PRODUCCION DE VACUNA ANTIAFTOSA: FILTRABILIDAD DEL SUERO BOVINO TRATADO CON POLIETILENGLICOL Y SU EFECTO EN EL CRECIMIENTO CELULAR

J.L. REIS[1], F.B. RANGEL FILHO[2], A. ALONSO[1], J.A. MESQUITA[1]

[1]Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)
Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil
[2]Instituto de Veterinaria, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Antiga Estrada Rio-São Paulo Km 47, 23851-970 Itaguaí, RJ, Brasil

Resumen. **Se analizó el efecto del suero bovino con anticuerpos para el virus de la fiebre aftosa sin tratamiento y después de tratado con 2, 4, 6 y 8% de polietilenglicol (PEG), en el crecimiento de células BHK-21 Clon 13, cultivadas en suspensión. También se investigó la capacidad filtrante a través de membranas de 0,22 µm del medio de crecimiento suplementado con suero de bovino previamente tratado con PEG. Se comprobó que el más bajo porcentaje de PEG que aún mantenía el crecimiento celular y una filtrabilidad de alto rendimiento era del 2%.**

La línea de células fibroblásticas de riñón de hamster joven BHK-21 Clon 13, descrita por MacPherson y Stocker (*9*) adaptada a cultivos en suspensión (*5*), es la más utilizada para producir antígenos para la elaboración de vacunas contra la fiebre aftosa (FA) (*11*). El crecimiento de células *in vitro* requiere la presencia de determinantes macromoleculares, presentes en suero de animales (*3*). El suero de bovino posee factores de crecimiento necesarios para el crecimiento de cultivos de células BHK (*12*), y para que mantengan la susceptibilidad al virus de la FA. Por otra parte, el suero extraído de animales vivos puede vehiculizar agentes infecciosos y factores tóxicos que perjudican el crecimiento de los cultivos celulares, por lo que cada partida de suero debe ser adecuadamente controlada.

Warrington & Morgan (*16*) demostraron que el tratamiento del suero bovino con polietilenglicol (PEG) precipita selectivamente las proteínas de alto peso molecular y los anticuerpos. Barteling (*4*) trató con 8% de PEG suero de bovinos vacunados varias veces con el virus de la FA para retirar los anticuerpos anti-FA, y observó que los medios de cultivo suplementados con el suero tratado, mantenían el efecto promotor del crecimiento de células BHK-21 Clon 13, en suspensión. El medio de crecimiento para cultivos celulares en monocamada conteniendo suero tratado con 8% PEG mantuvo su susceptibilidad frente al virus de la FA (*1*).

Usualmente, los laboratorios productores de vacuna antiaftosa ubicados en áreas endémicas de la enfermedad enfrentan dificultades relacionadas con la necesidad de esterilizar grandes volúmenes de medio de cultivo suplementado con suero bovino, a través de filtros tipo membrana que dan más seguridad y calidad al producto. Además, tienen el inconveniente de que los sueros de bovinos disponibles poseen altos niveles de anticuerpos anti-FA.

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la proporción de PEG que resulte más adecuada para tratar el suero de bovinos vacunados con vacunas antiaftosa, permitiendo a la vez una

Solicitar separatas al:
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

buena filtrabilidad en membranas de 0,22 µm, sin comprometer el crecimiento de las células en botellas rolantes.

MATERIALES Y METODOS

Suero bovino: El suero se obtuvo a partir de sangre colectada de bovinos en el momento de su sacrificio en el matadero (Bagé, Rio Grande do Sul, Brasil) por sección de la carótida. La sangre se recogió en recipientes esterilizados, con una solución de 100 UI de penicilina/ml y 0,15 mg de neomicina/ml. El coagulado después de cortado en pedazos pequeños se dejó en reposo durante 24 horas a 4°C en recipientes de plástico, perforados y colocados sobre otros para separar el suero. Los restos celulares y los residuos de los coágulos se separaron por centrifugación continua.

Tratamiento del suero con PEG: Alícuotas de 1000 ml de suero fueron adicionadas respectivamente de 2, 4, 6 y 8% de PEG (Polietilenglicol 8000 - Carbowax) disuelto en solución salina 0,15 M. La mezcla fue mantenida en agitación continua durante 60 min a 4°C, seguidamente se dejó decantar por otros 60 minutos a 4°C (*4*). A continuación, se retiró el sobrenadante y se filtró por membrana millipore 0,22 µm. Posteriormente se midió el pH y la osmolaridad. El nivel de anticuerpos específicos para los virus de la FA, tipos O, A y C fue determinado por seroprotección en ratones lactantes (*6*) e inmunoelectroforesis (*13*).

Medio de cultivo de células con suero: Alícuotas de suero antes y después de tratado con PEG se incorporaron al medio de cultivo para pruebas de esterilidad y crecimiento celular. El medio de cultivo usado (MEM) para realizar el estudio descrito fue el mismo empleado en la rutina de la Planta Piloto de Producción de Vacuna del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (PANAFTOSA).

Células BHK-21 Clon 13: Se usaron células BHK-21 Clon 13 de bajo pasaje, adaptadas al cultivo en suspensión, y mantenidas en nitrógeno líquido, en volúmenes de 1 ml, a una concentración de 5,0 x 106 cél/ml em medio MEM, conteniendo 20% de suero bovino inactivado y 10% de glicerol. Las células se descongelaron y cultivaron en balones de vidrio de 2 litros, que contenían 1 litro de medio de crecimiento. Las células se incubaron a 37°C con agitación magnética, y se aerearon a través de filtros de algodón no absorbente para mantener el pH.

La capacidad de promover el crecimiento celular del suero se evaluó mediante la observación microscópica de su morfología. La viabilidad de las células se analizó en base a las curvas de crecimiento de cinco pasajes sucesivos, realizando recuentos a las 24 y 48 horas. El recuento inicial se ajustó para 0,5 x 106 cél/ml.

RESULTADOS

Filtrabilidad del suero tratado con PEG: El Cuadro 1 muestra los resultados de la filtrabilidad del suero y se observa que el suero tratado con 2% PEG filtró cinco veces más que el suero del mismo lote sin tratar. Los Cuadros 2 y 3 indican que no se observaron alteraciones de los valores de pH y osmolaridad respectivamente en el medio de cultivo suplementado con el suero antes y después de tratado. Los padrones de tonicidad del suero bovino fetal oscilan entre 260 y 340 m Osm/kg H_2O.

El sistema de filtros de membranas 0,22 µm tipo cartucho que se utiliza en la Planta Piloto de Producción de Vacuna de PANAFTOSA, permite filtrar alrededor de 200 litros de medio de cultivo suplementado con 8% de suero bovino íntegro, sin tratamiento. No obstante, se consigue filtrar hasta 1.500 litros de medio de cultivo que contiene la misma proporción de suero tratado con 2% de PEG (datos no publicados).

Cuadro 1. Filtrabilidad (membrana 0,22 µm) del suero bovino antes y después de tratados con PEG.

Tratamiento con PEG (%0)	Volumen filtrado (ml)
0	5
2	25
4	25
6	30
8	40

Anticuerpos anti-FA: Los niveles de anticuerpos determinados mediante las pruebas de seroprotección (Cuadro 4) e inmunoelectroforesis (Figura 1) en el suero tratado con 2% de PEG, comparados con los del suero del mismo lote antes y después de tratado con 8% de PEG revelan que el tratamiento con 2% de PEG no fue capaz de retirar anticuerpos.

Capacidad promotora de crecimiento celular: El Cuadro 5 muestra que los sueros tratados con PEG e incorporados al medio de cultivo, mantienen las características morfológicas de las células, sin perjudicar el crecimiento a lo largo de cinco pasajes.

Cuadro 2. pH del suero y del medio de cultivo con suero antes y después de tratados con PEG.

Tratamiento con PEG (%)	Suero	Medio con suero
0	7.2	7.52
2	7.3	7.52
4	7.4	7.52
6	7.4	7.52
8	7.7	7.52

DISCUSION

El suero es comúnmente usado en cultivos celulares como elemento del medio de crecimiento. Es una mezcla compleja pero se reconocen algunas macromoléculas y su actividad. Por ejemplo, las albúminas controlan la biosíntesis celular, protegiendo la desintegración e inhibiendo la acción de las enzimas proteolíticas y las globulinas promueven el crecimiento celular, estimulando la síntesis del ADN, ARN y proteínas *(8)*. Igualmente, los polipéptidos y las hormonas producen diversos efectos en las células, mientras que la insulina regula el consumo de glucosa y aminoácidos, pudiendo ser mitogénica. Por otra parte, la hidrocortisona actúa en la ligación y proliferación celular *(7)*.

Los estudios sobre la filtrabilidad del suero tratado con diferentes porcentajes de PEG (Cuadro 1) demostraron que la menor cantidad capaz de aumentar la filtrabilidad en comparación con la del mismo suero sin tratar fue el tratamiento con 2% de PEG. Por otra parte, los tratamientos con 4 y 6% de PEG no proporcionaron mejor rendimiento, mientras que este fue excelente como resultado del tratamiento con 8% de PEG. Sin embargo, este último puede causar problemas en la producción del virus de la FA, cuando se le incorpora en el medio para cultivar células BHK en botellas rolantes *(14, 15)*. Por lo tanto, los laboratorios productores de vacuna antiaftosa podrán utilizar este método de tratamiento, disminuyendo la dificultad de esterilizar grandes volúmenes de medio de cultivo, suplementado con el suero bovino, a través de membranas 0,22 µm.

También se confirmó en el presente estudio que el suero tratado con 2% de PEG incorporado al medio de cultivo, fue capaz de mantener las características morfológicas y el crecimiento celular (Cuadro 4) al igual que el mismo suero tratado con 4, 6, 8% de PEG y el suero sin tratar.

Cuadro 3. Osmolaridad (m Osm/Kg H2O) del suero y del medio de cultivo con suero antes y después de tratados con PEG.

Tratamiento con PEG (%)	Suero	Medio con suero
0	304	350
2	321	351
4	339	351
6	362	349
8	392	350

Cuadro 4. Indice de anticuerpos de un suero antes y después de tratado con PEG, por prueba de seroprotección.

Tratamiento con PEG (%)	O_1 Campos	A_{24} Cruzeiro	C_3 Indaial
0	4.40	1.25	3.60
2	3.60	1.75	2.36
8	0.10	0.10	0.86

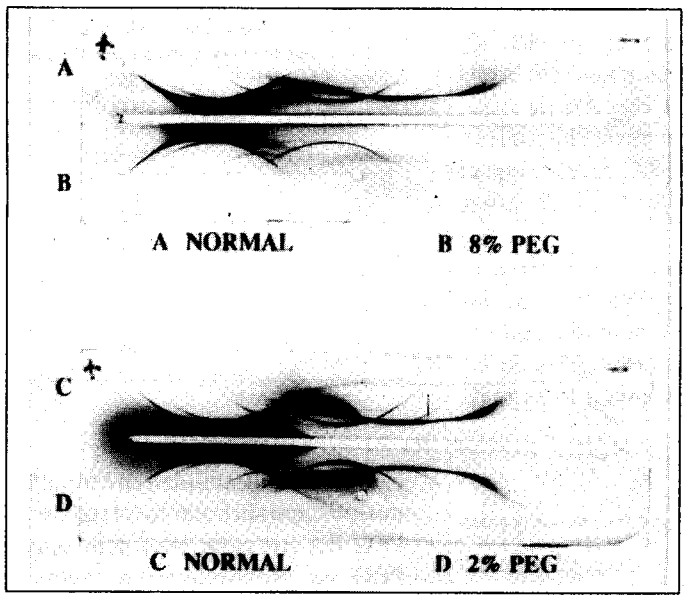

Figura 1. Inmunoelectroforesis en gel de agar de sueros bovinos antes y después de tratados con PEG usando como antígeno suero total de conejo anti-IgG bovina (canaleta central). Las láminas muestran que hubo una reducción total de los niveles de anticuerpos detectables en el suero tratado con 8% PEG (B), mientras que en los sueros tratados con 2% PEG (D) y sin tratar (A y C) estos niveles permanecieron intactos.

El tratamiento del suero previo a su incorporación en el medio de cultivo usado en la rutina de producción del virus de la FA, por el método de cultivo celular en botellas rolantes, permitió obtener excelentes resultados del virus producido en la Planta Piloto. También se comprobó que el tratamiento con 2% de PEG no causaba problemas de adherencia celular en la superficie de las botellas, ni perjudicaba la replicación viral (datos no publicados).

Las pruebas de seroprotección (Cuadro 4) e inmunoelectroforesis (Figura 1) indican que el tratamiento del suero con 2% PEG no fue capaz de retirar anticuerpos específicos a diferencia del suero del mismo lote tratado con 8% PEG. De ahí que esto imposibilite su uso en las pruebas de aislamiento de virus en cultivos celulares con fines diagnósticos *(10)*. Se considera que la presencia de anticuerpos específicos debe ser la más baja posible para que éstos no interfieran en la infección celular neutralizando el virus. Aunque esto no debe ser un problema común, hay numerosas soluciones entre las cuales: el uso de medio libre de suero, la inoculación con cantidad suficiente de virus para superar los anticuerpos existentes (2), y el uso de altas concentraciones de PEG para disminuir la cantidad de anticuerpos.

Se concluye que el tratamiento del suero con 2% PEG: (a) aumenta sensiblemente la filtrabilidad de los medios de cultivo celular en membranas 0,22 µm que, por estar exentas de residuos tóxicos para

Cuadro 5. Crecimiento de células BHK-21 en suspensión en medio suplementado con suero antes y después de tratados con PEG.

	Recuento Final (x 10^6 cél/ml)									
Pasajes	1		2		3		4		5	
% PEG	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	1.1	2.3	0.8	1.5	1.9	2.8	0.9	1.7	0.8	2.5
2	0.8	2.1	1.0	1.8	1.4	2.9	1.2	2.8	1.3	2.8
4	1.2	2.7	0.7	2.5	1.4	2.8	1.4	2.4	1.5	2.4
6	1.2	2.5	0.6	1.6	1.7	3.0	1.0	1.4	1.4	2.0
8	0.9	2.1	0.7	1.9	1.2	2.5	0.9	2.3	1.9	2.1

Ajustado recuento inicial para 0,5 x 106 cél/ml a cada pasaje.

cultivo de células, permiten trabajar con seguridad y calidad; (b) mantiene la misma capacidad promotora de crecimiento celular que el suero sin tratar; (c) a pesar de no retirar anticuerpos específicos, no compromete la calidad del virus de la FA producido en botellas rolantes para la preparación de vacuna, como se observa con el tratado con 8% de PEG; (d) permite trabajar con grandes volúmenes de suero en ambiente aséptico y a baja temperatura, con lo que se evita el crecimiento bacteriano.

RECONOCIMIENTOS

Este estudio forma parte de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Microbiología Veterinaria de la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro.

Agradecimiento especial a los Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo y Ubiratan Mendes Serrão, y a todo el personal de la Planta Piloto.

REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenoglicol (PEG). *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, 21-22*: 44-48, 1976.
2. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J., ASTUDILLO, V., and DORA, J.F. The production and application of an oil adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *European Society for Animal Cell Technology. Modern Approaches to Animal Cell Technology.* England, Butterworth & Co., 1987, p. 628-640.
3. BARAHONA, H.J., GAGGERO, A.C., and MESQUITA, J.A. *Manual de métodos de produçao de vacina antiaftosa com adjuvante oleoso.* LARA/ Campinas. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1982, p. 103.
4. BARTELING, S.J. Use of polyethyleneglycol-treated serum for production of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in growing BHK suspended cell cultures. *Bull. Off. int. Epiz., 81* (11- 12): 1243-1254, 1974.
5. CAPSTICK, P.B., TELLING, R.C., CHAPMAN, W.G. Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature, 195* (4847): 1163-1164, 1962.
6. CUNHA, R.G., BAPTISTA Jr., J.A., SERRÃO, U.M., TORTURELLA, I. El uso de los ratones lactantes en la evaluación de los anticuerpos contra el virus de la fiebre aftosa y su significación inmunológica. *Gac. vet., B. Aires, 19* (110): 243-267, 1957.
7. FRESHMY, R.J. The culture environment substrate, gas phase, mediun, and temperature. In: .- *Culture of animal cells: a manual of basic technique.* New York, Alan R. Liss, 1987, p. 72-73.
8. LUSTIG, E.S. de, and NEBEL, A.E. *Cultivo de tejidos: un manual práctico.* Buenos Aires, Argentina, CEPANZO, 1981.
9. MAC PHERSON, I., and STOCKER, M. Polyoma transformation of hamster cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virol., 16*: 147-151, 1962.
10. MESQUITA, J.A., and VIEIRA, A. Suero bovino tratado por PEG para uso en cultivos de células. *Bol. Cent. Panam. Fiebre Aftosa, 63*: 35-36, 1979.
11. MOWAT, G.N., and CHAPMAN, W.G. Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature, 194*: 253-255, 1962.
12. OPS.PROASA. *Producción, control de calidad y uso de vacunas con adyuvante oleoso contra la fiebre aftosa.* Washington, D.C., OPS, 1987.
13. OUCHTERLONY, O., NILSSON, L.A. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In: Weir, D.M., Ed. *Handbook of experimental immunology.* 2 ed. Oxford. Blakwell v. 1, p. 19-1-19.28.
14. POLATNICK, J., and BACHRACH, H.L. Production and purification of milligram amounts of foot-and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell cultures. *Appl. Microb., 12*: 368-373, 1964.
15. UBERTINI, B., NARDELLI, L., DEL PRATO, A., PANINA, G., SANTERO, G. Large-scale cultivation of foot-and-mouth disease virus on calf kidney cell monolayers in rolling bottles. *Zentralbl. Veterin., 10*:93-101, 1963.
16. WARRINGTON, R.E., and MORGAN, D.O. Foot-and-mouth disease virus in cattle and pigs: use of polyethylene glycol or dextrans for purifying 195 yM., immunoglobulin from sera. *Arch. ges. Virus, 33*: 134-144, 1971.