

RINITIS ATRÓFICA PORCINA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La rinitis atrófica es una enfermedad infecciosa porcina que se caracteriza por la secreción nasal serosa o mucopurulenta, el acortamiento o deformación de la jeta, la atrofia de los cornetes nasales y una reducción de la productividad. Dependiendo de diversos factores, como la inmunidad de la piara, la enfermedad puede aparecer de forma enzoótica o más esporádicamente. La forma progresiva de la misma, que es más grave, está causada por la infección con cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida* sola, o en combinación con *Bordetella bronchiseptica*. Las infecciones por *B. bronchiseptica* sola pueden causar una forma de la enfermedad, que varía de leve a moderada, con una atrofia no progresiva de los cornetes. La atrofia de los cornetes puede ser solo evidente al sacrificar el animal, o en el animal vivo mediante radiografía o tomografía. Factores medioambientales y de manejo pueden contribuir a la gravedad y a la incidencia de esta enfermedad. Una gran proporción de las piaras porcinas, aparentemente normales, pueden estar infectadas por *B. bronchiseptica*, o por *P. multocida* no toxigénica, y presentan un ligero grado o baja prevalencia de atrofia de los cornetes.

Identificación de los agentes: El diagnóstico de la rinitis atrófica se basa en las observaciones clínicas y postmortem de cerdos afectados, junto con el aislamiento y la caracterización de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*. Con frecuencia, el aislamiento de ambos microorganismos es complicado, debido al crecimiento más abundante de otros. Los porcentajes de aislamiento han mejorado debido a la conservación de los hisopos de las amígdalas y nasales a 4–8°C en un medio de transporte no nutritivo, y a la utilización de un medio de cultivo selectivo.

Pasteurella multocida y *B. bronchiseptica* se pueden identificar mediante las pruebas bioquímicas tradicionales. Las cepas de *Pasteurella multocida* pueden caracterizarse posteriormente por sus antígenos capsulares y somáticos. El tipo capsular D es el más frecuente en muchas partes del mundo, pero en algunas regiones predomina el tipo A. Los antígenos capsulares pueden distinguirse serológicamente mediante la hemoaglutinación indirecta o la inmunofluorescencia, y químicamente por la precipitación con acriflavina, o por la susceptibilidad a la hialuronidasa. Los tipos de antígeno somático se pueden diferenciar mediante una prueba de precipitación por difusión en gel, siendo el tipo 3 el que se encuentra con mayor frecuencia en los cerdos. La toxigenicidad de las cepas de *P. multocida* puede demostrarse mediante la prueba de la citotoxicidad en cultivos celulares o con un ensayo inmunoenzimático (ELISA) comercial específico de toxina. El ELISA también es apropiado para detectar la producción de toxina por parte de bacterias a partir de placas de cultivos primarios, sin necesidad del aislamiento e identificación previos de las colonias.

Se ha observado que las pruebas basadas en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya sea convencional o en tiempo real, ofrecen una detección rápida, sensible y muy específica de *B. bronchiseptica* y de *P. multocida* toxigénica y no toxigénica en los laboratorios con capacidad para realizarlas. También se ha descrito una PCR múltiple para la tipificación capsular de *P. multocida*.

Pruebas serológicas: La detección de anticuerpos contra *P. multocida* y *B. bronchiseptica* tiene escaso valor, ya que las cepas de *P. multocida* no toxigénicas comparten antígenos que presentan reacción cruzada con las cepas toxigénicas, y *B. bronchiseptica* puede aislarse en muchas piaras porcinas. Se ha descrito un ELISA para la detección de anticuerpos contra la toxina de *P. multocida*, pero su utilidad es escasa, ya que no todos los cerdos infectados desarrollan dichos

anticuerpos. La vacunación generalizada con el toxoide de *P. multocida* induce la aparición de anticuerpos de origen vacunal, complicando la interpretación de los resultados.

Requisitos para las vacunas: Hay varias vacunas disponibles en el mercado que contienen bacterinas de *B. bronchiseptica* y una mezcla de cepas de *P. multocida* toxigénicas y no toxigénicas, o un toxoide derivado de *P. multocida* o de una cepa de *Escherichia coli* recombinante.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción e impacto de la enfermedad

Los signos clínicos iniciales son estornudos, resoplidos y secreción ocular que da lugar a manchas oscuras en los lagrimales, y la posterior secreción nasal, que puede oscilar entre serosa y mucopurulenta; en algunos casos, los cerdos pueden presentar epistaxis. La atrofia de los cornetes nasales y la desviación del tabique nasal pueden comportar acortamiento o torsión de la jeta y, en los casos graves, dificultades para comer. El aumento de la gravedad se asocia con el hacinamiento y un manejo, alojamiento y condiciones medioambientales inadecuados. La reducción de la productividad en general se relaciona con una rinitis atrófica moderada a grave, aunque no se ha aclarado del todo la relación precisa entre la infección por las bacterias causales y el escaso aumento de peso.

Bordetella bronchiseptica o *P. multocida* toxigénica pueden estar presentes en una pira sin que se observen signos clínicos de enfermedad, sobre todo cuando no hay otros agentes patógenos respiratorios y las condiciones medioambientales y de manejo son óptimas. Dichas piras portadoras representan un riesgo para la transmisión de estos agentes a otras piras, en las que puede producirse la evolución hacia a una enfermedad grave. *Bordetella bronchiseptica* *P. multocida* toxigénica se hallan con frecuencia en muchas especies animales domésticas y salvajes que podrían llegar a transmitir la bacteria a piras de cerdos.

2. Naturaleza y clasificación de los agentes patógenos causales

La rinitis atrófica es una enfermedad infecciosa porcina que se caracteriza por un desarrollo atrofiado o deformación de los cornetes y tabique nasal.

Se han descrito dos formas de rinitis atrófica, en función del agente(s) causal(es) (Brockmeier *et al.*, 2012):

- i) Una forma progresiva grave, causada por cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida*, más frecuentemente de los tipos capsulares D o A, solas o en combinación con *Bordetella bronchiseptica*.
- ii) Una forma menos grave, no progresiva, con atrofia de los cornetes, que varía de leve a moderada, y a menudo sin cambios significativos en la jeta, que es la causada por *B. bronchiseptica*.

3. Posible riesgo zoonótico y requisitos de bioseguridad y bioprotección

La infección de seres humanos por *B. bronchiseptica* es muy infrecuente y tiene lugar más a menudo en personas inmunocomprometidas expuestas a mascotas infectadas o vacunadas; la transmisión del cerdo al hombre no está documentada. *Pasteurella multocida* puede ser un agente patógeno grave para el ser humano, pero la mayoría de infecciones zoonóticas se asocian a exposición a mascotas o animales salvajes. *Pasteurella multocida* también se ha aislado con frecuencia de personas sanas portadoras que trabajan en explotaciones porcinas o que viven cerca de las mismas, y en ocasiones se ha asociado a enfermedad respiratoria crónica o aguda en estos individuos (Donnio *et al.*, 1999; López *et al.*, 2013; Marois *et al.*, 2009). La transmisión tiene lugar principalmente por mordeduras o arañazos y la contaminación de la herida por material infectado, pero también puede derivar de una inhalación de aerosoles. Deben respetarse las precauciones correspondientes cuando se contacta con cerdos infectados por *P. multocida*, sobre todo en el caso de personas inmunocomprometidas. Cuando se manipulan muestras clínicas y cultivos de *B. bronchiseptica* y *P. multocida* deben aplicarse los procedimientos de bioseguridad y bioprotección apropiados, que vendrán determinados por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

4. Diagnóstico diferencial

El citomegalovirus porcino también causa rinitis en cerdos jóvenes, pero no llega a causar atrofia de cornetes ni deformación nasal. La aparición de hueso asimétrico como consecuencia de un hábito de mordisqueo o

masticado de las instalaciones o los bebederos pueden comportar una considerable falta de alineación de la mandíbula en algunos cerdos. Una cuidadosa inspección permite diferenciar este trastorno del acortamiento o desviación de la jeta propios de la rinitis atrófica.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la rinitis atrófica porcina y su propósito

Método	Propósito					
	Determinar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección - vigilancia	Determinar el estado inmunitario de un animal o una población post-vacunación
Identificación del agente¹						
Cultivo y pruebas bioquímicas	+++	+++	+++	+++	+++	–
PCR en tiempo real	++	++	++	++	++	–
PCR convencional	++	++	++	++	++	–
ELISA para la toxina de <i>P. multocida</i>	++	++	++	++	++	–
ECP propio de la toxina de <i>P. multocida</i>	+	+	+	+	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA para toxina de <i>P. multocida</i>	–	–	–	–	–	++
ELISA o prueba de aglutinación para <i>B. bronchiseptica</i>	++	++	n/a	++	++	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

PCR= reacción en cadena de la polimerasa; ELISA= enzimoimmunoanálisis; ECP = efecto citopático en cultivo tisular.

El diagnóstico de la rinitis atrófica se basa en la exploración física y en pruebas anatomopatológicas y microbiológicas, siendo las últimas particularmente importantes en las explotaciones con una infección subclínica. Generalmente se acepta que una pira en la que esté presente *P. multocida* toxigénica se considere como afectada por rinitis atrófica progresiva, tanto si se observan signos clínicos como si no (Pedersen *et al.*, 1988). Por lo tanto, en muchos países, el control se ha centrado en la detección de la infección, incluso en animales infectados de forma subclínica considerados posibles portadores.

1. Criterios de diagnóstico anatomopatológico

La atrofia de los cornetes solo puede verse en el sacrificio, cuando se examinan cortes de la jeta entre el primer y el segundo premolar. A menudo, para el seguimiento de las piaras, es conveniente y útil la valoración subjetiva de la atrofia de los cornetes. (Brockmeier *et al.*, 2012), pero las escalas de medición objetivas van mejor en los estudios que requieren un análisis de datos (Gatlin *et al.*, 1996). La radiografía (Done, 1976) y la tomografía

¹ Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una misma muestra clínica.

(Magyar *et al.*, 2013) permiten realizar observaciones objetivas de los animales vivos; la tomografía no solo revela las lesiones graves sino también las pequeñas alteraciones que no se detectan mediante radiografía. No obstante, estas técnicas no se utilizan demasiado a causa del equipo y del conocimiento experto necesarios. El diagnóstico se basa en la detección de los rasgos histopatológicos típicos, como son la sustitución fibrosa de las placas óseas de las conchas ventrales, con distintos grados de alteraciones inflamatorias y reparadoras.

2. Identificación de los agentes

2.1. Cultivo *in vitro*

Los hisopos o biopsias de las amígdalas proporcionan los máximos porcentajes de aislamiento, ya que *P. multocida* coloniza preferentemente las amígdalas (Ackermann *et al.*, 1994). Para el aislamiento de *B. bronchiseptica*, se recomiendan los hisopos nasales. Cuando no es posible el muestreo de las amígdalas, los hisopos nasales son suficientes para el aislamiento de ambos microorganismos. Se deben utilizar hisopos con mangos flexibles; la recogida de muestras en los cerdos jóvenes será más fácil con hisopos de puntas diminutas. Se utiliza un único hisopo para muestrear ambos lados de la cavidad nasal, que a continuación se coloca en un medio de transporte no nutritivo (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), y se conservan a 4–8°C durante el transporte, para impedir el crecimiento en exceso de otras bacterias que crecen más rápidamente. El transporte no puede durar más de 24 horas.

Aunque tanto *P. multocida* como *B. bronchiseptica* crecen fácilmente en agar sangre, se prefiere un medio selectivo, ya que el crecimiento en exceso de otras bacterias presentes en mayor cantidad interfiere, a menudo, con su detección. Otra dificultad relacionada con *B. bronchiseptica* es que este microorganismo crece más lentamente que la mayoría de las otras bacterias presentes en las muestras clínicas. Se han utilizado diferentes formulaciones de los medios que contienen antibióticos para el aislamiento de *P. multocida*, pero la comparación de los resultados de diferentes estudios reflejados en la bibliografía indica que los índices de aislamiento más altos se obtienen con medio de Knight modificado (agar sangre bovina que contenga 5 µg/ml de clindamicina, 0,75 µg/ml de gentamicina) (Lariviere *et al.*, 1993) o KPMD (agar sangre bovina que contenga 3,75 U/ml de bacitracina, 5 µg/ml de clindamicina, 0,75 µg/ml de gentamicina y 2,25 µg/ml de anfotericina B) (Ackermann *et al.*, 1994). Para el crecimiento selectivo de *B. bronchiseptica*, a partir de hisopos nasales, muchos laboratorios utilizan agar de MacConkey con glucosa al 1% y 20 µg/ml de furaltadona, sin embargo un medio de Smith–Baskerville modificado (una formulación de agar peptona que contiene 20 µg/ml de penicilina, 20 µg/ml de furaltadona y 0,5 µg/ml de gentamicina) parece mejor, especialmente cuando la cantidad presente de *B. bronchiseptica* es baja (Lariviere *et al.*, 1993; Smith & Baskerville, 1979). Se ha descrito una mejora adicional en el índice de aislamiento empleando agar sangre con 40 µg/ml de cefalexina (Lariviere *et al.*, 1993). Se ha descrito también un medio selectivo de agar sangre para el aislamiento simultáneo de *P. multocida* y *B. bronchiseptica*, que contiene 5 mg/litro de clindamicina-HCl, 0,75 mg/litro de gentamicina sulfato, 2,5 mg/litro de telurito potásico, 5 mg/litro de anfotericina-B y 15 mg/litro de bacitracina (De Jong & Borst, 1985). Sin embargo, se ha observado que el telurito potásico inhibe a veces el crecimiento del tipo D de *P. multocida* (Lariviere *et al.*, 1993).

2.2. Características bioquímicas

Pasteurella multocida es un bacilo gramnegativo pleomórfico, bipolar, que forma colonias grisáceas no hemolíticas en agar sangre, de un característico olor “dulzón”. No crece en agar MacConkey, pero da reacciones positivas de oxidasa y catalasa, y produce indol.

Bordetella bronchiseptica también es un bacilo gramnegativo, que forma colonias convexas de 1–2 mm de diámetro, generalmente hemolíticas, en agar sangre o en medio Bordet–Gengou, después de 48 horas de cultivo. No es fermentativa, es positiva para oxidasa, catalasa, citrato y urea, y crece en NaCl al 6,5%.

Se han descrito pruebas de aglutinación en las que se emplean antisueros específicos para confirmar la identidad de presuntas cepas de *B. bronchiseptica*, pero con frecuencia no se dispone de los antisueros idóneos para su uso.

2.2.1. Tipificación capsular de *P. multocida*

La tipificación capsular de *P. multocida* es útil con fines epidemiológicos, ya que *P. multocida* a menudo tiene una cápsula mucoide. Tradicionalmente se ha utilizado la serotipificación por hemoaglutinación indirecta (Carter, 1955), pero solo unos pocos laboratorios en todo el mundo producen y mantienen los antisueros que se requieren. Sin embargo, la mayoría de las cepas

porcinas pueden distinguirse normalmente por métodos químicos más sencillos. Los que producen la cápsula del tipo D forman un floculado abundante en solución acuosa de acriflavina 1/1.000 (Carter & Subronto, 1973), mientras que las cepas capsulares del tipo A se pueden identificar por inhibición del crecimiento en presencia de hialuronidasa (Carter & Rundell, 1975). Una pequeña proporción de las cepas porcinas no tiene cápsula.

2.2.2. Procedimiento de la prueba con acriflavina para el tipo capsular D de *Pasteurella multocida*

- i) Para cada cepa de *P. multocida* analizada, se inocula un tubo que contiene 3 ml de caldo cerebro corazón, utilizando un cultivo fresco en agar sangre bovina. Como controles positivo y negativo se incluyen cepas conocidas de los tipos D y A.
- ii) Los tubos inoculados se incuban a 37°C durante 18–24 horas.
- iii) Las bacterias se sedimentan por centrifugación y se toman 2,5 ml del sobrenadante.
- iv) Se añaden 0,5 ml de una solución acuosa a 1/1.000 de acriflavina neutra. La solución de acriflavina debe prepararse de nuevo cada semana y conservarse a 4°C, protegida de la luz.
- v) Se mezcla para resuspender el sedimento bacteriano y se incuba el tubo a temperatura ambiente, sin agitación.
- vi) Al cabo de 5 minutos se observa para comprobar si aparece un precipitado floculante abundante.

2.2.3. Procedimiento de la prueba con hialuronidasa para el tipo capsular A de *P. multocida*

- i) Se preparan cultivos frescos de las cepas que se analizan en agar sangre bovina. Como controles positivo y negativo se incluyen cepas conocidas de los tipos D y A.
- ii) Cada cepa que se ha de examinar se siembra, por separado, en una placa de agar sangre con tripticasa-soja con sangre ovina al 5% o bovina al 6%, haciendo varias estrías paralelas, con una separación de 3–5 mm aproximadamente, a través del diámetro de la placa. Para la máxima producción de ácido hialurónico, es importante que las placas sean recientes y no estén deshidratadas.
- iii) Se siembra en estrías con abundancia una cepa de *Staphylococcus aureus* productora de hialuronidasa en ángulos rectos con respecto a las líneas de crecimiento de *P. Multocida*.
- iv) Se incuban las placas a 37°C, en una atmósfera húmeda, y se observan periódicamente durante un máximo de 24 horas. Las cepas del tipo A exhibirán una marcada inhibición del crecimiento en la región contigua a las líneas de crecimiento de *S. aureus*.

2.2.4. Tipificación de los antígenos somáticos de *P. multocida*

Las diferencias de los polisacáridos de las paredes celulares entre las cepas de *P. multocida* constituyen la base para la clasificación de los antígenos somáticos. Pueden distinguirse dieciséis tipos mediante la prueba de la precipitación por difusión en gel de agar (Heddleston *et al.*, 1972), y el tipo 3 se encuentra con mayor frecuencia en los cerdos. Aunque no es fácil disponer de los antisueros necesarios, muchos Laboratorios de Referencia y algunos laboratorios de diagnóstico ofrecen el servicio de tipificación de antígenos somáticos.

2.2.5. Detección de la toxina de *P. multocida*

El diagnóstico de la rinitis atrófica progresiva se basa en caracterizar como toxigénicas las cepas de *P. multocida*. La toxina termolábil de *P. multocida* produce una dermonecrosis en cobayas, y es letal en ratones tras la inyección intraperitoneal. La toxigenicidad se puede demostrar también *in vitro*, comprobando los efectos citopáticos en monocapas de células de pulmón de embriones bovinos (EBL) (Rutter & Luther, 1984), en células de riñón de mono verde africano (células Vero) (Pennings & Storm, 1984) o en células de cornetes bovinos (Eamens *et al.*, 1988). Las bacterias se cultivan en caldo infusión de cerebro y corazón a 37°C, durante 24 horas, y se sedimentan mediante centrifugación. El sobrenadante se esteriliza por filtración, y se titula en cultivos monocapa preparados en placas de microtitulación. Después de la incubación a 37°C, durante 2–3 días, se tiñen las monocapas con cristal violeta y se comprueba al microscopio si presentan efecto citopático. Una prueba rápida de cultivo celular, en la que las colonias sospechosas se cultivan sobre una capa de agar de células EBL (Chanter *et al.*, 1986), permite un análisis más eficaz de grandes cantidades de cepas.

Para analizar mezclas de bacterias recubiertas de medios de aislamiento primario, se puede utilizar un ensayo inmunológico (ELISA) específico para la detección de la toxina de *P.*

multocida, que se vende en ciertos países. Esto constituye una ventaja importante, ya que los cerdos pueden ser colonizados simultáneamente por una mezcla de cepas toxigénicas y no toxigénicas (Ackermann *et al.*, 1994; Brockmeier *et al.*, 2012). Para alcanzar el mismo nivel de sensibilidad que el ELISA, los métodos de cultivo celular exigirían que se analizaran todas las colonias de *P. multocida* de la muestra, lo cual es claramente inviable. El ELISA también es adecuado para cepas aisladas individualmente. Aunque es muy específico, un resultado positivo sin antecedentes de enfermedad o de signos sospechosos debe investigarse a fondo hasta que se logre recuperar cepas toxigénicas de los animales analizados.

2.3. Métodos moleculares

La morfología de las colonias y las pruebas bioquímicas siguen constituyendo la base para la identificación de *P. multocida* y *B. bronchiseptica* en muchos laboratorios. Sin embargo, las PCR para la detección de estos agentes en cerdos, como la PCR convencional (Kamp *et al.*, 1996; Lichtensteiger *et al.*, 1996; Nagai *et al.*, 1994; Register & DeJong, 2006) y la PCR en tiempo real (Scherrer *et al.*, 2016) permiten un diagnóstico más rápido, más específico y más sensible. Dado que cada vez existe una mayor disponibilidad de equipos y de especialistas, los laboratorios de diagnóstico utilizan cada vez más la PCR para la identificación de estos agentes. Es esencial la validación interna mediante la utilización de controles bien conocidos y medidas de control de calidad muy estandarizadas (véase el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores y la sonda descritos por Register y DeJong (2006) para la detección de *B. bronchiseptica* y de *P. multocida* toxigénica mediante PCR en tiempo real, respectivamente, en sentido 5' a 3', son las siguientes:

Fla4: TGG-CGC-CTG-CCC-TAT-C / Fla2: AGG-CTC-CCA-AGA-GAG-AAA-GGC-TT

toxA-7: ACT-ACA-GAT-TCC-TAA-CAA-AGG-TTC-TGG / toxA-6: TGC-TCA-AAT-CCT-AAA-TCA-CCT-TGT

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores y la sonda para la detección de *P. multocida* toxigénica mediante PCR en tiempo real (Scherrer *et al.*, 2016), en sentido 5' a 3', son las siguientes:

toxA-F: GAA-ATG-GCT-GGA-AAA-ACC-AGT-G / toxA-R: GAA-AAG-GCG-CTG-AAA-TTA-CTG-TAT-C

toxA-probe: CGG-CTG-ATT-TAA-TAC-GCT-TTG-CCT-TGC

Una técnica de PCR múltiple para la tipificación capsular de *P. multocida* (Townsend *et al.*, 2001) parece proporcionar resultados más fiables que los métodos fenotípicos, y se utiliza con frecuencia en los laboratorios de diagnóstico que están convenientemente equipados para llevar a cabo PCR.

Con el fin de diferenciar las cepas de *P. multocida*, numerosos grupos han evaluado varias técnicas de huella genética de AND o de tipificación basada en la secuencia, como el análisis mediante la endonucleasa de restricción (REA), la ribotipificación, la electroforesis en gel de campos pulsados, la tipificación de secuencia multilocus y los procedimientos basados en la PCR. Se han realizado algunas comparaciones entre métodos utilizando cepas procedentes de cerdos con rinitis atrófica, pero para los estudios epidemiológicos actualmente el método de elección parece ser el REA, ya que proporciona un alto nivel de discriminación sin necesidad de utilizar ni equipo ni reactivos especializados (Djordjevic *et al.*, 1998; Gardner *et al.*, 1994; Harel *et al.*, 1990).

3. Pruebas serológicas

Actualmente no hay pruebas serológicas satisfactorias en las que se pueda confiar para detectar animales infectados por *P. multocida* toxigénica, y que puedan desarrollar o propagar la enfermedad. La detección de anticuerpos contra *P. multocida* no es útil, ya que las cepas no toxigénicas comparten muchos antígenos que dan reacciones cruzadas con cepas toxigénicas. Se han descrito ELISA para la detección de anticuerpos contra la toxina de *P. multocida* (Foged, 1992; Takada-Iwao *et al.*, 2007). Sin embargo, muchos animales infectados por *P. multocida* no producen anticuerpos contra la toxina, y el uso generalizado de vacunas que contienen toxoides limita el valor diagnóstico de este ELISA a las pjaras sin historial de vacunación (cuyos resultados solo son definitivos cuando son positivos), o a la detección de una respuesta vacunal en las pjaras vacunadas.

La infección por *B. bronchiseptica* puede detectarse serológicamente mediante la prueba de la aglutinación con bacterias tratadas con formalina, o con un ELISA más sensible (Venier *et al.*, 1984). Si no se controla el estado

de una piara negativa, la serología de *B. bronchiseptica* puede resultar de escaso valor, ya que el microorganismo está presente en muchas piaras porcinas aparentemente normales.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Hay varias vacunas disponibles comercialmente que contienen bacterinas de células completas de *B. bronchiseptica* combinadas con bacterina de *P. multocida* toxigénica y/o un toxoide de *P. multocida*. La bacterina de *P. multocida* toxigénica suele ser del tipo D capsular, pero algunas vacunas también incluyen una cepa de tipo A, que puede ser toxigénica o no toxigénica. También existen vacunas vivas atenuadas de *B. bronchiseptica*. Las vacunas que contienen solo *B. bronchiseptica* no son adecuadas para el control de la rinitis atrófica progresiva, pero pueden resultar ventajosas en piaras que sufran la forma no progresiva. Las vacunas de *Pasteurella multocida* y *B. bronchiseptica* parecen reducir el nivel de colonización por estas bacterias, pero no las eliminan ni impiden la infección. La mayoría de vacunas comercializadas contienen un adyuvante oleoso o un gel de hidróxido de aluminio.

La toxina de *P. multocida* es el antígeno protector por sí solo más importante relacionado con la rinitis atrófica progresiva. Las vacunas basadas en un toxoide de *P. multocida* ofrecen una protección específica contra la acción de la toxina, que por sí misma puede utilizarse para reproducir todos los principales signos de esta enfermedad (para una revisión, véase la referencia 14). El nivel de la toxina producida por *P. multocida* es relativamente bajo, y la respuesta de anticuerpos específicos contra la toxina, inducida por las vacunas que solo tienen bacterinas, puede que no sea la óptima. El toxoide purificado (inactivado mediante formaldehído) es más inmunógeno que el toxoide crudo, y la inmunogenicidad de la forma inactivada no resulta afectada por la mezcla con una bacterina de *B. bronchiseptica*. No obstante, la dificultad y el coste de la purificación a gran escala de cultivos de *P. multocida* impide incorporar sistemáticamente toxoide nativo inactivado químicamente a las vacunas. Las vacunas recombinantes que contienen proteínas de toxina de subunidad o derivados detoxificados genéticamente de toxina de longitud completa son muy eficaces y menos caras de producir (Foged *et al.*, 1992; Hsuan *et al.*, 2009). Se demostró que una vacuna de ADN que codifica un toxoide completo pero enzimáticamente inactivo era muy inmunógena en cerdos, pero aún no se ha establecido su eficacia frente al desafío (Register *et al.*, 2007).

Bordetella bronchiseptica produce diversas toxinas y adhesinas que son factores potenciales de virulencia en el cerdo. Se ha demostrado que solo una proteína, la pertactina de la membrana externa, protege contra la enfermedad en los cerdos (Kobisch & Novotny, 1990). A pesar de este hecho, tradicionalmente se ha considerado una toxina dermonecrótica producida por *B. bronchiseptica*, no comparable con la toxina producida por *P. multocida*, como el principal factor de virulencia e inmunógeno protector para el ganado porcino (Brockmeier *et al.*, 2012). Varios estudios implican a la toxina como un factor de virulencia, e indudablemente aquella juega un papel en la patogénesis y quizás, en la protección. Sin embargo, el papel de la pertactina y de otros varios factores de virulencia en la inmunidad protectora es muy probablemente idéntico e incluso superior al de la toxina.

Bordetella bronchiseptica está sometida a una variación fenotípica en determinadas condiciones de crecimiento (por ejemplo, a temperaturas por debajo de 37°C, o en presencia de moduladores químicos, como el MgSO₄ o el ácido nicotínico), en las que la producción de la mayoría de los factores de virulencia está inactivada de forma reversible. Los mutantes espontáneos, permanentemente incapaces de producir la mayoría de los factores de virulencia, aparecen también con una baja frecuencia durante el cultivo. Para mantener los cultivos en fase I (conocida también como Bvg⁺), o virulenta, es imprescindible prestar mucha atención a la morfología de la colonia en una zona de la placa donde las colonias estén bien separadas. Las colonias de la fase I son pequeñas (1–2 mm de diámetro), abombadas, y hemolíticas en agar sangre. La pérdida de la capacidad hemolítica y la aparición de colonias más grandes y planas indican la conversión a la forma no virulenta. En la medida de lo posible, los cultivos se propagarán utilizando colonias hemolíticas individuales para minimizar la lenta acumulación de clones no virulentos en el cultivo.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se encuentran en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de las vacunas veterinarias*. Las directrices indicadas a continuación y en el Capítulo 1.1.8 son de naturaleza general y tal vez tengan que complementarse con los requisitos nacionales y regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Se empleará el sistema de lotes de inóculo para las cepas bacterianas utilizadas para preparar bacterinas de células completas, así como para las cepas a partir de las que se obtienen los antígenos purificados.

En el caso de las bacterinas de células completas, se describirá el origen y el historial de las cepas de *P. multocida* y de *B. bronchiseptica*, y se establecerá la caracterización completa de los inóculos originales en un protocolo del lote de inóculo original. La cepa de *Bordetella bronchiseptica* que se utilice para a producción de vacuna debe proceder de un cultivo virulento en fase I, y las cepas de *P. multocida* utilizadas deben ser toxigénicas.

Los inóculos de trabajo utilizados para la producción de la vacuna derivarán del inóculo original, y se comprobarán en ellos todas las propiedades pertinentes, como se describe en el protocolo del lote de inóculo original.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Tanto el inóculo original como el de trabajo tienen que ser cultivos puros, y no pueden contener contaminación bacteriana, micótica, micoplásmica ni vírica. Se proporcionan directrices relacionadas en el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en materiales biológicos destinados a uso veterinario*.

Debe confirmarse la identidad de las especies bacterianas y la producción de antígenos relevantes.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

No se dispone de los detalles precisos de las normas para la producción de vacunas comerciales eficaces, pero se sabe que contienen 10^{10} células de *B. bronchiseptica* inactivada con formalina y 10 µg de toxoide de *P. multocida* por dosis. Debe confirmarse que *Bordetella bronchiseptica* se encuentra en la cultivo de fase I, y en el caso de *P. multocida*, debe confirmarse que el cultivo contiene niveles suficientes de toxina. Debe emplearse un número definido de pases para conseguir el cultivo de producción. Se inactiva, detoxifican y formulan con un adyuvante células de *Bordetella bronchiseptica*, así como células de *P. multocida* y/o toxina. Dado que la toxina de *P. multocida* se localiza intracelularmente y se libera cuando las células se lisan durante la fase estacionaria, debe recolectarse el sobrenadante del cultivo unas 48 horas después del final de la fase exponencial del crecimiento.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Todas las cepas bacterianas deben propagarse en medios que permitan un crecimiento eficiente y que permitan la expresión óptima de los antígenos que sean relevantes para la inducción de anticuerpos protectores.

2.2.3. Controles durante el proceso

Se inoculan cultivos de inóculo y de producción en placas de agar sangre, y se incuban. En estas placas no deben crecer colonias inespecíficas.

Los cultivos se inactivan mediante formaldehído. Se realizan pruebas para comprobar la eficacia del proceso de inactivación y para averiguar si queda formaldehído residual.

Se lleva a cabo una cuantificación de los antígenos con un recuento de células totales empleando una cámara de recuento bacteriano para enumerar las células enteras o una determinación de la masa antigénica para antígenos concretos, como por ejemplo la toxina de *P. multocida*, mediante enzoinmunoanálisis cuantitativo.

2.2.4. Pruebas en lotes del producto final

i) Esterilidad

En cada lote de vacuna debe comprobarse la esterilidad, mediante métodos estándar (véase el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*) descritos en la Farmacopea Europea o en las *United States Code of Federal Regulations*.

ii) Identidad

Se deben realizar pruebas de identidad en cada lote de vacuna utilizando métodos estándar, como los descritos en la Farmacopea Europea o en las *United States Code of Federal Regulations*.

iii) Inocuidad

En cada lote de vacuna debe comprobarse la inocuidad en la especie de destino, administrando una dosis doble por la vía de vacunación recomendada, y una segunda dosis normal 2 semanas después. No debe aparecer ninguna reacción local ni sistémica. Cuando se emplee un conservante, debe medirse la concentración en cada lote. No debe superar el nivel máximo permitido. Se requieren pruebas de inocuidad lote a lote a menos que la inocuidad del producto se haya comprobado y aprobado en el expediente de registro y la producción sea conforme a la descrita en el capítulo 1.1.8.

iv) Potencia del lote

En cada lote de vacuna debe comprobarse la potencia empleando pruebas serológicas validadas, y debe correlacionarse con la protección obtenida en la prueba de eficacia, como se describe en el apartado C.2.3.2. La prueba de potencia no necesariamente se lleva a cabo en la especie de destino, ya que también pueden utilizarse ratones o conejos. En estos últimos casos, se ha observado correlación con los niveles de anticuerpos protectores en la especie de destino.

2.3. Requisitos para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes

2.3.1. Proceso de fabricación

Para la autorización de la vacuna por parte de las autoridades reguladoras correspondientes, todos los detalles relevantes sobre la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véase la Sección C.2.1 Características del inóculo y la Sección C.2.2. Método de fabricación) deben presentarse a las autoridades. Esta información se proporcionará a partir de tres lotes de vacunas consecutivos con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

La atenuación de los cambios genéticos en las vacunas vivas modificadas de *B. bronchiseptica* generalmente no está bien caracterizada, pero no se ha descrito la reversión a la virulencia. La aprobación por parte de las autoridades reguladoras puede requerir estudios de retro-pase, en los cuales la vacuna se pasa en serie en las especies de destino un número específico de veces, sin evidencia de un aumento en la virulencia.

ii) Precauciones (peligros)

Aunque la inactivación de los cultivos bacterianos mediante un método validado es un procedimiento estándar, *B. bronchiseptica* y *P. multocida* producen toxinas dermonecróticas; cuando en la vacuna se incluyen toxoides, debe confirmarse la detoxificación de estas toxinas.

Cuando se emplea una emulsión oleosa como adyuvante, la inyección accidental del operario puede causar una intensa reacción local. Debe acudir al médico inmediatamente, y tratar la herida como se fuera una herida por pistola de engrasar.

Los fabricantes deben advertir adecuadamente que se debe buscar ayuda médica en caso de autoinyección, mostrando advertencias en la ficha técnica/prospecto del producto para que el vacunador conozca todos los posibles peligros.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, se deberá demostrar su eficacia (protección) en un lote o lotes producidos de acuerdo con el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno o nivel de potencia; cada lote comercial futuro se someterá a análisis antes de su puesta en circulación para garantizar que tenga el mismo nivel de potencia que se ha demostrado en los lotes utilizados para la(s) prueba(s) de eficacia.

Normalmente, la vacuna se aplica durante la última fase de la gestación, de modo que la descendencia estará protegida por la captación de anticuerpos mediante el calostro. La eficacia de una vacuna provisional debe medirse vacunando grupos de cerdas gestantes. Su descendencia debe exponerse a cultivos virulentos de *B. bronchiseptica* y de *P. multocida* productora de toxina. Debe obtenerse una considerable protección contra los signos clínicos de la forma progresiva de la rinitis atrófica, es decir, contra la atrofia de los cornetes nasales. Los signos clínicos inducidos en los animales control y en los vacunados pueden compararse aplicando el sistema de puntuación de Done (1976).

2.3.4. Duración de la inmunidad

Como parte del procedimiento de aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes, se debe exigir al fabricante que demuestre la duración de la inmunidad de una vacuna determinada mediante una prueba de desafío o una prueba alternativa al final del período de protección declarado.

Cuando la vacuna se puede aplicar en cualquier fase de la gestación, la inmunidad debe durar al menos 6 meses, de tal modo que revacunaciones semestrales deben mantener niveles eficaces de anticuerpos.

2.3.5. Estabilidad

procedimiento de aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes, se debe exigir al fabricante que demuestre la estabilidad de todas las propiedades de la vacuna al final del período de validez declarado. Se debe indicar la temperatura de conservación y se deben mostrar advertencias si el producto se puede dañar por congelación o por permanecer a temperatura ambiente.

Cada lote de vacuna debe someterse a una prueba de estabilidad acelerada, que se haya correlacionado con una comprobación del período de validez en tiempo real.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

Se han descrito y evaluado en condiciones experimentales varias vacunas que contienen subunidades de toxina de *P. multocida* enzimáticamente inerte o toxina entera inactivada por mutación. Las proteínas recombinantes en general se expresan en *Escherichia coli* y se purifican antes de ser utilizadas. Actualmente, solo algunas de las vacunas que incluyen toxina o subunidades de toxina recombinante se comercializan; pueden incluir o no una bacterina de *P. multocida*. Por lo que se sabe hasta ahora, estas vacunas desencadenan niveles de anticuerpos específicos de toxina iguales o mayores que los generados con las vacunas que contienen toxoide nativo inactivado químicamente.

BIBLIOGRAFÍA

ACKERMANN M.R., DEBEY M.C., REGISTER K.B., LARSON D.J. & KINYON J.M. (1994). Tonsil and turbinate colonization by toxigenic and nontoxigenic strains of *Pasteurella multocida* in conventionally raised swine. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 375–377.

BROCKMEIER S.L., REGISTER K.B., NICHOLSON T.L & LOVING C.L. (2012). *In: Diseases of Swine*, Tenth Edition, Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J & Stevenson G.W., eds. John Wiley & Sons, Inc., Ames, Iowa, USA, 670–679.

CARTER G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am. J. Vet. Res.*, **16**, 481–484.

- CARTER G.R. & RUNDELL S.W. (1975). Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. *Vet. Rec.*, **96**, 343.
- CARTER G.R. & SUBRANTO P. (1973). Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. *Am. J. Vet. Res.*, **34**, 293–294.
- CHANTER N., RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1986). Rapid detection of toxigenic *Pasteurella multocida* by an agar overlay method. *Vet. Rec.*, **119**, 629–630.
- DE JONG M.F. & BORST G.H. (1985). Selective medium for the isolation of *P. multocida* and *B. bronchiseptica*. *Vet. Rec.*, **116**, 167.
- DJORDJEVIC S.P., EAMENS G.J., HA H., WALKER M.J. & CHIN J.C. (1998). Demonstration that Australian *Pasteurella multocida* isolates from sporadic outbreaks of porcine pneumonia are non-toxicogenic (tox^A-) and display heterogeneous DNA restriction endonuclease profiles compared with toxicogenic isolates from herds with progressive atrophic rhinitis. *J. Med. Microbiol.*, **47**, 679–688.
- DONE J.T. (1976). Porcine atrophic rhinitis: snout radiography as an aid to diagnosis and detection of the disease. *Vet. Rec.*, **98**, 23–28.
- DONNIO P.Y., ALLARDET-SERVENT A., PERRIN M., ESCANDE F. & AVRIL J.L. (1999). Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolated from man and swine. *J. Med. Microbiol.*, **48**, 125–131.
- EAMENS G.J., KIRKLAND P.D., TURNER M.J., GARDNER I.A., WHITE M.P. & HORNITZKY C.L. (1988). Identification of toxicogenic *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of pigs by in vitro characterisation. *Aust. Vet. J.*, **65**, 120–123.
- FOGED N.T. (1992). *Pasteurella multocida* toxin. The characterisation of the toxin and its significance in the diagnosis and prevention of progressive atrophic rhinitis in pigs. *APMIS Suppl.*, **25**, 1–56.
- GARDNER I.A., KASTEN R., EAMENS G.J., SNIPES K.P. & ANDERSON R.J. (1994). Molecular fingerprinting of *Pasteurella multocida* associated with progressive atrophic rhinitis in swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **6**, 442–447.
- GATLIN C.L., JORDAN W.H., SHRYOCK T.R. & SMITH W.C. (1996). The quantitation of turbinate atrophy in pigs to measure the severity of induced atrophic rhinitis. *Can. J. Vet. Res.*, **60**, 121–126.
- HAREL J., COTE S. & JACQUES M. (1990). Restriction endonuclease analysis of porcine *Pasteurella multocida* isolates from Quebec. *Can. J. Vet. Res.*, **54**, 422–426.
- HEDDLESTON K.L., GALLAGHER J.E. & REBERS P.A. (1972). Fowl cholera: gel diffusion precipitation test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.*, **16**, 925–936.
- HSUAN S.-L., LIAO C.-M., HUANG C., WINTON J.R., CHEN Z.-W., LEE W.-C., LIAO J.-W., CHEN T.-H., CHIOU C.-J., YEH K.-S. & CHIEN M.-S. (2009). Efficacy of a novel *Pasteurella multocida* vaccine against progressive atrophic rhinitis of swine. *Vaccine*, **27**, 2923–2929.
- KAMP E.M., BOKKEN G.C., VERMEULEN T.M., DE JONG M.F., BUYS H.E., REEK F.H. & SMITS M.A. (1996). A specific and sensitive PCR assay suitable for large-scale detection of toxicogenic *Pasteurella multocida* in nasal and tonsillar swabs specimens of pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 304–309.
- KOBISCH M. & NOVOTNY P. (1990). Identification of a 68 kilodalton outer membrane protein as the major protective antigen of *Bordetella bronchiseptica* by using specific-pathogen-free piglets. *Infect. Immun.*, **58**, 352–357.
- LARIVIERE S., LEBLANC L., MITTAL K.R. & MARTINEAU G.P. (1993). Comparison of isolation methods for the recovery of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from the nasal cavities of piglets. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 364–367.
- LICHTENSTEIGER C.A., STEENBERGEN S.M., LEE R.M., POLSON D.D. & VIMR E.R. (1996). Direct PCR analysis for toxicogenic *Pasteurella multocida*. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 3035–3039.
- LÓPEZ C., SANCHEZ-RUBIO P., BETRÁN A. & TERRÉ R. (2013). *Pasteurella multocida* meningitis caused by contact with pigs. *Braz. J. Microbiol.*, **44**, 473–474.
- MAGYAR T., DONKÓ T., REPA I. & KOVÁCS M. (2013). Regeneration of toxicogenic *Pasteurella multocida* induced severe turbinate atrophy in pigs detected by computed tomography. *BMC Vet. Res.*, **9**, 222.

- MAROIS C., FABLET C., GAILLOT O., MORVAN H., MADEC F. & KOBISCH M. (2009). Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 1830–1836.
- NAGAI S., SOMENO S. & YAGIHASHI T. (1994). Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 1004–1010.
- PEDERSEN K.B., NIELSEN J.P., FOGED N.T., ELLING F., NIELSEN N.C. & WILLEBERG P. (1988). Atrophic rhinitis in pigs: proposal for a revised definition. *Vet. Rec.*, **122**, 190–191.
- PENNINGS A.M. & STORM P.K. (1984). A test in vero cell monolayers for toxin production by strains of *Pasteurella multocida* isolated from pigs suspected of having atrophic rhinitis. *Vet. Microbiol.*, **9**, 503–508.
- REGISTER K.B. & DEJONG K.D. (2006). Analytical verification of a multiplex PCR for identification of *Bordetella bronchiseptica* and *Pasteurella multocida* from swine. *Vet. Microbiol.*, **117**, 201–210.
- REGISTER K.B., SACCO R.E. & BROCKMEIER S.L. (2007). Immune response in mice and swine to DNA vaccines derived from the *Pasteurella multocida* toxin gene. *Vaccine*, **25**, 6118–6128.
- RUTTER J.M. & LUTHER P.D. (1984). Cell culture assay for toxigenic *Pasteurella multocida* from atrophic rhinitis of pigs. *Vet. Rec.*, **114**, 393–396.
- SCHERRER S., FREI D. & WITTENBRINK M.M. (2016). A novel quantitative real-time polymerase chain reaction method for detecting toxigenic *Pasteurella multocida* in nasal swabs from swine. *Acta Vet. Scand.*, **58**, 83.
- SMITH I.M. & BASKERVILLE A.J. (1979). A selective medium facilitating the isolation and recognition of *Bordetella bronchiseptica* in pigs. *Res. Vet. Sci.*, **27**, 187–192.
- TAKADA-IWAO A., UTO T., MUKAI T., OKADA M., FUTO S. & SHIBATA I. (2007). Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using recombinant toxin for detection of antibodies against *Pasteurella multocida* toxin. *J. Vet. Med. Sci.*, **69**, 581–586.
- TOWNSEND K.M., BOYCE J.D., CHUNG J.Y., FROST A.J. & ADLER B. (2001). Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *J. Clin. Microbiol.*, **39**, 924–929.
- VENIER L., ROTHSCHILD M.F. & WARNER C.M. (1984). Measurement of serum antibody in swine vaccinated with *Bordetella bronchiseptica*: comparison of agglutination and enzyme-linked immunosorbent assay methods. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 2634–2636.

*

* *

NB: En el momento de la publicación (2018) no existían Laboratorios de Referencia de la OIE para la rinitis atrófica porcina (puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.