

## La inmunización de lechones precebos con linfocitos alogénicos de cerdos adultos, no afectó la incidencia de rinitis atrófica ni la productividad durante la ceba, en una granja con problemas respiratorios

G Pérez, MV; JG Maldonado, MVZ, MS.

\*Grupo de Teriogenología, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia y Programa de Biogénesis, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. AA 1226, Medellín., Colombia.

(Recibido: marzo 3, 98; aceptado: junio 5, 98)

### Resumen.

El presente estudio se diseñó para evaluar si la inoculación de lechones de precebo con linfocitos de cerdos de la misma granja clínicamente sanos al sacrificio, tenía efecto en los parámetros productivos; la granja se caracterizaba por presentar alta incidencia de problemas respiratorios. Los cerdos donadores se sangraron por punción yugular y la sangre se sometió al proceso de obtención de células mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll (D=1077).

Tres lotes de lechones detetados se asignaron al azar al tratamiento con una mezcla de linfocitos alogénicos ( $7.5 \times 10^7$  cel/dosis) - Grupo aloinmunizado,  $n = 65$ , o con 1 ml de solución salina - Grupo control,  $n = 65$ . Durante el período de la ceba se hizo un seguimiento para evaluar la morbilidad y mortalidad, la ganancia diaria de peso y la ganancia total. Los datos productivos se evaluaron por análisis de varianza multifactorial y los casos de morbilidad y mortalidad por prueba de "Ji-cuadrado". Ni la ganancia diaria ni la ganancia total de peso presentaron diferencias estadísticas significativas entre los grupos ( $p > 0.005$ ). El grupo aloinmunizado presentó significativamente mayores signos de rinitis leve ( $p < 0.05$ ) que el grupo control, pero las diferencias no fueron significativas cuando se evaluaron todos los cerdos afectados por rinitis ( $p > 0.05$ ). Los resultados sugieren que la terapia con linfocitos alogénicos no disminuye la incidencia de enfermedad en una granja con altos problemas respiratorios y confirman otros estudios que no han demostrado un efecto de la terapia con linfocitos como alternativa para aumentar la productividad o reducir la morbilidad en ceba.

*Palabras clave:* ceba, lechones, leucocitos, respuesta inmune.

### Introducción

Las enfermedades respiratorias constituyen una de las mayores limitantes de la industria porcina intensiva (17). La explotación de cerdos sanos mantenidos en contacto con otros infectados por *Mycoplasma*, redujo en 12.7% el crecimiento entre los 50 y 85 kg. de peso; la tasa de crecimiento de cerdos expuestos a madres infectadas bajó un 15% entre 8 y 85 kg. de peso; y la conversión se disminuyó en 13.8% entre 10-25 kg. de peso (13). De otro lado, existe una correlación positiva entre el grado de lesión pulmonar y la reducción en la ganancia diaria de peso (13, 16). La Rinitis atrófica, por su parte, es un síndrome clínico que cursa con estornudos en los lechones

seguido por atrofia de los cornetes, desviación del tabique nasal, reducción y destrucción del maxilar y reducción del ritmo de crecimiento (3). A pesar de los esfuerzos para solucionar los problemas respiratorios en las granjas, aún existen muchas dudas acerca de la patogenicidad, la inmunidad, la prevención y el control de las diversas enfermedades (12).

Como consecuencia de algunos estudios que demostraron un aparente efecto benéfico de la inoculación de cerdas gestantes en la morbilidad de la camada al destete (6, 11), se pensó en la posibilidad de conferir protección a los lechones de precebo, si éstos se inoculaban con linfocitos provenientes de cerdos sanos al sacrificio. Para

ello, se hicieron dos postulados *a priori*: 1) que los cerdos sanos al sacrificio podrían ser el resultado de una condición de resistencia contra los patógenos que los pudieron haber afectado durante la ceba; y 2) que dicha resistencia podría ser transmitida a lechones jóvenes por medio de la inoculación de linfocitos obtenidos de estos cerdos sanos.

El propósito del presente estudio fue probar alternativas durante la ceba, en una granja con altos problemas respiratorios con predominio de la rinitis atrófica. Estos resultados complementan los hallazgos de otros dos estudios similares en los cuales pretendió estudiar la posibilidad de potenciar la respuesta inmune de los lechones recién destetados mediante la inoculación de linfocitos alogénicos obtenidos de ganglios linfáticos (1) o de sangre periférica (8) tanto en granjas con niveles óptimos de sanidad (1, 8) como en el presente caso en una granja con alta incidencia de tipo respiratorio.

## Materiales y Métodos

El estudio se realizó en una granja porcícola ubicada en el Municipio de Entreríos, en el departamento de Antioquia, que se había caracterizado por presentar alta incidencia de problemas respiratorios, en donde predominaba la rinitis atrófica, sin que ninguno de los esquemas preventivos utilizados hubiera dado resultados satisfactorios para disminuir la incidencia de la enfermedad en los lotes afectados.

*Selección del lote referencia (Donadores).* De un lote de cerdos en la fase de acabado se hizo un examen clínico para seleccionar el grupo de animales donadores potenciales, en donde se hizo en la selección de aquellos que no presentaban evidencia clínica de enfermedad respiratoria, tal como ausencia de signos de rinitis, tos o estornudos (3). Los animales seleccionados se sangraron por punción de la vena yugular en tubos de vacío estériles. La sangre se transportó al laboratorio bajo refrigeración, para obtener los leucocitos mononucleares que se utilizaron para preparar el inóculo.

*Obtención de leucocitos de sangre periférica y preparación del inóculo.* Las muestras se centrifugaron a 2500 r.p.m./25 min./15°C para obtener el *Buffy coat* (capa de leucocitos totales), que se tomó con pipeta Pasteur y se diluyó 1:3

en tampón salino fosfatado (PBS 0.15M, pH = 7.2), luego se vertieron en columna de Histopaque D = 1.077 (Sigma, St. Louis MO) y se centrifugaron a 2500 r.p.m./156°C/30 min. Luego se tomó la capa de células mononucleares de la interfase entre el Histopaque y el PBS y se lavó tres veces en 10 ml de PBS a 1500 r.p.m./10min/15°C. Finalmente, las células se suspendieron en 10 ml de solución salina y se determinó la concentración celular en cámara de Neubauer y la viabilidad por exclusión de azul de Tripaño al 0.2%. Las células se empacaron en dosis individuales (promedio de  $7.5 \times 10^7$ ) en viales de Eppendorf, resuspendidas en 1 ml de solución salina.

*Selección de los grupos experimentales (receptores).* Tres lotes de cerdos se seleccionaron en promedio a los 72 días de edad con un intervalo entre el destete y la inoculación promedio de 42 días, y se asignaron al azar a los siguientes grupos experimentales: Grupo aloinmunizado (n=65). Recibió dos dosis con intervalo de 15 días, de una mezcla de linfocitos alogénicos ( $7.5 \times 10^7$  cel/dosis); y Grupo control (n=65). Recibió dos dosis de 1 ml de solución salina, cada una con intervalo de quince días. Todas las inoculaciones se practicaron por vía subcutánea en el pliegue caudal de la oreja.

*Distribución de los grupos experimentales.* con el objeto de evaluar el comportamiento de los lechones inoculados cada uno de los dos grupos experimentales se repartieron en tres lotes, los cuales se levantaron y cebaron en el mismo ambiente en donde se cebaron los cerdos donadores de los linfocitos. Al momento previo a la inoculación se tomó el peso individual de los lechones, como base para la posterior evaluación de los diferentes parámetros productivos y sanitarios; cada lechón se identificó con muesca en la oreja. Todos los cerdos recibieron las mismas condiciones de manejo sanitario preventivo que se llevan a cabo en la granja. Otros factores como estrés, alimentación, alojamiento, se controlaron proporcionando a los animales las mismas condiciones de manejo.

A los animales del estudio se les llevó un seguimiento individual mediante observación permanente en la granja desde el momento de la inoculación, con el fin de observar cualquier evidencia clínica de enfermedad de tipo respiratoria.

Los lechos de los dos grupos se mantuvieron mezclados hasta el momento de llevarlos a los

lotes de engorde, en donde se seleccionaron por tratamiento, para determinar la ganancia diaria de peso y la incidencia de problemas respiratorios durante el período de ceba.

*Grado de rinitis observado en el momento del sacrificio.* El grado de rinitis se determinó, dependiendo de la intensidad de las lesiones macroscópicas externas del hocico y la nariz y de los signos clínicos, en las tres siguientes categorías: Grado 1, rinitis leve: en donde se observó lagrimeo, estornudos y reducción leve de la longitud del maxilar; Grado 2, rinitis moderada: en donde además de lagrimeo y estornudos se observó reducción más notoria del maxilar y presencia de moco con manchas de sangre; y Grado 3, rinitis severa: en donde además de lo anterior se observó marcado prognatismo mandibular, algunos cerdos con el tabique desviado, moco sanguinolento y algunas veces sangrado abundante.

### Análisis estadístico

Los datos de ganancia diaria y total de peso se evaluaron por análisis de varianza multifactorial de acuerdo con el modelo de media mínimo cuadráticas para grupos no pareadas propuestos por Harvey (7). Como efectos principales se incluyeron en el tratamiento, el intervalo entre el destete y la inoculación y, la edad de inoculación; la duración del período de ceba se evaluó como covariable. Los datos de

morbilidad y mortalidad en lactancia se evaluaron por prueba de "Ji-cuadrado".

### Resultados

En total se seleccionaron 131 cerdos de los cuales se evaluaron 125; se descartaron 6 cerdos por las siguientes causas: neumonía (2 lechones), diarrea (2 lechones), canibalismo (1 lechón) y anemia (1 lechón), sin diferencias estadísticas significativas entre los grupos ( $p > 0.05$ ).

*Ganancia diaria de peso.* La ganancia diaria de peso no presentó diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ; F-ratio = entre el grupo aloinmunizado ( $682 \pm 9$  gr) y el control  $691 \pm 9$  gr). El sexo presentó un efecto significativo en este parámetro con una ganancia de  $672 \pm 9$  gr para las hembras y de  $701 \pm 9$  gr para los machos ( $p < 0.05$ ) (Tabla 1).

*Ganancia total de peso.* La ganancia total de peso no presentó diferencias estadísticas significativas con el grupo control ( $p > 0.05$ ). Los machos tuvieron una ganancia de peso mayor (4 kg) que las hembras ( $p = 0.08$ ) (Tabla 1).

El grupo aloinmunizado presentó mayor el número de casos de rinitis leve, pero menor número de casos de rinitis severa. Así mismo, el grupo control presentó mayor número de casos de Rinitis severa. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ) (Tabla 2).

Tabla 1. *Parámetros productivos durante la ceba en cerdos inoculados con linfocitos alogénicos (medias mínimas cuadráticas  $\pm$  error estándar).*

Grupo	sexo	n (gr)*	ganancia diaria (kg)*	ganancia total de la ceba (días)*	duración
Control	H	30	$668 \pm 13$	$74 \pm 1.3$	$112 \pm 2.3$
	M	31	$713 \pm 13$	$77 \pm 1.2$	$109 \pm 2.2$
Aloinmunizado	H	35	$675 \pm 12$	$73 \pm 1.2$	$109 \pm 2.1$
	M	29	$688 \pm 14$	$74 \pm 1.3$	$107 \pm 2.3$

\*  $p > 0.05$

Tabla 2. Grado de rinitis y número de casos en cerdos inoculados con linfocitos alogénicos

Grupo	Grado de rinitis			Total
	Leve	Moderada	Severa	
Control	5 <sup>a</sup>	14	9	28 <sup>b</sup>
Aloinmunizado	14 <sup>a</sup>	15	6	35 <sup>b</sup>

a.  $p = 0.07$  (prueba exacta de Fisher).

b.  $p > 0.05$ .

## Discusión

La industrialización porcícola, cuyo objetivo ha sido la búsqueda de la máxima eficiencia de la especie porcina, ha llevado a desarrollar explotaciones con una alta concentración de animales en pequeñas áreas (17). Esto ha generado un aumento de la presentación de enfermedades infectocontagiosas, cuyo curso viene determinado por factores genéticos, climáticos, de alojamiento y de manejo, que cada día tienen mayor repercusión económica en esta actividad (4).

En los últimos años se han presentado varias crisis en el sector porcícola de nuestro país (4) originado por varias causas como son: bajo consumo de carne de cerdo, poca disponibilidad de materias primas, y altos costos e insumos, lo que conlleva a unos costos de producción muy altos y por esto no somos competentes frente a otros mercados (10). Si a toda esta problemática le adicionamos una alta incidencia de problemas sanitarios en las granjas, que traen como consecuencia una baja eficiencia productiva al disminuir la ganancia diaria de peso, el índice de conversión alimenticia, y al aumentar los índices de morbilidad y mortalidad (16), el panorama se vuelve aún más difícil. Con el propósito de disminuir la presentación de las enfermedades respiratorias dentro de las granjas se han utilizado diferentes estrategias como son: la desinfección permanente de instalaciones, la implementación del sistema de manejo "Todo dentro, todo fuera" y del destete temprano medicado, y la inmunización activa a partir de vacunas (4). No obstante, muchas de las enfermedades se siguen presentando por lo que se hace necesario el estudio de nuevas alternativas que sean más efectivas desde el punto de vista de la prevención.

Dentro de estas alternativas se han venido estudiando el efecto que puede tener la inoculación de cerdos destetados con linfocitos de cer-

dos de sacrificio, con linfocitos de cerdos de sacrificio, con base en la transferencia adoptiva de inmunidad: esto es, la inoculación de linfocitos de animales resistentes contra determinado patógeno o antígeno, a individuos susceptibles para transmitirles la resistencia (5).

El objetivo buscado en el trabajo era el de transmitir a los lechones destetados una suficiente cantidad de antígenos o células de memoria que les permitiera generar resistencia o les transmitiera una mayor capacidad de respuesta inmune; y que al ser sometidos a un reto antigénico alto, de tipo respiratorio, propio de la granja, éstos tuvieran una adecuada respuesta para enfrentarlos. Por consiguiente, el grado de afección por enfermedades respiratorias sería mínimo. Sin embargo, en ninguno de los parámetros evaluados, tanto cuantitativos como cualitativos, hubo diferencias estadísticas significativas entre el grupo aloinmunizado y el control.

Si se tiene en cuenta que todos los factores externos como manejo, alimentación y microclima, fueron iguales en ambos grupos, se sugiere que la inoculación de linfocitos no tuvo ningún efecto en los parámetros evaluados. Estos resultados concuerdan con los estudios de Higueta et al (8) y Bustamante et al (11) quienes no encontraron un efecto benéfico de la aloinmunización en los parámetros productivos en ceba, en lotes de cerdos inoculados con linfocitos obtenidos de sangre periférica o de ganglios linfáticos, respectivamente.

Los resultados sobre el efecto de la aloinmunización en la incidencia de rinitis atrófica, concuerdan también con los resultados de Higueta et al (8), quienes no hallaron efecto del tratamiento en la morbilidad y mortalidad. Sin embargo, en el estudio de Bustamante et al (1) se halló una disminución significativa del número de pulmones con lesiones macroscópicas

en los cerdos del grupo aloinmunizado con respecto a los del grupo control, pero estos resultados no pudieron ser confrontados en el presente estudio por la falta de evaluación *postmortem* de los cerdos.

Por consiguiente, se sugiere que para obtener una mejor respuesta inmune con este tipo de aproximaciones es necesario una mayor especificidad de los antígenos inoculados, es decir el inóculo solo contenga linfocitos de memoria específicos contra determinadas enfermedades, como por ejemplo las respiratorias, que se controle el componente genético de los cerdos, para poder discriminar su condición de resistencia o susceptibilidad y que se hagan estudios más completos del lote de donantes para clasificar de manera objetiva su estado de resistencia. Estos implicarían el estudio de la respuesta inmune *in vitro* y podrían implicar pruebas de linfoproliferación, linfoblastotransformación contra antígenos específicos, producción de citoquinas tipo Th1 ó Th2 en cultivo, entre otros.

La rinitis atrófica es un síndrome clínico que cursa con estornudos en los lechones seguido por atrofia de los cornetes, desviación del tabique nasal, y reducción de la longitud y destrucción de la mandíbula superior. Provoca una reducción en el ritmo de crecimiento y el aumento de peso. Los agentes causales más importantes son *Bordetella bronchiseptica* y cepas toxigénicas de *Pasteurella multocida*, especialmente el tipo D (3); esta última produce un toxina dermonecrotica que es la causante del daño (12). Las infecciones causadas únicamente por *B. bronchiseptica* no son de mayor importancia económica, pero ésta facilita la colonización por *P. multocida* toxigénica y produce una enfermedad mucho más severa que si ocurriera la infección de cada uno de estos microorganismos en forma separada (12).

Existen tres posibilidades para producir inmunidad contra *P. multocida* vacunación parenteral con

vacunas muertas que estimulan la producción de anticuerpos antibacteriales para prevenir colonización de la mucosa nasal, vacunas vivas atenuadas con cepas no toxigénicas para prevenir la colonización, y aplicación de toxoides para prevenir el daño producido por la toxina, siendo ésta la de mayor importancia (12).

La aproximación experimental se probó como una alternativa para producir inmunidad contra la rinitis, pero la aloinmunización no mostró efectividad para reducir la incidencia de rinitis atrófica en la granja del estudio. A pesar de que la incidencia global de rinitis no presentó diferencia estadística significativa entre los grupos, no deja de preocupar el hecho de encontrar una tendencia en los lechones del grupo aloinmunizado a presentar mayor incidencia de rinitis leve. Lo que se puede interpretar como uno de los posibles efectos adversos de la terapia con linfocitos. Hasta el momento, en los diferentes estudios realizados no se ha observado efectos adversos que se puedan atribuir al tratamiento (1, 8, 11) situación que no descarta la posibilidad de transmitir otros patógenos en vez de resistencia, cuando se inoculan linfocitos alogénicos. Sin embargo, esta posibilidad se ha tratado de reducir al máximo, inoculando los lechones con linfocitos de animales de la misma granja y obteniendo el inóculo de los animales que muestran un estado clínico normal.

En conclusión, la alternativa terapéutica propuesta no mostro efectividad para reducir la incidencia de rinitis atrófica en la granja de estudio. Lo anterior sugiere que la presencia de la enfermedad, no solo obedece al estado de susceptibilidad o resistencia de los lotes de cerdos que entran a la ceba, sino que hay múltiples factores que se deben controlar para lograr un adecuado nivel de sanidad en la granja.

### Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a la Universidad de Antioquia por la cofinanciación del estudio por intermedio del Comité Para el Desarrollo de la Investigación (Acta 56 de marzo de 1996). A los laboratorios de Genética y Reproducción y de Virología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia, por el apoyo logístico para la obtención de linfocitos alogénicos.

## Summary

*Alloimmunization of weaned piglets did not have any effect on atrophic rinitis or growth-fattening performance in a farm with high a incidence or respiratory diseases.*

This study was designed to evaluate if lymphocyte immunotherapy could improve the performance of growing piglets from a farm with a High incidence of respiratory diseases. Healthy finishing pigs from the same farm were bled by jugular puncture and peripheral blood mononuclear cells were obtained by gradient (Histopaque D=1077). Three groups of weaned piglets were selected at 7 days after weaning and randomly assigned to inoculation with pooled allogeneic lymphocytes ( $7.5 \times 10^7$  cell/dosis) in 1 ml saline solution (alloimmunized group,  $n = 80$ ) or 1 ml saline (Control group,  $n = 80$ ). Morbidity and mortality rates and growth-fattening performance were evaluated from inoculation to slaughter by daily clinical physical evaluation or average daily gain and total weight gain, respectively. No statistical significant differences between groups were found for any of the productive traits evaluated ( $p > 0.05$ ); however middle rinitis tended to increase ( $p = 0.07$ ) in alloimmunized than control groups, although the difference was not statistically significant when overall rinitis was evaluated ( $p > 0.05$ ). These results suggest that allogeneic lymphocyte immunotherapy did not have effect on the incidence of respiratory diseases in a farm with high frequency of respiratory problems and support similar data found with lymphocytes isolated from lymph nodes which did not have an effect on productive traits.

**Key Words.** Lymphocyte immunotherapy, fattening, immune response, piglets, leukocytes.

## Referencias

- Bustamante A, Agudelo F, Restrepo CE, Maldonado JG. Efecto de la aloinmunización de cerdos de precebo sobre la tasa de morbilidad y la productividad durante la ceba. *Rev. Inmunoalergia* 1998; 7:8-15.
- Christensen G, Mousing J. Respiratory system in diseases of swine. 7th Ed. Leman AR, Straw B. Iowa State University Press. Ames, 1992; pp 138-162.
- De Jorg Mf. Progressive Atrophic Rinitis. En: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D'Allaire S, Taylor DJ. *Diseases of Swine*. 7<sup>th</sup> edition. Iowa State University Press. Ames; 1992; 314-335.
- Estrada R. Neumonía micoplásmica del cerdo y su impacto económico. *Porcinotas* 1994; 10: 9-11.
- Ghalib HW, White J, Kubin M, et al. IL-12 enhances Th1-type response in human *Leishmania donovani* infections. *J Immunol* 1995; 154: 4623-4629.
- González MS, Otero AM, Maldonado JG, Hernández P, García G, Ossa JE. Efecto de la inmunización de cerdas gestantes sobre la morbilidad y mortalidad de la camada en la lactancia. *Memorias, VII ALVEC*, 1997.
- Harvey WR. Least-square analysis of data with unequal subclass numbers. *USDA*. 1975. 157p.
- Higuera D, Tobón JC, Peláez JC, Maldonado JG. Evaluación de la terapia con linfocitos alogénicos de sangre periférica en lechones precebos sobre sus parámetros productivos durante la ceba. *Rev Col Cienc Pec* 1999; 12: 17-23
- Leman A, Straw B, Mengeling W, et al. *Diseases of swine*. 7th edition. Iowa USA. 1992; p 1021.
- Lotero LH. Competitividad y costos de producción en porcicultura. *Porcicultura Colombiana* 1996; 43: 33-34.
- Maldonado JG, Mejía AF, Quejada P, Giraldo S, Ossa JE. Efecto de la aloinmunización intrauterina preconcepción de cerdas de replazo en los parámetros de la camada al nacer. *Memoria: VII Congreso Latinoamericano de ALVEC*. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. Octubre 5-8 de 1997.
- Mogollón JD, Valenzuela S. Inmunidad y patogénesis de las enfermedades respiratorias del cerdo. *Noticamburoug* 1995; 5: 36.
- Straw B, Tuovinen VK, Bigras-Poulin M. Estimation of the cost of pneumoniae in swine herds. *J Am Vet Med Ass.* 1989; 195: 1702-1706.
- Switzer WP, Ross RF. *Mycoplasma diseases*. Dumme HW, Leman Ad. *Diseases of Swine*. Iowa State University Press. Ames, 1975. 741-764.
- Taylor DJ. *Enfermedades del cerdo*. Editorial El Manual Moderno; México. 1992; 392p.
- Uribe JE, Cardona A. Efecto de las lesiones pulmonares sobre el rendimiento productivo del cerdo. *Memorias VI Congreso Latinoamericano de ALVEC*. Santafé de Bogotá. 1995.
- Velásquez JI. Competitividad de la industria porcina colombiana. *Rev Col Cienc Pec* 1997; 10 (Supl): 145-150.