Influencia de la vacunación frente a *M.hyopneumoniae* en los niveles séricos de dos proteínas de fase aguda

Anna Romagosa[1], Rut Menjón[2], Jesús María Bollo[2], Ana María Ibáñez[2], Enrique Cálvo[2]

Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la vacunación frente a *Mycoplasma hyopneumoniae (M. hyo)* en los niveles séricos de dos proteínas de fase aguda (PFAs), Haptoglobina (Hp) y Pig-MAP (PM), y para ello se utilizaron 120 lechones de una granja comercial negativos a PRRS, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y Aujeszky. Se dividieron en tres grupos en el momento del destete y en cada grupo se separaron machos y hembras. En el día 3 post destete, dos de los grupos recibieron vacunas comerciales frente a *M. hyo* (grupo T: M+PAC®, y grupo B: otra vacuna comercial) y el tercer grupo se mantuvo como control sin vacu-

nar (grupo C). La prueba tuvo una duración de 43 días y se tomaron muestras de sangre de los animales los días 7, 14, 29 y 43 de la prueba, para medir los niveles de PFAs. El día 38, cuando las concentraciones séricas de PM y Hp alcanzaron niveles basales, los animales del grupo C (sin vacunar) fueron vacunados con las dos vacunas comerciales y el resto de animales vacunados previamente se tomaron como grupo control.

Los resultados mostraron que la vacunación frente a *Mycoplasma* en el día 3 post destete no supuso un factor aditivo en el incremento de los niveles séricos de PM ni Hp determinado en un estudio preliminar y normalmente asociado al estrés post destete. Sin embargo, en el día 26 post vacunación, el grupo vacunado con M+PAC® presentaba niveles mas elevados de ambas proteínas respecto al grupo B y el grupo control C. En la segunda parte del estudio, hubo un incremento significativo de la PM en los animales vacunados el día 38 con ambas vacunas comerciales respecto a los animales no vacunados. Aunque no hubo diferencias significativas en los niveles séricos de Hp entre los diferentes grupos durante toda la prueba, el grupo vacunado con M+PAC® mantuvo niveles mas altos que el resto de los grupos.

Esta situación podría deberse a la acción de Emunade® (adyuvante de M+PAC) que originaría una liberación más prolongada en el tiempo de antígenos vacunales, y por tanto una exposición al sistema inmune también más prolongada.

Introducción

Las proteínas de fase aguda (PFAs) son producidas por el hígado como respuesta al estímulo de las citoquinas pro inflamatorias presentes en el torrente sanguíneo durante procesos inflamatorios y como primera respuesta del sistema inmuno innato a cualquier agresión (infección, heridas, antígenos o estrés).

En un estudio previo, incrementos en las concentraciones séricas de PM y Hp fueron observados durante las dos semanas posteriores al destete y fueron atribuibles al estrés que supone la separación de la madre, el cambio de alimentación y la mezcla de los lechones. En el momento del destete y las semanas posteriores a éste, tanto el sistema nervioso, como el

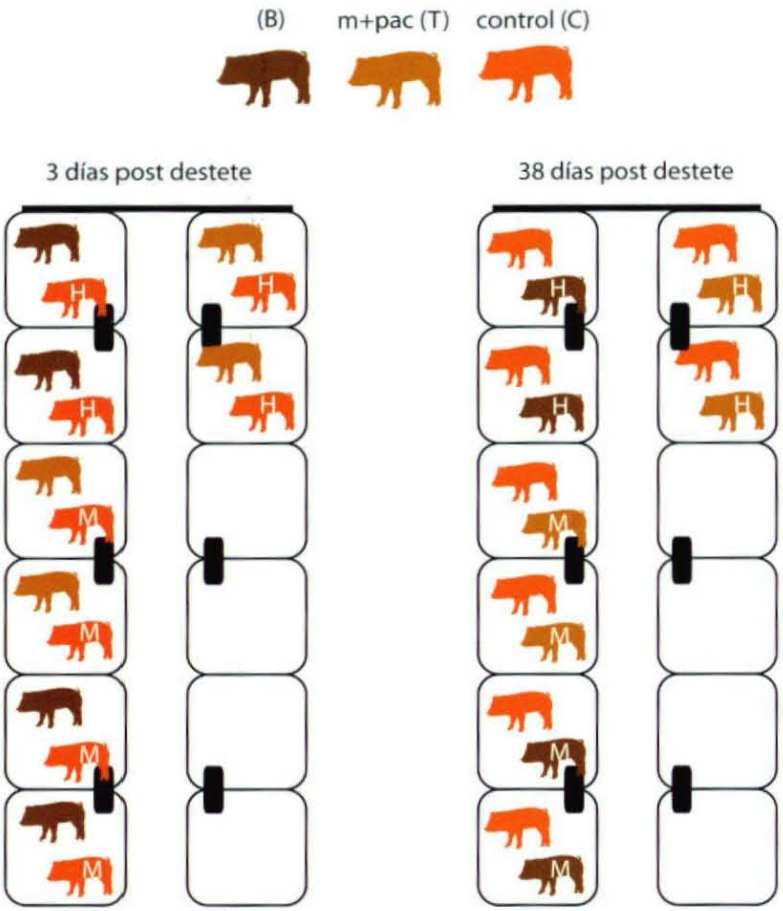
endocrino y el sistema inmune trabajan conjuntamente, provocando el llamado "reflejo inflamatorio", el cual activa componentes y mediadores tanto inflamatorios como antiinflamatorios, entre los cuales se encuentran las PFAs.

El objetivo del presente estudio fue determinar los efectos de la vacunación frente a *M. hyopneumoniae* sobre los niveles de dos PFAs (Haptoglobina y pig-MAP) en lechones destetados. La vacunación de micoplasma al destete suele ser una pauta bastante habitual en nuestras explotaciones por la facilidad de manejo que supone.

Materiales y métodos

Para el estudio se seleccionaron 120 lechones de una explotación comercial situada en el NE de España y fue llevado a cabo en la misma explotación. Los animales fueron seleccionados por edad y peso al destete (19±1 días/vida y ≥5,5 kg de peso vivo) y fueron asignados aleatoriamente a 8 corrales con una capacidad de 15 animales cada uno.

Alimento y agua fueron provistos "ad libitum" y todos los animales fueron medicados durante los 10 diez primeros días post destete con antibióticos en pienso para evitar cualquier proceso infeccioso que pudiera cursar con fiebre y\o inflamación. Para evitar cualquier variación en los niveles séricos de las PFAs por el efecto "corral", "sexo" o "vacunación", se separaron machos y hembras y, dentro de cada corral, 8 animales fueron vacunados y los 7 restantes quedaron sin vacunar como controles. Se utilizaron 2 vacunas comerciales diferentes frente a M. hyo, ambas aplicadas en pauta monodosis al día 3 post destete.



(Diagrama de la distribución por grupos y pauta de vacunación de los lechones. Cada corral tenía animales vacunados y controles . Grupos: (T) M+PAC®, (B) vacuna comercial frente M. hyo, y (C) lechones no vacunados. Sexo: M machos, H hembras).

Así en la primera fase del estudio se obtuvieron 3 grupos:

- **Grupo T:** 32 animales, vacunados con M+PAC®.
- **Grupo B:** 32 animales, vacunados con una vacuna comercial frente a M. hyo.
- **Grupo C:** 56 animales, control sin vacunar.

Se tomaron muestras de sangre en todos los lechones los días 0 (destete), 7, 14 y 29 del estudio para evaluar las concentraciones en suero de las PFAs.

Posteriormente se quiso valorar el impacto solo de la vacuna (alejada del momento del destete, y con niveles basales en las PFA), por lo que se vacunaron los animales del grupo Control (C) en el día 38 del estudio con las 2 vacunas anteriores y dejando los 8 animales de cada corral que estaban previamente vacunados en la primera fase como controles.

En la segunda fase del estudio se obtuvieron 3 grupos:

- **Grupo CT:** 28 animales, vacunados con M+PAC®
- **Grupo CB:** 28 animales, vacunados con una vacuna comercial frente a M. hyo (la misma que la del grupo B).
- **Grupo BT:** 64 animales control, sin vacunar el día 38.

En esta segunda fase del estudio las muestras fueron tomadas los días 29 y 43 post destete.

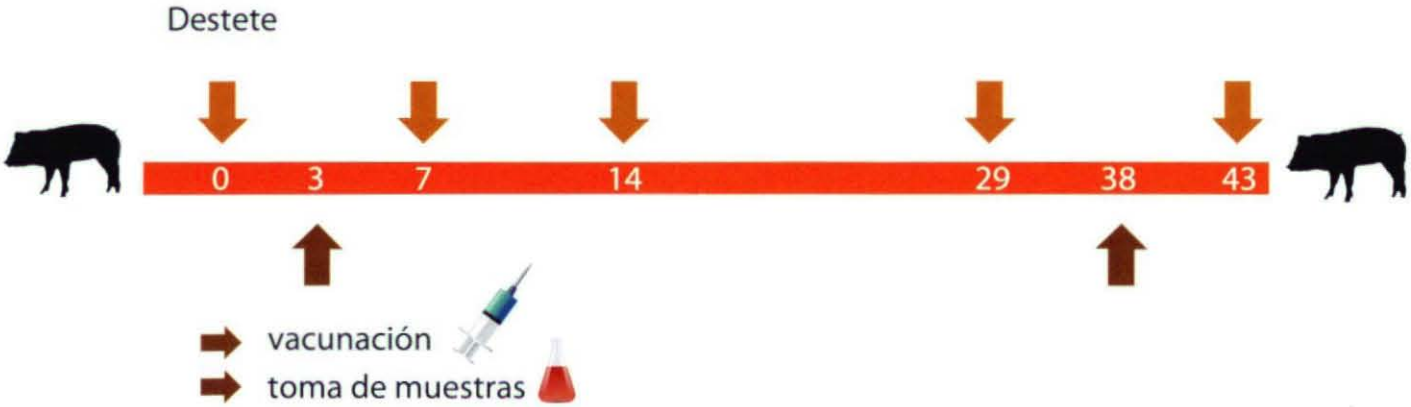
Determinaciones y análisis estadístico

Las concentraciones plasmáticas de Pig-MAP fueron determinadas mediante un ELISA tipo sándwich (PigChamp® Proeuropa, Spain), basado en dos anticuerpos monoclonales de ratón específicos para esta proteína, y las concentraciones de Haptoglobina fueron determinadas mediante un kit comercial (*Phase Range Haptoglobin assay kit*, Tridelta Development, Greystones, Ireland).

Para el análisis estadístico, cada lechón se consideró una unidad experimental y se uso el método ANOVA (repeated measures) con el software SPSS v. 15.0 (Chicago USA).

Resultados

En los dos grupos (T y B) vacunados a los 3 días, no hubo un efecto aditivo durante las dos pri-



meras semanas del destete en las concentraciones plasmáticas de PM y Hp con respecto al grupo C, mas allá del incremento normalmente asociado con el estrés post destete. Así, las concentraciones séricas de PigMAP alcanzaron el pico mas alto en el día 7 post destete (día 4 post vacunación) en todos los grupos y en el día 14 en el grupo B.

Aunque las diferencias no fueron significativas, los valores de PigMAP fueron más altos en los lechones del grupo B durante las dos primeras semanas con respecto al grupo de animales vacunados con M+PAC® y el grupo de animales no vacunados C. Estos valores disminuyeron de forma significativa ($p \leq 0.0012$) por debajo de los valores iniciales el día 29 en el grupo B y el grupo C respecto al grupo T vacunado con M+PAC® (Figura 1).

En la segunda parte de la prueba se observó un incremento significativo ($p<0,05$) en los niveles séricos de PigMAP en el día 43 del estudio (5 días post vacunación de los grupos CB y CT) respecto a los grupos B/ T que se encontraban en niveles basales (Figura 2).

Aunque no se observaron diferencias significativas en los niveles de Haptoglobina de los diferentes grupos durante todo el estudio, en el día 29 el grupo T (animales vacunados con M+PAC®) mantenían niveles más elevados de esta proteína respecto a los animales del grupo B y del grupo control C.

Para el análisis estadístico, cada lechón se consideró una unidad experimental, se uso el método ANOVA

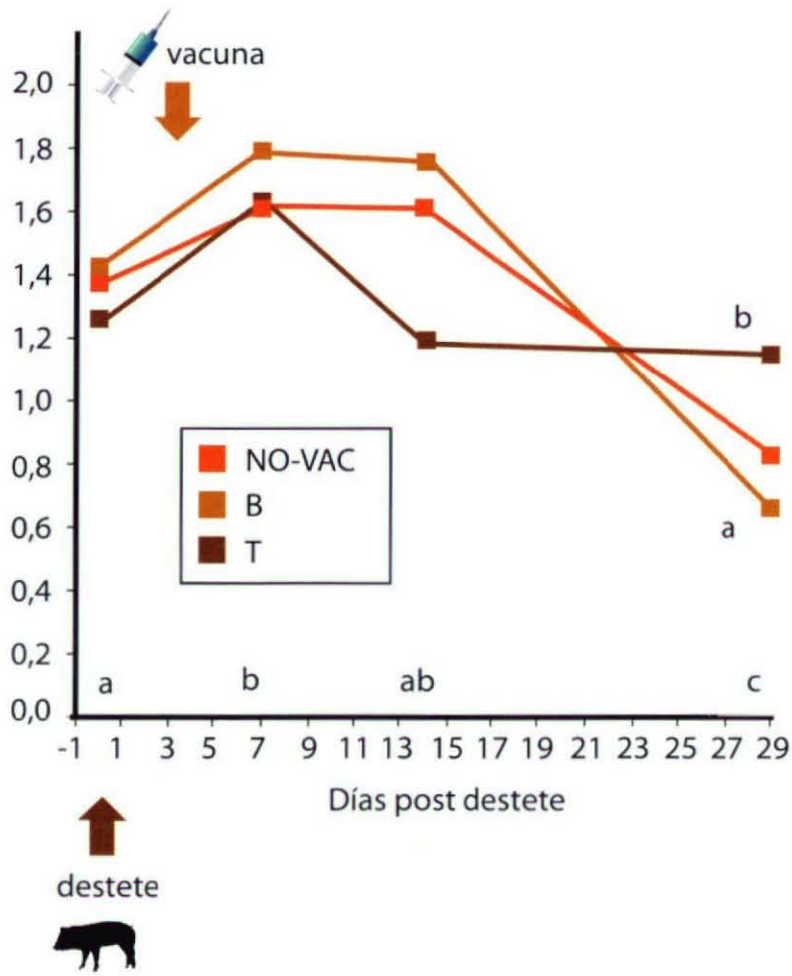


Figura 1: *Media de las concentraciones plasmáticas de PM (±SEM) en los tres grupos de lechones, desde el día 0 (destete) hasta el día 29. Las letras cerca de los valores indican diferencias entre los grupos. Letras en la parte inferior de la grafica indican diferencias entre los días.*

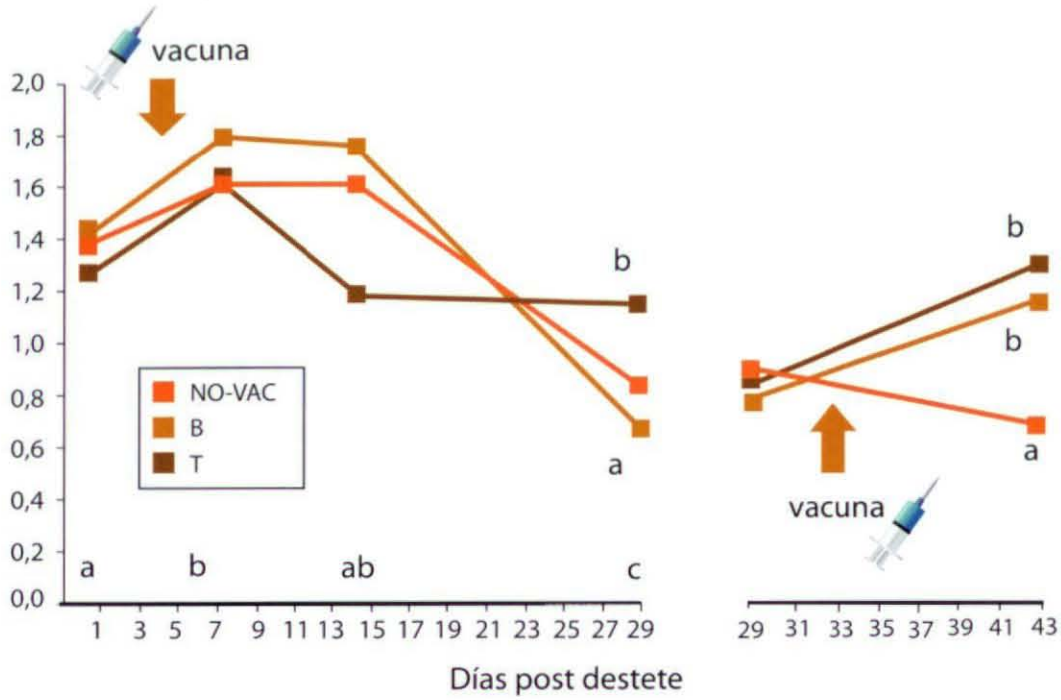


Figura 2: *Media de las concentraciones plasmáticas de PM (±SEM) en los tres grupos de lechones, desde el día 0 (destete) hasta el día 29 y desde el día 29 al 43. Las letras cerca de los valores indican diferencias entre los grupos. Letras en la parte inferior de la grafica indican diferencias entre los días.*

No hubo diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de los animales vacunados el día 38 con ninguna de las vacunas respecto al grupo control B/T (Figura 3).

Discusión

En un estudio preliminar sobre el efecto del estrés en los lechones en el periodo inmediatamente posterior al destete, se determinaron los perfiles de dos de las principales proteínas de fase aguda más relevantes en el cerdo: Haptoglobina y Pig-MAP durante las primeras 4 semanas post destete. En este estudio, el objetivo es determinar el posible efecto de la vacunación frente a *M. hyo* con dos vacunas comerciales diferentes.

Los resultados de esta segunda fase determinaron que la vacunación de lechones con M+PAC® no constituyó un factor aditivo en las concentraciones séricas de estas PFAs en las dos semanas posteriores al destete cuando la vacunación se realizo el día 3. Sin embargo, se mantuvieron mas elevadas respecto al grupo control no vacunado y al grupo vacunado con otra vacuna comercial hasta el día 29, cuando

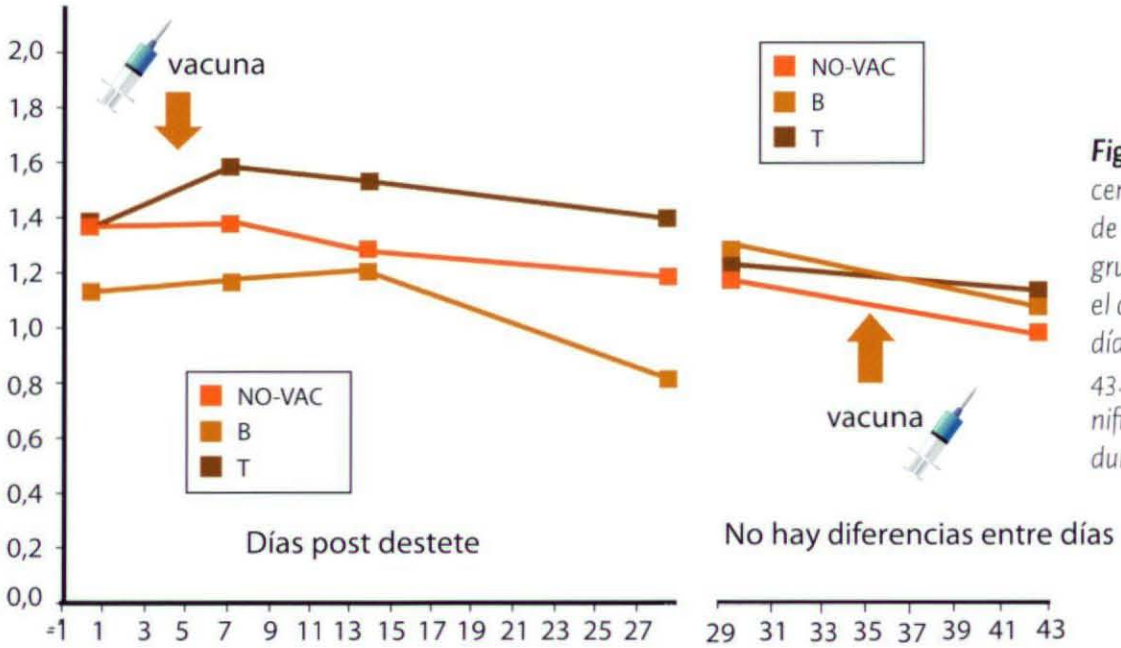


Figura 3: *Media de las concentraciones plasmáticas de Hp (±SEM) en los tres grupos de lechones, desde el día 0 (destete) hasta el día 29 y desde el día 29 al 43. No hubo diferencias significativas entre los grupos durante todo el estudio.*

las concentraciones séricas de ambas proteínas deberían encontrarse en sus niveles basales (0,5-1mg/ml). Durante todo el estudio los lechones se mantuvieron seronegativos frente a PRRSv y no se observo ninguna manifestación clínica de procesos respiratorios o sistémicos que pudieran cursar con inflamación y/o fiebre. Además, las condiciones fueron las mismas para todos los animales por lo que la presencia de niveles moderados en sangre de estas PFAs durante 26 días en los lechones vacunados con M+PAC® no pudieron atribuirse a procesos subclínicos concurrentes. Todo ello sugiere, que la acción de Emunade® (adyuvante de M+PAC) puede originar una liberación más prolongada en el tiempo de antígenos vacunales, y por tanto una exposición y activación del sistema inmune más prolongada en el tiempo.

Debido al estrés del destete, el efecto real de la vacunación frente a *M. hyo* sobre los niveles de la PM y la Hp pudo quedar enmascarado, por ello se vacunaron los lechones que inicialmente actuaron como controles, a los 38 días post-destete. En este caso se observo un incremento significativo respecto al grupo control en los niveles séricos de PM debido al efecto de ambas vacunas a los 5 días post vacunación.

Nuevos estudios son necesarios para dilucidar el efecto que pueda tener la estimulación de las proteínas de fase aguda en momentos críticos de estrés en el lechón sobre el sistema inmune.

Datos de los autores

1 P. Victoria. Eix 11 de Septembre 32-34. 08500 - Vic (Barcelona). España.

2 Intervet/Schering Plough. Cantabria, 2 – Edificio Amura. 28108 Alcobendas (Madrid). España.

Referencias

• **Bigoszewski M, Rychlik A, Nieradka R, Depta A, Sarti, K.** (2007) Utility of acute phase protein determination in weaned piglets reared in conventional farms. *Polish Journal of Natural Science*, 22, 534-544.

• **Black PH.** (2002). Stress and the inflammatory response. A review of neurogenic inflammation. Brain, *Behaviour and Immunity*, 16, 622-653.

• **De Groot J, Ruis AW, Scholten JW, Koolhaas JM, Boersan WJA.** (2001) Long term effects of social stress on anti-viral inmunity in pigs. *Physiology & Behavior*,73,145-158.

• **Grellner G, Fangman T, Carroll J.** (2002) Using serology in combination with Acute Phase Proteins and cortisol to determine stress and inmune function of early-weaned pigs. *Swine Health and Production*, 10, 199-204.

• **Lampreave F, González-Ramón N, Martínez-Ayensa S, Hernández MA, Lorenzo HK, García-Gil A, Piñeiro A.** (1994) Characterization of the acute phase serum protein response in pigs. *Electrophoresis*, 15, 672-676.

• **Petersen HH, Dideriksen D, Christiansen BM, Nielsen JP.** (2002) Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs. *The Veterinary Record*, 151, 85-89.

• **Pié S, Lallés JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, Oswald IP.** (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *Journal of Nutrition*, 134, 641-647.

• **Romagosa A, et al.** (2008) Effect of Mycoplasma hyopneumoniae vaccination on acute phase serum proteins (PigMAP® and haptoglobin) in weaned piglets. *The 20th IPVS Congress*, Or. 02.15,114.