

PRODUCCION MASIVA DE ANTICUERPOS COMERCIALES EN CERDOS

HÉCTOR BARBOSA ¹
JORGE RAVINES ²
JUAN GARZA ²
CARLOS LARRALDE ¹

Resumen

La inmunización de cerdos de 5 a 8 semanas antes de su sacrificio no interfiere seriamente con su ganancia de peso, y dada la crianza intensiva de cerdos, permite tener un método de producción masiva de anticuerpos. Este puede ser el mejor método para la producción de anticuerpos en gran escala que sería necesario para extender la seroterapia a problemas de medicina humana y veterinaria. Constituye también una alternativa más económica que la producción de anticuerpos en caballos.

Introducción

La transferencia pasiva de resistencia a microorganismos o sus productos por medio de la administración de anticuerpos es todavía una de las aplicaciones más espectaculares de la inmunología. Asimismo, anticuerpos contra miles de diferentes moléculas orgánicas son usados extensivamente en laboratorios clínicos o de investigación para la detección o purificación de antígenos. Sin embargo, los métodos empleados para la producción de anticuerpos específicos en cantidades industriales fueron diseñados sin tomar en cuenta la práctica moderna de la ganadería: muchos anticuerpos administrados a humanos provie-

nen de caballos, los cuales son destinados exclusivamente a ese propósito, en vez de utilizar otros animales que son criados en gran número como fuente de carne. Esto no solamente eleva grandemente el costo de producción, sino que también limita la cantidad de anticuerpos producidos y sus usos en medicina humana y veterinaria. En México, por ejemplo, cerca de la cuarta parte del ganado porcino, bovino, caprino y ovino muere en los primeros 45 días después del nacimiento, principalmente por infecciones gastrointestinales (Uruchurtu *et al.*, 1976). Los humanos lactantes también sufren, principalmente, de enfermedades gastrointestinales (Kumate, Cañedo y Pedrotta, 1977). En ambos casos, las enfermedades gastrointestinales se ven propiciadas por el estado natural de inmunodeficiencia del recién nacido, y tal vez puedan ser prevenidas o tratadas por la administración oral de anticuerpos. El uso de anticuerpos puede tener ventajas sobre el uso de antibióticos, ya que no se seleccionan las cepas de bacterias resistentes a drogas y pueden actuar sobre algunos virus.

Aunque *a priori* la sangre porcina puede utilizarse como una fuente de anticuerpos al igual que la de los caballos, cantidades enormes de sangre porcina son desechadas en los rastros del mundo, o en el mejor de los casos, la sangre es utilizada como un producto marginal de la industria ganadera. En un intento de hacer un uso mejor y más provechoso de esta sangre, se diseñó un protocolo de inmunización con el fin de enriquecer notablemente el contenido de anticuerpos en la sangre de los cerdos al momento de su muerte

Recibido para su publicación el 23 de julio de 1980.

¹ Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México 20, D.F., México.

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, México 20, D.F., México.

en el rastro, sin interferir con la producción de carne.

La empresa no fue difícil: los cerdos respondieron a la inmunización con un antígeno convencional (toxoides tetánico) con niveles de antitoxina similares a los obtenidos en caballos (Larralde *et al.*, 1974). La inmunización no produjo efectos significativos en la curva de peso de los cerdos. Si los cerdos responden tan efectivamente a otros antígenos, como lo hicieron al toxoide tetánico, este método puede proporcionar una gran variedad de anticuerpos a gran escala y a bajo precio, los cuales pueden utilizarse para ayudar a resolver algunos problemas en medicina veterinaria y, quizá, también en medicina humana.

Material y métodos

Diseño experimental

Una experiencia previa inyectando caballos con toxoide tetánico demostró que, para una dosis dada de antígeno, el número de estimulaciones antigénicas y el uso de adyuvantes fueron dos de las variables más importantes para desarrollar un estado hiperinmune de interés industrial en períodos cortos de tiempo (Larralde *et al.*, 1974). Consecuentemente una dosis constante de toxoide tetánico, el equivalente de 160 L₊ de toxina, fue utilizado en la inmunización de cerdos. 39 cerdos adultos (Duroc-Yorkshire) con pesos de 65 a 100 kg fueron divididos en tres lotes: un primer lote subdividido en dos grupos de 8 animales cada uno, fue inmunizado; el primero, con adyuvante completo de Freund y el otro con adyuvante incompleto de Freund; un mes más tarde fueron reinmunizados con el antígeno sin adyuvante y una semana después del segundo estímulo antigénico fueron sacrificados en el rastro. Un segundo lote de 17 animales se subdividió en un grupo de 8 animales inmunizados con adyuvante completo de Freund y un grupo de 9 animales inmunizados con adyuvante incompleto de Freund; un mes más tarde recibieron un segundo estímulo antigénico mezclado también con adyuvante de Freund, quince días

después un tercer estímulo antigénico administrado sin adyuvante y 8 días después de este estímulo antigénico fueron sacrificados en el rastro. El tercer lote de 6 animales fue utilizado como control.

Este esquema resulta en cerdos que fueron inmunizados dos o tres ocasiones antes de su muerte con adyuvante completo o incompleto de Freund. En la última inyección el antígeno fue administrado sin adyuvante en todos los grupos experimentales. El antígeno mezclado con el adyuvante fue administrado subcutáneamente en la punta de las orejas derechas en volúmenes finales de 1 ml. Los animales testigos y experimentales fueron manejados y alimentados bajo las mismas condiciones.

Antígeno y adyuvantes

El toxoide tetánico fue donado por Laboratorios Dr. Zapata * y preparado de un lote de toxina tetánica cruda (*Cl. tetani* Harvard A-47; con 46 Lf/ml, 320 L₊/ml, 800,000 dosis mínimas letales ratón/ml) tratada con 0.4% de formaldehído, de acuerdo a procedimientos estándar (Dawson y Mauritzen, 1969). El adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund fueron preparados con 84.5% de aceite mineral (Nujol), 14.5% de lanolina, y 1% de emulsificador 815 D (Colloids de México, S.A.), con o sin, respectivamente, 2 mg/ml de *M. tuberculosis* H37 R_v sometido al autoclave y seco. Volúmenes iguales de toxoide y adyuvante fueron mezclados vigorosamente para hacer una emulsión conteniendo el equivalente de 160 L₊/ml de toxina y 1 mg/ml de *M. tuberculosis*.

Colección de suero y ensayo de antitoxina

Aproximadamente 10 ml de sangre fueron obtenidos de las venas marginales de las orejas izquierdas de los cerdos al inicio del experimento, una semana después de cada estimulación antigénica y el día de su

* Antigua Av. Las Granjas Núm. 625, México 16, D.F., México.

muerte. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente hasta que coaguló y entonces se separó el suero por decantación y centrifugación a 2,500 rpm (1,000 g) a 4°C. El suero fue guardado a -20°C hasta que todas las muestras fueron obtenidas y entonces se determinó el contenido de antitoxina utilizando el mismo lote de toxina.

La determinación de unidades antitóxicas en los sueros fue hecha utilizando ratones CBA isogénicos, de ambos sexos, y de pesos (18-20 g) y edades (4 semanas aproximadamente) similares. El procedimiento consiste en: a) preparaciones estándar de toxina y antitoxina tetánica (Department of Health, Education and Welfare. Bulletin by Division of Biologic Standards, National Institutes of Health, Bethesda 14. MD. U.S. Public Health Service, Dec. 15, 1952) fueron mezcladas de tal manera que 0.9 ml contuvieron 1 L₊ de toxina tetánica y 0.01 unidades de antitoxina; b) 0.1 ml de una dilución dada del suero por ensayar se añadió a la mezcla de toxina-antitoxina y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora; c) se inyectaron 2 ratones intramuscularmente en las patas traseras con 0.5 ml de cada muestra; d) los ratones inyectados fueron examinados dos veces diariamente y se anotaron los animales muertos en los primeros cuatro días; e) el doble de la recíproca de la dilución máxima de suero que protegió a los ratones durante los primeros cuatro días fue tomada como la concentración de unidades antitóxicas por mililitro de suero (UA/ml).

Nota: El procedimiento descrito arriba no es el ensayo convencional para antitoxina tetánica (Bull. of NIH, 1952), pero es un procedimiento estándar en inmunología industrial como una manera de vigilar la producción de antitoxina dado que los ratones son más accesibles y baratos que los suyos.

Otras observaciones

Todos los cerdos fueron pesados y examinados clínicamente al inicio del experimento y cada semana durante el transcurso del mismo, asimismo se inspeccionó el sitio de la oreja donde se inmunizaron. Después, las canales fueron clasificadas por un ins-

pector ajeno a nuestro experimento. Muestras de diversos tejidos (corazón, hígado, bazo, riñón, pulmón, ganglio linfático, músculo y orejas) fueron colectadas para realizar estudios histológicos convencionales.

Resultados y discusión

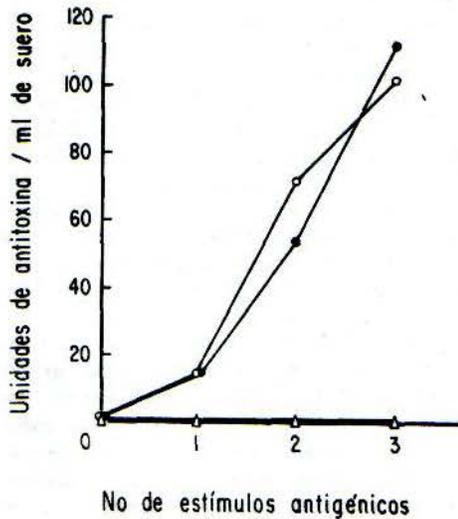
Los cuadros 1, 2 y 3 muestran los valores de unidades antitóxicas por mililitro de suero (UA/ml) y los pesos de los cerdos en kilogramos (kg) registrados una semana después de cada estimulación antigénica, tanto en los cerdos testigos como en los inmunizados dos y tres veces respectivamente. El efecto de la estimulación antigénica sobre la concentración de antitoxina en suero es claro, ya que en los cerdos testigos permanece en valores de cero en todos los tiempos, mientras que en los inmunizados tiende a incrementarse de acuerdo al tiempo y número de estimulaciones antigénicas, alcanzando al final concentraciones con promedio de 63.8 y 106.7 UA/ml para los animales inmunizados dos y tres veces respectivamente (Gráfica 1). El efecto de los diferentes adyuvantes sobre la concentración de antitoxina en suero, no es tan aparente como el número de estimulaciones antigénicas. De hecho, los resultados del análisis de varianza de dos vías, resumido al final de los cuadros 2 y 3 no muestra diferencias entre los adyuvantes. Obviamente, el número de estimulaciones antigénicas y el progreso del tiempo están confundidos en el diseño, pero se supone que el aumento de UA/ml es debido a la estimulación antigénica progresiva, ya que los grupos testigos permanecen en valores de cero.

El análisis de los efectos del tratamiento sobre el peso de los cerdos es más difícil de realizar ya que aquí hay una relación entre el peso inicial y el peso final, y porque el diseño resultó en dos intervalos de tiempo diferentes entre la iniciación y la terminación de los experimentos para los animales que recibieron dos o tres estimulaciones antigénicas. Como primera impresión, el peso final de los cerdos inmunizados y el del

CUADRO 1

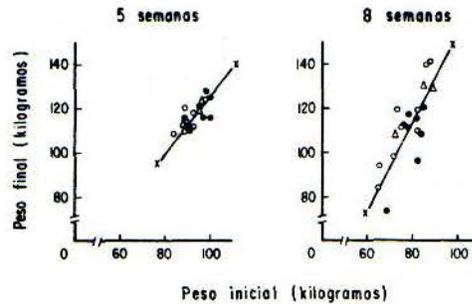
Concentración de antitoxina en suero y peso de los cerdos no inmunizados, una semana después de cada estimulación antigénica de los grupos experimentales

Número de cerdos	ESTIMULACIONES ANTIGENICAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES							
	0		1		2		3	
	UA/ml	kg	UA/ml	kg	UA/ml	kg	UA/ml	kg
1	0	89	0	93	0	114	0	129
2	0	72	0	76	0	92	0	108
3	0	85	0	90	0	110	0	131
4	0	87	0	92	0	113	—	—
5	0	86	0	101	0	123	—	—
6	0	85	0	99	0	119	—	—



Gráfica 1. Promedio de unidades antitóxicas por mililitro de suero (UA/ml) en cerdos inmunizados con toxoide tetánico mezclado con adyuvante completo (●—●) e incompleto (○—○) de Freund, graficados contra el número de estimulaciones antigénicas. Se grafican también en los estimados de UA/ml de los cerdos no inmunizados (△—△) en los tiempos correspondientes a cada estimulación antigénica de los grupos inmunizados para comparación. Claramente, la concentración de antitoxina en suero aumenta con las estimulaciones antigénicas, pero no hay diferencias apreciables entre los adyuvantes.

grupo testigo sugiere que la inmunización inhibe la ganancia de un peso en un promedio aproximado de 10%. Sin embargo, la Gráfica 2 sugiere que cuando se considera la relación entre el peso inicial y el final, los pesos de los grupos experimentales y el grupo testigo aumentan de manera similar, cayendo todos los puntos cercanos a una misma línea de regresión, y que los pesos bajos



Gráfica 2. Relación entre los pesos iniciales y finales del grupo control (△) y los grupos inmunizados (● adyuvante completo; ○ adyuvante incompleto) con intervalos de 5 a 8 semanas entre el comienzo y la terminación de los experimentos. La gráfica sugiere que las diferencias en los pesos finales son atribuibles a diferencias en los pesos iniciales y no al tratamiento ya que todos los puntos caen muy cerca de una sola línea de regresión.

CUADRO 2

Concentración de antitoxina en suero y peso de los cerdos que recibieron un total de dos estímulos antigénicos, estimados al inicio del experimento y una semana después de cada estimulación

Tipo de adyuvante	ESTIMULOS ANTIGENICOS					
	0		1		2	
	UA/ml	kg	UA/ml	kg	UA/ml	kg
Adyuvante incompleto de Freund	0	84	14	87	100	108
	0	83	14	86	100	—
	0	92	14	87	100	118
	0	97	14	100	100	124
	0	88	14	96	100	120
	0	88	14	92	100	109
	0	88	14	90	29	114
	0	92	14	93	57	112
Adyuvante completo de Freund	0	95	14	100	43	121
	0	100	14	103	29	125
	0	69	14	92	86	116
	0	90	14	92	57	114
	0	98	14	100	29	128
	0	100	14	104	100	116
	0	90	14	91	72	110
	0	96	14	100	72	117

Cuadro de análisis de varianza para UA/ml

Fuente	GL	SS	MS	F	P
Estímulos antigénicos	2	48561	24280	101.0	<<.005
Tipo de adyuvante	1	816	816	3.4	>.05
Interacciones	2	1633	816	3.4	.01 < P < .05
Residual	42	10041	239		
Total	47	61053			

CUADRO 3

Concentración de antitoxina en suero y peso de los cerdos que recibieron un total de tres estímulos antigénicos, estimados al inicio del experimento y una semana después de cada estimulación

Tipo de adyuvante	ESTIMULOS ANTIGENICOS							
	0		1		2		3	
	UA/ml	kg	UA/ml	kg	UA/ml	kg	UA/ml	kg
Adyuvante incompleto de Freund	0	88	14	95	57	124	72	141
	0	73	14	78	—	128	57	119
	0	82	14	85	57	102	129	119
	0	86	14	90	57	115	100	140
	0	71	14	72	—	87	86	98
	0	65	14	67	57	80	171	94
	0	75	14	74	43	91	86	111
	0	65	14	68	57	78	171	84
	0	82	14	82	57	96	29	110
Adyuvante completo de Freund	0	84	14	93	43	107	43	108
	0	78	14	88	43	100	86	112
	0	82	14	78	57	86	100	97
	0	68	14	67	57	69	157	73
	0	76	14	76	57	93	128	112
	0	81	14	93	57	100	128	115
	0	77	14	80	57	97	171	117
	0	85	14	89	43	106	86	121

Cuadro de análisis de varianza para UA/ml

Fuente	GL	SS	MS	F	P
Estímulos antigénicos	3	105197	35065	63.6	<< .005
Tipo de adyuvante	1	153	153	.2	> .05
Interacciones	3	903	301	.5	> .05
Residual	56	30862	551		
Total	63	137116			

de los animales inmunizados pueden ser explicados por sus pesos bajos iniciales.

Se desarrollaron abscesos de 5 cm aproximadamente en las orejas inyectadas con la mezcla de antígeno-adyuvante, muchos de los cuales drenaron eventualmente material purulento. Estos abscesos no afectaron ostensiblemente a los cerdos. Después de su sacrificio, las canales de los cerdos fueron clasificadas como aptas para consumo humano por un inspector de carnes, usando criterios estándar. El examen microscópico de las orejas inyectadas, así como del músculo, bazo, hígado, pulmones, corazón, riñones y ganglios linfáticos, revelaron infiltrado de inflamación crónica y aguda en las orejas, depleción linfoides en bazo y ganglios linfáticos y estructuras normales en el resto de los órganos.*

Estas observaciones establecen que los cerdos criados para la producción de carne pueden ser inmunizados pocas semanas antes de su sacrificio para enriquecer su concentración de antitoxina tetánica en suero, y presumiblemente de otros anticuerpos, sin lesionar ostensiblemente la producción de carne. Esta alternativa a la producción de sueros en caballos, resulta más económica dado que elimina la necesidad de utilizar un animal exclusivamente con ese fin, y los problemas que plantea la colección de sangre en los rastros son menores a los de reintegración del paquete globular en los caballos.

De hecho actualmente en algunos países se utiliza este sistema de producción de anticuerpos para su uso por vía parenteral en la prevención de algunas enfermedades (Agrosíntesis, 1979).

Con las cantidades enormes de anticuerpos que pueden obtenerse de esta manera, es posible tratar de disminuir el alto índice de mortalidad que se observa en los recién nacidos de ganado porcino, bovino, ovino y caprino en México (Uruchurtu *et al.*, 1976) y cualquier lugar que utilice

* El examen microscópico fue realizado gentilmente por el Dr. De la Concha del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

métodos primitivos de ganadería, aumentando así la eficiencia de la producción de carne. Una manera de intentar lo anterior sería el administrar suero por vía oral a los recién nacidos, pues existen observaciones previas en lechones que indican que aquellos alimentados con una dieta suplementada con suero se desarrollan mejor que sus controles (Kurcyn *et al.*, 1976; Quiroz, Olgún y Garza, 1975); asimismo que la IgG por vía oral es capaz de proteger a recién nacidos de algunas enfermedades bacterianas (Brandenburg y Wilson, 1973), y más recientemente se demostró (Snodgrass y Wells, 1978) que anticuerpos administrados oralmente protegen eficazmente a borregos de una enfermedad gastrointestinal causada por rotavirus, condición muy similar a la observada en humanos (Espejo, Calderón y González, 1977).

Dado que en los humanos la protección por el calostro y la presencia de enfermedades gastrointestinales es muy similar a la de otros mamíferos, resulta muy interesante la posibilidad de administrar grandes cantidades de antisuero en la leche de la dieta de niños expuestos a riesgos altos de contraer infecciones gastrointestinales bacterianas o virales o ambas, como un medio de alcanzar niveles terapéuticos de anticuerpos en el lumen intestinal a pesar de las condiciones desnaturizantes de proteínas del estómago y el intestino delgado (Jeffcott, 1972). Así pues, el optimismo concerniente a la seroterapia oral no es extravagante, aunque requiere de más experimentación antes de ser implementada.

Que el contenido de anticuerpos en animales inmunizados se incremente con el número de estimulaciones antigénicas y con el uso de adyuvantes es, por supuesto, trivial inmunológicamente, así como lo es el hecho de que los cerdos producen anticuerpos, y han sido ocasionalmente usados como donadores de cantidades limitadas de anticuerpos destinados a medicina veterinaria o a reactivos biológicos. Se recalca que las observaciones muestran que es posible acoplar la ganadería moderna con la industria de reactivos biológicos, utilizan-

do más adecuadamente la sangre. El aco-
plamiento facilitará la producción masiva
de anticuerpos necesaria para extender el
uso de la seroterapia en medicina veteri-
naria y en ciertas condiciones humanas que
probablemente requerirán de grandes can-
tidades de anticuerpos. Cambiar la produc-
ción de grandes cantidades de biológicos a
especies tales como el cerdo, es hoy eco-
nómicamente sólido e inescapable en un
futuro cercano. Las curvas de peso, la cla-
sificación de la carne y las autopsias reve-
laron efectos insignificantes del protocolo
de inmunización sobre el resto del organismo
y en particular sobre la cantidad y cali-
dad de la carne. La utilización de anti-
genos y adyuvantes deberá someterse a las
mismas pruebas de inocuidad a las que se
somete a las vacunas con el fin de elimi-
nar el temor a la contaminación de la car-
ne. En este caso en particular, el adyuvante
completo de Freund con su producto posi-

blemente no deseado (*M. tuberculosis*), so-
metido al autoclave no fue necesario para
la producción adecuada de anticuerpos, y
puede no ser usado. Asimismo se deben te-
ner en mente algunas enfermedades virales
de las que los cerdos pueden funcionar co-
mo portadores, v. gr. pseudorrabia.

Summary

Immunization of pigs 5-8 weeks prior to
slaughter does not seriously interfere with
their weight gain and leads to a method
for the massive production of antibodies
due to the intensive breeding of pigs. It
may be the best method of producing the
large quantities of antibodies necessary to
extend the serotherapy of veterinary and
human medical problems, and offers an eco-
nomically interesting alternative to the pro-
duction of antibodies in horses.

Literatura citada

- ANÓNIMO, 1979, Puercos de La Piedad, mueren
en aras de la ciencia, *Agro-Síntesis*, 10:40.
- BRANDENBURG, A.C. and M.R. WILSON, 1973, Im-
munity to *Escherichia coli* in Pigs. IgG Immu-
noglobulin in passive immunity to *E. coli* en-
teritis, *Immunology*, 24:119.
- Department of Health, Education and Welfare,
Bulletin by Division of Biologics Standards,
National Institutes of Health, Bethesda 14, MD.
US, Appendix A The Mouse. Test for Deter-
mination of Tetanus Antitoxin in Sera. 4th
revision. USA, 8.
- DAWSON, D.J., and C.M. MAURITZEN, 1969, Stu-
dies on tetanus toxin and toxoid. IV. Inter-
action of formaldehyde with tetanus toxin, *Aus-
tralian J. Biol. Sci.*, 22:1217.
- ESPEJO, R., E. CALDERÓN and N. GONZÁLEZ, 1977,
Distinct Reovirus like agents associated with
acute infantile gastroenteritis, *J. Clin. Micro-
biol.*, 6:502.
- JEFFCOTT, L.B., 1972, Passive immunity and its
transfer with special reference to the horse,
Biol. Rev., 47:439.
- KUMATE, J., L. CAÑEDO y O. PEDROTTA, 1977, Sa-
lud de los Mexicanos y la Medicina en México,
Editorial del Colegio Nacional, 1ª Ed., Méxi-
co, D.F., 205.
- KURCYN, G., J. GARZA, F. OLCUÍN y F. QUINTA-
NA, 1976, Efecto de la adición al calostro del
suero sanguíneo, albúmina y gamaglobulinas en
lechones, *Veterinaria Méx.*, 7:124.
- LARRALDE, C., H. BARBOSA, O. ROBINSON, J.L. MO-
LINARI y R. DEL ARCO, 1974, Optimización de
la Producción Industrial de Antitoxina Tetáni-
ca Equina por Medio del Adyuvante Completo
de Freund y de la Frecuencia de Inmunización.
Rev. Invest. Publ. (Méx.) 34:125.
- QUIROZ PÉREZ, J., F. OLCUÍN y J. GARZA, 1975,
Anticuerpos adquiridos pasivamente en relación
con mortalidad e incremento de peso de lechones,
Veterinaria Mex., 6:84.
- SNODGRASS, D.R., and P.W. WELLS, 1978, The im-
munoprophylaxis of rotavirus infections in
lambs, *Vet. Rec.*, 102:146.
- URUCHURTU, A., D. MÉNDEZ, J.M. DOPORTO, R.M.
ROMERO, J. LÓPEZ ALVAREZ y F. SÁNCHEZ GAR-
CÍA, 1976. Un estudio sobre la mortalidad de
lechones en México, *Veterinaria Méx.*, 7:111.