalíticos y enfermedades en sus concentraciones:

- Objetivo 1. Validación de métodos nuevos para la medición de biomarcadores en saliva porcina:
    - Elementos traza y ferritina.
    - Inhibidor de inter-alfa-tripsina cadena pesada 4 (ITIH4).

  Los resultados de este objetivo están publicados en los artículos nº1 y nº9 (indicados en la sección de artículos).

- Objetivo 2. Evaluación del efecto de factores preanalíticos sobre biomarcadores salivales seleccionados. Estos factores incluyen el efecto del momento de muestreo, la fase productiva, el material de muestreo y las condiciones de almacenamiento. Los resultados de este objetivo están publicados en los artículos nº2, nº3, nº4, nº5 y nº6 (indicados en la sección de artículos).

- Objetivo 3. Evaluación de la respuesta de biomarcadores salivales seleccionados en determinadas patologías y su tratamiento. Esto incluye dos afecciones:
    - Diarrea por *Escherichia coli* (*E. coli).*
    - Meningitis por *Streptococcus suis* (*S. suis)*.

  Los resultados de este objetivo están publicados en los artículos nº7 y nº8 (indicados en la sección de artículos).

MATERIAL Y METODOLOGÍA GENERAL

1. Animales y consideraciones éticas

Grupos de diferentes cerdos (*Sus scrofa domesticus*) en una edad y fase productiva específica fueron muestreados en la Granja Docente Veterinaria de la Universidad de Murcia, España, y en otras granjas comerciales. Todos los procedimientos experimentales en animales fueron de acuerdo con el principio de las tres Rs siguiendo la legislación española (RD 53/2013) y europea (Directiva 2010/63/EU). Los animales fueron alojados y alimentados según la legislación europea (Junta Directiva 2001/88/CE de 23 octubre 2001 modificada de la Directiva 91/630/CEE respecto a mínimos estándares para la protección de los cerdos) y la legislación española (RD 1135/2002, respecto a mínimos estándares para la protección de los cerdos).

Los experimentos que requirieron manejo animal fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia (Comité Ético de Experimentación Animal, CEEA), bajo los números de protocolo CEEA 235/2016, 780/2022, y 937/2024. Los estudios cumplieron con las pautas ARRIVE para el cuidado y uso de animales. Un consentimiento informado fue obtenido de los propietarios de las granjas donde las muestras de cerdo fueron recogidas.

2. Muestreo de saliva y plasma

Las muestras de saliva fueron recolectadas usando tubos de recogida de saliva (Salivette, Sarstedt, Aktiengesellschaft & Co., Nümbrecht, Alemania) y esponjas sintéticas previamente reportadas (Contreras-Aguilar et al., 2019). En resumen, a cada animal se le permitió masticar suavemente una esponja (de 5 cm de largo y 2.5 cm de ancho), que estaba unida a una delgada y flexible varilla de metal, hasta que la esponja estuviera completamente humedecida, alrededor de 1-2 minutos. Cada esponja se introdujo en un tubo Salivette y se transportó en hielo al laboratorio. Una vez en el laboratorio, los tubos fueron centrifugados (3000 g, 10 min, 4 ºC), y las muestras de saliva fueron transferidas a tubos de 1.5 mL (Eppendorf Ibérica, España) y almacenadas a –80 ºC hasta el análisis. El tiempo promedio desde la recolección hasta la centrifugación fue de aproximadamente de 2 h.

Las muestras de sangre fueron recolectadas mediante punción de la vena yugular utilizando tubos con vacío de heparina (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA) y agujas 25 mm × 0.8 mm (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, USA). El plasma fue separado por centrifugación en el laboratorio (2000 g, 15 min, 4 ºC), transferido a tubos de 1.5 mL (Eppendorf Ibérica, España) y almacenado a –80 ºC hasta su uso.

3. Validación de métodos

La validación analítica se desarrolló en la mayoría de los artículos presentados en esta tesis para demostrar la fiabilidad de los ensayos recién desarrollados en el laboratorio. Por lo tanto, para cubrir esto, se evaluaron la reproducibilidad, la precisión y la sensibilidad siguiendo los siguientes conceptos generales.

Reproducibilidad: se evaluó mediante la imprecisión intra- e interensayo utilizando muestras de saliva de diferentes cerdos con diferentes concentraciones de analito.

La imprecisión intraensayo se calculó mediante la medición de cada muestra cinco veces en un mismo ensayo analítico (mismo día). La imprecisión interensayo se estableció midiendo las mismas muestras cinco veces en ensayos separados en diferentes días.

El posible efecto del descongelamiento y congelamiento repetido se eliminó almacenando alícuotas de cada muestra y utilizando una nueva alícuota para cada medición. El nivel de imprecisión se calculó como el coeficiente de variación (CV), siendo la desviación estándar (SD) de los replicados dividida por la media y expresada en porcentaje (CV% =SD/media×100).

Exactitud: fue evaluada indirectamente mediante linealidad bajo dilución y/o pruebas de recuperación.

Para evaluar la linealidad bajo dilución, las muestras de saliva con una alta concentración de cada analito se diluyeron de forma seriada con agua ultra pura o con el tampón de muestra del método. Cada uno fue analizado para realizar ecuaciones de regresión lineal con coeficientes de determinación (R^2) y representación gráfica de la concentración esperada y observada.

Para las pruebas de recuperación, se mezclaron dos muestras con una concentración baja y alta de analito en proporciones conocidas: 50%-50%, 25%-75% y

75%-25% (alta-baja respectivamente). Los porcentajes de recuperación se calcularon según la siguiente fórmula: resultados observados/resultados esperados×100.

Sensibilidad: se determinó mediante el límite de detección (LoD), que se define como la concentración más baja de analito que se puede detectar en una muestra de un espécimen de valor cero. Se calculó midiendo agua ultra veinte veces pura o el tampón diluyente de muestra del ensayo y se expresó como la media más tres desviaciones estándar de los resultados (LoD =media+3×SD). En algunos ensayos, el LoD se determinó midiendo 10 réplicas de una muestra con baja concentración y 20 réplicas de una muestra en blanco, y se calculó mediante la siguiente ecuación: LOD =LOB + 1.645 × SD de la muestra de baja concentración, donde LOB =media de la muestra en blanco + 1.645 × SD de la muestra en blanco (Shrivastava and Gupta, 2011).

La sensibilidad funcional, definida como la concentración más baja de una sustancia que un método puede medir con fiabilidad pequeñas cantidades de un analito dentro de unas condiciones de precisión y exactitud establecidas, se evaluó en algunos artículos mediante la dilución seriada de una muestra de saliva porcina con el tampón de ensayo y el análisis de cinco réplicas de cada dilución. Luego, se calcularon los CV de cada dilución, y la sensibilidad funcional se estableció en la concentración más baja que se pudiera medir repetidamente de forma exacta con un CV del 20% o menor (Armbruster and Pry, 2008).

4. Análisis estadístico

Los análisis de datos se realizaron utilizando software de hojas de cálculo (Excel Versión 10, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA), un paquete estadístico (GraphPad Prism 6 y 8, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) y le programa estadístico SPSS (IBM SPSS Estadístico para Windows, Versión 26.0. IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Se aplicó la prueba de normalidad de D'Agostino y Pearson para evaluar la distribución de los datos. Los parámetros descriptivos (media, SD, CV o mediana y rango), la regresión lineal y el R^2 se calcularon utilizando procedimientos estadísticos de rutina. El nivel de significancia para los resultados de la prueba *t* se estableció en $p < 0.05$.

Los estudios de correlación entre los diferentes biomarcadores analizados se realizaron mediante la prueba de Spearman para datos no paramétricos. El grado de correlación se evaluó utilizando la Regla Thumb (Hinkle et al., 2003).

METODOLOGÍA ESPECÍFICA Y DISEÑO EXPERIMENTAL DE LOS DIFERENTES OBJETIVOS

Objetivo 1. Validación de nuevos métodos para medir biomarcadores en saliva porcina

Los artículos nº1 y nº9 están relacionados con el objetivo 1 donde diversos métodos comerciales fueron analíticamente validados y testados para detectar cambios en diferentes condiciones:

– Elementos traza y ferritina (Artículo nº1).
– ITIH4 (Artículo nº9)

***Artículo nº1*: Ensayos automatizados para la medición de elementos traza y ferritina en la saliva de cerdos: Validación analítica y una aplicación piloto para evaluar diferentes estados de hierro**

En este trabajo, se evaluaron analíticamente los ensayos automatizados para la medición de hierro (Fe), zinc (Zn), cobre (Cu) y ferritina en saliva de cerdo. Además, se estudiaron posibles cambios de estos analitos en la saliva de cerdos con diferentes estados de hierro inducidos por la suplementación con Fe exógeno, lo que llevó a diferencias en los índices de glóbulos rojos y en el Fe y ferritina plasmáticos.

1. Material y metodología específica

1.1 Ensayos

Las muestras de saliva fueron recolectadas de cerdos con el fin de realizar una validación analítica. Los métodos usados en este artículo fueron:

- Fe fue analizado mediante un método colorimétrico (Iron-Ferrozine, 11,509, BioSystems S.A., Barcelona, España).
- Zn fue medido mediante un método colorimétrico (Zinc, ZN2341, Laboratorios Randox Ltd., Reino Unido).
- Cu fue medido mediante un método colorimétrico (Copper, CU2340, Laboratorios Randox Ltd., Reino Unido).
- Ferritina en muestras de saliva y plasma fue medida usando un método automatizado inmunoturbidimétrico (Ferritin látex, 31935, Biosystems S.A.,

Barcelona, España) disponible comercialmente para medir ferritina en plasma humano.

Las mediciones se realizaron en un analizador de química automatizado (Olympus AU 400 para ferritina, Zn y Cu; Olympus AU 600 para Fe, Olympus Diagnostica GmbH1, Hamburgo, Alemania).

Para completar la validación analítica, una comparación con un método de referencia, ICP-MS (Agilent 7900 Espectrometría de Masas-Plasma de Acoplamiento Inductivo) fue usado para las mediciones de Fe, Zn y Cu donde 25 muestras de saliva fueron analizadas mediante el método automatizado y por el método ICP-MS que es una técnica altamente sensible y exacta que usa un tratamiento de muestra de desproteinización (Montaño et al., 2016). Se utilizó análisis de regresión lineal para comparar los resultados del método automatizado después de medir Fe, Zn y Cu en 25 muestras de saliva de cerdo con el método ICP-MS.

Un analizador de hematología basado en láser (Siemens ADVIA 120 Healthcare Diagnostics) fue empleado para medir parámetros de rutina en células de la serie roja en el ensayo experimental.

2. Diseño experimental

2.1 Cambios en la saliva y el plasma de lechones con diferentes suplementaciones de Fe

Un total de 42 lechones en fase de crecimiento (edad 4 semanas, peso de 7 ± 1 Kg) que fueron seleccionados de forma aleatoria en este estudio experimental. Dos grupos de lechones fueron estudiados:

- Grupo A (*n* =22): Lechones a los que se les inyectó intramuscularmente con Fe exógeno comercial (Gleptoferron Labiana 200 mg/mL, 3575 ESP, LABIANA Life Sciences, S.A.) a la edad de 3 días de vida para prevenir la anemia, de acuerdo con manejo recomendado de los lechones en las granjas (Sutherland, 2015).
- Grupo B (*n* =20): Lechones que no recibieron la suplementación de Fe exógeno. En ambos grupos se recogieron las muestras de saliva a la edad de 4 semanas para comparar los niveles de los elementos traza del estudio y la ferritina.

La sangre y el plasma fueron utilizados para medir y comparar biomarcadores hematológicos, Fe y ferritina entre los grupos. Después de terminar el experimento, los lechones del grupo B fueron suplementados con Fe exógeno para evitar cualquier alteración de salud relacionada con una deficiencia de Fe y cumplir con el bienestar animal. Un test no paramétrico Mann-Whitney fue empleado para detector cambios significativos en los niveles de los biomarcadores estudiados.

Artículo nº9: Inhibidor de inter-alfa-tripsina cadena pesada 4 (ITIH4) en saliva de cerdo: evaluación de dos kits ELISA disponibles comercialmente para su medición y la distribución de sus principales componentes

El objetivo de este trabajo fue aportar conocimiento sobre la presencia y posibilidades de medir la proteína ITIH4 en saliva de cerdos, también conocida como proteína de fase aguda en el cerdo (Pig MAP), usando kits de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) comercializados para medir la ITIH4 en suero. El artículo también describe las diferentes formas de la proteína en saliva de cerdo, evaluadas mediante western blotting (WB) y su comparación con muestras de plasma usando un anticuerpo comercial anti- ITIH4 y un anticuerpo policlonal anti-ITIH4 porcina producido en el laboratorio.

1. Material y metodología específica

1.1 Ensayos

Cuatro kits ELISA que estaban comercialmente disponibles para medir ITIH4 en plasma de cerdo fueron evaluados para ver si había reactividad usando muestras de saliva de cerdo:

- Kit A: Fine test Pig MAP.
- Kit B: Acuvet ELISA pig-MAP.
- Kit C: Cusabio Pig MAP.
- Kit D: Elabscience ITIH4 Porcina.

1.2 Purificación de la ITIH4 nativa

La purificación de la proteína porcina nativa se realizó mediante un sistema automatizado de cromatografía líquida. (AKTA pure, GE Healthcare Life Sciences) utilizando una columna de afinidad recubierta con el anticuerpo policlonal recombinante

comercial anti-ITIH4 humana (Cloud-Clone Corp, Ref: PAH776Hu01). La columna (HiTrap NHS-activated HP 1 ml, cytiva.com/hitrap, GE Healthcare Life Sciences, Munich, Alemania). Se recubrió siguiendo las instrucciones del fabricante y posteriormente se purificó la proteína nativa a partir de plasma porcino procesado y tratado.

1.3 Inmunización y producción de anticuerpo

Para producir el anticuerpo policlonal en ovejas se siguió un protocolo descrito previamente (Leenaars and Hendriksen, 2005). Se seleccionó una oveja hembra joven de alrededor de 9 meses de edad para ser inmunizada con la proteína nativa purificada mezclada con adyuvante incompleto de Freund en proporción 1:1 (Freund's adjuvant, Incomplete; Sigma-Aldrich; Ref: F5506). La oveja se inmunizó inicialmente tres veces (con un intervalo de dos semanas entre cada inoculación). Se tomó una muestra de plasma de la vena yugular y se analizó mediante una prueba ELISA común para comprobar si la inmunización era adecuada y evaluar la titulación de anticuerpos. Para mantener la producción, la oveja se inoculó una vez al mes.

La columna de afinidad de proteína G HP HiTrap se utilizó para purificar el anticuerpo policlonal del plasma de oveja procesado y obtenido después de extracciones de sangre de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare Life Sciences, Munich, Alemania).

2. Diseño experimental

2.1 Evaluación de kits ELISA comerciales para diferenciar niveles salivales de ITIH4 en cerdos con inflamación de cerdos sanos

Tras la validación analítica, los kits ELISA fiables para medir ITIH4 en saliva porcina fueron evaluados con el fin de observar su capacidad para detectar una condición inflamatoria como la mordedura de cola. (Valros et al., 2022).

- Grupo TB (n= 13): Los cerdos del grupo con inflamación presentaron signos recientes de mordedura de cola.
- Grupo C (n= 14): Los cerdos del grupo control no presentaban lesiones en la cola.

Los cerdos tenían una edad similar (8-9 semanas) y procedían de una granja comercial de producción de lechones en el suroeste de Finlandia. Para confirmar la

presencia de inflamación en estos animales y también para comparar y estudiar su correlación con ITIH4, se utilizaron valores de haptoglobina (Hp), que también es una APP moderada en cerdos, como ITIH4 (Eckersall and Bell, 2010). Para la comparación entre grupos se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney y además se realizó un estudio de correlación entre ITIH4 y Hp mediante la prueba de Spearman.

2.2 Procedimientos para el SDS-PAGE y western blotting

La proteína nativa purificada en el laboratorio, las proteínas de plasma y saliva de cerdo se separaron a través de geles prefabricados de acrilamida al 12 % mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) (SurePAGE™, Bis-Tris, 10x8, 12%, 12 wells; Ref: M00668, Genescript, NJ, USA).

Uno de los geles se empleó para la identificación de la proteína purificada mediante un gel teñido con Coomassie (Azul Brillante Coomassie R-250). El ITIH4 porcino purificado para el gel teñido también se desnaturalizó con ditiotreitol al 4 % (GE Healthcare Life Sciences PlusOne DTT; Ref: 17-1318-02), calentado a 95º durante 5 y 20 minutos.

Los otros dos geles se transfirieron a dos membranas mediante electrotransferencia utilizando membranas de difluoruro de polivinilideno (PB9220, Power Blotter Pre-cut Membranes and Filters, PVDF mini, 0.45 µm pore, Invitrogen™). Luego una de las membranas se incubó con el anticuerpo comercial anti-ITIH4 y la otra membrana se incubó con el policlonal de fabricación propia, siendo ambas previamente marcadas con el kit HRP según las instrucciones del fabricante (Abcam, HRP Conjugation Kit - Lightning-Link®; Ref: ab102890). Se analizaron proteínas y muestras porcinas con el anticuerpo comercial y el anticuerpo de producción propia.

Objetivo 2. El efecto de los factores preanalíticos en la determinación de biomarcadores salivales seleccionados

Los artículos nº2, nº3, nº4, nº5 y nº6 están relacionados con el objetivo 2. El efecto del momento de la toma de la muestra, la fase productiva, el material de muestreo y las condiciones de almacenamiento de varios biomarcadores de diferentes perfiles bioquímicos.

– El efecto de la fase productiva en un panel de biomarcadores salivales (Artículo nº2).
– El efecto del momento de la toma de la muestra en un panel de biomarcadores salivales (Artículo nº3).
–Los efectos de la presencia de heces y alimento de los corrales en las mediciones de un panel de biomarcadores en fluido oral porcino (Artículo nº4)
– El efecto de factores preanalíticos en elementos traza y ferritina salival (Artículo nº5).
– El efecto del tipo de material para recoger muestras de saliva en diferentes biomarcadores salivales (Artículo nº6).

Artículo nº2: Cambios en un perfil exhaustivo de analitos salivales en cerdos de cebo durante un ciclo productivo completo: un estudio longitudinal

Este artículo se centra en posibles influencias fisiológicas en el perfil sialoquímico porcino en cerdos sanos de cebo en su ciclo productivo desde la fase de lactación hasta fase final de crecimiento de cebo. Además, las posibles influencias de género y parámetros productivos como peso al nacer, ganancia de peso y el espesor de grasa dorsal (BF) fueron estudiadas en estos biomarcadores salivales.

1. Metodología específica

1.1 Ensayos

Un total de 29 biomarcadores de estrés, inflamación, sistema inmunológico, estrés oxidativo y otros biomarcadores de función metabólica, orgánica y tisular fueron medidos en las muestras de saliva de los cerdos incluidos en el estudio utilizando diferentes técnicas:

- Analizador automatizado (Olympus AU600, Olympus Diagnostica GmbH, Ennis, Irlanda).
- Tecnología AlphaLISA (ensayos homogéneos de proximidad luminiscente amplificados, PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA).
- Ensayo inmunofluorométrico de resolución temporal.

2. Diseño experimental

Las muestras de saliva fueron recogidas de cerdos raza Large-White (25 machos y 25 hembras) de 5 camadas (tamaño medio de la camada de 10.0 ± 0.7). El peso medio de la camada fue de 1.93 ± 0.59 kg (1.83 ± 0.49 para hembras, 2.02 ± 0.66 para machos). La recogida de muestras y datos se realizó de la siguiente manera:

- T1: en la fase de lactación a los 24 días de edad (datos de peso).
- T2: fase inicial de transición, una semana después del destete 35 días de edad (datos de peso y muestras de saliva).
- T3: al final de la fase de transición a los 88 días de edad (datos de peso y muestras de saliva).
- T4: principio de la fase de crecimiento de cebo tras una semana de aclimatación a la edad de 99 días (datos de peso y muestras de saliva).
- T5: y al final de la fase de crecimiento de cebo a los 193 días de edad (datos de peso, muestras de saliva y datos de BF).

Los cambios en las diferentes mediciones a lo largo del tiempo se evaluaron mediante un Modelos lineales generales de medidas repetidas (GLMs), en los que el tiempo y el sexo se consideraron factores fijos, y el peso al nacer, la ganancia de peso y el BF se utilizaron como covariables. Los analitos que se observaron significativamente influenciados por las covariables se estudiaron con mayor profundidad mediante análisis de regresión lineal para determinar si los resultados analíticos pueden utilizarse para predecir parámetros de rendimiento. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS.

***Artículo nº3*: Evaluación del efecto del momento de muestreo en biomarcadores de estrés, sistema inmunológico, estado redox y otros analitos bioquímicos en saliva de cerdos de final de cebo**

Esta investigación evaluó si los valores de un panel de analitos salivales en el cerdo puede cambiar cuando se miden en salivas recogidas en diferentes momentos del día (8:00, 12:00, 16:00 and 20:00) y si estos cambios pueden estar relacionados con el género.

1. Material y metodología específica

1.1 Ensayos

Se midió un panel de 26 analitos salivales, incluidos biomarcadores de estrés, biomarcadores del sistema inmunitario, biomarcadores relacionados con el estado redox y otros analitos relacionados con el metabolismo y el estado fisiológico de diferentes tejidos y órganos. Las técnicas utilizadas fueron:

- Analizador automatizado Olympus AU600.
- Tecnología AlphaLISA (PerkinElmer, Inc., Massachusetts, USA).

2. Diseño experimental

Se seleccionaron aleatoriamente 40 cerdos para el experimento (20 machos y 20 hembras, de aproximadamente 21 semanas de edad). Se tomaron muestras de saliva de los cerdos el mismo día en cuatro momentos:

- 08:00 h
- 12:00 h
- 16:00 h
- 20:00 h

Los cambios diarios significativos en los biomarcadores salivales medidos se evaluaron mediante GLM considerando factores fijos como la hora (de 8:00 a 20:00 h) y el género. Cuando alguno de los factores fijos resultó significativo, se evaluó mediante un análisis univariante y una prueba post-hoc de Bonferroni.

***Artículo nº4*: Efectos de la contaminación de heces y alimento de corral y en la determinación de biomarcadores en fluido oral de cerdos**

Se mezcló fluido oral porcino limpio con dos concentraciones diferentes de heces o alimento de corral, con un nivel alto o bajo de contaminación de cada material, para observar su efecto en las mediciones de diferentes biomarcadores salivales. Posteriormente, las muestras se trataron con centrifugación, filtración o clarificación química para evaluar si estas técnicas podían revertir los efectos de dichos contaminantes en la evaluación de biomarcadores.

1. Material y metodología específica

1.1 Ensayos

Un total de 21 biomarcadores salivales fueron medidos para evaluar el efecto de la suciedad y los efectos de diferentes métodos para eliminar contaminantes. Los analitos seleccionados fueron de diferentes perfiles bioquímicos de estrés, inflamación, inmunidad, estado redox, daño muscular y de funciones de diferentes órganos.

- Analizador automatizado Olympus AU600.
- Tecnología AlphaLISA.
- Un inmunoensayo enzimático quimio-luminiscente competitivo comercial de fase sólida competitivo.

2. Diseño experimental

2.1 Efecto de las heces y alimento del corral

Las muestras fueron tomadas de 60 cerdos de final de cebo aparentemente sanos y se mezclaron en un total de 9 muestras. Tres grupos principales fueron diseñados para el experimento:

- Grupo C: muestras de fluido oral limpias.
- Grupo D: se añadieron heces en dos proporciones distintas: altas cantidades (grupo HD), que consistió en 250 mg heces mezcladas con 1 mL de fluido oral limpio, y bajas cantidades de heces (grupo LD), que consistió en 25 mg heces mezcladas con 1 mL de fluido oral limpio.
- Grupo F: se añadió pienso de la alimentación de los animales en dos proporciones: alta cantidad de pienso (grupo HF), fue preparado mezclando 250

mg de pienso con 1 mL de fluido oral limpio; y baja cantidad de pienso (grupo LF), que fue preparado añadiendo 25 mg de comida a 1 mL de fluido oral limpio.

2.3 Efectos de los procedimientos para eliminar los contaminantes del fluido oral

Tres alícuotas de cada grupo (HD, LD, HF, LF) fueron tratadas de la siguiente forma:

- Centrifugación: las alícuotas fueron centrifugadas a 20000 *g*, 4 ◦C por 60 min, traspasando el sobrenadante a tubos Eppendorf.
- Filtración: las alícuotas fueron filtradas mediante filtros comerciales de 1.2 µm (Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts, USA).
- Tratamiento químico: las alícuotas fueron tratadas añadiendo quitosano (Sigma Aldrich) en una proporción final de 10 mg/mL seguido por una centrifugación de 10000 *g,* 10 min, 4 ◦C y traspasando el sobrenadante a tubos Eppendorf.

Los datos fueron transformados logarítmicamente (Ln + 1). ANOVA de una vía (Análisis de efecto mixto para múltiples comparaciones) fue empleado para evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en los biomarcadores del fluido. El test Dunnett fue empleado para las múltiples comparaciones.

***Artículo nº5*: Elementos traza y ferritina en saliva de cerdo: Variaciones durante la fase de cebo, el momento de muestreo, el efecto de la suciedad y la estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento**

En este estudio Fe, Zn, Cu y ferritina fueron evaluados bajo diferentes condiciones fisiológicas y otras variables preanalíticas con el fin de evaluar posibles variaciones en las medidas debido a estos factores.

1. Material y metodología específica

1.1 Ensayos

Los ensayos empleados fueron los mismos mencionados previamente en el punto 1.1 del artículo nº1. Estos métodos fueron validados para medir los analitos en saliva porcina con una media de imprecisión intra e interensayo <12%, y una media del porcentaje de variación de los valores observados comparados con los valores esperados en el test de recuperación <9%.

2. Diseño experimental

2.1 Evaluación de los cambios del Zn, Cu, Fe y ferritina en cerdos de fase final de cebo en un ciclo productivo completo (estudio longitudinal)

Se emplearon muestras de saliva cerdo tomadas de 45 cerdos (Large-White, 24 machos y 21 hembras) de un estudio previo. Este experimento está descrito en el punto 2 del artículo nº2.

2.2 Evaluación de los cambios del Zn, Cu, Fe y ferritina respecto al momento de la toma de muestra (estudio de variaciones diurnas)

Se usaron muestras de saliva de cerdo de un estudio previo (20 machos y 20 hembras). Este experimento está descrito en el punto 2 del artículo nº3.

Para ambos estudios, se empleó un GLMs donde el tiempo y el sexo eran factores fijos. Un análisis univariable y un test post hock Bonferroni fueron realizados los factores fijos considerados como significativos.

2.3 Influencia de la contaminación fecal y de alimento en muestras de saliva para las mediciones de Zn, Cu y Fe

Muestras de saliva limpias fueron tomadas de cerdos de final cebo aparentemente sanos (aproximadamente 110 kg de peso y 5 meses de edad) y se mezclaron para formar grupos (n =16). El ensayo experimental se realizó con base en un estudio previo (Franco-Martínez et al., 2022). El alimento y las heces se recogieron de la misma granja.

Se prepararon cinco alícuotas de cada mezcla y se trataron de la siguiente manera:

- Grupo C (n =16): con 3.5 mL de saliva sin ningún tratamiento.
- Grupo HD (n =8) efecto de las heces de corral altas añadiendo 875 mg de heces de corral a 3.5 mL de saliva de cerdo limpia.
- Grupo LD (n =8): efecto de las heces de corral bajas añadiendo 87.5 mg de heces de corral a 3.5 mL de saliva de cerdo limpia.
- Grupo HF (n =8): efecto de la alta contaminación del alimento al agregar 875 mg de alimento a 3.5 mL de saliva limpia.
- Grupo LF (n =8): efecto de la baja contaminación del alimento al agregar 87.5 mg de alimento a 3.5 mL de saliva limpia.

La concentración de elementos traza de dichas mezclas se analizó por métodos colorimétricos, y también con ICP-MS, para evaluar el posible efecto del método de medición en las interferencias.

Los resultados obtenidos después de la adición de heces o alimento a la muestra se analizaron mediante GLM, seguido de una prueba post hoc de Bonferroni para comparaciones por pares.

2.4 Estabilidad de almacenamiento de Zn, Cu, Fe y ferritina

Se evaluó el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento a lo largo del tiempo en la medición de Zn, Cu, Fe y ferritina en saliva de cerdos. Se recogieron diez muestras de saliva de la Granja Docente de la Universidad de Murcia y se midieron tras la recolección (T0). Posteriormente, cada muestra se dividió en tres alícuotas:

- Una refrigerada a 4 ºC.
- Una congelada a –20 ºC.

- Una congelada a –80 ºC.

Las muestras se midieron en diferentes momentos del experimento:

- T0: antes del almacenamiento.
- TW: después de una semana de almacenaje en las diferentes condiciones.
- T6: tras 6 meses de almacenaje a diferentes temperaturas.

Los porcentajes de pérdida y recuperación de marcadores después de cada punto de medición se calcularon como porcentajes del análisis inicial. (T0 como 100% de cada concentración de analito de la muestra de saliva). Las mediciones se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: (T – T0) x 100/T0 (Escribano et al., 2018). Los biomarcadores de este estudio se consideraron estables cuando los cambios observados en las muestras almacenadas no excedieron el límite de cambio significativo (SCL) aceptable para el ensayo, que se definió como SCL =100% ± 2 x Intra-CV (Gröschl et al., 2001). Los cambios fuera del SCL y con diferencias significativas (prueba ANOVA de medidas repetidas, seguida de la prueba de comparación múltiple de Dunnett) desde T0 se consideraron como que tenían una estabilidad inaceptable para esas condiciones de almacenamiento.

Artículo nº6: El material de muestreo de saliva es importante: efectos sobre los resultados del análisis de saliva en cerdos

Este trabajo describe una comparación de mediciones de biomarcadores en diferentes materiales de recolección de muestras de saliva con el fin de ver si podrían afectar de manera diferente los niveles de biomarcadores salivales.

1. Material y metodología específicos

1.1 Toma de muestras

La saliva se recogió utilizando dos materiales diferentes:

- Rollos de algodón (Salivette®, Sarstedt, Aktiengesellschaft and Company, D–51588 Nümbrecht, Alemania).
- Esponjas de polipropileno cortadas manualmente (Esponja Marina, La Griega E. Koronis, Madrid, Spain).

Cada material de recolección se sujetó a una varilla metálica delgada y flexible. Este sistema permite al cerdo masticar dos dispositivos simultáneamente, introduciéndolos en el mismo lado de la boca.

1.2 Ensayos

Se midió un panel de 13 analitos salivales, incluyendo biomarcadores de estrés, inflamación, biomarcadores del sistema inmunitario, sepsis, biomarcadores relacionados con el estado redox y otros analitos relacionados con el metabolismo y el estado fisiológico de diferentes tejidos y órganos. Las técnicas utilizadas fueron:

- Analizador automatizado Olympus AU600.
- Tecnología AlphaLISA.

2. Diseño experimental

En este estudio se utilizaron un total de 41 cerdos en su fase de cebo (100 días, 60 kg de peso corporal medio, 20 machos, 21 hembras).

2.1 Validación del procedimiento de muestreo utilizado para la comparación de los materiales

Se utilizaron 10 cerdos sanos para cada validación. Se introdujeron simultáneamente dos piezas iguales de ambos materiales en la boca de los cerdos durante un minuto para obtener dos muestras diferentes de cada animal:

- C1 y C2: dos piezas iguales de algodón (combinación de algodón–algodón).
- P1 y P2: dos piezas iguales de esponja de polipropileno (combinación esponja–esponja).

Los resultados obtenidos con un material similar (combinaciones esponja-esponja y algodón-algodón) se compararon mediante la prueba de Wilcoxon. Tras demostrarse la ausencia de diferencias significativas entre los biomarcadores analizados en las dos muestras obtenidas de cada cerdo mediante este sistema de doble recolección, se pudo analizar simultáneamente dos materiales diferentes mediante este procedimiento.

2.3 Comparación entre algodón y polipropileno para la recolección de saliva

Se evaluó el efecto de diferentes materiales de muestreo sobre los resultados salivales, un dispositivo con algodón y otro con esponja de polipropileno (combinación algodón-esponja), se utilizaron simultáneamente para muestrear un total de 21 cerdos.

Estos animales se subdividieron en dos grupos diferentes:

- Grupo 1 (n =10): cerdos sin signos clínicos de enfermedad en la inspección de la granja, por lo que se consideraron sanos.
- Grupo 2 (n =11): cerdos con cojera cuando se alcanzó un puntaje >1 para su puntuación de cojera (Main et al., 2000).

Tras la transformación logarítmica de los datos, se realizaron análisis de varianza de dos vías (ANOVA) de medidas repetidas, seguidos de comparaciones por pares de Sidak. Los resultados obtenidos se compararon considerando los diferentes materiales y el estado de salud de los animales como factores fijos. Cada par de datos se representó gráficamente y analizó mediante análisis de regresión lineal, y se construyeron gráficos de Bland-Altman (Bland and Altman, 1999; Giavarina, 2015).

Objetivo 3. Respuesta de biomarcadores salivales seleccionados a patologías y su tratamiento

Los artículos nº7 y nº8 están relacionados con el objetivo 3. Cambios en biomarcadores relacionados con la inflamación, inmunidad, estado redox, estrés y daño tisular en saliva porcina de cerdos que padecen dos enfermedades:

–Diarrea debida a *E. coli* (Artículo nº 7).
–Meningitis debida a *S. suis* (Artículo nº 8).

Artículo nº 7. Cambios en S100A8/A9 y S100A12 y su comparación con otros analitos en la saliva de cerdos con diarrea por E. coli

Este artículo mostró cambios en calgranulinas seleccionadas, S100A8/A9 (también conocidas como Calprotectina) y S100A12, en una condición clínica consistente en cerdos con diarrea por *E. coli.* Estos datos se compararon con otros analitos para explorar las posibles causas o mecanismos implicados en estos cambios. Tras estos resultados, se analizó la capacidad de los diferentes analitos para diferenciar entre animales enfermos e individuos sanos, y se estudiaron las correlaciones entre estos analitos y las calgranulinas.

1. Material y metodología específicos

1.1 Ensayos

En este artículo se emplearon 12 métodos con saliva porcina como muestra. Las calgranulinas S100A8/A9 y S100A12, biomarcadores de inflamación, estrés, sistema inmunitario, daño tisular, sepsis y estado redox, se midieron mediante diferentes técnicas:

- Analizador automatizado Olympus AU600.
- Tecnología. AlphaLISA.
- Kit ELISA disponible comercialmente específico para la especie porcina.

2. Diseño experimental

Se incluyeron 72 lechones destetados (Pietrain x Large White x Landrace, de 4 a 8 semanas de edad) de una granja comercial ubicada en España. Los cerdos se dividieron en dos grupos:

- Grupo *E.coli* (n =34, 18 machos y 16 hembras): un grupo de cerdos con diarrea natural causada por *E. coli*.
- Grupo Sano (n =38, 17 machos y 21 hembras): un grupo de cerdos clínicamente sanos que no mostraron ningún signo clínico en el examen externo.

Para la comparación entre grupos, se utilizó la prueba de Mann-Whitney para evaluar las diferencias en cada variable. Se calculó la curva ROC de cada variable para determinar el valor de corte que diferenciaba a los grupos. Se seleccionaron los analitos con un área bajo la curva (AUC) significativa para calcular los valores de corte según el punto de la curva ROC con la distancia mínima desde la esquina superior izquierda del cuadrado unitario, como se describió previamente. (Perkins and Schisterman, 2006). Se realizó un estudio de correlación entre los diferentes analitos evaluados mediante el test de Spearman.

***Artículo nº 8*: Cambios en los biomarcadores de inmunidad y estrés en saliva durante el tratamiento de cerdos con meningitis debida a Streptococcus suis**

El objetivo de esta investigación fue evaluar los cambios en los niveles de biomarcadores de proteínas de fase aguda, analitos del sistema inmunitario y biomarcadores de estrés en saliva porcina tras el tratamiento de la meningitis causada por *S. suis*. Además, esta investigación también proporciona datos sobre la validación analítica de dos nuevos métodos para cuantificar la proteína C reactiva (CRP) y la Hp en saliva porcina. Estos nuevos métodos, desarrollados mediante la tecnología AlphaLISA, ofrecen las ventajas de un bajo volumen de muestra y la eliminación de lavados.

1. Material y metodología específicos

1.1 Ensayos

Se midieron un total de seis biomarcadores salivales en muestras porcinas:

- Hp y CRP se validaron en saliva de cerdo mediante nuevos inmunoensayos tipo sándwich desarrollados utilizando AlphaLISA (PerkinElmer, MA).
- La adenosina desaminasa (ADA), la calprotectina, la proteína total (TP) y la alfa-amilasa (sAA) se midieron en analizadores químicos automatizados Olympus AU 400.

2. Diseño experimental

Se incluyeron en el ensayo un total de 28 lechones (Landrace x Large-White, de 7-8 semanas de edad y 12-15 kg de peso), procedentes de una granja comercial del sur de España. Los cerdos se reclutaron según signos clínicos compatibles con meningitis por *S. suis* (movimiento en círculos, convulsiones, movimientos de decúbito lateral, inclinación de la cabeza, nistagmo, artritis e hipertermia). (Werinder et al., 2020) y se clasificaron de enfermedad leve a grave según una escala de severidad publicada previamente (López-Martínez et al., 2023).

Se tomaron tres muestras de cerdos incluidos en el estudio:

- D0: antes del inicio del tratamiento.
- D3: tres días después del tratamiento.
- D7: una semana después de iniciar el tratamiento.

El tratamiento fue el estándar en la granja y se inició inmediatamente después de la aparición de los signos clínicos y consistió en un protocolo basado en antibióticos y antiinflamatorios corticosteroides. (MacInnes and Desrosiers, 1999; Neila-Ibáñez et al., 2023). El antibiótico fue seleccionado en base a antibiogramas previos donde el patógeno era sensible a los antibióticos del grupo D, específicamente amoxicilina y aminopenicilinas.

Durante el seguimiento, el operario visitó a los animales al menos dos veces al día, por la mañana y por la tarde, y les ofreció agua y alimento. Los animales se clasificaron como:

- Grupo de recuperación, Grupo A: lechones que respondieron bien al tratamiento sin signos clínicos de enfermedad con un grado de severidad 1.
- Grupo sin recuperación, Grupo B: lechones que no se recuperaron completamente después del tratamiento y aún mostraban signos como artritis crónica o lateralización de la cabeza con un grado de severidad de 2 a 4.

La granja seleccionada presentaba antecedentes de brotes recurrentes de *S. suis*, y el patógeno se aisló mediante cultivo y serotipificó mediante PCR multiplex a partir de diferentes muestras de los cerdos incluidos en el estudio. Los lechones que fallecieron durante el estudio presentaron los serotipos 1 y 2 (1/2) de *S. suis*, uno de los serotipos virulentos más comunes en las granjas europeas (Segura et al., 2020; Neila-Ibáñez et al., 2023).

Inicialmente, se utilizaron los GLM para evaluar los efectos principales del tiempo, el grupo y su interacción de forma independiente para cada biomarcador. El tiempo y los grupos se consideraron factores fijos, mientras que el individuo se consideró un factor aleatorio. Los análisis estadísticos de los GLM se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS. (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Los cambios a lo largo del tiempo se evaluaron mediante la prueba no paramétrica de Friedman seguida de pruebas de comparación múltiple de Dunn utilizando GraphPad Prism 6. También se realizó un estudio de correlación entre los diferentes biomarcadores analizados.

RESULTADOS DE LOS DIFERENTES OBJETIVOS

Objetivo 1. Validación de nuevos métodos para medir biomarcadores en saliva porcina

Resultados del artículo nº1 y nº9 relacionados con objetivo 1 están descritos abajo.

Artículo nº1: Ensayos automatizados para la medición de elementos traza y ferritina en la saliva de cerdos: Validación analítica y una aplicación piloto para evaluar diferentes estados de hierro

1. Resultados de la validación analítica de las mediciones de Fe, Zn, Cu y ferritina en saliva de cerdos

Para la reproducibilidad, los promedios de los CV obtenidos en el estudio intra e interensayo de las salivas con concentraciones altas, medias y bajas de Fe, Zn y Cu y ferritina fueron en todos los casos <12%.

Para la exactitud, los resultados del R^2 de diluciones seriadas de dos muestras diferentes de saliva porcina con concentraciones altas y medias de Fe, Zn, Cu y ferritina fueron R^2 >0,99 en todos los casos. El porcentaje de variación en las pruebas de recuperación de Fe, Zn, Cu y ferritina fue <9% con respecto a la concentración esperada.

Para la sensibilidad, el límite de detección del ensayo para Fe, Zn, Cu y ferritina fue 13.84 µg/dL, 6.32 µg/dL, 0 µg/dL, y 1.49 µg/L, respectivamente.

Los resultados del análisis de regresión lineal entre el método ICP-MS y los ensayos automatizados para Fe, Zn y Cu mostraron un coeficiente de determinación de R^2 >0.86, R^2 >0.94 and R^2 >0.92, respectivamente. La pendiente fue significativamente diferente de cero en todos los casos (p <0.001).

2. Cambios en lechones en diferentes condiciones de suplementación de Fe

2.1 Analitos hematológicos

Varios índices de glóbulos rojos, como la hemoglobina y el hematocrito, fueron estadísticamente más altos en el grupo A (suplementado con hierro) que en el grupo B. Mientras que otros parámetros del recuento sanguíneo, como el recuento y el porcentaje

de células reticulocitarias, fueron estadísticamente más bajos en el grupo A que en el grupo B.

2.2 Analitos plasmáticos

A las 4 semanas de edad, la mediana de los niveles de ferritina plasmática fue significativamente mayor en el grupo A que en el grupo B (p <0.001). Si bien el Fe en plasma mostró un valor medio mayor en el grupo A que en el grupo B, este no fue estadísticamente significativo.

2.3 Analitos salivales

Los niveles medios de ferritina salival fueron estadísticamente significativamente mayores en el grupo A en comparación con el grupo B (p <0.001). El Fe salival mostró valores medios más altos en el grupo A, pero no significativamente diferentes en comparación con el grupo B. El Zn fue significativamente mayor en el grupo A que en el grupo B (p <0.01). No hubo diferencias estadísticamente significativas para Cu entre los grupos experimentales.

Artículo nº9: Inhibidor de inter-alfa-tripsina cadena pesada 4 (ITIH4) en saliva de cerdo: evaluación de dos kits ELISA disponibles comercialmente para su medición y la distribución de sus principales componentes

1. Reactividad de los ensayos con saliva porcina, validación analítica y cambios en la mordedura de cola

Solo los kits ELISA C y D fueron validados analíticamente ya que el kit A no mostró linealidad en las mediciones realizadas en diluciones seriadas de muestras de saliva y el kit B no mostró valores superiores a su límite LoD.

Para la imprecisión de ELISA C y ELISA D, el CV (%) fue inferior al 14% en todos los casos. Ambos kits mostraron un R^2 cercano a 1 después de diluciones seriadas de una saliva de cerdo.

En el kit D, los cerdos con mordedura de cola mostraron niveles más altos de ITIH4 que el grupo de control (p <0.05). Sin embargo, no se mostraron diferencias entre los dos grupos cuando se utilizó el kit C. Se encontró una correlación moderada entre los valores de ITIH4 del kit D y Hp. (r =0.58, p <0.001).

2. Distribución de la ITIH4 en saliva

La proteína purificada mostró cuatro bandas principales en condiciones de desnaturalización utilizando SDS:

- (1) Alrededor de 200 kDa.
- (2) Alrededor de 120 kDa.
- (3) Alrededor de 80 kDa.
- (4) Alrededor de 60 kDa.

Tras la desnaturalización mediante DTT y calentamiento a 95ºC, se mantuvieron las bandas 3 y 4, y se observó una banda adicional:

- (5) Alrededor de 30 kDa.

En los WBs, el anticuerpo comercial y el anticuerpo de desarrollo propio mostraron para el ITIH4 purificado una banda de alrededor de 200 kDa y otra de alrededor de 80 kDa. Sin embargo, el anticuerpo policlonal producido en el laboratorio mostró una mayor intensidad de las bandas y también una banda de alrededor de 120 kDa que no apareció con el anticuerpo comercial.

En muestras de plasma porcino, al utilizar el anticuerpo comercial, se detectaron bandas de alrededor de 200 y 120 kDa. El anticuerpo policlonal desarrollado en nuestro laboratorio mostró las mismas dos bandas que el anticuerpo comercial, además de bandas de alrededor de 80 y 60 kDa.

En muestras de saliva porcina, al utilizar el anticuerpo comercial, se detectaron bandas de 200, 60 y 30 kDa. Con el anticuerpo desarrollado en nuestro laboratorio, se detectaron bandas de alrededor de 200 y 120 kDa, así como bandas de entre 60 y 30 kDa en algunas muestras.

Objetivo 2. Efecto de factores preanalíticos en la determinación de biomarcadores salivales seleccionados

Los siguientes resultados de los artículos nº2, nº3, nº4, nº5 y nº6 están relacionados con el objetivo 2.

Artículo nº2: Cambios en un perfil exhaustivo de analitos salivales en cerdos de cebo durante un ciclo productivo completo: un estudio longitudinal

Según los resultados, 28 de los 29 biomarcadores analizados mostraron cambios estadísticamente significativos en el estudio realizado, con la excepción del peróxido de hidrógeno. Los biomarcadores se dividieron en aquellos cuya concentración aumenta o disminuye a lo largo del ciclo productivo de los animales.

Dentro del grupo de biomarcadores salivales que disminuyen los valores se podrían dividir en dos subgrupos:

- Analitos que comenzaron a disminuir su concentración al final de la fase de cebo: sAA, actividad total esterasa (TEA), butirilcolinesterasa (BChE), oxitocina, Hp, habilidad reductora férrica de la saliva (FRAS), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), ɣ-glutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa (LDH), creatina quinasa (CK), calcio (Ca) y TP.
- Analitos que comenzaron a disminuir su concentración desde la fase de transición, siendo también divididos en otros dos grupos:
    - Analitos que aumentaron más tarde en la fase de cebo, pero no alcanzaron los valores en la lactancia: ADA1, ADA2, productos avanzados de oxidación proteica (AOPP) y aspartato aminotransferasa (AST).
    - Analitos que volvieron a valores iniciales al final de la fase de cebo: cromogranina A (CgA), lipasa (Lip), capacidad antioxidante reductora cúprica (CUPRAC), ácido úrico (UA) y urea.

Dentro del grupo de analitos salivales que mostraron incrementos significativos con el tiempo en su concentración, también podrían subdividirse en tres grupos:

- Analitos que aumentaron y se mantuvieron altos al final de la fase de cebo: creatinina.

- Analitos que aumentaron durante el período de transición y luego volvieron a valores similares a los de la lactancia al final de la fase de cebo: compuestos reactivos derivados del oxígeno (d-ROMs) y glucosa.
- Analitos que aumentaron en transición seguido de una disminución en los valores por debajo de los obtenidos en lactación en la fase final de cebo: cortisol, lactato y fósforo (P).

Se observaron valores diferentes entre sexos en algunos analitos. Las hembras mostraron valores más altos de TEA, Lip, CUPRAC, FRAS, UA, AOPP, ALT, AST, GGT, CK, urea, glucosa, P y TP. Estas diferencias se observaron principalmente al final de las fases de transición y crecimiento.

Se midieron parámetros de rendimiento, como el peso al nacer, la ganancia de peso y la BF, en cada animal. Los resultados de los análisis de regresión lineal realizados con estas covariables que afectaron significativamente los biomarcadores salivales en estas condiciones mostraron que la GGT y la LDH tenían una relación débil con el peso al nacer de los lechones y con la BF, respectivamente. Sin embargo, los coeficientes B fueron cercanos a 0, por lo que solo un pequeño porcentaje de la variabilidad de las variables dependientes pudo predecirse mediante biomarcadores salivales.

***Artículo nº3*: Evaluación del efecto del momento de muestreo en biomarcadores de estrés, sistema inmunológico, estado redox y otros analitos bioquímicos en saliva de cerdos de final de cebo**

En este artículo se midieron un total de 29 analitos salivales en diferentes momentos del día. Los biomarcadores que mostraron cambios significativos en comparación con otros momentos de muestreo fueron los siguientes:

- Valores superiores a las 08:00 h: LDH y lactato.
- Valores superiores a las 16:00 h: cortisol, sAA, TEA, isoenzima ADA1 solo en hembras, BChE, SOD solo en hembras, ALT, AST, ALP, CK y triglicéridos.
- Valores superiores a las 20:00 h: Lip, ADA2 isoenzima solo en hembras y UA.

No se observaron efectos significativos entre las diferentes horas del día en la mayoría de los biomarcadores del estado redox, ni para urea, creatinina, glucosa, Ca y P.

***Artículo nº4*: Efectos de la contaminación de heces y alimento de corral y en la determinación de biomarcadores en fluido oral de cerdo**

1. Efectos de las heces y el alimento de los corrales

En cuanto al efecto de las heces:

- La adición de altos niveles no modificó los valores de cortisol medidos por quimioluminiscencia, Hp, CK, LDH, ADA y SOD.
- La adición de niveles bajos no modificó los valores de cortisol, Hp, oxitocina, CK, ADA, SOD, sAA, UA, TP, similar a la glutatión peroxidasa (GPOX) y compuestos reactivos derivados del oxígeno (d-ROMs).

En cuanto al efecto del alimento:

- Después de la adición de niveles altos, todos los biomarcadores excepto CK, LDH, ADA, UA y peróxido de hidrógeno se vieron afectados.
- La adición de niveles bajos no modificó los niveles estadísticamente significativos de CK, oxitocina, LDH, ADA, UA, peróxido de hidrógeno, cortisol medido por AlphaLISA, SOD, GPOX, d-ROMs y GGT.

2. Efectos de los procedimientos (centrifugación, filtración y clarificación química con quitosano) para eliminar los contaminantes del fluido oral

En general, los resultados de los biomarcadores afectados por la contaminación de la muestra no mejoraron después de los tratamientos, con excepción de TP y d-ROMs, en HD; AOPP en LD y LF, o peróxido de hidrógeno en todos los tratamientos que recuperaron los niveles de biomarcadores con una desviación media ≤ ±15% en comparación con los análisis en alícuotas limpias (100%).

La centrifugación fue el método que mayormente mejoró los efectos de los contaminantes en comparación con las alícuotas sin tratar:

- Reducción del efecto de las heces: TP, peróxido de hidrógeno, d-ROMs, GGT y AOPP.
- Reducción del efecto del alimento: CK, peróxido de hidrógeno, GGT y AOPP.

***Artículo nº5*: Elementos traza y ferritina en saliva de cerdo: Variaciones durante la fase de cebo, el momento de muestreo, el efecto de la suciedad y la estabilidad bajo diferentes condiciones de almacenamiento**

1. Evaluación de los cambios de Zn, Cu, Fe y ferritina en cerdos de engorde durante un ciclo productivo completo (estudio longitudinal)

Se encontraron variaciones en oligoelementos salivales seleccionados y ferritina en cerdos durante las fases productivas de engorde:

- Las concentraciones de Zn alcanzaron sus valores máximos al inicio de transición. Posteriormente, se observó una disminución progresiva hasta el final de la fase de cebo.
- Las concentraciones de Cu fueron menores durante la lactancia y luego aumentaron significativamente, alcanzando su pico máximo al inicio de transición. Posteriormente, el Cu disminuyó durante la fase de cebo.
- Las concentraciones de Fe fueron mayores en la lactancia y al inicio de transición, luego disminuyeron al final de la fase de transición y los valores se mantuvieron estables desde entonces.
- Las concentraciones de ferritina fueron mayores durante la lactancia, mostrando una marcada disminución al inicio de transición. Al final de transición, las concentraciones de ferritina alcanzaron valores estables hasta el final de la fase de cebo.

Además, en las hembras se detectaron concentraciones de Cu y Fe significativamente mayores que en los machos al final de los períodos de transición y cebo. No obstante, la evolución de las concentraciones de biomarcadores salivales fue similar en ambos sexos, ya que la interacción tiempo-género no fue significativa en ningún caso.

2. Evaluación de cambios de Zn, Cu, Fe y ferritina según el momento de muestreo (estudio de variaciones diurnas)

Los resultados del efecto del tiempo fueron significativos para las concentraciones salivales de Zn y Cu.

- Las concentraciones de Zn fueron significativamente más bajas a las 16:00 h en comparación con las 12:00 h.
- Las concentraciones de Cu fueron significativamente menores a las 16:00 h y a las 20:00 h en comparación con las 08:00 h.

No se observó ningún efecto de género en el Zn y el Cu a lo largo del día. Las concentraciones salivales de Fe y ferritina se mantuvieron estables a lo largo del día, sin cambios significativos debido a la hora o el género.

3. Influencia de la contaminación fecal y del alimento en muestras de saliva para las mediciones de Zn, Cu y Fe

Los siguientes resultados se observaron después de agregar diferentes cantidades de heces y alimento en muestras de saliva, comparando los ensayos automatizados previamente validados con el método ICP-MS:

- La adición de altas concentraciones de heces o alimento a las muestras de saliva aumentó significativamente los valores de Zn, Cu y Fe tanto en los métodos colorimétricos como en los de ICP (GLM $p < 0.001$ en todos los casos).
- No se encontraron cambios estadísticamente significativos en los ensayos colorimétricos para Zn y Fe después de la adición de bajas concentraciones de heces o alimento, mientras que el Cu se vio afectado cuando la concentración de suciedad fue baja.
- En el caso de los ensayos ICP, la presencia de heces o alimento en cualquier concentración aumentó significativamente los resultados en todos los analitos.

4. Estabilidad de almacenamiento de Zn, Cu, Fe y ferritina

Se almacenaron alícuotas de diferentes muestras de saliva en diferentes condiciones de temperatura para comparar la estabilidad de los analitos después de una conservación a largo plazo:

- El Zn no mostró diferencias significativas entre las diferentes condiciones de almacenamiento después de seis meses, pero las concentraciones medias de las muestras almacenadas a 4 ºC fueron mayores y mostraron una mayor variabilidad que las congeladas en ese momento y la saliva almacenada a –20 ºC mostró niveles medios fuera del SCL.

- Los valores del Cu fueron estables una semana a –20 ºC y –80 ºC. Después de seis meses, las muestras almacenadas a –80 ºC mostraron valores medios más similares a los controles y dentro del SCL.
- Los valores de Fe fueron estables hasta seis meses de almacenamiento a –80 ºC, con la mayoría de los valores mantenidos dentro del SCL sin cambios estadísticamente significativos en ningún momento.
- Los niveles de ferritina mostraron un aumento significativo después de seis meses de refrigeración con resultados fuera del SCL; mientras que los valores de las muestras congeladas se mantuvieron dentro del SCL o cerca, sin variación estadísticamente significativa en ningún momento.

***Artículo nº6*: El material de muestreo de saliva es importante: efectos sobre los resultados del análisis de saliva en cerdos**

1. Validación del sistema de recolección de muestras de saliva

Los resultados obtenidos de los 14 biomarcadores salivales en la validación del procedimiento de muestreo (algodón-algodón y esponja-esponja) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos con ninguna de las dos muestras de saliva recolectadas con algodón ni con las dos muestras obtenidas con la esponja de polipropileno.

2. Comparación de la combinación de algodón y polipropileno para la recolección de saliva en animales sanos y enfermos

Las medianas (percentiles 25-75) de los volúmenes de saliva obtenidos fueron corregidas por los gramos de material utilizado para la recolección, siendo con el rollo de algodón y la esponja de polipropileno 2.50 (2.10-2.93) mL/mg y 3.26 (2.40-4.09), respectivamente, siendo significativamente mayores con la esponja. (p =0.010).

El material utilizado para la recolección de saliva no tuvo efecto significativo en los biomarcadores salivales con excepción de CK, Hp y TP, que dieron valores más bajos en las muestras recolectadas con el rollo de algodón.

Cuando se compararon animales sanos y enfermos, todos los analitos mostraron una diferencia similar entre los grupos con rollos de algodón y esponjas de polipropileno.

Las regresiones lineales y los gráficos de Bland-Altman, construidos con los valores obtenidos con la combinación algodón-esponja, mostraron que las pendientes no eran significativamente cercanas a cero para todos los analitos. Los gráficos de Bland-Altman mostraron un sesgo significativamente alejado de cero (fuera del intervalo de confianza del 95%) para los análisis de CK, Hp y TP, con un sesgo proporcional significativo para CK y Hp a favor del polipropileno. El resto de los analitos mostraron un sesgo dentro del intervalo de confianza del 95%, aunque se observó proporcionalidad para la oxitocina y el PCT a favor del algodón.

Objetivo 3. Respuesta de biomarcadores salivales seleccionados a patologías y su tratamiento

Los siguientes resultados de los artículos nº7 y nº8 están relacionados con el objetivo 3.

Artículo nº 7: Cambios en S100A8/A9 y S100A12 y su comparación con otros analitos en la saliva de cerdos con diarrea por E. coli

1. **Variaciones de S100A8/A9 y S100A12 en la saliva de cerdos con diarrea por *E. coli***

Las concentraciones de S100A8/A9 fueron significativamente mayores en el grupo de cerdos con diarrea por *E. coli* (mediana =0.60 mg/L; rango =0.12-3.2) comparado con el grupo de cerdos sanos (mediana = 0.18 mg/L; rango =0.01-0.78) (p <0.001). En el caso de S100A12, también aumentó en la saliva de cerdos con diarrea (mediana =1.4 mg/L; rango =0.4-7.5) comparado con los cerdos sanos (mediana =0.3 mg/L; rango =0.1-1.9) (p <0.001).

2. **Cambios de otros analitos salivales en cerdos con diarrea por *E. coli***

Los demás analitos medidos en este artículo también aumentaron en la saliva del grupo de cerdos con diarrea en comparación con los cerdos sanos:

- Biomarcadores de inflamación: Hp, ITIH4, y TP, cuyos valores incrementaron 3.08, 2.87, y 2.11 veces, respectivamente.
- Biomarcadores del sistema inmunológico: ADA, mostró incrementos de 5.46 veces.
- Biomarcadores de estrés: sAA fue 4.93 veces mayor.
- Biomarcadores relacionados con el daño tisular: lactato, y LDH, mostraron un incremento de 3.83 y 2.86 veces.
- Biomarcadores de sepsis: aldolasa, se observó un incremento de 3.36 veces.
- Biomarcadores del estado redox: FRAS y AOPP, también mostraron un aumento de 1.85 y 2.31 veces.

Los análisis de la curva ROC mostraron AUCs de 0.88 y 0.81 para S100A12 y S100A8/A9, respectivamente. Adicionalmente, AUCs mayores de 0.8 fueron observados para ADA (AUC =0.87), aldolasa (AUC =0.87), TP (AUC =0.87), ITIH4 (AUC =0.85), y Hp (AUC =0.84).

3. Correlación de los analitos salivales

El análisis de correlación de Spearman mostró una correlación positiva moderada de S100A8/A9 con ADA (r =0.61; p <0.001) y ITIH4 (r =0.50; p =0.002). La S100A12 mostró una alta correlación positive con TP (r =0.81; p <0.001), y AOPP (r =0.75; p <0.001), y una correlación positiva moderada con FRAS (r =0.69; p <0.001), LDH (0.63; p <0.001), ITIH4 (r =0.65; p <0.001), ADA (r =0.58; p <0.001) y lactato (r =0.54; p <0.001). Una correlación moderada significativa (r =0.65; p <0.001) fue encontrada entre las dos proteínas S100 (S100A8/A9 y S100A12).

***Artículo nº 8*: Cambios en los biomarcadores de inmunidad y estrés en saliva durante el tratamiento de cerdos con meningitis debida a Streptococcus suis**

1. Validación analítica de CRP y Hp en ensayos AlphaLISA

Los promedios de los CV obtenidos en la imprecisión intra e interensayo de saliva porcina con concentraciones altas, medias y bajas de CRP y Hp fueron, en todos los casos, <12%.

Los resultados del R^2 de diluciones seriadas de dos muestras diferentes de saliva porcina con niveles altos y medios de CRP y Hp fueron cercanos a 1 (R^2 >0.99) en todos los casos. La media del porcentaje de recuperación y la desviación estándar para CRP y Hp fueron 100.34 ± 8.15% y 94.48 ± 2.01%, respectivamente.

La LoD y la sensibilidad funcional de los métodos fueron 0.32 y 0.86 µg/L para la CRP y, 1.37 y 1.67 µg/L niveles para la Hp en saliva de cerdo, respectivamente.

2. Cambios de los biomarcadores salivales en cerdos con meningitis después del tratamiento

Para la CRP, el análisis de medidas repetidas no mostró un efecto significativo del tiempo, del grupo ni de la interacción entre el tiempo y el grupo, lo que indica que los niveles de CRP no variaron significativamente en los diferentes puntos temporales y que el patrón de cambio a lo largo del tiempo no difirió entre los grupos. Sin embargo, la prueba de Friedman mostró diferencias significativas para la CRP en el grupo A. (p <0.001). La prueba post hoc de Dunn en el grupo A reveló que las concentraciones de CRP eran significativamente más bajas en D3 (p =0.011) y D7 (p <0.001) comparado con D0. No se observaron diferencias en la CRP en el grupo B que no respondió adecuadamente al tratamiento.

En el caso de la Hp, el análisis de medidas repetidas reveló un efecto significativo del tiempo [$F(1,18)$ =7.07, p =0.016]. No se observó interacción significativa entre el tiempo y el grupo, ni el efecto del grupo, lo que sugiere que los niveles de Hp fueron similares entre los grupos. En las comparaciones post-hoc, la prueba de Dunn mostró concentraciones de Hp más bajas en el día 7 (p <0.001) comparado con D0 y D7 (p =0.021) comparado con D3. No se detectaron diferencias en Hp en el grupo B.

Respecto a la actividad del ADA, el análisis de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo [F(1,18) =6.13, *p* =0.023], indicó una tendencia descendente constante en los distintos tiempos, y no se encontró interacción significativa entre el tiempo y el grupo ni efecto de grupo. La prueba de Friedman mostró diferencias para el ADA (*p* =0.018) en el grupo A. Se observó una menor actividad de ADA en el grupo A D7 en comparación con D0. En el grupo B, no se observaron diferencias en ningún tiempo del muestreo.

Respecto a los niveles de calprotectina (S100A8/A9), el análisis de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo (F(1,18) =19.86, *p* <0.001), Esto indica una disminución constante a lo largo del tiempo y no mostró una interacción significativa entre el tiempo y el grupo ni efecto de grupo. La prueba de Friedman mostró diferencias para la calprotectina (*p* <0.001) en el grupo A. Se encontraron concentraciones más bajas de calprotectina en el grupo A en el tiempo D7 comparado con D0. En el grupo B, no se encontraron diferencias en ningún momento del muestreo.

En el caso de TP, el análisis de medidas repetidas reveló un efecto significativo del tiempo (F(1,18) =5.69, *p* =0.028) no se observó una interacción significativa entre el tiempo y el grupo, y el efecto del grupo sobre los niveles de TP tampoco fue significativo. La prueba de Friedman mostró diferencias para TP (*p* =0.018) en el grupo A. Concentraciones más bajas de TP se observaron en el grupo A en D7 comparado con D0. En el grupo B, no se encontraron diferencias entre ninguna de las tomas.

Respecto a la actividad sAA, el análisis de medidas repetidas mostró un efecto significativo del tiempo (F(1,18) =16.64, *p* <0.001); la interacción entre el tiempo y el grupo, así como el efecto de grupo, no fue significativa, lo que sugiere patrones temporales similares en ambos grupos. La prueba de Friedman mostró diferencias para la sAA en el grupo A (*p* <0.001). Se detectó una menor actividad de sAA en D3 y D7 as comparado con D0 en el grupo A. Sin embargo, no se detectaron diferencias en la actividad de esta enzima en el grupo B.

3. Análisis de correlaciones

En el grupo A, el análisis de correlación de Spearman mostró una alta correlación positiva de CRP con Hp. (r =0.77; *p* <0.001) y una correlación moderada positiva de CRP con calprotectina (r =0.56; *p* =0.001) y con TP (r =0.50; *p* =0.005), y también una baja correlación con sAA (r =0.43; *p* =0.018). Además, hubo una

correlación positiva moderada de Hp con calprotectina (r =0.69; *p* <0.001) y con TP (r =0.67; *p* <0.001). En el grupo B, una correlación similar se encontró entre CRP y Hp (r =0.75; *p* <0.001) y CRP con calprotectina (r =0.60; *p* <0.001) y TP (r =0.56; *p* =0.001). Además, se observó una correlación similar entre Hp y calprotectina (r =0.69; *p* <0.001). Adicionalmente, Hp estaba altamente correlacionado con TP (r =0.70; *p* <0.001), y hubo una correlación baja entre ADA y CRP (r =0.47; *p* =0.009) y entre ADA con Hp (r =0.48; *p* =0.008). También se realizó un análisis de correlación de los biomarcadores con los datos generados de ambos grupos, mostrando una alta correlación positiva entre Hp y CRP (r =0.73; *p* <0.001). Se observó una correlación moderada de Hp con TP (r =0.67; *p* <0.001), y también de la calprotectina con CRP (r =0.56; *p* <0.001), con Hp (r =0.68; *p* <0.001) y con TP (r =0.51; *p* <0.001). Finalmente, una baja correlación se observó entre CRP y TP (r =0.48; *p* <0.001) y entre ADA y calprotectina (r =0.49; *p* <0.001).

CONCLUSIONES

1. Los nuevos métodos validados en saliva de cerdo para la medición de Zn, Cu, Fe, ferritina e insulina tienen las ventajas de ser automatizados, rápidos y fáciles de realizar, y en el caso de oligoelementos, no es necesario un pretratamiento de desproteinización. La ITIH4 se puede medir en saliva cerdo de forma precisa y exacta mediante un kit comercial específico. Además, los analitos CRP, Hp y la S100A12 pueden medirse en saliva de cerdo mediante tecnología AlphaLISA con alta sensibilidad.

2. Los métodos validados en la conclusión 1 detectan cambios en los biomarcadores salivales en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas: Zn y ferritina mostraron una reducción significativa en sus concentraciones en cerdos con déficit Fe. Adicionalmente, ITIH4, CRP, Hp y S100A12 aumentaron en situaciones de inflamación.

3. Los factores preanalíticos pueden afectar las concentraciones de marcadores salivales, sobre todo la fase del ciclo productivo, el momento del muestreo y el sexo. Por lo tanto, es importante tener en cuenta estos factores cuando se realizan estudios para medir algunos de estos biomarcadores salivales o cuando se comparan los resultados obtenidos con otras investigaciones.

4. El grado y tipo de suciedad de las muestras de saliva, el tipo de material para la recolección de saliva o las condiciones de almacenamiento hasta el análisis son factores preanalíticos adicionales a tener en consideración. Idealmente, se debe tener especial cuidado durante el muestreo para obtener muestras de fluidos orales limpios a fin de evitar interferencias en los análisis. Además, sería deseable utilizar el mismo tipo de material de recolección durante el mismo estudio y realizar las mediciones lo antes posible o, al menos, las muestras de saliva deberían almacenarse a –80 °C hasta el momento del análisis.

5. Los analitos salivales pueden variar sus concentraciones en enfermedades como la diarrea causada por *E. coli* y en meningitis por una infección de *S. suis*. La saliva puede utilizarse para el seguimiento del tratamiento de la infección por *S.*

suis, ya que la respuesta eficaz al tratamiento se asocia con una disminución de las concentraciones de Hp, CRP, TP, ADA, calprotectina (S100A8/A9) y sAA.

ARTICLES

Article 1

Article 1 (published)

Automated assays for trace elements and ferritin measurement in saliva of pigs: Analytical validation and a pilot application to evaluate different iron status

A. Ortín-Bustillo [a], G. Ramis Vidal [b,c], D. Escribano Tortosa [a,b], M. López-Arjona [a], C. Peres Rubio [d], J.J. Cerón [a], A. Muñoz-Prieto [e], L. Pardo-Marín [a], M.J. López-Martínez [a], M. Botia [a], S. Martínez-Subiela [a], A. Tvarijonaviciute [a], F. Tecles [a]

[a] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Campus of Excellence Mare Nostrum, University of Murcia, Espinardo, 30100 Murcia, Spain*

[b] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, Spain*

[c] *Instituto Murciano de Investigación en Biomedicina (IMIB), Murcia, Spain*

[d] *Department of Animal and Food Science, School of Veterinary Science, Universitat Autónoma de Barcelona, Spain*

[e] *Clinic for Internal Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Hiezelova 55, 10000 Zagreb, Croatia*

Journal: Research in Veterinary Science (ELSEVIER), 15 September 2022; Volume 152, Pages 410-416

Abstract: The aim of this study was to validate automated methods to measure iron (Fe), zinc (Zn), copper (Cu) and ferritin in pig saliva samples. A complete analytical validation was performed of all assays. In addition, these methods were applied to saliva of Fe supplemented (*n* =22) and non-supplemented (*n* =20) piglets. All assays were able to measure these biomarkers in pig saliva with adequate precision, accuracy and high sensitivity and, in case of trace elements without needing a deproteinization pre-process. The group of piglets supplemented with Fe presented significantly higher levels of ferritin and Zn in saliva. In conclusion, the automated assays evaluated were able to measure Fe, Zn, Cu and ferritin in saliva of pigs, and in case of trace elements, they have the advantage of not needing a deproteinization pre-treatment and thus these analytes can be measured in a simple and fast manner.

URL: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.007

Article 2

Article 2 (published)

Changes in a Comprehensive Profile of Saliva Analytes in Fattening Pigs during a Complete Productive Cycle: A Longitudinal Study

Alba Ortín-Bustillo [1], Damián Escribano [1,2], Marina López-Arjona [1], María Botia [1], Pablo Fuentes [3], Silvia Martínez-Miró [3], Camila P. Rubio [4], Edgar García-Manzanilla [5,6], Lorena Franco-Martínez [1,5], Luis Pardo-Marín [1], José J. Cerón [1], Pol Llonch [4] and Fernando Tecles [1]

[1] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[2] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[3] *Cefu S.A., 30840 Murcia, Spain*

[4] *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

[5] *Pig Development Department, Teagasc Grassland Research and Innovation Centre, P61 C996 Fermoy, Ireland*

[6] *School of Veterinary Medicine, University College Dublin, D04 V1W8 Dublin, Ireland*

Journal: Animals (MDPI), 21 July 2022; 12(14):1865

Abstract: A comprehensive panel of 29 salivary analytes was measured in fattening pigs to evaluate its possible changes along their productive cycle. The identification of those changes would allow a better interpretation of the results according to the productive phase of the animal. Saliva samples were obtained from 49 Large-White pigs (24 females, 25 males) in suckling phase, at the beginning and the end of the nursery phase, and at the beginning and the end of the growing phase. Several analytes changed according to the phase of the productive cycle, with most of the analytes showing higher values at lactation and at the beginning of nursery. Additionally, differences were seen due to sex. When possible relations between performance parameters and analytes were evaluated, significant positive but weak relationships were found between weight at birth and salivary γ-glutamyl transferase, and between back-fat thickness and salivary lactate dehydrogenase. In conclusion, differences in the values of salivary analytes can be found in fattening pigs depending on the productive phase and sex of the animals.

URL: https://doi.org/10.3390/ani12141865

Article 3

Article 3 (published)

Evaluation of the Effect of Sampling Time on Biomarkers of Stress, Immune System, Redox Status and Other Biochemistry Analytes in Saliva of Finishing Pigs

Alba Ortín-Bustillo [1], María D. Contreras-Aguilar [1], Camila P. Rubio [2], María Botia [1], José J. Cerón [1], Marina López-Arjona [1], Silvia Martínez-Subiela [1], Damián Escribano [1,3] and Fernando Tecles [1]

[1] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[2] *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

[3] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

Journal: Animals (MDPI), 19 August 2022; 12(16):2127

Abstract: This study aims to evaluate the possible variations due to the sampling time in the day in 26 analytes of pigs' saliva, related to stress, the immune system, redox status and other biomarkers related to metabolism and selected tissues and organs, in order to know the possible effects of the hour of the day in their interpretation. These analytes were measured in saliva obtained from a population of 40 clinically healthy pigs from 8 a.m. to 8 p.m., every 4 h in the same day. In our experimental conditions, daily variations were observed in cortisol, salivary α-amylase, total esterase activity, butyrylcholinesterase, lipase, adenosine deaminase isoenzyme 1, uric acid, superoxide dismutase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, creatine kinase, lactate dehydrogenase, lactate and triglycerides. These changes appeared in both sexes, except for adenosine deaminase isoenzyme 1 and superoxide dismutase which only showed differences in females. In conclusion, this report indicates that, in the experimental conditions of this trial, the time of the day and sex can influence the values obtained in various salivary analytes in pigs. These variations should thus be taken into consideration for an adequate interpretation of these analytes when used for the evaluation of health and welfare in this species.

URL: https://doi.org/10.3390/ani12162127

Article 4

Article 4 (published)

Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs

Lorena Franco-Martínez [a,1], Alba Ortín-Bustillo [a,1], Camila P. Rubio [a,d], Damián Escribano [a,b], Marina López-Arjona [a], Edgar García-Manzanilla [c], José J. Cerón [a], Silvia Martínez-Subiela [a], Asta Tvarijonaviciute [a], Fernando Tecles [a,*]

[a] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis (Interlab-UMU), Campus of Excellence Mare Nostrum, University of Murcia, Espinardo, 30100 Murcia, Spain*

[b] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Espinardo, Murcia, Spain*

[c] *Moorepark Animal and Grassland Research Centre, Teagasc, Irish Agriculture and Food Development Authority, P61 C996 Cork, Ireland*

[d] *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

1 These authors contributed equally to this article.

Journal: Research in Veterinary Science (ELSEVIER), 14 September 2022; Volume 152, Pages 403-409

Abstract: The present study aims to evaluate the possible effects of the presence of pen faeces and feed on the measurement of a panel of biomarkers in porcine oral fluid. For this, clean porcine oral fluid was pooled and incubated with two different concentrations of pen faeces or feed representing a high or low level of contamination with each material. In addition, these pools were aliquoted and subjected to centrifugation, filtration or chemical clarification to evaluate if these techniques could revert the effects of those contaminants in biomarker evaluation. A panel of 21 biomarkers that assessed stress, inflammation, immune system and redox homeostasis among others, were measured for all aliquots. Changes of statistical relevance (p <0.05) in oral fluid contaminated with pen faeces or feed versus untreated samples were observed for all methods employed with the exception of adenosine deaminase (ADA) and creatine kinase (CK) in oral fluid contaminated with pen faeces or feed. Pen faeces did not affect the measurement of haptoglobin, superoxide dismutase, CK, lactate dehydrogenase (LDH), ADA and cortisol (when the latter is measured by chemiluminescence); while uric acid, LDH, CK, ADA, and hydrogen peroxide methods were not affected by the

presence of feed in oral fluid. The effects of centrifugation, filtration or chemical clarification with chitosan in these contaminated samples were modest and for most cases did not caused baseline levels on the measured biomarkers. In conclusion, the presence of pen faeces or feed in porcine oral fluid can interfere with the results obtained when analytes are measured.

URL: https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.003

Article 5

Article 5 (published)

Trace Elements and Ferritin in Pig Saliva: Variations during Fattening, Time of Sampling, Effect of Dirtiness and Stability under Different Storage Conditions

Alba Ortín-Bustillo [1], Damián Escribano [1,2], Silvia Martínez-Subiela [1], Asta Tvarijonaviciute [1], Alberto Muñoz-Prieto [1], Marina López-Arjona [3], José J. Cerón [1] and Fernando Tecles [1]

[1] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[2] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[3] *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain*

Journal: Antioxidants (MDPI), 5 March 2023; 12(3):649

Abstract: The objective of this study was to evaluate the possible changes of zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe) and ferritin during the entire productive cycle in fattening pigs and at different diurnal sampling times. Moreover, the possible effects of the presence of pen contaminants and storage stability at different temperature conditions were assessed. The analytes changed along the different phases of the fattening productive cycle, showing, in general, higher values at the initial phases. In addition, statistically significant variations were found in Zn and Cu measurements at different sampling times of the day. In the spectrophotometric assays, the values of all analytes significantly increased after adding high concentrations of feces or feed. However, when low concentrations of feces or feed were added, only Cu showed a significant increase. Overall, the salivary levels of Zn, Cu, Fe and ferritin in pigs can change during different fattening phases and the different hours of the day. These analytes were more stable at -80 ºC and, if saliva is contaminated with feces or feed, it can lead to an increase in these analytes.

URL: https://doi.org/10.3390/antiox12030649

Article 6

Article 6 (published)

Saliva Sampling Material Matters: Effects on the Results of Saliva Analysis in Pigs

Alba Ortín-Bustillo [1,†], María Botía [1,†] , Marina López-Arjona [2], Luis Pardo-Marín [1], José J. Cerón [1], Silvia Martínez-Subiela [1], María José López-Martínez [1], Asta Tvarijonaviciute [1], Alberto Muñoz-Prieto [1], Camila P. Rubio [1], Silvia Martínez Miró [3], Damián Escribano [1,3] and Fernando Tecles [1,*]

[1] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[2] *Department of Animal and Food Science, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Barcelona, Spain*

[3] *Department of Animal Production, Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

† These authors contributed equally to this work.

Journal: Animals (MDPI), 5 December 2023; 13(24):3757

Abstract: The use of saliva as a biological sample from pigs is of high practical interest because blood collection from pigs is difficult and stressful. In this study, the influence of two different materials, a cotton roll and a polypropylene sponge, in porcine saliva collection was evaluated. For this purpose, the effect of the material used for sampling was evaluated in a panel of 13 analytes, including those related to stress (cortisol and oxytocin), inflammation and immunity (adenosine deaminase, haptoglobin and myeloperoxidase), redox homeostasis (the cupric reducing ability of saliva, the ferric reducing activity of saliva, and the Trolox equivalent antioxidant capacity), and sepsis (procalcitonin), as well as other routine analytes related to metabolism and different tissues and organs, such as lactate dehydrogenase, creatine kinase, urea, and total protein concentration. The polypropylene sponge provided a higher sample volume than the cotton roll. Although the results of some salivary analytes were equivalent for both materials, other analytes, such as creatine kinase, haptoglobin and total proteins, showed significant differences depending on the material used for saliva collection. Therefore, the type of material used for salivary collection in pigs should be considered when interpreting the results of analyses of the salivary analytes.

URL: https://doi.org/10.3390/ani13243757

Article 7

Article 7 (published)

Changes in S100A8/A9 and S100A12 and Their Comparison with Other Analytes in the Saliva of Pigs with Diarrhea Due to *E. coli*

Alba Ortín-Bustillo [1], María Botía [1], María José López-Martínez [1], Silvia Martínez-Subiela [1], José Joaquín Cerón [1], Antonio González-Bulnes [2,3], Edgar García Manzanilla [4,5], Elena Goyena [6], Fernando Tecles [1] and Alberto Muñoz-Prieto [1]

[1] *Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[2] *Departamento de Producción y Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115 Valencia, Spain*

[3] *Cuarte S.L. Grupo Jorge, Ctra. De Logroño, Km 9,2., Monzalbarba, 50120 Zaragoza, Spain*

[4] *Pig Development Department, The Irish Food and Agriculture Authority, Teagasc, Moorepark, P61 C996 Fermoy, Ireland*

[5] *School of Veterinary Medicine, University College Dublin, Belfield, D04 W6F6 Dublin, Ireland*

[6] *Department of Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain*

Journal: Animals (MDPI), 8 August 2023; 13(16):2556

Abstract: The family of calgranulins includes S100A8 (calgranulin A), S100A9 (calgranulin B), which can appear as a heterodimer known as S100A8/A9 or Calprotectin, and S100A12 (calgranulin C). These proteins are related to different inflammatory conditions, immune-mediated diseases, and sepsis and are considered biomarkers of potential interest. This study aims to evaluate if S100A8/A9 and A12 could change in pigs with diarrhea due to *E. coli* and to compare the changes of S100A8/A9 and A12 with other analytes in order to explore the possible causes or mechanisms involved. For this purpose, a panel integrated by analytes related to inflammation (haptoglobin, inter-alpha trypsin inhibitor 4 (ITIH4), and total protein); immune system (adenosine deaminase, ADA); stress (alpha-amylase); tissue damage (lactate and lactate dehydrogenase (LDH)); sepsis (aldolase) and redox status (ferric-reducing ability of saliva (FRAS) and advanced oxidation protein products (AOPP)) was evaluated. S100A8/A9 and A12 and the other analytes measured in this study

showed increases in the saliva of pigs with diarrhea due to *E. coli*. S100A8/A9 and/or A12 showed a significant correlation of different magnitude with some of the other analytes evaluated. Further studies should be conducted to gain knowledge about the possible practical applications as biomarkers of the measurements of S100A8/A9 and A12 in the saliva of pigs.

URL: https://doi.org/10.3390/ani13162556

Article 8

Article 8 (published)

Changes in immunity- and stress- biomarkers in saliva following treatment of pigs with meningitis due to *Streptococcus suis*

Alba Ortín-Bustillo [a], Elena Goyena [b], Andrea Martínez-Martinez [c], José Joaquín Cerón Madrigal [a], Silvia Martínez-Subiela [a], María José López-Martínez [a], Edgar García Manzanilla [d, e], Asta Tvarijonaviciute [a], Antonio González-Bulnes [f], Alberto Muñoz-Prieto [a]

[a] *Salilab-UMU, Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[b] *Department of Anatomy and Comparative Pathological Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain.*

[c] *Agropecuaria Casas Nuevas, Fuente Álamo de Murcia, 30320, Murcia.*

[d] *Pig Development Department, The Irish Food and Agriculture Authority, Teagasc, Moorepark, P61 C996 Fermoy, Ireland*

[e] *School of Veterinary Medicine, University College Dublin, Belfield, D04 W6F6 Dublin, Ireland*

[f] *Department of Animal Health and Production, Faculty of Veterinary, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115, Valencia, Spain.*

Journal: The Veterinary Journal (ELSEVIER), 1 October 2025; Volume 314, 106458

Abstract: The aim of this research was to evaluate the possible changes in a profile of biomarkers in saliva integrated by C-reactive protein (CRP), haptoglobin (Hp), adenosine deaminase (ADA), calprotectin (S100A8/A9), alpha-amylase (sAA) and total proteins (TP) in pigs with *Streptococcus suis (S. suis)* infection before and after treatment. Furthermore, a secondary aim was to provide data on the analytical validation of the two methods used in this report to quantify CRP and Hp in porcine saliva based on AlphaLISA technology. CRP and Hp assays were precise and accurate. When the response of pigs with *S. suis* infection to treatment was evaluated, significantly lower concentrations of salivary CRP and sAA were observed in the pigs that recovered from the disease and did not present signs of illness at 3 days post-treatment in comparison to the pre-treatment sampling ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively). At 7 days after treatment, all evaluated salivary biomarkers showed a decrease in the recovered group compared to non-recovered group after treatment. In conclusion, methods developed for CRP and Hp assays in this report showed adequate analytical validation results.

Furthermore, saliva could be used for treatment monitoring of *S. suis* infection, being the effective response to the treatment associated with a decrease in the analytes measured in this report.

URL: https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2025.106458

Article 9

Article 9 (published)

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) in saliva of pigs: evaluation of two commercially available ELISA kits for its measurement and distribution of its main components

Alba Ortín-Bustillo [a], Silvia Martínez-Subiela [a], José Joaquín Cerón [a], Antonio González-Bulnes [b], Asta Tvarijonaviciute [a], Alberto Muñoz-Prieto [a]

[a] *SALILAB-UMU, Interdisciplinary Laboratory of Clinical Analysis of the University of Murcia (Interlab-UMU), Regional Campus of International Excellence 'Campus Mare Nostrum', University of Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain*

[b] *Department of Animal Health and Production, Faculty of Veterinary, Universidad Cardenal Herrera-CEU, CEU Universities, C/Tirant lo Blanc, 7, Alfara del Patriarca, 46115, Valencia, Spain.*

Journal: PLOS One, 24 October 2025; Volume 20 (10), e0335133

Abstract: Inter-alpha-trypsin inhibitor protein heavy chain 4 (ITIH4), also named porcine major acute phase protein (Pig-MAP), is a positive acute phase protein (APP) in pigs and can be measured in plasma and also in saliva to assess the animal health. The objectives of this report were (1) to evaluate if different commercially available porcine ELISA kits can measure ITIH4 concentrations in saliva samples of pigs, and (2) to study the distribution of ITIH4 components in saliva and compare it to the distribution in plasma. The results showed that two of the ELISA kits used in this report could measure salivary ITIH4 with precision and accuracy, but only one showed significant differences between pigs with tail biting and control animals without this condition. Western blotting analysis revealed the presence of a different distribution of ITIH4 bands in saliva samples compared to plasma samples. In conclusion, in saliva of pigs ITIH4 can be quantified using a commercial ELISA kit increasing its concentration in cases of tail biting. In addition, ITIH4 shows bands at western blot in saliva that are different from serum but are compatible with different ITIH4 forms. These data confirm that ITIH4 can be detected in saliva and be potentially used as a biomarker of inflammation.

URL: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0335133

BIBLIOGRAPHY

Armbruster, D.A., Pry, T., 2008. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. Clin. Biochem. Rev. 29 Suppl 1, S49-52.

Bland, J.M., Altman, D.G., 1999. Measuring agreement in method comparison studies. Stat. Methods Med. Res. 8, 135–160. https://doi.org/10.1177/096228029900800204

Cerón, J.J., Contreras-Aguilar, M.D., Escribano, D., Miró, S.M., Martínez, M.J.L., 2022. Basics for the potential use of saliva to evaluate stress, inflammation, immune system, and redox homeostasis in pigs. BMC Vet. Res. 18, 81. https://doi.org/10.1186/s12917-022-03176-w

Contreras-Aguilar, M.D., Escribano, D., Martínez-Miró, S., López-Arjona, M., Rubio, C.P., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., Tecles, F., 2019. Application of a score for evaluation of pain, distress and discomfort in pigs with lameness and prolapses: correlation with saliva biomarkers and severity of the disease. Res. Vet. Sci. 126, 155–163. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.08.004

Czycholl, I., Büttner, K., Beilage, E., Krieter, J., 2015. Review of the assessment of animal welfare with special emphasis on the 'Welfare Quality® animal welfare assessment protocol for growing pigs'. Arch. Tierzucht 58, 237–249. https://doi.org/10.5194/aab-58-237-2015

Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. Vet. J. 185, 23–27. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009

Escribano, D., Contreras-Aguilar, M.D., Tvarijonaviciute, A., Martínez-Miró, S., Martínez-Subiela, S., Cerón, J.J., Lamy, E., Tecles, F., 2018. Stability of selected enzymes in saliva of pigs under different storage conditions: A pilot study. J. Vet. Med. Sci. 80, 1657–1661. https://doi.org/10.1292/jvms.18-0346

Franco-Martínez, L., Ortín-Bustillo, A., Rubio, C.P., Escribano, D., López-Arjona, M., García-Manzanilla, E., Cerón, J.J., Martínez-Subiela, S., Tvarijonaviciute, A., Tecles, F., 2022. Effects of pen faeces and feed contamination in biomarkers determination in oral fluid of pigs. Res. Vet. Sci. 152, 403–409. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.09.003

Giavarina, D., 2015. Understanding Bland Altman analysis. Biochem. Medica 25, 141–151. https://doi.org/10.11613/BM.2015.015

Giri, U., Nagaraj, V., Sankaran, A., Ramesh, R., Rajaram, S., Muthanandam, S., Arumugam, S., Santhanam, V., 2018. Sialochemical profile in depressive individuals under antidepressant therapy: An observational study. J. Clin. Diagnostic Res. 12, VC06–VC09. https://doi.org/10.7860/JCDR/2018/28999.11456

Gröschl, M., Wagner, R., Rauh, M., Dörr, H.G., 2001. Stability of salivary steroids: The influences of storage, food and dental care. Steroids 66, 737–741. https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00111-8

Henao-Diaz, A., Giménez-Lirola, L., Baum, D.H., Zimmerman, J., 2020. Guidelines for oral fluid-based surveillance of viral pathogens in swine. Porc. Heal. Manag. 6, 1–12. https://doi.org/10.1186/s40813-020-00168-w

Hinkle, D.E., Wiersma, W., Jurs, S.G., 2003. Applied Statistics for the Behavioral Sciences, 5th edition. Houghton Mifflin Harcourt: London, UK.

Hoelzle, K., Grimm, J., Ritzmann, M., Heinritzi, K., Torgerson, P., Hamburger, A., Wittenbrink, M.M., Hoelzle, L.E., 2007. Use of recombinant antigens to detect antibodies against Mycoplasma suis, with correlation of serological results to hematological findings. Clin. Vaccine Immunol. 14, 1616–1622.

https://doi.org/10.1128/CVI.00345-07
Kaczor-Urbanowicz, K.E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F., Wong, D.T.W., 2017. Saliva diagnostics – Current views and directions. Exp. Biol. Med. https://doi.org/10.1177/1535370216681550
Kaufman, E., Lamster, I.B., 2002. The diagnostic applications of saliva—a review. Crit. Rev. oral Biol. Med. 13, 197–212. https://doi.org/10.1177/154411130201300209
Lamy, E., Mau, M., 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. J. Proteomics 75, 4251–4258. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.05.007
Leenaars, M., Hendriksen, C.F.M., 2005. Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations. Ilar J. 46, 269–279. https://doi.org/10.1093/ilar.46.3.269.
Lima, D.P., Diniz, D.G., Moimaz, S.A.S., Sumida, D.H., Okamoto, A.C., 2010. Saliva: reflection of the body. Int. J. Infect. Dis. 14, 184–188. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2009.04.022
López-Martínez, M.J., Ornelas, M.A.S., Amarie, R.E., Manzanilla, E.G., Martínez-Subiela, S., Tecles, F., Tvarijonaviciute, A., Escribano, D., González-Bulnes, A., Cerón, J.J., López-Arjona, M., Muñoz-Prieto, A., 2023. Changes in salivary biomarkers of stress, inflammation, redox status, and muscle damage due to Streptococcus suis infection in pigs. BMC Vet. Res. 19, 1–9. https://doi.org/10.1186/s12917-023-03650-z
MacInnes, J.I., Desrosiers, R., 1999. Agents of the 'suis-ide diseases' of swine: Actinobacillus suis, Haemophilus parasuis, and Streptococcus suis. Can. J. Vet. Res. 63, 83–89.
Main, D.C., Clegg, J., Spatz, A., Green, L.E., 2000. Repeatability of a lameness scoring system for finishing pigs. Vet. Rec. 147, 574–576. https://doi.org/10.1136/vr.147.20.574
Montaño, M.D., Olesik, J.W., Barber, A.G., Challis, K., Ranville, J.F., 2016. Single Particle ICP-MS: Advances toward routine analysis of nanomaterials. Anal. Bioanal. Chem. 408, 5053–5074. https://doi.org/10.1007/s00216-016-9676-8
Muneta, Y., Yoshikawa, T., Minagawa, Y., Shibahara, T., Maeda, R., Omata, Y., 2010. Salivary IgA as a useful non-invasive marker for restraint stress in pigs. J. Vet. Med. Sci. 72, 1295–1300. https://doi.org/10.1292/jvms.10-0009
Neila-Ibáñez, C., Napp, S., Pailler-García, L., Franco-Martínez, L., Cerón, J.J., Aragon, V., Casal, J., 2023. Risk factors associated with Streptococcus suis cases on pig farms in Spain. Vet. Rec. 193, 3056. https://doi.org/10.1002/vetr.3056
Nienhaus, F., Meemken, D., Schoneberg, C., Hartmann, M., Kornhoff, T., May, T., Heß, S., Kreienbrock, L., Wendt, A., 2020. Health scores for farmed animals: Screening pig health with register data from public and private databases. PLoS One 15, 1–22. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228497
Perkins, N.J., Schisterman, E.F., 2006. The inconsistency of 'optimal' cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. Am. J. Epidemiol. 163, 670–675. https://doi.org/10.1093/aje/kwj063
Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., Punyadeera, C., 2011. Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. Clin. Chem. 57, 675–687. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767
Segura, M., Aragon, V., Brockmeier, S.L., Gebhart, C., de Greeff, A., Kerdsin, A., O'Dea, M.A., Okura, M., Saléry, M., Schultsz, C., Valentin-Weigand, P., Weinert, L.A., Wells, J.M., Gottschalk, M., 2020. Update on Streptococcus suis research and prevention in the era of antimicrobial restriction: 4thinternationalworkshop on s.

suis. Pathogens 9, 374. https://doi.org/10.3390/pathogens9050374

Shrivastava, A., Gupta, V.B., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles Young Sci. 2, 21–25. https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345

Tecles, F., Contreras-Aguilar, M.D., Martínez-Miró, S., Tvarijonaviciute, A., Martínez-Subiela, S., Escribano, D., Cerón, J.J., 2017. Total esterase measurement in saliva of pigs: Validation of an automated assay, characterization and changes in stress and disease conditions. Res. Vet. Sci. 114, 170–176. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.007

Truong, C., Mahe, D., Blanchard, P., Le Dimna, M., Madec, F., Jestin, A., Albina, E., 2001. Identification of an immunorelevant ORF2 epitope from porcine circovirus type 2 as a serological marker for experimental and natural infection. Arch. Virol. 146, 1197–1211. https://doi.org/10.1007/s007050170115

Valros, A., Lopez-Martinez, M.J., Munsterhjelm, C., Lopez-Arjona, M., Ceron, J.J., 2022. Novel saliva biomarkers for stress and infection in pigs: Changes in oxytocin and procalcitonin in pigs with tail-biting lesions. Res. Vet. Sci. 153, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2022.10.013

Werinder, A., Aspán, A., Backhans, A., Sjölund, M., Guss, B., Jacobson, M., 2020. Streptococcus suis in Swedish grower pigs: Occurrence, serotypes, and antimicrobial susceptibility. Acta Vet. Scand. 62, 1–9. https://doi.org/10.1186/s13028-020-00533-3

Yoshizawa, J.M., Schafer, C.A., Schafer, J.J., Farrell, J.J., Paster, B.J., Wong, D.T.W., 2013. Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. Clin. Microbiol. Rev. 26, 781–791. https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13

ANNEX

RESEARCH IN VETERINARY SCIENCE (Res. Vet. Sci.)

Journal information

Subject Area, Categories, Scope: Veterinary (miscellaneous) (Q1)

SCImago Journal Rank (SJR): 0.608

Impact Score: 1.96

Publisher: Elsevier B.V.

Country: Netherlands

Print ISSN: 0034-5288

Online ISSN: 1532-2661

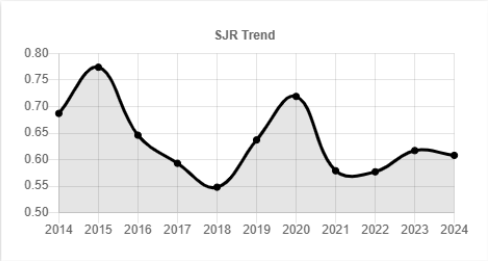
Best Quartile: Q1

h-index: 93

Impact factor: 1.8

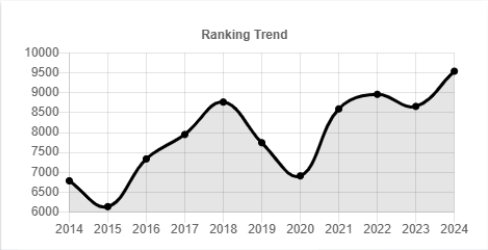
CiteScore: 4.6

SJR of Research in Veterinary Science by Year



Year	SJR
2025/2026	Coming Soon
2024	0.608
2023	0.617
2022	0.577
2021	0.579

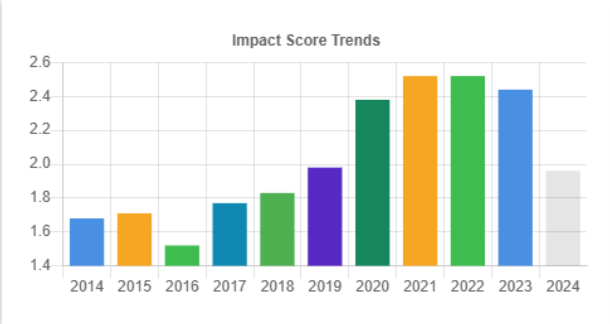
Ranking of Research in Veterinary Science by Year



Year	Ranking
2025/2026	Coming Soon
2024	9540
2023	8656
2022	8960

Impact IF Trend

Year wise Impact IF of Research in Veterinary Science. Based on Scopus data.



Year	Impact IF
2025/2026	Coming Soon
2024	1.96
2023	2.44
2022	2.52
2021	2.52

ANIMALS

Journal information

Subject Area, Categories, Scope: Animal Science and Zoology (Q1); Veterinary (miscellaneous) (Q1)

SCImago Journal Rank (SJR): 0.733

Impact Score: 2.96

Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

Country: Switzerland

ISSN: 2076-2615

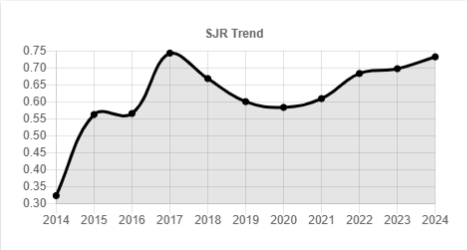
Best Quartile: Q1

h-index: 95

Impact factor: 2.7

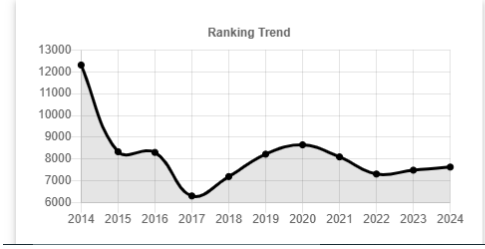
CiteScore: 5.2

SJR of Animals by Year



Year	SJR
2025/2026	Coming Soon
2024	0.733
2023	0.698
2022	0.684
2021	0.610

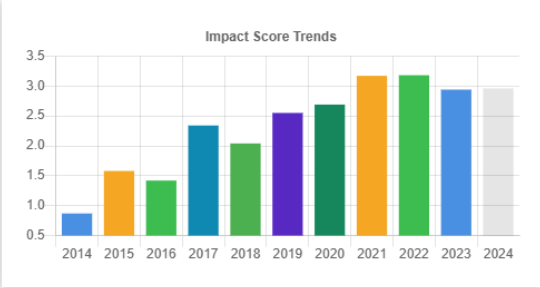
Ranking of Animals by Year



Year	Ranking
2025/2026	Coming Soon
2024	7634
2023	7492
2022	7315

Impact IF Trend

Year wise Impact IF of Animals. Based on Scopus data.



Year	Impact IF
2025/2026	Coming Soon
2024	2.96
2023	2.94
2022	3.18
2021	3.17

ANTIOXIDANTS

Journal information

Subject Area, Categories, Scope: Biochemistry (Q1); Clinical Biochemistry (Q1); Food Science (Q1); Molecular Biology (Q1); Physiology (Q1); Cell Biology (Q2)

SCImago Journal Rank (SJR): 1.484

Impact Score: 6.93

Publisher: Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)

Country: Switzerland

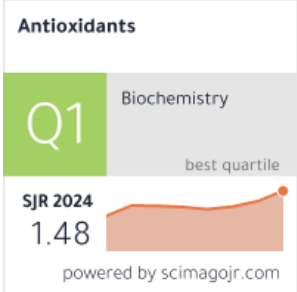
ISSN: 2076-3921

Best Quartile: Q1

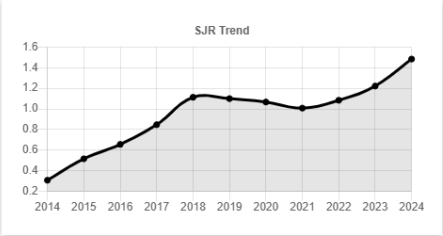
h-index: 133

Impact factor: 6.6

CiteScore: 12.4

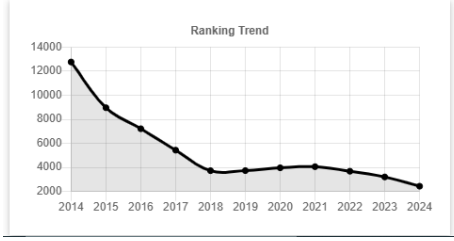


SJR of Antioxidants by Year



Year	SJR
2025/2026	Coming Soon
2024	1.484
2023	1.222
2022	1.084
2021	1.008

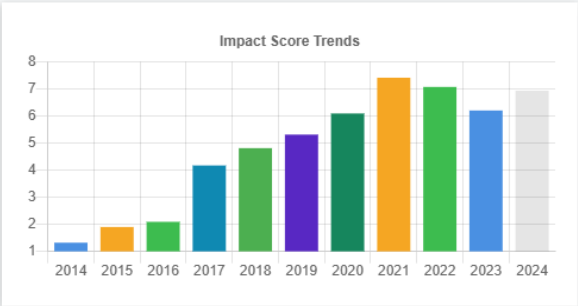
Ranking of Antioxidants by Year



Year	Ranking
2025/2026	Coming Soon
2024	2433
2023	3203
2022	3679

Impact IF Trend

Year wise Impact IF of Antioxidants. Based on Scopus data.



Year	Impact IF
2025/2026	Coming Soon
2024	6.93
2023	6.20
2022	7.07
2021	7.41

THE VETERINARY JOURNAL (Vet. J.)

Journal information

Subject Area, Categories, Scope: Animal Science and Zoology (Q1); Veterinary (miscellaneous) (Q1)

SCImago Journal Rank (SJR): 0.824

Impact Score: 2.98

Publisher: Elsevier B.V.

Country: United Kingdom

Print ISSN: 1090-0233

Online ISSN: 1532-2971

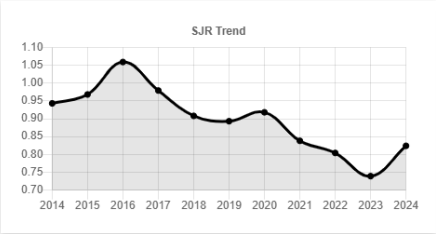
Best Quartile: Q1

h-index: 132

Impact factor: 3.1

CiteScore: 3.6

SJR of Veterinary Journal by Year



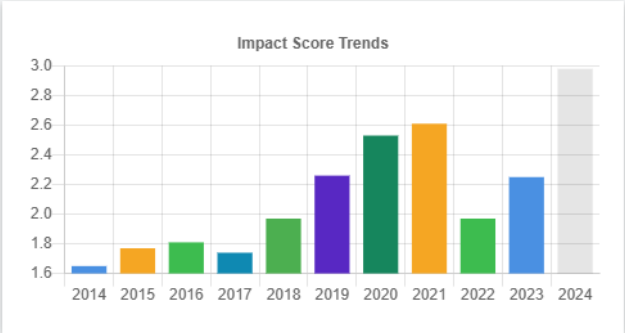
Year	SJR
2025/2026	Coming Soon
2024	0.824
2023	0.739
2022	0.804
2021	0.838

Ranking of Veterinary Journal by Year

Year	Ranking
2025/2026	Coming Soon
2024	6510
2023	6985
2022	5934

Impact IF Trend

Year wise Impact IF of Veterinary Journal. Based on Scopus data.



Year	Impact IF
2025/2026	Coming Soon
2024	2.98
2023	2.25
2022	1.97
2021	2.61

PLOS One

Journal information

Subject Area, Categories, Scope: Multidisciplinary sciences (Q1)

SCImago Journal Rank (SJR): 0.803

Impact Score: 2.82

Publisher: Public Library of Science (PLOS)

Country: United States

ISSN: 1932-6203

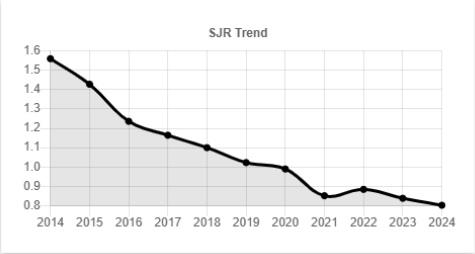
Best Quartile: Q1

h-index: 467

Impact factor: 2.6

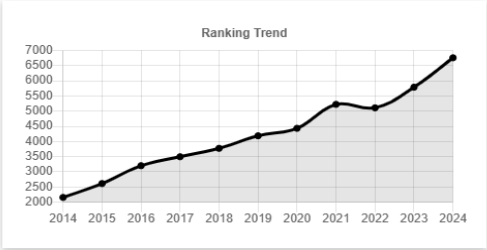
CiteScore: 5.4

SJR of PLoS ONE by Year



Year	SJR
2025/2026	Coming Soon
2024	0.803
2023	0.839
2022	0.885
2021	0.852

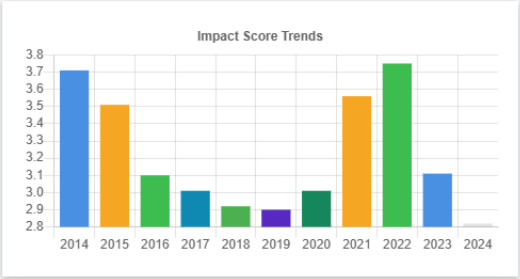
Ranking of PLoS ONE by Year



Year	Ranking
2025/2026	Coming Soon
2024	6756
2023	5787
2022	5108
2021	5222

Impact IF Trend

Year wise Impact IF of PLoS ONE. Based on Scopus data.



Year	Impact IF
2025/2026	Coming Soon
2024	2.82
2023	3.11
2022	3.75
2021	3.56