

OBTENCIÓN Y MANTENIMIENTO DE LECHONES DONANTES S.P.F. (Specific Pathogen Free) PARA XENOTRASPLANTE

Muñoz, A., Pallarés, F.J., Ramis, G., Martínez, J.S., Bretón, J., Sánchez, A.

Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia

INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha propuesto la posibilidad de transmisión de patógenos en xenotrasplantes. Existen varios estudios sobre ello, pero en animales obtenidos a través de parto normal. De la misma forma que en los trasplantes humanos uno de los objetivos es evitar la transmisión de patógenos como el virus de la hepatitis o el VIH. Se ha diseñado un protocolo para evitar o reducir la transmisión de patógenos de cerdos donantes a monos.

El objetivo de este estudio es minimizar los riesgos para la salud del receptor del xenotrasplante, y seleccionar madres de futuros donantes en base a un estudio patológico específico.

ABSTRACT

Recently, has been proposed the possibility of pathogen transmission in xenotransplantation. There are some studies about this, but in animals obtained through normal farrow. In the same way in human transplantation in witch one of the objectives is avoid transmission of pathogens like hepatitis virus or HIV, we have design a selection protocol in order to avoid or reduce transmission of pathogens from donor pigs to baboons.

The objectives of this study were to minimize health risks for xenotransplantation receptor, and select the mothers of future donors in the basis of an speciphic pathological study criterion.

RESUMEN

Para la obtención de lechones MD (Minimal Disease) y/o SPF (Specific Pathogen Free) existen tres modelos: Modelo de histerec-tomia a término (HT) propuesta por Alexander et al. (1976), el destete precoz medicado

(MEW; Medicated Early Weaning) propuesto por Alexander et al. (1980) y la producción en múltiples fases (PMF) propuesto por Harris et al. (1988).

La HT fue utilizada por algunas compañías de mejora genética con el fin de introducir animales en sus Granjas Núcleo con garantías

sanitarias suficientes para mantener el status sanitario de dichas granjas. Los lechones se obtenían mediante una histerectomía realizada el día 114 de gestación, encalostrándose en la primera media hora de vida con calostro natural obtenido en la granja de destino y llevándose a ésta en un plazo no superior a las dos horas. Una vez en la granja se daba en adopción a cerdas paridas ese mismo día y se les aplicaba el tratamiento rutinario de la granja. El MEW consiste en adelantar el destete hasta los 8-9 días de lactación y la utilización de tratamientos antibióticos con el fin de evitar la propagación de gran número de patógenos que se transmiten a partir de esos días de edad. Con este método se consigue eliminar el contagio por *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Haemophilus parasuis*, y minimizar la presión de infección y recirculación del virus SRRP. El PMF se basa en romper el ciclo productivo mediante distancias en los momentos más críticos de recirculación de patógenos. Los lechones se separan físicamente (distancias > 2 Km) de sus madres a la edad de 21 días y se llevan a instalaciones donde conviven exclusivamente con animales contemporáneos. Este modelo garantiza la ausencia de transmisión del virus de Aujeszky, el de la Gastroenteritis Transmisible Porcina (TGE), *Serpulina hyodysenteriae*, así como otros patógenos de menor trascendencia. Igualmente minimiza la presión de infección y recirculación del virus SRRP.

De estos tres métodos, el orden de mayor a menor en eficacia y costo es: HT, MEW y PMF. La HT es el más eficaz, puesto que al no contactar con otros cerdos la garantía de ausencia de patógenos específicos es mayor, así como el de mayor coste debido a que la obtención de cada camada supone el sacrificio de una cerda reproductora.

MATERIAL Y MÉTODOS

Elección de cerdas madres como candidatas

Para la realización de esta experiencia se disponía de una población base de 2.063 reproductoras pertenecientes a una granja convencional de producción con un buen estado sanitario. Una vez determinada la fecha de trasplante (FT) se localizaron todas las cerdas con fecha prevista de parto de 28 ± 1 días antes de FT. Una granja de este volumen tiene una media de 13 ± 4 partos diarios, por lo que se dispone aproximadamente de 40 candidatas. El protocolo de elección siguió los siguientes criterios:

- 1) Las candidatas elegidas serán preferiblemente de primer o segundo parto.
- 2) Evidenciación de ausencia del gen receptor Ryanodine, responsable de la susceptibilidad al Síndrome de hipertermia maligna, mediante PCR.
- 3) Chequeo serológico (ELISA) los días 80, 94 y 108 de gestación evidenciando la posible presencia de anticuerpos frente al virus campo de: PRRS, influenza, herpesvirus suis tipos I y II, parvovirus y picornavirus.
- 4) Ecografía de pantalla el día 84 de gestación a fin de eliminar cerdas con úteros que contengan lechones momificados
- 5) Evidenciación de patógenos específicos conocidos el día 108 de gestación mediante PCR.

Las candidatas seleccionadas hasta el día 100 de gestación se sometieron a una pauta nutricional específica en la que se incrementó la ración convencional (2.900 Kcal E.M./Kg) en un 15% en peso, el contenido en fibra hasta el 7% y el aporte de vitamina E a 300 UI/Kg de pienso.

Realización de las histerectomías

Se realizaron 4 histerectomías a término en cerdas primerizas seleccionadas de un total de 82 candidatas monitorizadas (dos sesiones de dos histerectomías). La técnica requiere disponer de 2 quirófanos y una sala de reanimación:

- 1) Quirófano séptico: un primer equipo veterinario realizó la histerectomía propiamente dicha, mediante técnica de aturdimiento con pistola de bala cautiva y extracción del útero completo tras disección del ligamento ancho y ligadura del cuello del útero. El órgano y su contenido se depositaron en un recipiente con desinfectante (Betadyne®) al 5% en agua a 37° C y se trasladó al quirófano limpio. El tiempo máximo de intervención se fijó en 45 segundos para evitar la hipoxia de los lechones neonatos.
- 2) Quirófano aséptico: un segundo equipo veterinario recibió el recipiente con el útero y realizó la apertura del mismo en condiciones de asepsia. A los lechones neonatos se les practicó clampaje del cordón umbilical y extracción de flemas, pasando posteriormente a reanimación. El tiempo máximo de intervención se fijó en 45 segundos para evitar la hipoxia e hipotermia de los lechones neonatos.
- 3) Sala de reanimación: los lechones neonatos se secaron totalmente y se mantuvieron a 37-38° C, iniciándose un protocolo específico de manejo post-histerectomía.

Manejo de los lechones neonatos

38 lechones neonatos, obtenidos mediante

histerectomía a término, se sometieron a un tratamiento específico de manejo y nutrición desde el momento de su extracción y hasta la fecha del xenotrasplante. El protocolo seguido responde a la siguiente secuencia:

- 1) Encalostramiento inicial en los primeros 10 minutos de vida mediante la administración de calostro natural pasteurizado (12-20 cc por lechón).
- 2) Mantenimiento en reanimación durante 2 horas a 37-38° C y práctica de:
 - Repaso de cordones umbilicales y desinfección (30 minutos post-histerectomía).
 - Inyección de hierro (45 minutos post-histerectomía).
 - Descolmillado (60 minutos post-histerectomía).
 - Segunda toma de calostro (15-25 cc por lechón) (75 minutos post-histerectomía).
 - Reposo en cama de viruta de papel tratada 12 horas con rayos UVA.
- 3) Nutrición en las primeras 24 horas de vida: se administraron 6 tomas cada 4 horas combinando un calostro artificial comercial y leche reconstituida (Tabla I).
- 4) Nutrición y manejo del día 2 al 9 de vida: se administraron 8 tomas cada 3 horas de leche reconstituida y se mantuvieron a temperatura de 32-34° C.
- 5) A partir del día 10 y hasta el día 21 de vida se trasladaron a jaulas especiales manteniendo una temperatura de 30-32° C, se les administraron 6 biberones diarios por lechón y se les presentó alimento sólido (Tabla II) durante 20 minutos antes de cada toma en tolvas adecuadas a su tamaño. El acceso al agua de bebida fue libre.

- 6) A partir del día 21 y hasta el día 28 (fecha del xenotrasplante) sólo se alimentaron con pienso sólido a libre disposición.

Tabla I: Características nutritivas de la leche maternizada artificial (Milkivit®, Trouw Nutrition S.A).

COMPOSICIÓN Y ANÁLISIS	INGREDIENTES
- Humedad: 5%	- Leche descremada 55%
- Proteína bruta: 25%	- Suero reengrasado 18%
- Materia grasa: 20%	- Concentrados protéicos vegetales y animales
- Celulosa bruta: 0,15%	- Grasa vegetal
- Lactosa: 42%	- Complemeto vitamínico-mineral
- Ceniza bruta: 8,5%	- Aditivos:
- Calcio: 1,1%	- Sulfato de cobre
- Fósforo: 1%	- Etoxiquin (50 ppm)
- Sodio: 0,9%	- Virginiamicia (40 ppm)
- Cobre: 5 mg/Kg	
- Vitamina A: 40.000 UI/Kg	
- Vitamina E: 20 mg/Kg	
- Vitamina D3: 4.000 UI/Kg	

Tabla II: Características nutritivas del pienso de preiniciación (Salvalechones-Ingaso® - Internacional de Premenclas, S.A.).

COMPOSICIÓN Y ANÁLISIS	INGREDIENTES
- Proteína bruta: 24,5%	- Maíz
- Materia grasa bruta: 7,4%	- Trigo
- Celulosa bruta: 1,1%	- Harina de pescado
- Ceniza bruta: 7,8%	- Suero dulce
- Calcio: 1,4%	- Suero reengrasado
- Fósforo: 1,9%	- Corrector vitamínico-mineral
- Sodio: 0,75%	- Aminoácidos esenciales:
- Vitamina A: 11.025 UI/Kg	- Lisina
- Vitamina E: 15,6 mg/Kg	- Metionina
- Vitamina D3: 2.500 UI/Kg	- Treonina
- Sulfato de cobre: 170 mg/Kg	
- Lisina: 1,99%	
- Olaquinox: 100 mg/Kg	

Durante todo el proceso se pesaron diariamente, el día 9 de vida se realizó un análisis microbiológico de heces (Tabla III), y el día 14

se sometieron a una extracción de sangre para la realización de pruebas específicas.

Tabla III: Medios de cultivos utilizados para identificar la flora digestiva

-
- Agar KF (Difco) para *Streptococcus* sp.
 - Agar Rogosa SL (Difco) para *Lactobacillus* sp.
 - Agar McConkey (Difco) para *Enterobacteriaceae*
 - Agar XLD, verde brillante, SS y caldo selenito (Difco) para *Salmonella* sp.
 - Agar selectivo con polimixina y yema de huevo (Oxoid) para *Bacillus cereus*
 - Agar T.S.N (Difco) *Clostridium* sp.
 - Para diferenciar Enterobacteriaceas, bacilos no fermentadores y fermentadores oxidasa + se utilizaron galerías API 20 y API 20E.
-

RESULTADOS

Tras aplicar el protocolo establecido para

la elección de cerdas madres candidatas los resultados obtenidos aparecen reflejados en la Tabla IV:

Tabla IV: Test de candidatas

Número de cerdas candidatas	Histerectomía 1ª y 2ª	Histerectomía 3ª y 4ª
Partos previstos FT- (28±1) días	43	39
Partos previstos de 1º y 2º ciclo	21	16
Gen receptor Rynadine (-,-)	19	16
Ausencia de anticuerpos a virus campo	14	11
Ecografía de pantalla +	11	10
Negativos a patógenos el día 108 por PCR	10	10
% de descarte en el protocolo	76,74%	74,36%

Los resultados obtenidos en la realización de las histerectomías se expresan en la Tabla V:

Los resultados obtenidos tras la aplicación de este modelo de manejo y nutrición se expo-

nen en la Tabla VI:

El análisis microbiológico evidenció la ausencia total de patógenos digestivos específicos de cerdos en todas las muestras analizadas.

Tabla V: Tiempo de realización y nº de lechones nacidos en cada histerectomía

	Histerectomía 1 ^a	Histerectomía 2 ^a	Histerectomía 3 ^a	Histerectomía 4 ^a
Tiempo de extracción del útero	42 s	40 s	46 s	42 s
Tiempo de apertura del útero	39 s	41 s	40 s	44 s
Nº de lechones neonatos vivos	9	4	12	13
Lechones hipóxicos o inmaduros (< 800 g de peso)	1	0	2	0

Tabla VI: Viabilidad de los lechones

	Nº lechones obtenidos vivos	Nº lechones inmaduros (<800 g)	Nº bajas en 24 h post-histerectomía	Nº bajas del día 2-10 de vida	Nº bajas desde el día 10 hasta el xenotrasplante	Total de bajas
Histerectomía 1	9	2	1	1 (peso <900 g)	0	2
Histerectomía 2	4	0	0	1 (atresia ano)	0	1
Histerectomía 3	12	4	0	0	2 (intolerancia a leche)	2
Histerectomía 4	13	2	0	0	0	0
TOTAL	38	8	1	2	2	5 (12,8%)

Tabla VII: Parámetros relativos al crecimiento.

Peso vivo al nacimiento (Kg) Media±S.E.	Peso vivo a los 21 días Media±S.E.	Peso vivo a los 28 días Media±S.E.
1,17±0,21	4,938±621	6,930±1,017

DISCUSIÓN

En el caso que nos ocupa se han hecho necesarias algunas modificaciones del modelo de HT propuesto por Alexander et al. (1976) para la obtención de animales próximos a la

gnotobiosis. La modificación más significativa es la monitorización de las candidatas hasta el día de la intervención. Esto garantiza la posibilidad de excluir de la experiencia aquellas cerdas que evidencien presencia de patógenos transplacentarios. Otra modificación es la rea-

lización de la necropsia reglada de la cerda tras la histerectomía, fundamentalmente para la detección de retrovirus endógenos porcinos que pudieran estar acantonados en órganos de interés para el xenotrasplante, así como diagnosticar la presencia de Herpesvirus suis Tipo II o Citomegalovirus que provocan rinitis por cuerpos de inclusión. La tercera modificación es que los lechones no se dan en adopción a cerdas recién paridas sino que se realiza un manejo artificial de los mismos sin que en ningún momento tengan contacto con otros animales.

El modelo propuesto para la selección de

futuras candidatas garantiza la detección precoz de problemas en los futuros donantes y consecuentemente minimiza el fracaso en la obtención de donantes SPF. La aplicación del protocolo y técnica de histerectomía propuesta son suficientes para garantizar un porcentaje aceptable de lechones neonatos viables.

El manejo post-histerectomía de los lechones neonatos garantiza una viabilidad muy similar a la obtenida en granjas de alto nivel sanitario y tecnológico, siendo el crecimiento aceptable para alcanzar el peso óptimo del donante.

BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDER, T. et al. (1976) P.I.C. internal communication.
ALEXANDER. T.J.L.; THORNTON, J.; BOON, G.; LYONS, R.I.; GUSH, A.F., 1980. Medicated early weaning to obtain

pigs free from pathogens endemic in the herds of origen. *Veterinary Records*. 106:114.

HARRIS, D.L., 1988. Alternative approaches to eliminate endemic diseases and improving performances of pigs. *Veterinary Records*, 123:422.