



# Eficacia y seguridad de una nueva vacuna frente a la rinitis atrófica porcina

Jordi Montané<sup>1</sup>, Daniel Torrents<sup>2</sup>, J.A. Mesonero Escuredo<sup>3</sup>, Ricard March<sup>4</sup> y Marta Sitjà<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Hipra I+D Biol. <sup>2</sup> Hipra Global Technical Services. <sup>3</sup> Hipra Global Product Manager. <sup>4</sup> HIPRA CEYC Manager. <sup>5</sup> Hipra I+D Biol. Director.

El objetivo del presente estudio fue evaluar la seguridad y la eficacia de una nueva vacuna frente a la rinitis atrófica porcina mediante infección experimental. La variable principal para valorar la eficacia vacunal fue la reducción de las lesiones de atrofia de los cornetes nasales y la desviación del septo nasal provocadas por *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* toxigénica. Para evaluar la seguridad se utilizó el incremento de temperatura rectal, la aparición de reacciones sistémicas y locales y la alteración de los parámetros reproductivos, en comparación con una vacuna comercial de base oleosa con vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol) donde la nueva vacuna Rhiniseng<sup>®</sup> demostró ser más segura sin detrimento de su eficacia.

## Introducción

La rinitis atrófica porcina es una enfermedad infecciosa que en los estadios iniciales se caracteriza por estornudos y descarga nasal que puede variar entre serosa y mucopurulenta. La atrofia de los cornetes nasales y la desviación del septo nasal pueden provocar una braquignatia superior y desviación del hocico. La forma más grave de la enfermedad está causada por la infección de cepas toxigénicas

de *Pasteurella multocida* solas o en combinación con *Bordetella bronchiseptica* (Rinitis Atrófica Progresiva). Las infecciones en las que únicamente participa *B. bronchiseptica* provocan una forma más leve de la enfermedad denominada rinitis atrófica no progresiva caracterizada por una atrofia de los cornetes de leve a moderado (de Jong, 1999).

Las vacunas actuales frente a la rinitis atrófica porcina son principalmente emulsiones oleosas o sus-

pensiones con base oleosa que provocan reacciones locales evidentes o marcados incrementos de temperatura postvacunación. Rhiniseng® (HIPRA) es una nueva vacuna formulada con un adyuvante acuoso Hipramune G<sup>d</sup> que minimiza la aparición de reacciones locales, en comparación con las emulsiones oleosas, y que reduce el aumento de temperatura, en comparación con las suspensiones con base oleosa. En el presente estudio se pretende demostrar que la eficacia de la vacuna no queda comprometida al mejorar su seguridad.

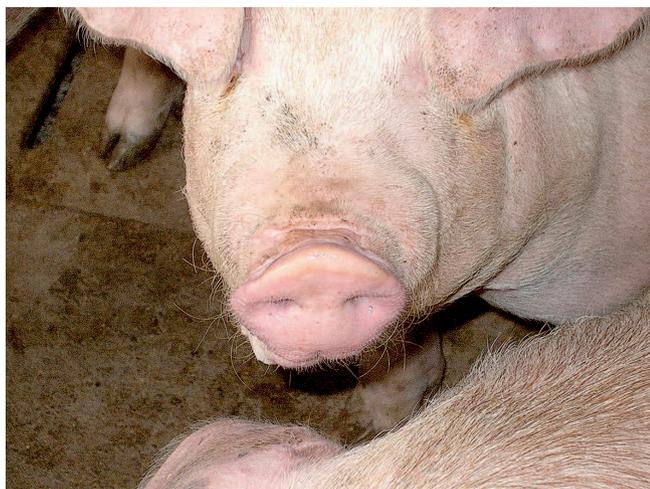
## Objetivos

El objetivo del presente estudio fue evaluar la seguridad y la eficacia de una nueva vacuna frente a la rinitis atrófica porcina mediante infección experimental. La variable principal para valorar la eficacia vacunal fue la reducción de las lesiones de atrofia de los cornetes y la desviación del septo nasal provocadas por *Bordetella bronchiseptica* y *Pasteurella multocida* toxigénica. Para evaluar la seguridad se utilizó el incremento de temperatura rectal, la aparición de reacciones sistémicas y locales y la alteración de los parámetros reproductivos.

## Material y métodos

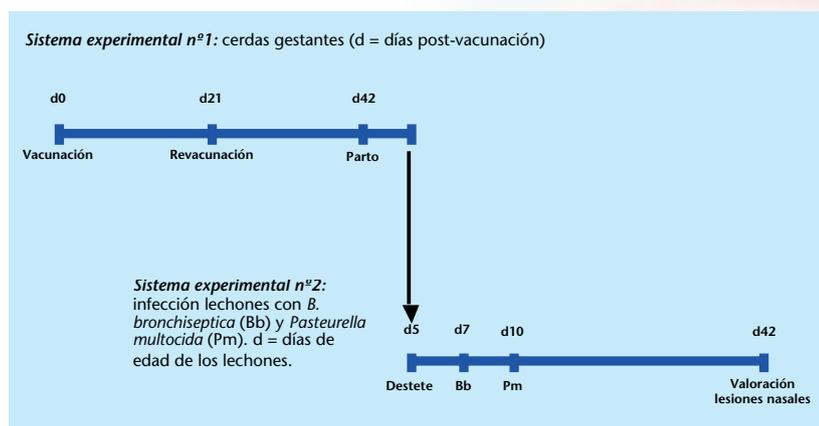
Para el estudio se seleccionaron 15 cerdas gestantes seronegativas frente a *Bordetella bronchiseptica* y frente a *Pasteurella multocida* toxigénica, procedentes de una granja sin signos clínicos de rinitis atrófica. Las cerdas se vacunaron 6 semanas antes de la fecha prevista de parto y se revacunaron 3 semanas después. Las cerdas se repartieron en tres grupos de tratamiento realizando primero un bloqueo por número de partos y, a continuación, una aleatorización del tratamiento recibido por cada una de las cerdas. Cinco cerdas fueron vacunadas con Rhiniseng® (HIPRA), cinco cerdas fueron vacunadas con una vacuna comercial con un adyuvante de base oleosa con vitamina E ( $\alpha$ -Tocoferol) y las cinco restantes recibieron tampón fosfato como tratamiento placebo.

La temperatura rectal de las cerdas se registró el día antes de la vacunación, justo antes de la inoculación, 2, 4 y 6 horas después de aplicar el tratamiento y a diario durante los 3 días siguientes. Se evaluaron las reacciones locales por inspección y palpación minuciosa de todo el lado del cuello donde se realizó la inoculación, las reacciones generales y los efectos sobre la gestación. En el momento



del parto se registró el número de momificados, el número de nacidos muertos, el tamaño de la camada y cualquier alteración que pudiera afectar a la descendencia de cada cerda.

Los lechones nacidos de las cerdas se dejaron con sus respectivas madres hasta el día 5 de edad. Llegado este día, los lechones fueron destetados y trasladados a las instalaciones de seguridad biológica donde fueron sometidos a una infección con *P. multocida* toxigénica (Grupo Pm), o bien a una infección combinada con *B. bronchiseptica* y *P. multocida* toxigénica (Grupo Bb + Pm). Para formar dichos grupos de infección experimental se seleccionaron aleatoriamente 6 lechones/cerda de un total de cuatro cerdas de cada uno de los grupos de tratamiento. Los 6 lechones de cada camada se distribuyeron en 2 salas de aislamiento distintas (3 lechones/sala). Así, tres de los lechones de cada camada se infectaron con *Bordetella bronchiseptica* a los 7 días de vida y con *Pasteurella multocida* a los 10 días de vida (Grupo Bb + Pm), mientras que los otros 3 lechones de la misma camada se infectaron con *Pasteurella multocida* a los 10 días de vida (Grupo Pm). Para formar el grupo control



**Grado atrofia de los cornetes**



Grado 0.



Grado 1.



Grado 2.



Grado 3.



Grado 4.

**Grado desviación septo nasal**



Septo grado 1.



Septo grado 2.

no infectado (grupo centinela) se seleccionaron aleatoriamente 2 lechones (de 2 camadas diferentes) de cada uno de los grupos de cerdas para formar un grupo de 6 animales.

Los dos días anteriores a la infección experimental se instiló 1 ml de una solución de ácido acético (10 g/l) por vía intranasal (0,5 ml/cavidad nasal) para provocar una irritación de la mucosa nasal previa a la inoculación con los agentes patógenos de la rinitis atrófica. Este tratamiento es especialmente necesario cuando la infección experimental se realiza únicamente con *P. multocida* toxigénica, ya que ésta no es capaz de colonizar la mucosa nasal sin que se haya producido una irritación previa por factores ambientales o por una infección previa con *B. bronchiseptica*.

El inóculo de *B. bronchiseptica* para la infección experimental se preparó con la cepa 4609, productora de dermonecrotina y patógena en cerdos (Ackermann *et al.*, 1991; Register and Ackermann, 1997). El inóculo contenía  $2 \cdot 10^8$  unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml). Los inóculos de *P. multocida* se prepararon con la cepa NCTC 12178, una cepa altamente toxigénica de tipo capsular D (Foged *et al.*, 1988) aislada por J.P. Nielsen (1978). Los lechones incluidos en el grupo *Bb + Pm* recibieron 1 ml (0,5 ml/cavidad nasal) de un inóculo con  $6,9 \cdot 10^8$  UFC/ml, mientras que los lechones incluidos en el grupo *Pm* recibieron 2 ml (1 ml/cavidad nasal) de un inóculo con  $4,4 \cdot 10^9$  UFC/ml.

Los animales se sacrificaron a los 42 días de vida y se seccionó el hocico entre el primer y el segundo premolar para valorar el grado de atrofia de los cornetes y la desviación del septo nasal. El sistema de puntuación para valorar el grado de atrofia de cada uno de los cornetes nasales ventrales y dorsales fue el siguiente (Magyar *et al.*, 2002; Monografía 1361 de la Farmacopea Europea):

Puntuación	Descripción de la lesión
0	No existe atrofia
1	Atrofia ligera (falta menos de la mitad del cornete)
2	Atrofia moderada (falta más de la mitad del cornete)
3	Atrofia grave (el hueso del cornete es recto)
4	Atrofia muy grave (desaparición completa del cornete)

La desviación del septo nasal se valoró en base a la siguiente escala:

Puntuación	Descripción de la lesión
0	No existe desviación
1	Desviación muy ligera
2	Desviación clara del septo

La puntuación de lesión nasal (PLN) total se obtuvo realizando el sumatorio del grado de atrofia de los 4 cornetes (puntuación máxima de 16) y del grado de desviación nasal (puntuación máxima de 2), para obtener una puntuación total máxima de 18.

El estudio se realizó de forma ciega tanto para el personal encargado de valorar las variables

clínicas y reproductivas, así como para el personal responsable de realizar los análisis de laboratorio.

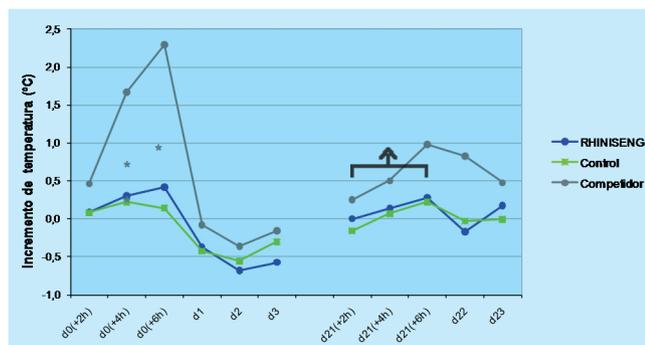
## Análisis estadístico

Para el análisis de las temperaturas rectales se utilizó un modelo mixto de análisis de la varianza (*Mixed Model*). Los datos reproductivos se analizaron mediante una prueba *One-Way ANOVA* y una prueba *Kruskal-Wallis*. La puntuación de lesión nasal se analizó mediante un análisis de la varianza (*ANOVA*) con una prueba *post hoc* de *Dunnett* para las comparaciones dos a dos. Estos análisis se realizaron mediante el paquete estadístico *SPSS 11.5*. El nivel de significación aceptado en todos los casos fue  $p < 0,05$ .

## Resultados

La vacuna *Rhiniseng*<sup>®</sup> provocó un aumento de temperatura significativamente menor que la vacuna comercial de base oleosa, especialmente en el periodo entre las 4 y las 6 horas postvacunación (**Figura 1**). En la revacunación, la única vacuna que provocó un aumento de la temperatura rectal fue la vacuna de base oleosa.

La vacunación no dio lugar a reacciones locales en el punto de inoculación. A la palpación se observó en algunos casos una ligera protrusión en la piel que correspondía al punto de entrada



**Figura 1:** Evolución del incremento medio de la temperatura rectal (°C) en cada grupo experimental en los períodos de vacunación (incremento calculado respecto a la temperatura del día o justo antes de la vacunación) y revacunación (incremento calculado respecto a la temperatura del día 21 justo antes de la revacunación). \* Existen diferencias estadísticamente significativas (modelo mixto de análisis de la varianza con matriz de covarianzas de tipo “unstructured”;  $p < 0,05$ ) a las 4 y a las 6 horas postvacunación entre la vacuna *Rhiniseng* y la vacuna competidora. ↑ Existe un incremento significativo de la temperatura rectal (modelo mixto de análisis de la varianza con matriz de covarianzas de tipo “unstructured”;  $p < 0,05$ ) en el periodo comprendido entre la revacunación y las 6 horas postrevacunación únicamente en los animales vacunados con la vacuna competidora.

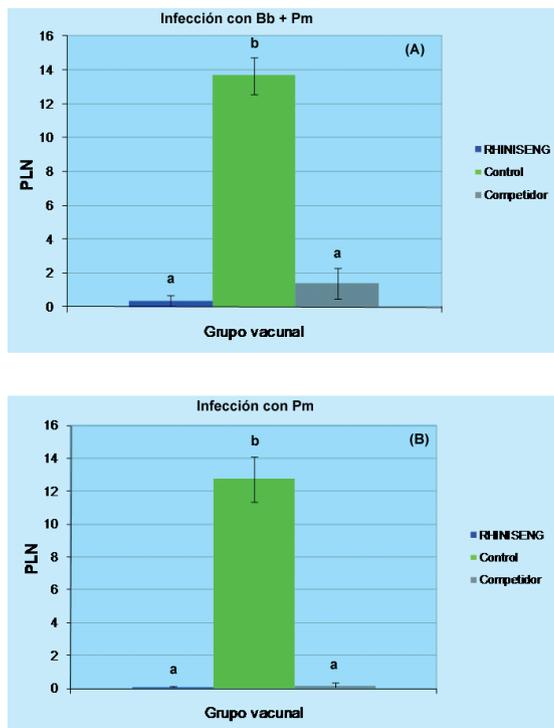
de la aguja. Este hallazgo apareció también en las cerdas del grupo control, que habían recibido *PBS*, en una proporción similar a la registrada en las cerdas vacunadas, por lo que se consideró una reacción al daño físico causado por la aguja más que una reacción vacunal. Tras la revacunación no se observaron reacciones locales por inspección. A la palpación se detectó, en una cerda vacunada con *Rhiniseng*<sup>®</sup>, una tumefacción leve y transitoria que llegó a tener como máximo 3 cm de diámetro.

**Tabla 1:** Parámetros reproductivos en los distintos grupos experimentales (promedio  $\pm$  EEM).

Grupo (n)	N° partos	Abortos	Lechones		
			Nacidos vivos	Nacidos muertos	Momificados
<b>Rhiniseng<sup>®</sup> (5)</b>	1,8 $\pm$ 1,32	0/5	11,0 $\pm$ 1,64	1,8 $\pm$ 0,92	0,6 $\pm$ 0,40
<b>Control (5)</b>	1,6 $\pm$ 1,17	0/5	11,6 $\pm$ 1,70	0,8 $\pm$ 0,58	1,4 $\pm$ 0,00
<b>Competidor (5)</b>	1,8 $\pm$ 0,66	1/5	11,8 $\pm$ 1,70	0,8 $\pm$ 0,58	0,0 $\pm$ 0,00

No se encontraron diferencias significativas dentro de una misma columna (prueba *One-way ANOVA* y prueba *Kruskal-Wallis*;  $p < 0,05$ ).





**Figura 2:** Puntuación de lesión nasal (promedio  $\pm$  EEM [error estándar de la media]) a los 42 días de vida de los lechones, considerando la cerda como unidad experimental, en los grupos de infección experimental Bb + Pm (A) y Pm (B). <sup>a, b</sup> Los valores con distinto superíndice son estadísticamente distintos entre grupos experimentales (One-Way ANOVA;  $p < 0,05$ ).

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros reproductivos (Tabla 1). Una de las cinco cerdas que recibió la vacuna competidora sufrió un aborto. Esta cerda fue la que presentó el mayor aumento de temperatura tanto después de la vacunación ( $2,64^{\circ}\text{C}$ ) como

después de la revacunación ( $1,89^{\circ}\text{C}$ ).

La puntuación de lesión nasal, el parámetro principal de eficacia de las vacunas frente a la rinitis atrófica porcina, fue significativamente menor en los lechones procedentes de las cerdas vacunadas que en los procedentes de las cerdas control (Figura 2).

## Discusión

La eficacia de la vacuna Rhinisen<sup>®</sup> fue demostrada mediante infección experimental en el periodo de máxima susceptibilidad de los lechones a la rinitis atrófica. La cepa de *B. bronchiseptica* utilizada era una cepa en fase I, es decir en fase virulenta, productora de dermonecrotina (Register y Ackermann, 1997) y capaz de producir lesiones de rinitis atrófica no progresiva. Recientemente se ha demostrado que la expresión de dermonecrotina por parte de *B. bronchiseptica* no es un factor necesario para predisponer a la infección frente a *P. multocida* toxigénica (Brockmeier y Register, 2007), por lo tanto, la cepa utilizada en la presente infección experimental era más virulenta de lo que sería necesario para reproducir un cuadro de rinitis atrófica progresiva. Pese a ello, Rhinisen<sup>®</sup> protegió a los cerdos sometidos a la infección combinada con cepas toxigénicas de *B. bronchiseptica* y *P. multocida*.

Rhinisen<sup>®</sup>, además de proporcionar la protección adecuada, frente a las infecciones experimentales, provocó un aumento de temperatura rectal significativamente inferior al causado por la vacuna competidora y, a diferencia de ésta, no causó ningún aborto

## Referencias Bibliográficas

**Ackermann MR, Rimler RB, Thurston JR.** Experimental model of atrophic rhinitis in gnotobiotic pigs. *Infection and Immunity* 1991, 59: 3626-3629.

**Brockmeier SL, Register KB.** Expression of demonecrotic toxin is not necessary for predisposing to infection

with toxigenic *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology* 2007, 125: 284-289.

**De Jong MF.** Progressive and Nonprogressive Atrophic Rhinitis. En: *Diseases of Swine*. Ed. Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL Taylor DJ. Iowa University Press, Ames (IA); 1999: 355-384.

**Foged NT, Nielsen JP, Pedersen KB.** Differentiation of toxigenic from nontoxi-

genic isolates of *Pasteurella multocida* by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Clinical Microbiology* 1988, 26: 1419-20.

**Magyar T, King VL, Kóvacs F.** Evaluation of vaccines for atrophic rhinitis – a comparison of three challenge modes. *Vaccine* 2002, 20: 1797-1802.

Monografía 1361. Farmacopea Europea. Vacunas

inactivadas frente a la rinitis atrófica progresiva.

**Register, KB., Ackermann MR.** A highly adherent phenotype associated with virulent Bvg<sup>+</sup>-phase swine isolates of *Bordetella bronchiseptica* grown under modulating conditions. *Infection and Immunity* 1997, 65: 5295-5300.