

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 975**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/EP2016/063109**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16729850 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2025 EP 3308163**

54 Título: **Procedimiento y aparato para vigilar el estado de salud de vacas lecheras**

30 Prioridad:

**10.06.2015 DE 102015007366**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.04.2025**

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR  
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V. (100.00%)  
Hansastr. 27c  
80686 München, DE**

72 Inventor/es:

**LEHMANN, JÖRG y  
ZOLDAN, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

**DEL VALLE VALIENTE, Sonia**

ES 3 014 975 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento y aparato para vigilar el estado de salud de vacas lecheras

La presente invención se refiere a procedimientos y dispositivos para vigilar el estado de salud de vacas lecheras, en particular, de rebaños completos de vacas lecheras según las reivindicaciones 1 a 12. El procedimiento se basa en el análisis de los biomarcadores haptoglobina (HP) y una parte del receptor polimérico de inmunoglobulinas (PIGR), del componente secretor (SC), en una muestra de leche. En particular, el procedimiento y el dispositivo reivindicados de la invención permiten un diagnóstico de enfermedades sistémicas, que se producen fuera de la ubre sobre la base de los biomarcadores proteicos HP y PIGR (SC) descritos en el presente documento. La invención permite así controlar periódicamente el estado general de salud de un rebaño de vacas lecheras. La presente invención se refiere a procedimientos de diagnóstico no invasivos, así como a dispositivos y kits de diagnóstico para llevar a cabo estos procedimientos.

### Descripción

Los métodos técnicos más avanzados permiten gestionar de forma rentable rebaños lecheros cada vez mayores. Además, los costes de mano de obra pueden reducirse drásticamente utilizando, por ejemplo, sistemas de ordeño automático. Sin embargo, esto significa que los controles sanitarios diarios de las vacas solo pueden realizarse de forma limitada o no pueden realizarse en absoluto. Una solución a este problema sería automatizar la vigilancia de la salud de los animales. Esto puede hacerse detectando determinados marcadores de salud en la leche. Como tales marcadores pueden servir proteínas de fase aguda como, por ejemplo, la HP, ya que sus concentraciones aumentan muy rápido incluso en la fase inicial de una respuesta inmunitaria. La medición de HP en la leche aún no se utiliza de forma rutinaria en la agricultura ni en el diagnóstico de laboratorio veterinario.

El control sanitario postparto se realiza mediante un examen clínico 7-10 días después del parto y un control puerperal (entre los días 20 y 28 después del parto) a través del responsable del rebaño o del personal cualificado de la granja. Se evalúa el estado general, la temperatura corporal, los loquios, la producción de leche y, dado el caso, las cetonas de la leche o de la orina. El personal de ordeño comprueba diariamente la salud de las ubres en el puesto de ordeño. Durante la prueba mensual de rendimiento lechero, se recaban parámetros como el recuento celular, el contenido de urea y el contenido de grasa y proteína de la leche, para evaluar la salud de la ubre y el estado metabólico de cada animal y del rebaño. Cada vez son más las explotaciones que registran el recuento de células en el sistema de ordeño automático durante cada operación de ordeño. Existen enfoques para el registro rutinario de parámetros sanitarios mediante diversos métodos. Sin embargo, estos solo pueden proporcionar información sobre el estado metabólico, una enfermedad específica o la salud de la ubre del animal.

Por tanto, la vigilancia de la salud en la explotación es muy subjetiva y laboriosa. Hasta ahora, se han ofrecido soluciones mediante el registro y la evaluación de combinaciones de parámetros (conductividad de la leche, producción de leche, patrones de movimiento, tiempos de reposo, concentración de progesterona, cuerpos cetónicos, lactato deshidrogenasa, grasa, proteína, lactosa y urea en la leche) utilizando correspondientes técnicas de medición y programas multifuncionales de gestión del rebaño, como FullExpert (Lemmer-Fullwood). Esto permite detectar animales con comportamientos anormales (celo, cojera, aborto, desplazamiento de abomaso (DA), cetosis, mastitis). Sin embargo, estos sistemas son complejos y caros de adquirir. En caso de hallazgos críticos, se consulta a un veterinario. La medición de parámetros clínico-químicos, metabólicos y endocrinológicos en la sangre de los animales forma parte del análisis rutinario de laboratorio veterinario, pero solo puede realizarlo el veterinario en animales seleccionados, con comportamientos anormales o ya enfermos. Los parámetros utilizados habitualmente en la química clínica solo pueden proporcionar información general sobre el estado del ganado en combinación.

Ya existen enfoques para evaluar el estado de salud del ganado lechero de forma más sencilla, rápida y objetiva. Esto se hace midiendo las proteínas de fase aguda en la sangre o la leche. La HP es la proteína de fase aguda más estudiada en el ganado bovino. Durante la mastitis, la concentración de HP en la leche también aumenta considerablemente. Sin embargo, hasta ahora solo se ha hablado de la presencia de HP en la leche como posible indicador de mastitis.

La SC no es una proteína de fase aguda, sino que forma parte de un receptor transmembrana para inmunoglobulinas poliméricas, el PIGR, en las células epiteliales secretoras de las mucosas y también en la ubre. Cuando la inmunoglobulina polimérica (Ig)A o IgM se une, el complejo anticuerpo-receptor se canaliza desde la cara lateral a la apical del epitelio a través de la transcitosis. Allí, el receptor se escinde enzimáticamente de tal modo, que se liberan SC e IgA o IgM. De este modo, la IgA se transporta a la leche. Durante la inmunosupresión periparto y al principio de la lactación, las vacas lecheras también son especialmente susceptibles a enfermedades infecciosas que no se producen en la ubre (enfermedades sistémicas) como, por ejemplo, infecciones uterinas, de pezuñas o respiratorias. Tampoco es raro que se produzcan DA. Las pruebas de diagnóstico de estas enfermedades se realizan periódicamente en la sangre de los animales. El animal ha de ser examinado y tratado por un veterinario. Dado que una muestra de leche puede tomarse con un esfuerzo considerablemente menor, resulta económicamente interesante para el ganadero poder detectar enfermedades sistémicas en este medio de muestreo.

Grönlund et al. (2005) revelaron el potencial de la haptoglobina y el amiloide sérico A (SAA) en leche, como indicadores de mastitis crónica subclínica y observaron una variación considerable en las concentraciones de haptoglobina y SAA en leche en cuartos de ubre con mastitis crónica subclínica.

5 Kalmus et al. (2013) muestran la relación entre los resultados bacteriológicos cuantitativos de una prueba de PCR en tiempo real y las concentraciones de proteínas de fase aguda (PFA) y la actividad N-acetil-β-d-glucosaminidasa (NAG) en la leche en mastitis clínicas naturales.

10 Boehmer et al. (2010) revelan enfoques proteómicos para realizar análisis comparativos de leche de vacas sanas y vacas con mastitis clínica y de proteínas identificadas en leche con mastitis.

El documento WO 01/27631 A1 se refiere a un ensayo para la detección de haptoglobina (Hp) en leche, como medio para predecir o detectar mastitis o mastitis subclínica, por ejemplo, en ganado lechero.

15 Mansor (2012) muestra cambios en los proteomas, peptidomas y metabolomas de la leche durante el curso de la mastitis bovina, en comparación con muestras de leche normales y ha investigado nuevos biomarcadores para la mastitis bovina.

20 Makimura et al. (1982) divulgan la medición de haptoglobina en suero para la detección de enfermedades inflamatorias graves como mastitis, pimetra o reticulitis traumática, para lo cual se utilizó un procedimiento de Tarukoski modificado.

Ashour et al. (1987) divulgan un procedimiento para la determinación rutinaria de la velocidad de las reacciones enzimáticas colorimétricas, utilizando un lector de placas de microtitulación de 96 pocillos.

25 La gestión sanitaria de explotaciones lecheras en crecimiento busca constantemente soluciones alternativas para supervisar el rebaño. En la práctica, hay varios parámetros que pueden utilizarse para detectar vacas con comportamientos anormales (celo, cojera, aborto, DA, cetosis, mastitis), cuando se realizan controles automáticos diariamente en la explotación. Hasta la fecha, para la leche no existe ningún biomarcador validado para analizar el estado de salud general del ganado. El análisis de la leche simplifica considerablemente la extracción de muestras, ya que permite realizar los análisis en la explotación. Cabe destacar que, a diferencia de la extracción de sangre, en este caso no se necesita veterinario para ello, lo que repercute positivamente en los costes y perturba menos el proceso general de producción ganadera. En consecuencia, es objeto de la presente invención proporcionar nuevos enfoques para la vigilancia de la salud de los rebaños de vacas lecheras, que permitan una supervisión simplificada y rutinaria de grandes rebaños lecheros sin la necesidad de intervención de un veterinario.

35 En un primer aspecto, el objetivo planteado se resuelve mediante un procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, en donde el procedimiento que no se utiliza para diagnosticar mastitis comprende las siguientes etapas:

- 40 (a) proporcionar una muestra de leche de la vaca lechera,
- (b) medir la concentración del biomarcador haptoglobina (HP) en la muestra de leche,
- (c) comparar la concentración medida a partir de (b) con un valor de referencia del biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera,
- 45

y en donde el estado de salud comprende enfermedad sistémica leve, enfermedad sistémica leve con desplazamiento de abomaso (DA), enfermedad sistémica grave o combinaciones de estas afecciones.

50 En un segundo aspecto, el objetivo planteado se consigue mediante un procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende las siguientes etapas:

- (a) proporcionar una muestra de leche de la vaca lechera,
- 55 (b) medir la concentración de los biomarcadores haptoglobina (HP) y componente secretor del receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR (SC)) en la muestra de leche,
- (c) comparar la concentración medida de (b) con un valor de referencia del al menos un biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera.
- 60

Preferiblemente, el procedimiento no invasivo se lleva a cabo completamente *ex vivo* o *in vitro*. En particular, cabe destacar que los biomarcadores de la presente invención se analizan en una muestra de leche, de modo que el procedimiento puede llevarse a cabo independientemente de una extracción de muestra invasiva y, por tanto, independientemente de un veterinario. Esto permite extender el presente procedimiento a grandes rebaños de vacas

65

lecheras y a pruebas periódicas (mensuales), lo que no es económicamente factible, por ejemplo, mediante el análisis de biomarcadores en una muestra de sangre.

Los términos “biomarcador proteico”, “biomarcador” y “marcador” se utilizan como sinónimos en la presente descripción. Los términos se refieren preferiblemente a la concentración de moléculas biológicas individuales o combinadas, como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, etc. En particular, la presente divulgación trata de las proteínas como biomarcadores. En la medida en que la divulgación se refiere a una medición de la concentración de los biomarcadores, debe incluirse tanto una medición directa de la concentración (el número de moléculas de proteína/volumen o peso) como la medición indirecta. De este modo, también pueden medirse los productos de degradación de los marcadores proteicos de la invención o, alternativamente, deducirse su concentración a partir de las características bioquímicas de los biomarcadores. Las enzimas pueden determinarse, por ejemplo, detectando su actividad enzimática.

Si es necesario, el procedimiento de la presente invención puede comprender opcionalmente la medición de al menos otro biomarcador en la etapa (b). El al menos otro biomarcador se selecciona preferiblemente del grupo formado por la proteína A9 de unión al calcio S100 (S100A9), interleucina (IL-) 18, el factor de necrosis tumoral (TNF)-alfa, lactoferrina (LTF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Otro perfeccionamiento opcional y preferido de la presente invención es un procedimiento, en el que la etapa (b) comprende medir una combinación de al menos tres biomarcadores, concretamente, HP, PIGR (SC) y un tercer biomarcador seleccionado del grupo formado por S100A9, IL-18, TNF-alfa, LTF y VEGF. La especificidad y sensibilidad del procedimiento pueden mejorarse aún más midiendo biomarcadores adicionales.

Se prefiere un procedimiento como el descrito en el presente documento, en donde una desviación de la concentración medida de los biomarcadores HP y PIGR (SC) con respecto al valor de referencia indica una enfermedad sistémica de la vaca lechera, preferiblemente, una enfermedad sistémica que no se produce o no se produce exclusivamente en la ubre, por ejemplo, una enfermedad sistémica leve, una enfermedad sistémica leve con DA, una enfermedad sistémica grave o combinaciones de estas enfermedades. Preferiblemente, la desviación medida es un aumento de la concentración de los biomarcadores en la muestra de una vaca enferma en comparación con una vaca sana.

En un aspecto, la presente invención puede utilizarse para diagnosticar una enfermedad sistémica, preferiblemente, fuera de la ubre, utilizando los biomarcadores divulgados. Sin embargo, alternativamente, la invención también se refiere al diagnóstico de una mastitis sobre la base de los biomarcadores divulgados. Para este aspecto, en una forma de realización de la invención, se prefiere que el diagnóstico de mastitis en una vaca lechera se realice determinando una combinación de los biomarcadores HP y PIGR (SC).

El término “valor de referencia” debe interpretarse en este caso en un sentido amplio e incluir una pluralidad de posibles valores comparativos. Se selecciona un valor de referencia adecuado en función del objetivo del diagnóstico. Para reconocer animales enfermos, el valor de referencia puede ser, por ejemplo, un valor del biomarcador en una vaca sana. Sin embargo, si el procedimiento se utiliza para vigilar el curso de una enfermedad o para supervisar el tratamiento de una vaca enferma, el valor de referencia también puede representar una concentración del biomarcador en la leche de la vaca controlada en un momento anterior, por ejemplo, antes del inicio del tratamiento. En particular, es preferible que el valor de referencia sea un valor límite (*cut-off*) y en donde, si la concentración medida del biomarcador supera el valor límite, se confirme un estado no saludable de la vaca lechera. Dependiendo de cómo se seleccione el valor límite, puede detectarse un estado no saludable en un valor de prueba superior o igual al valor límite. También se puede determinar un valor límite específico para cada rebaño, en donde un rebaño de vacas lecheras sanas que se ha de vigilar se somete a pruebas periódicamente para detectar el biomarcador y se determina un valor de referencia “sano” específico para el rebaño a partir de estos valores. Si entonces una vaca destaca durante el control periódico del rebaño debido a un aumento de la concentración del biomarcador, se puede suponer que la vaca no está sana.

En formas de realización preferidas de la presente invención, los valores límite para distinguir los animales sanos de los enfermos pueden seleccionarse de forma que el correspondiente biomarcador tenga al menos un 90 % de especificidad o más, preferiblemente, un 92 %, más preferiblemente, un 94 % o más, con una sensibilidad de al menos un 50 %, preferiblemente, al menos un 60 %, un 70 % o al menos un 80 %. Por ejemplo, el valor límite para el marcador HP puede ser de aproximadamente 0,4 µg/ml, preferiblemente, de aproximadamente 0,5 µg/ml y, más preferiblemente, de aproximadamente 0,58 µg/ml. El valor límite para el marcador PIGR (SC) puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 µg/ml, preferiblemente, de aproximadamente 8 µg/ml y, más preferiblemente, de aproximadamente 8,2 µg/ml. El valor límite para el marcador LTF puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 80 µg/ml, preferiblemente, de aproximadamente 100 µg/ml y, más preferiblemente, de aproximadamente 120 µg/ml. El valor límite para el marcador VEGF puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 7 µg/ml, preferiblemente, de aproximadamente 9 µg/ml y, más preferiblemente, de aproximadamente 9,5 µg/ml. El término “aproximadamente” en relación con datos numéricos permite preferiblemente una desviación de +/- 20 % del valor indicado, más preferiblemente, una desviación de +/- 15 %, +/-10 % y, más preferiblemente, +/-5 %.

- Como se ha mencionado anteriormente, el procedimiento inventivo no invasivo es adecuado para supervisar una terapia de una vaca lechera, en donde una reducción en la concentración del biomarcador durante o después de una terapia indica un éxito de la terapia. Dado que el aumento en la leche de los biomarcadores descritos en este caso se correlaciona con el deterioro de la salud de una vaca lechera, el procedimiento también puede utilizarse para supervisar el éxito terapéutico de animales enfermos individuales. A este respecto, el valor de referencia con el que se compara una concentración medida del biomarcador o los biomarcadores de la invención en la muestra de leche es, por ejemplo, una concentración del biomarcador o los biomarcadores en la leche de la misma vaca en un momento anterior, por ejemplo, al inicio de la terapia.
- En algunas formas de realización, se prefiere que la concentración del biomarcador HP se determine en una muestra de leche sin diluir. En otras formas de realización, la muestra de leche es una muestra de leche mezclada con conservantes (por ejemplo, para pruebas de rendimiento de la leche).
- En particular, el procedimiento de la presente invención puede utilizarse de forma rutinaria para vigilar una vaca lechera o un rebaño de vacas lecheras. Por lo tanto, se prefiere que el procedimiento no invasivo se lleve a cabo periódicamente, preferiblemente, una vez al mes, más preferiblemente, una vez a la semana, todavía más preferiblemente, varias veces a la semana o incluso a diario.
- Cuando se lleva a cabo el procedimiento según la invención, la muestra de leche que se ha de analizar de la vaca lechera se extrae preferiblemente de la leche ordeñada (de forma no invasiva) durante una operación de ordeño. En los sistemas de ordeño totalmente automatizados, la muestra de leche de una vaca lechera puede extraerse (de manera automatizada) directamente de la leche ordeñada. A continuación, la muestra de leche así preparada se utiliza para el procedimiento según la invención descrito en el presente documento.
- Para medir la concentración de los biomarcadores de la presente invención, puede recurrirse a diversos procedimientos técnicos conocidos para el experto en la materia. En particular, la presente divulgación no pretende limitarse a procedimientos analíticos individuales. La determinación de la concentración de biomarcadores en una muestra de leche puede comprender la medición bioquímica de la concentración mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC); o la medición inmunológica de la concentración mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), inmunoensayo de fluorescencia (FIA), inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA), radioinmunoensayo (RIA), Western Blot y matrices peptídicas; o medir la concentración espectrométricamente mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: resonancia de plasmón superficial (SPR), desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) o ionización por electrospray (ESI). En particular, se prefieren procedimientos inmunológicos, por ejemplo, por medio de anticuerpos monoclonales (preferidos) o policlonales, por ejemplo, en un ELISA.
- El procedimiento descrito está previsto para utilizarse, en particular, para vigilar el estado de salud de una o varias vacas lecheras. Por lo tanto, en algunas formas de realización, se pretende que el procedimiento se utilice para determinar un estado no saludable de una vaca lechera. En esta forma de realización, no es forzosamente necesario un diagnóstico concretizado de la enfermedad de la vaca lechera clasificada como no sana. Por el contrario, deben realizarse a continuación otros procedimientos de diagnóstico para determinar qué enfermedad padece la vaca lechera no sana identificada. En estas formas de realización, el procedimiento de la presente divulgación está orientado a la detección más temprana posible de animales con comportamientos anormales mediante exámenes periódicos según la presente invención. Si se detecta un problema de salud, se puede consultar después a un veterinario para establecer un diagnóstico específico.
- En algunas formas de realización, la presente divulgación se refiere a un procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de un rebaño de vacas lecheras en una explotación lechera, que comprende la realización periódica de un procedimiento para vigilar el estado de salud de al menos una, preferiblemente, de cada una de las vacas lecheras del rebaño, según el procedimiento no invasivo descrito en el presente caso para vigilar el estado de salud de una vaca lechera.
- Por rebaño de vacas lecheras se entiende un rebaño de vacas lecheras dentro de una explotación lechera compuesto por al menos dos animales, preferiblemente, al menos 5 animales, 10 animales, 15 animales, 20 animales, 50 animales o más. La presente invención es particularmente útil para vigilar rebaños de vacas lecheras con más de 10 animales.
- En otro aspecto, el objetivo mencionado se consigue además mediante un sistema y/o dispositivo no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende:
- (a) agentes para alojar una muestra de leche de la vaca lechera,
  - (b) anticuerpos para la medición inmunológica de la concentración de los biomarcadores HP y PIGR (SC) en la muestra de leche,

(c) agentes para comparar la concentración medida a partir de (b) con un valor de referencia del biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera.

5 En algunas formas de realización, el sistema y/o dispositivo no invasivo puede comprender, además, agentes para almacenar datos y/o agentes para mostrar visualmente datos como, por ejemplo, una pantalla de visualización.

10 En algunas formas de realización, el sistema y/o dispositivo no invasivo comprende agentes para emitir información. A este respecto, los agentes de emisión de información son adecuados para emitir información a través de medios adecuados, en caso de determinar que una vaca lechera no está sana. Por ejemplo, puede activarse una alarma visual o acústica, si se detecta que una vaca lechera no está sana. Preferiblemente, se proporciona al menos un dato sobre la identidad de la vaca lechera no sana identificada.

15 Preferiblemente, el sistema y/o el dispositivo descritos en el presente documento están conectados a una instalación de ordeño (sistema de ordeño) y comprende agentes para entregar una muestra de leche de la vaca lechera desde la instalación de ordeño a los agentes para el alojamiento de una muestra de leche durante una operación de ordeño. Los sistemas automatizados de ordeño que permiten extraer muestras de leche son conocidos para el experto.

20 Además, el sistema y/o dispositivo no invasivo según la presente invención comprende, preferiblemente, anticuerpos para medir la concentración de al menos otro biomarcador seleccionado del grupo compuesto por S100A9, IL-18, TNF-alfa, LTF y VEGF.

25 Por tanto, el sistema y/o dispositivo no invasivo según la presente invención es adecuado para realizar un procedimiento como el descrito en el presente documento.

El objetivo de la invención también se consigue con un kit de diagnóstico para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende anticuerpos para la determinación o medición inmunológica de la concentración de los biomarcadores HP y PIGR (SC) en una muestra de leche.

30 En algunas formas de realización, el kit de diagnóstico según la invención comprende agentes para realizar un procedimiento seleccionado entre los siguientes: EIA, FIA, CLIA, RIA, Western Blot y matrices peptídicas. En particular, el kit de diagnóstico es adecuado para llevar a cabo un procedimiento como el descrito en el presente documento para vigilar el estado de salud de vacas lecheras.

35 La presente invención se describirá a continuación mediante ejemplos no limitativos.

En las figuras, se muestra:

40 **Figura 1:** Expresión de ARNm de marcadores seleccionados en células lácteas (CL) y leucocitos sanguíneos (LS) de vacas en diferentes estados patológicos. La concentración de los marcadores se ha determinado mediante qPCR y se expresa como porcentaje de la expresión de los genes de referencia ciclofilina B (PPIB) y transcripción de expresión ubicua (UXT). sistém.: sistémico; enferm.: enfermedad; CL: células lácteas; LS: leucocitos sanguíneos; \* 0,05 > p > 0,01, y \*\* p ≤ 0,01.

45 **Figura 2:** Concentraciones de biomarcadores proteínicos potenciales en la leche. Las concentraciones se determinaron utilizando kits ELISA disponibles en el mercado. n.d.= no detectable; sistém.: sistémico; enferm.: enfermedad; \* 0,05 > p > 0,01, y \*\* p ≤ 0,01.

50 **Figura 3:** Correlaciones de las concentraciones de los biomarcadores HP y LTF en leche y plasma. Las concentraciones se han determinado utilizando kits ELISA disponibles en el mercado. Las correlaciones positivas se indican mediante las líneas de regresión.

55 **Figura 4:** Curvas ROC de biomarcadores lácteos seleccionados. A: Análisis ROC de los marcadores individuales en diferentes estados patológicos. B: Análisis ROC resumido de todos los animales enfermos. sistém.: sistémico; enferm.: enfermedad

Ejemplos

Material y métodos:

60 Cuantificación de biomarcadores proteínicos en leche y plasma

Las proteínas seleccionadas de la leche y el plasma se cuantificaron mediante kits ELISA disponibles en el mercado. Todas las mediciones de HP se realizaron en muestras no diluidas, ya que esto es suficiente para reconocer fluctuaciones del marcador HP en distintos estadios de la enfermedad. Las placas previamente recubiertas se incubaron con 100 µl de muestra (30 min, temperatura ambiente (TA)). Se utilizó HP purificado (LeeBioSolutions, St.

Louis, Missouri, EE.UU.) como patrón en un intervalo de 8 a 0,125 µg/ml. La placa se lavó 3 veces en tampón de lavado de ensayo y luego se incubó con 100 µl de anticuerpo anti-HP diluido 1:40 conjugado con peroxidasa (30 min, TA). Después de 3 lavados, se añadieron 100 µL de solución de sustrato de tetrametilbencidina lista para usar (Moss Inc., Pasadena, Maryland, EE.UU.) y se incubaron a TA entre 10 y 30 minutos. La reacción se detuvo con 50 µl de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 9,9 %.

El PIGR (SC) se cuantificó utilizando un kit ELISA para la detección del PIGR bovino (Life Science USCN Inc.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La leche se diluyó en cada caso entre 1:300 y 1:1.000 para las muestras de control y entre 1:5.000 y 1:10.0000 para las muestras de vacas enfermas. Las muestras de plasma se diluyeron 1:100.000.

#### Análisis estadístico

El análisis de las diferencias entre los grupos, las correlaciones de rangos de Spearman, el análisis de las características operativas del receptor (ROC) y la visualización de los resultados se realizaron con el programa SigmaPlot11 (Systat Software, Erkrath, Alemania). Para evitar sesgos estadísticos no deseados, se seleccionaron aleatoriamente muestras de los animales para su análisis mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) o ELISA. Se analizó la distribución normal de los conjuntos de datos. Cuando la prueba de Shapiro-Wilk era positiva, se realizaba una prueba t. Cuando los datos no tenían una distribución normal, se utilizaba la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney. Todos los grupos enfermos se compararon con el grupo de control. Los datos de diferentes enfermedades fuera de la ubre se combinaron cuando se analizó un número reducido de muestras. Los valores P se definen del siguiente modo: \* 0,05 > p > 0,01, y \*\* p ≤ 0,01.

#### Selección y evaluación de biomarcadores potenciales

Se utilizó el análisis ROC para evaluar la capacidad discriminativa de los biomarcadores. Un área bajo la curva (*Area Under the Curve*, AUC) > 0,9 se consideró altamente discriminativa y valores de AUC < 0,6 se consideraron no discriminativos. Los biomarcadores se seleccionaron en función de la mejor diferenciación entre la enfermedad sistémica leve y el grupo de control. El análisis estadístico de los biomarcadores y de las combinaciones de marcadores se realizó con el programa informático de minería de datos de código abierto TANAGRA. Para evitar posibles sobreajustes, se llevó a cabo una validación cruzada (*Cross Validation*, CV) (10 veces, 1 repetición). Los valores de sensibilidad, especificidad y tasa de error de resustitución se tomaron de la CV. Las distintas enfermedades se agruparon en un grupo. Los biomarcadores o sus combinaciones se evaluaron en función de su capacidad para diferenciar a las vacas enfermas.

#### Ejemplo 1: Expresión génica diferencial de biomarcadores en la leche

La expresión de ARNm de los distintos biomarcadores en las células lácteas se analizó mediante qPCR. Para confirmar la relevancia sistémica de los posibles biomarcadores del entorno local de la glándula mamaria, también se examinó el patrón de expresión de los biomarcadores en los leucocitos sanguíneos periféricos. Los datos de los grupos de enfermedad sistémica leve y grave se resumieron y analizaron en un grupo de enfermedad sistémica en el caso de un número reducido de muestras. La figura 1 muestra los resultados de los biomarcadores más relevantes.

#### Ejemplo 2: Cuantificación y selección de biomarcadores

Sobre la base de los resultados de experimentos anteriores (microarrays, qPCR y otros), se seleccionaron biomarcadores potenciales y se cuantificaron a nivel proteico utilizando kits ELISA comercializados. Se encontraron concentraciones aumentadas de IL-18, LTF, PIGR (SC), TNF-alfa y VEGF en la leche en casos de DA, enfermedad sistémica grave, mastitis y combinaciones de las enfermedades. Sin embargo, HP y S100A9 mostraron niveles elevados en el caso de enfermedad sistémica leve (figura 2). También se determinaron los patrones de expresión de HP, IL-18 y LTF en plasma, para establecer la capacidad predictora de los marcadores para enfermedades sistémicas. En la figura 3 se muestra la correlación de las concentraciones de HP y LTF en leche y plasma. Los coeficientes positivos de correlación de Spearman (Spearman ρ) muestran la relación entre las concentraciones de proteínas de la leche y del plasma. Además, se analizó la correlación de los biomarcadores más potentes en la leche. Todas las proteínas mostraron una correlación positiva de la concentración en la leche con las enfermedades (Tabla 1). Los mejores marcadores se evaluaron estadísticamente.

Tabla 1: Correlaciones de biomarcadores proteínicos en leche y plasma

| Correlación de              | Coefficiente de correlación de Spearman | p     | n  |
|-----------------------------|-----------------------------------------|-------|----|
| Correlación en la leche     |                                         |       |    |
| Leche HP y leche PIGR (SC)  | 0,67                                    | 0,001 | 71 |
| Leche LTF y leche PIGR (SC) | 0,61                                    | 0,001 | 79 |

|                                            |                                  |      |       |     |
|--------------------------------------------|----------------------------------|------|-------|-----|
| 5                                          | Leche HP y leche LTF             | 0,59 | 0,001 | 142 |
|                                            | Leche HP y leche VEGF            | 0,58 | 0,001 | 120 |
|                                            | Leche LTF y leche VEGF           | 0,54 | 0,001 | 132 |
|                                            | Leche VEGF y leche PIGR (SC)     | 0,41 | 0,001 | 79  |
| <b>Correlación en la leche y el plasma</b> |                                  |      |       |     |
| 10                                         | Leche HP y Plasma HP             | 0,78 | 0,001 | 121 |
|                                            | IL-18 en leche e IL-18 en plasma | 0,38 | 0,088 | 21  |
|                                            | Leche LTF y Plasma LTF           | 0,33 | 0,005 | 69  |
| <b>Correlación en plasma</b>               |                                  |      |       |     |
|                                            | Plasma HP y Plasma LTF           | 0,59 | 0,001 | 63  |

Ejemplo 3: Análisis estadístico de los biomarcadores

Se seleccionaron para el análisis estadístico los biomarcadores lácteos HP, PIGR (SC), LTF y VEGF, altamente regulados y concentrados. Se utilizó un subconjunto de muestras, en las que se habían determinado los cuatro marcadores para poder comparar directamente los resultados. Se evaluaron los biomarcadores solos y combinaciones de dos biomarcadores. A este respecto, se utilizaron 17 muestras de control y 49 muestras de vacas enfermas. El poder discriminatorio para cada grupo de enfermedad se determinó mediante un análisis ROC (Figura 4A, Tabla 2). HP y PIGR (SC) mostraron la mejor discriminación de la enfermedad sistémica leve con un AUC de 0,69 y 0,68, respectivamente. Todas las proteínas fueron altamente discriminatorias para la enfermedad sistémica grave y la mastitis (AUC > 0,9).

**Tabla 2:** Capacidad de diferenciación de biomarcadores lácteos para diversas enfermedades. Los datos se generaron mediante análisis ROC. (Control: n = 17, enfermedad (enferm.) sistémica (sistém.) leve: n = 17, DA (+ enfermedad metabólica): n = 8, enferm. sistém. grave: n = 5, enferm. sistém. grave + DA: n = 8, mastitis: n = 11)

| Grupo de control frente a grupo enfermo | AUC  | Intervalo de confianza del 95 % | p       |
|-----------------------------------------|------|---------------------------------|---------|
| <b>HP</b>                               |      |                                 |         |
| enferm. sistém. leve                    | 0,69 | 0,48 – 0,89                     | 0,065   |
| DAL (+enferm. metabólica)               | 0,96 | 0,89 – 1,03                     | < 0,001 |
| enferm. sistém. grave                   | 0,99 | 0,95 – 1,03                     | 0,001   |
| enferm. sistém. grave +DAL              | 0,99 | 0,95 – 1,02                     | < 0,001 |
| mastitis                                | 1,00 | 1,00 – 1,00                     | < 0,001 |
| <b>PIGR (SC)</b>                        |      |                                 |         |
| enferm. sistém. leve                    | 0,68 | 0,49 – 0,87                     | 0,071   |
| DA (+enferm. metabólica)                | 0,84 | 0,64 – 1,04                     | < 0,05  |
| enferm. sistém. grave                   | 0,95 | 0,87 – 1,04                     | < 0,05  |
| enferm. sistém. grave +DAL              | 0,80 | 0,61 – 0,99                     | < 0,05  |
| mastitis                                | 0,99 | 0,98 – 1,01                     | < 0,001 |
| <b>LTF</b>                              |      |                                 |         |
| enferm. sistém. leve                    | 0,67 | 0,48 – 0,86                     | 0,088   |
| DAL (+enferm. metabólica)               | 0,82 | 0,62 – 1,03                     | < 0,05  |
| enferm. sistém. grave                   | 0,95 | 0,86 – 1,05                     | < 0,05  |
| enferm. sistém. grave +DAL              | 0,93 | 0,84 – 1,03                     | < 0,001 |
| mastitis                                | 0,98 | 0,95 – 1,02                     | < 0,001 |
| <b>VEGF</b>                             |      |                                 |         |
| enferm. sistém. leve                    | 0,57 | 0,38 – 0,77                     | 0,459   |
| DA (+enferm. metabólica)                | 0,99 | 0,96 – 1,02                     | < 0,001 |
| enferm. sistém. grave                   | 0,84 | 0,58 – 1,08                     | < 0,05  |
| enferm. sistém. grave +DAL              | 0,96 | 0,90 – 1,03                     | < 0,001 |
| mastitis                                | 0,97 | 0,91 – 1,03                     | < 0,001 |

Las combinaciones de marcadores se analizaron para discriminar entre animales enfermos y animales de control con dos procedimientos estadísticos de clasificación, la regresión logística multinomial (MLR) y la clasificación k vecino más próximo (K-NN) (Tabla 4). Se utilizó un segundo modelo estadístico para evitar posibles distorsiones de los resultados. HP es la mejor opción para su uso como biomarcador único. En combinación con PIGR (SC) o LTF, puede lograrse un ligero aumento de la sensibilidad o la especificidad. Estas combinaciones mostraron los mejores resultados para detectar animales enfermos.

Una aplicación práctica de los biomarcadores requiere una alta especificidad de la prueba, para no sobrestimar la aparición de enfermedades en grandes explotaciones lecheras. Por eso se realizó un análisis ROC combinado para todos los grupos de enfermedad frente al control, para evaluar la sensibilidad (“verdadero positivo”), especificidad (“verdadero negativo”), 1-sensibilidad (“falso negativo”) y 1-especificidad (“falso positivo”) de la determinación del biomarcador en la leche a diferentes concentraciones de corte. La tabla 3 muestra los valores de las posibles concentraciones de corte con una elevada especificidad del 94 %. Las curvas ROC correspondientes se muestran en la figura 4B. Con una especificidad del 94 %, un 6 % de las vacas realmente sanas se reconocerían como enfermas. El 18 %, 41 %, 45 % y 33 % de los animales enfermos se diagnosticarían como sanos con la detección, en cada caso, de HP, PIGR (SC), LTF y VEGF.

Sobre la base de este análisis, podría demostrarse que la determinación de la HP es adecuada para la detección de enfermedades en vacas lecheras. También es posible una medición combinada con PIGR (SC) o LTF para aumentar la sensibilidad o la especificidad.

**Tabla 3:** Capacidad de diferenciación de biomarcadores lácteos para animales enfermos. Los datos se generaron mediante análisis ROC. (control: n = 17, enfermos: n = 49)

| AUC              | Intervalo de confianza del 95 % | p       | Corte al 94 % de especificidad | Sensibilidad al 94 % Especificidad/% |
|------------------|---------------------------------|---------|--------------------------------|--------------------------------------|
| <b>HP</b>        |                                 |         |                                |                                      |
| 0,88             | 0,80 – 0,96                     | < 0,001 | 0,58 µg/ml                     | 82                                   |
| <b>PIGR (SC)</b> |                                 |         |                                |                                      |
| 0,82             | 0,72 – 0,93                     | < 0,001 | 8,20 µg/ml                     | 59                                   |
| <b>LTF</b>       |                                 |         |                                |                                      |
| 0,84             | 0,74 – 0,94                     | < 0,001 | 120,7 µg/ml                    | 55                                   |
| <b>VEGF</b>      |                                 |         |                                |                                      |
| 0,82             | 0,72 – 0,92                     | <0,001  | 9,50 ng/ml                     | 67                                   |

**Tabla 4:** Evaluación de biomarcadores lácteos y sus combinaciones. La clasificación se realizó mediante MLR y K-NN: Control (n = 17) vs. enfermos (n = 49). Las tasas de error de sensibilidad, especificidad y resustitución se tomaron de la CV (10 veces, 1 repetición).

| marcador (combinación)             | Regresión logística multinomial (validación cruzada)/% |               |               | Clasificación k vecino más próximo (validación cruzada)/% |               |               |
|------------------------------------|--------------------------------------------------------|---------------|---------------|-----------------------------------------------------------|---------------|---------------|
|                                    | Sensibilidad                                           | Especificidad | Tasa de error | Sensibilidad                                              | Especificidad | Tasa de error |
| <b>Marcador único</b>              |                                                        |               |               |                                                           |               |               |
| HP                                 | 86                                                     | 88            | 13            | 91                                                        | 69            | 15            |
| LTF                                | 84                                                     | 44            | 27            | 82                                                        | 63            | 23            |
| VEGF                               | 84                                                     | 38            | 28            | 73                                                        | 31            | 38            |
| PIGR (SC)                          | 86                                                     | 25            | 30            | 77                                                        | 19            | 38            |
| <b>Combinaciones de marcadores</b> |                                                        |               |               |                                                           |               |               |
| HP & VEGF                          | 86                                                     | 88            | 13            | 80                                                        | 94            | 17            |
| HP & PIGR (SC)                     | 89                                                     | 81            | 13            | 84                                                        | 75            | 18            |
| HP & LTF                           | 89                                                     | 69            | 17            | 86                                                        | 81            | 15            |
| VEGF & PIGR (SC)                   | 86                                                     | 63            | 20            | 82                                                        | 56            | 25            |
| LTF & PIGR (SC)                    | 84                                                     | 56            | 23            | 86                                                        | 31            | 28            |
| LTF & VEGF                         | 82                                                     | 56            | 25            | 84                                                        | 44            | 27            |

#### Lista de abreviaturas

|         |                                                                                        |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| AUC     | <i>Area Under the Curve</i> , área bajo la curva                                       |
| LS      | leucocitos sanguíneos                                                                  |
| CLIA    | inmunoensayo de quimioluminiscencia                                                    |
| CV      | <i>Cross Validation</i> , validación cruzada                                           |
| EIA     | inmunoensayo enzimático                                                                |
| ELISA   | <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas |
| enferm. | enfermedad                                                                             |
| ESI     | <i>Electrospray Ionization</i> , ionización por electrospray                           |
| FIA     | inmunoensayo de fluorescencia                                                          |

## ES 3 014 975 T3

|    |          |                                                                                                         |
|----|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | FPLC     | <i>Fast Protein Liquid Chromatography</i> , cromatografía líquida rápida de proteínas                   |
|    | HP       | haptoglobina                                                                                            |
|    | HPLC     | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografía líquida de alto rendimiento               |
| 5  | Ig       | inmunoglobulina                                                                                         |
|    | IL       | interleucina                                                                                            |
|    | K-NN     | clasificación k vecino más próximo                                                                      |
|    | DA       | Desplazamiento de abomaso                                                                               |
|    | LTF      | lactoferrina                                                                                            |
| 10 | MALDI    | <i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i> , desorción/ionización por láser asistida por matriz |
|    | RLM      | regresión logística multinominal                                                                        |
|    | mARN     | ácido ribonucleico mensajero                                                                            |
| 15 | CL       | Células lácteas                                                                                         |
|    | PIGR     | receptor polimérico de inmunoglobulina                                                                  |
|    | PPIB     | ciclofilina B (gen de referencia)                                                                       |
|    | RIA      | radioinmunoanálisis                                                                                     |
| 20 | ROC      | <i>Receiver Operating Characteristic</i> , característica operativa de receptor                         |
|    | S100A9   | S100 proteína de unión al calcio A9                                                                     |
|    | SC       | <i>Secretory Component</i> , componente secretor del PIGR                                               |
|    | SDS-PAGE | electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio                                     |
|    | SPR      | resonancia plasmónica superficial                                                                       |
| 25 | sistém.  | sistémico/a                                                                                             |
|    | TNF-alfa | factor de necrosis tumoral alfa                                                                         |
|    | UXT      | <i>Ubiquitously-Expressed Transcript</i> , transcripción de expresión ubicua (gen de referencia)        |
| 30 | VEGF     | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , factor de crecimiento endotelial vascular                   |

35

40

45

50

55

60

65

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, en donde el procedimiento no se utiliza para diagnosticar mastitis, que comprende las siguientes etapas:  
  - (a)proporcionar una muestra de leche de la vaca lechera,
  - (b)medir la concentración del biomarcador haptoglobina (HP) en la muestra de leche,
  - (c)comparar la concentración medida a partir de (b) con un valor de referencia del biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera,

y en donde el estado de salud comprende enfermedad sistémica leve, enfermedad sistémica leve con desplazamiento de abomaso (DA), enfermedad sistémica grave o combinaciones de estas afecciones.
2. Procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende las siguientes etapas:  
  - (a)proporcionar una muestra de leche de la vaca lechera,
  - (b)medir la concentración de los biomarcadores haptoglobina (HP) y componente secretor del receptor de inmunoglobulina polimérica (PIGR (SC)) en la muestra de leche,
  - (c)comparar la concentración medida de (b) con un valor de referencia del al menos un biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera.
3. Procedimiento no invasivo según la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa (b) comprende medir al menos otro biomarcador seleccionado del grupo formado por LTF, S100A9, IL18, TNF-alfa y VEGF.
4. Procedimiento no invasivo según una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica una enfermedad sistémica de la vaca lechera.
5. Procedimiento no invasivo según una de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el valor de referencia es un valor límite (*cut-off*) y en donde, si la concentración medida del biomarcador supera el valor límite, se confirma un estado no saludable de la vaca lechera.
6. Procedimiento no invasivo según una de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el procedimiento se realiza periódicamente, preferiblemente, mensualmente.
7. Procedimiento no invasivo según una de las reivindicaciones 1 a 6, en donde en la etapa (b), la medición de la concentración se lleva a cabo bioquímicamente mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: SDS-PAGE, FPLC y HPLC; o inmunológicamente mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: ELISA, EIA, FIA, CLIA, RIA, Western Blot y matriz peptídica; o espectrométricamente mediante un procedimiento seleccionado entre los siguientes: SPR, MALDI o ESI.
8. Procedimiento no invasivo para vigilar el estado de salud de un rebaño de vacas lecheras en una explotación lechera, que comprende la realización periódica de un procedimiento para vigilar el estado de salud de al menos una, preferiblemente, de cada una de las vacas lecheras del rebaño según una de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Sistema y/o dispositivo no invasivo para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende:  
  - (a)agentes para alojar una muestra de leche de la vaca lechera,
  - (b)anticuerpos para la medición inmunológica de la concentración de los biomarcadores HP y PIGR (SC) en la muestra de leche,
  - (c)agentes para comparar la concentración medida a partir de (b) con un valor de referencia del biomarcador medido, en donde una desviación de la concentración medida con respecto al valor de referencia indica un estado no saludable de la vaca lechera.
10. Sistema y/o dispositivo no invasivo según la reivindicación 9, que comprende, además, agentes para almacenar datos y/o agentes para mostrar visualmente datos como, por ejemplo, una pantalla de visualización.
11. Sistema y/o dispositivo no invasivo según la reivindicación 9 o 10, en donde el sistema y/o el dispositivo están conectados a una instalación de ordeño automática o semiautomática (sistema de ordeño) y comprende agentes para entregar una muestra de leche de la vaca lechera a los agentes para alojar una muestra de leche durante una operación de ordeño.

12. Kit de diagnóstico para vigilar el estado de salud de una vaca lechera, que comprende anticuerpos para la determinación inmunológica de la concentración de los biomarcadores HP y PIGR (SC) en una muestra de leche.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

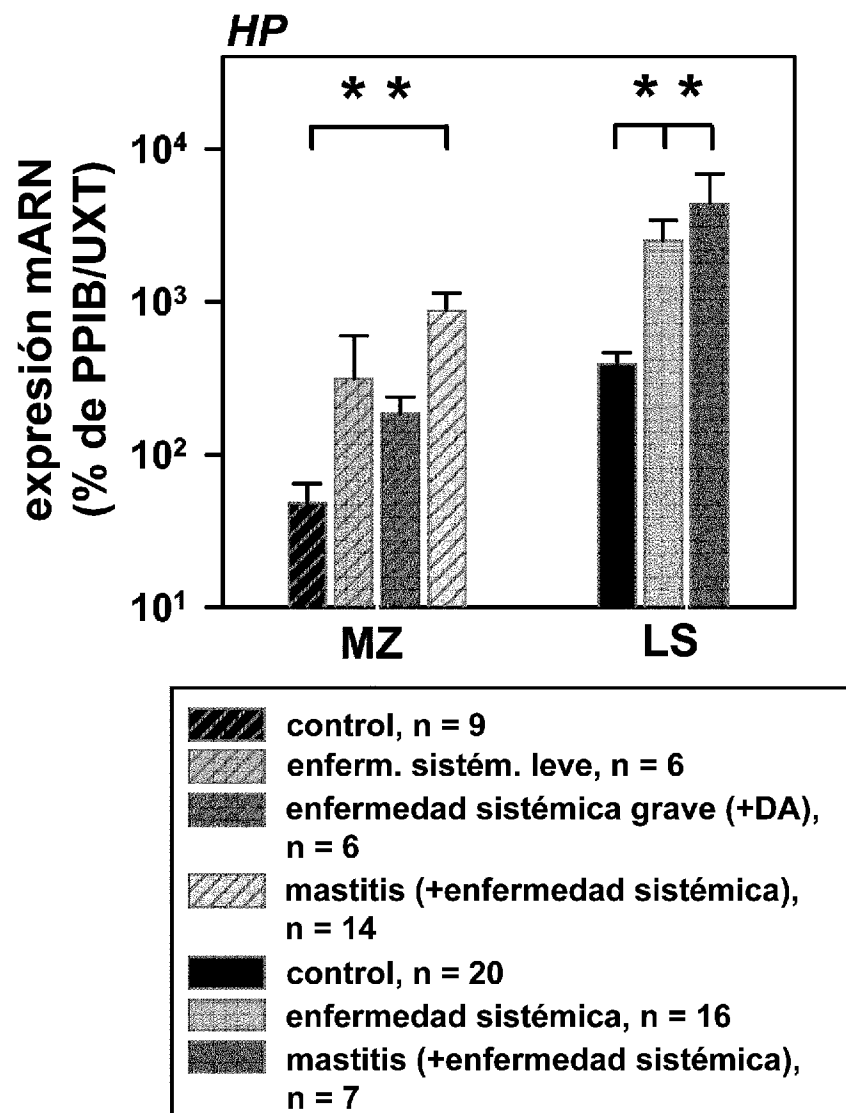


Figura 1 (continuación):

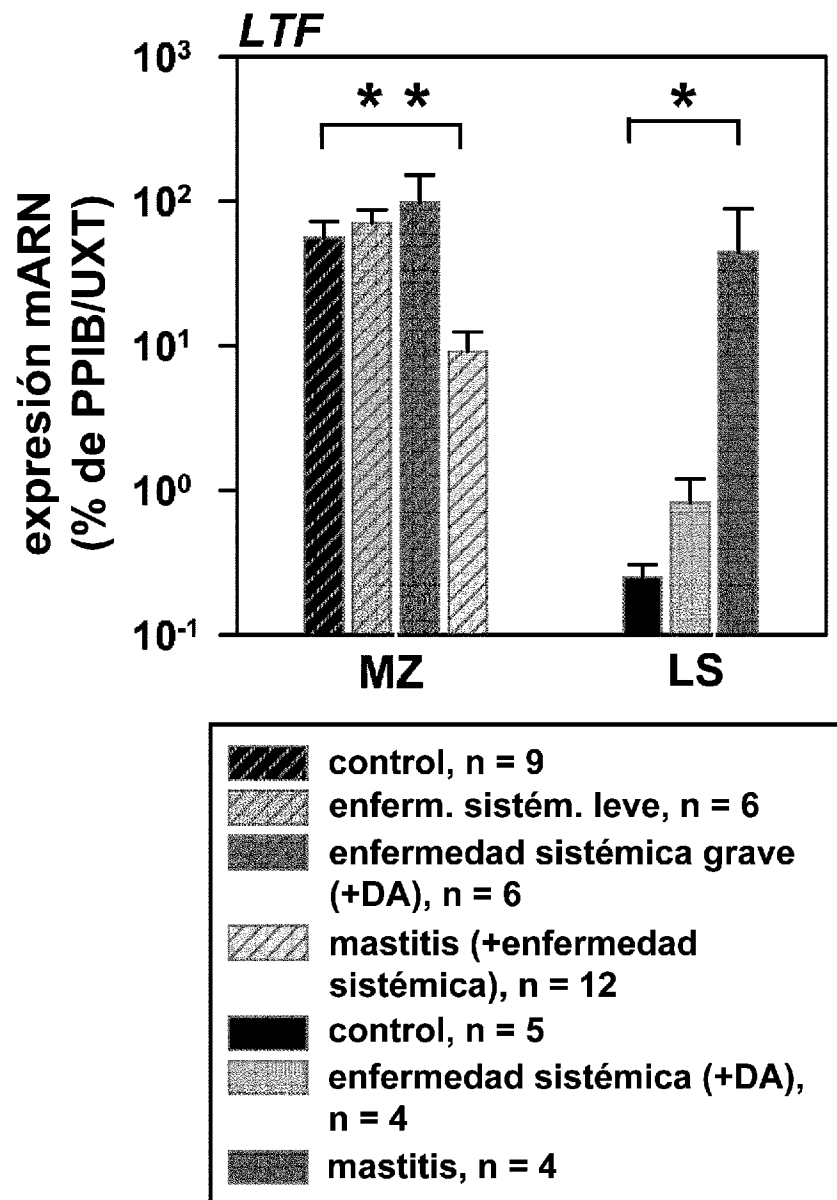


Figura 1 (continuación):

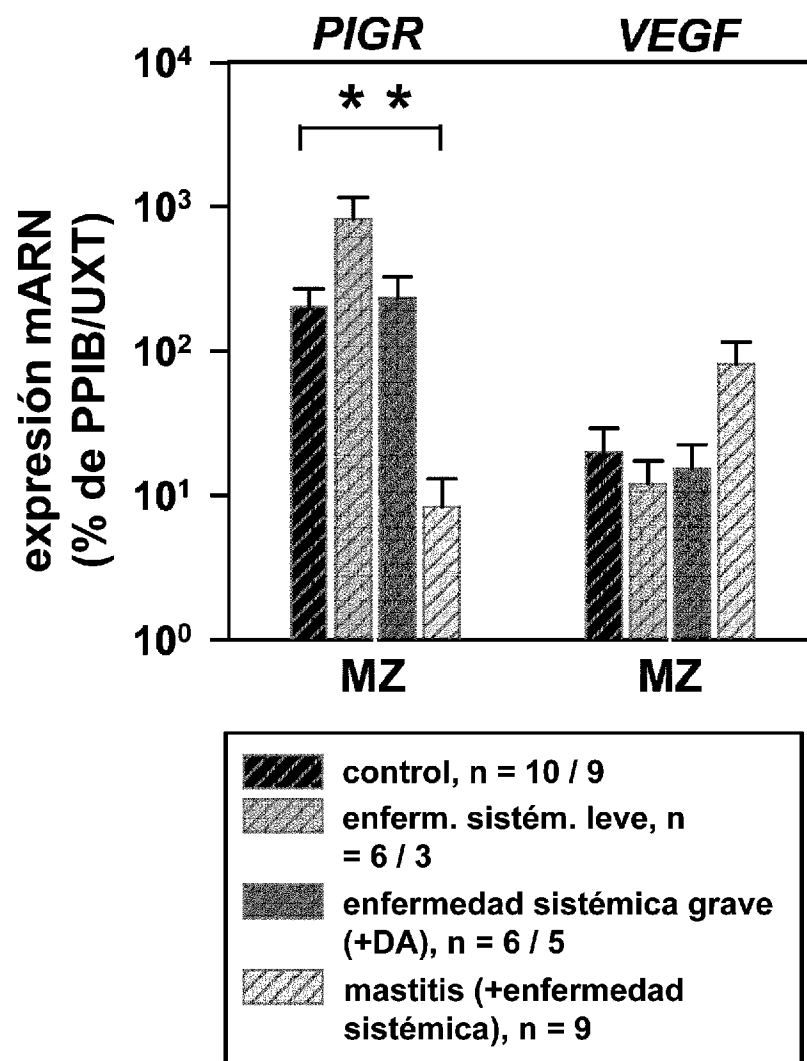


Figura 1 (continuación):

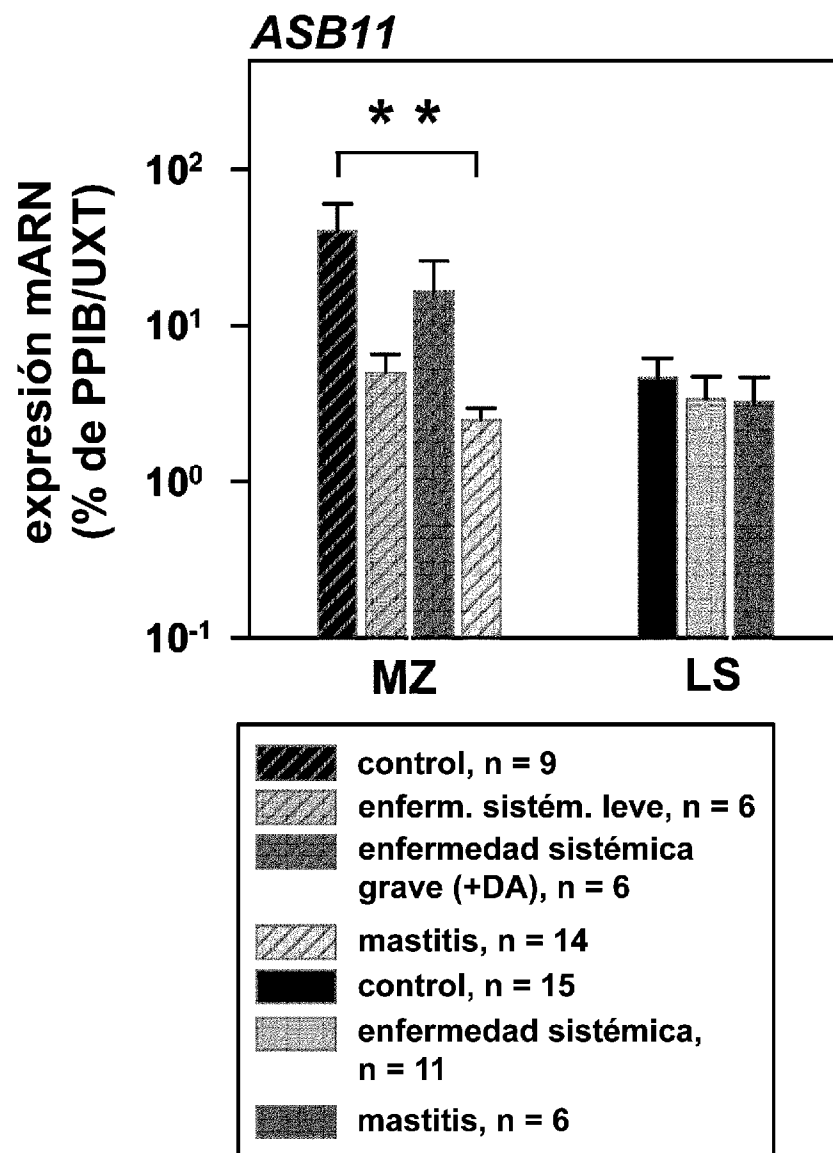


Figura 2

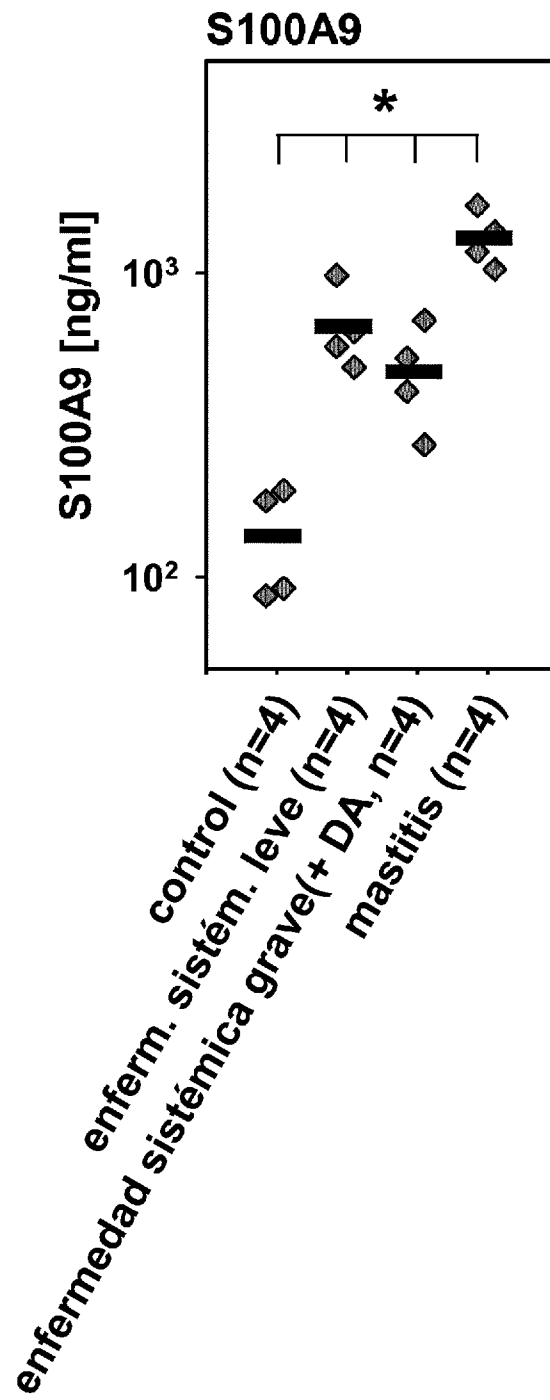


Figura 2 (continuación):

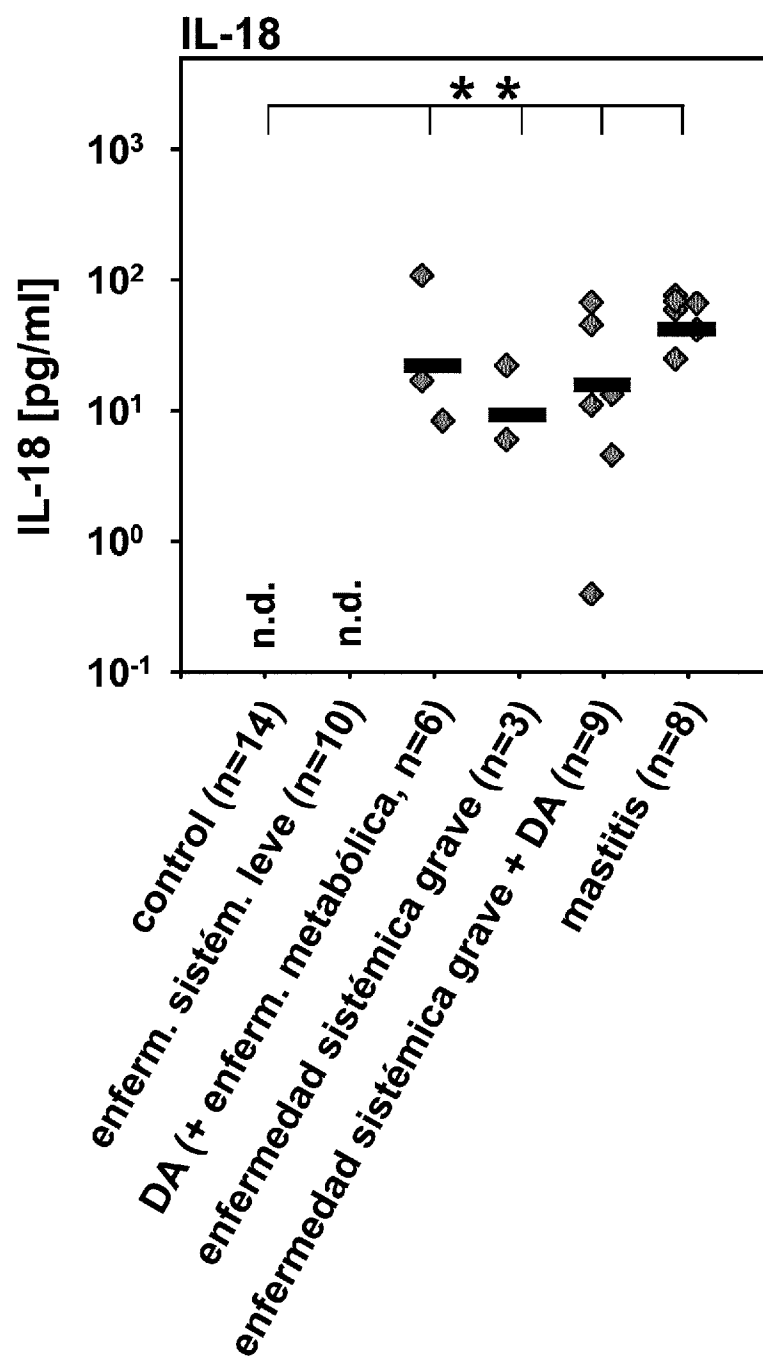


Figura 2 (continuación):

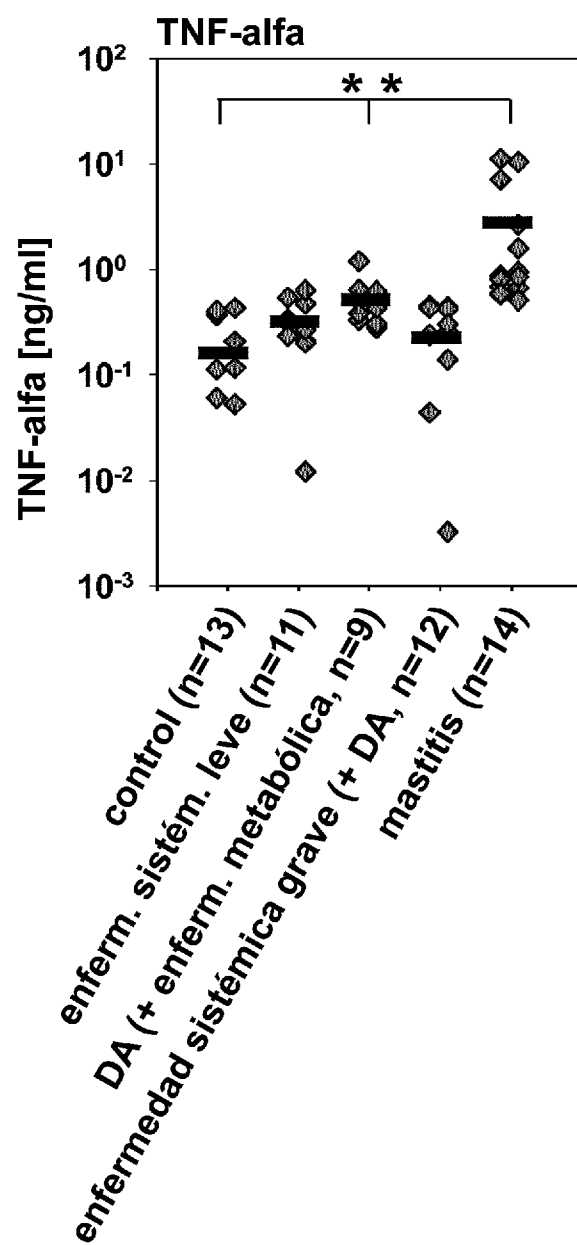


Figura 2 (continuación):

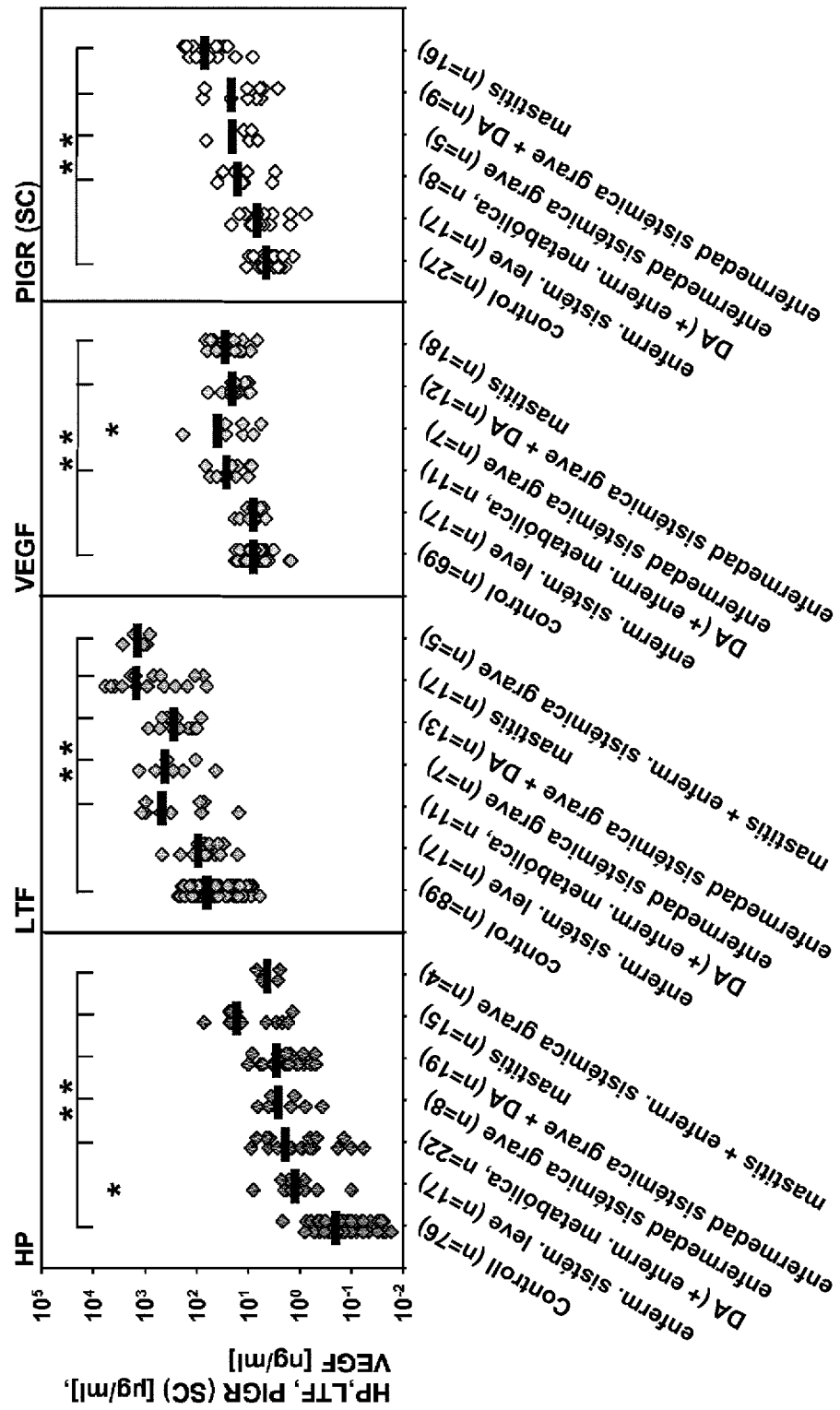


Figura 3

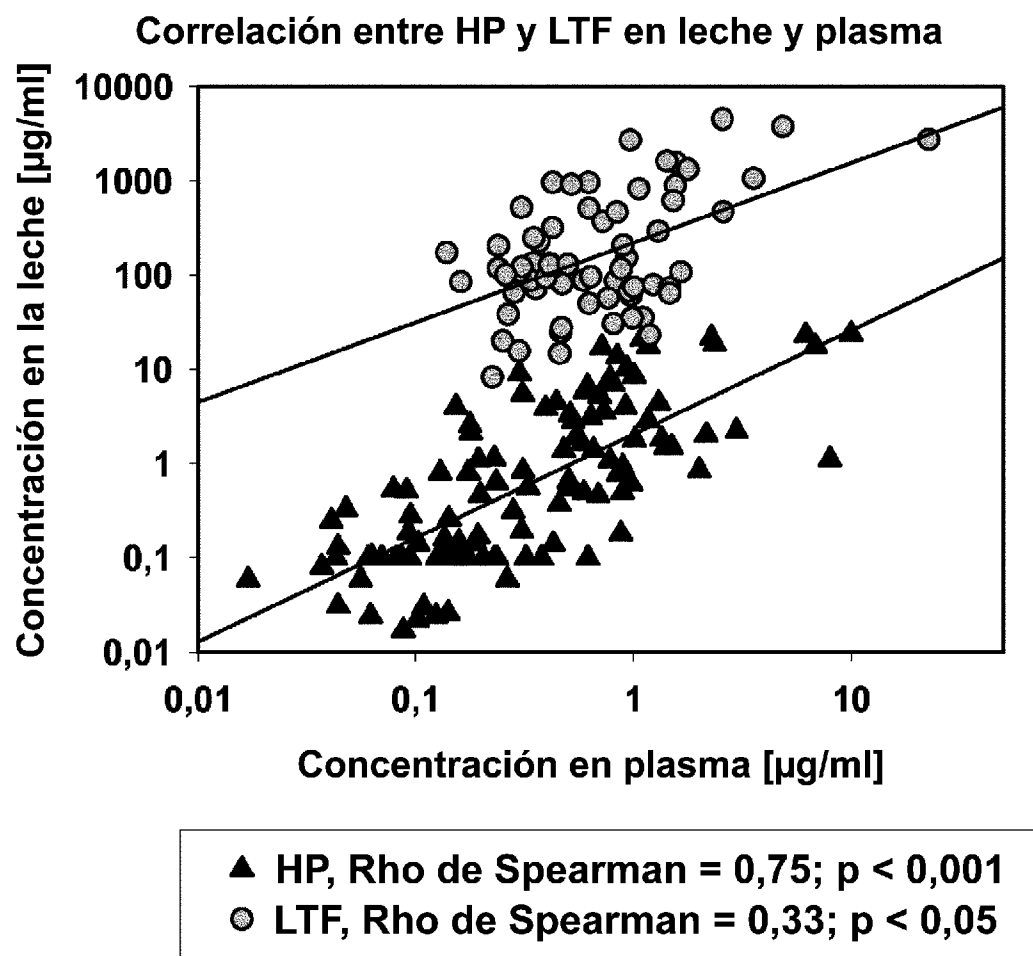
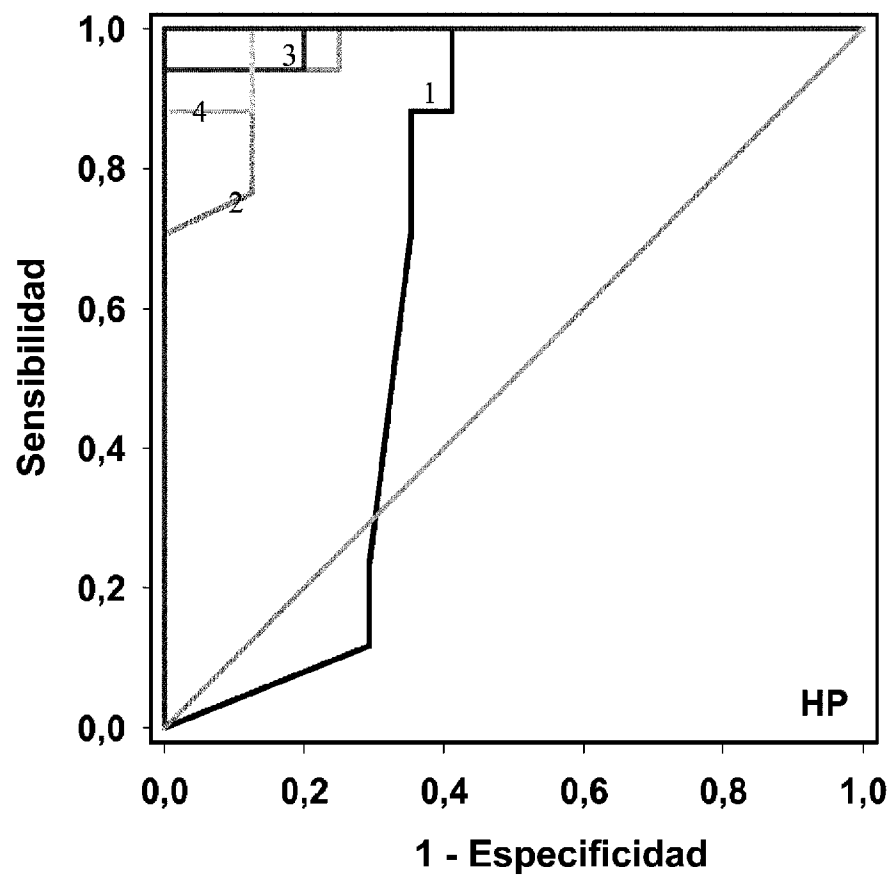


Figura 4A



- 1 — enferm. sistém. leve
- 2 — DA (+enfermedad metabólica)
- 3 — enfermedad sistémica grave
- 4 — enfermedad sistémica grave (+DA)
- 5 — mastitis

Figura 4A (continuación):

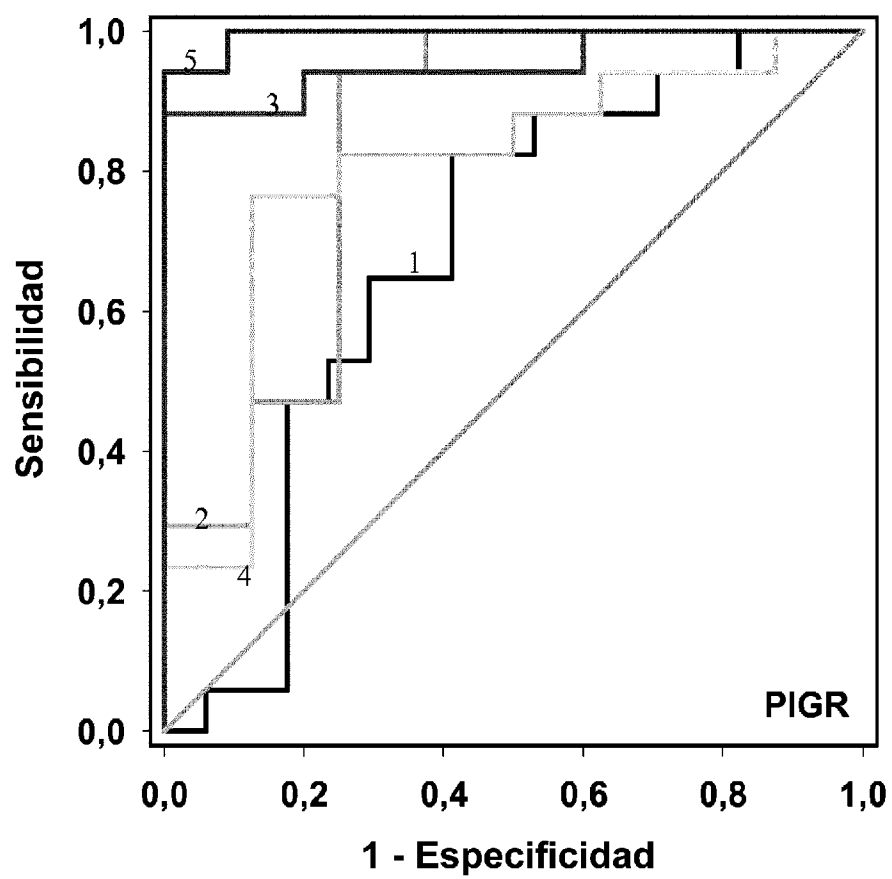


Figura 4A (continuación):

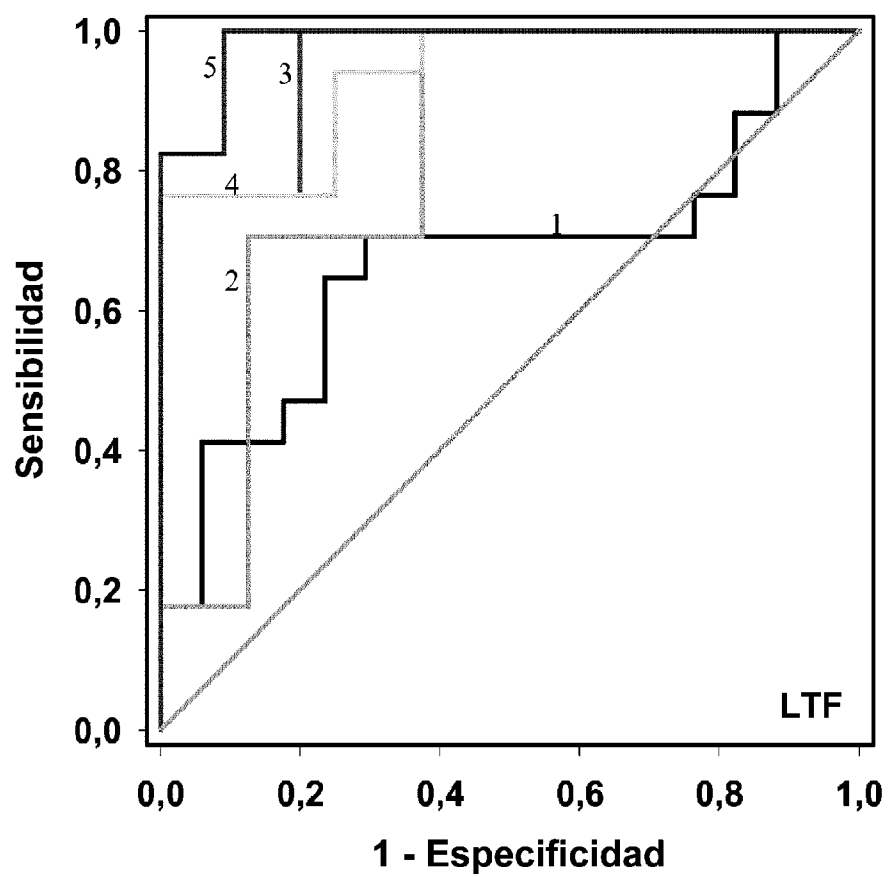


Figura 4A (continuación):

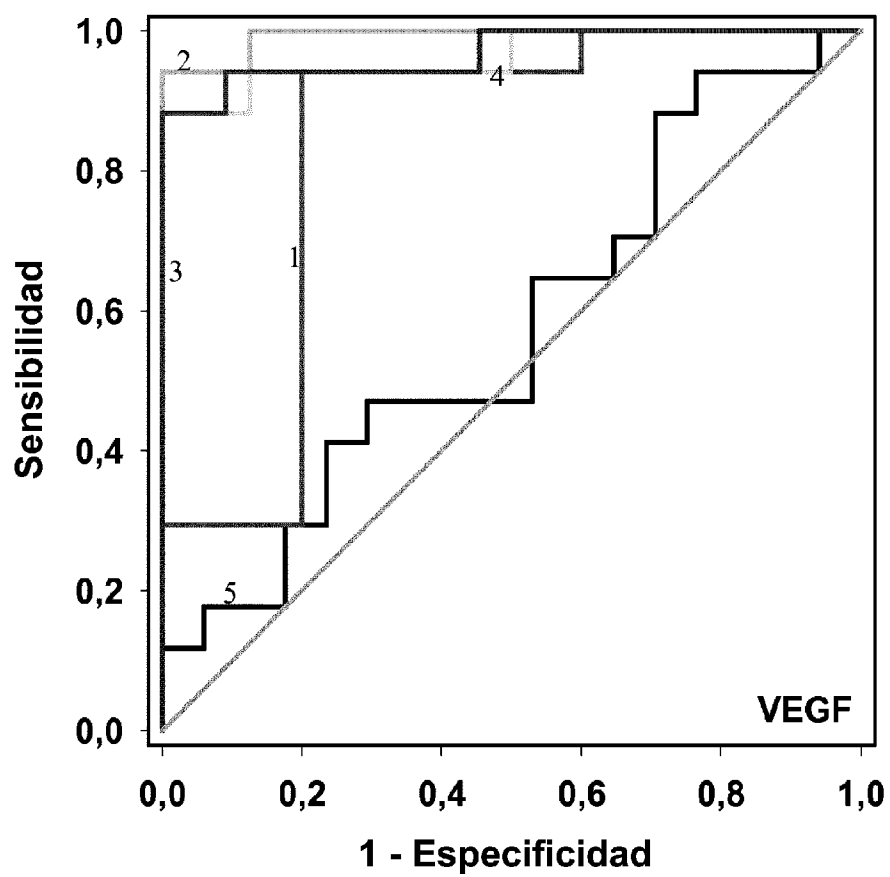


Figura 4B

