

TRATAMIENTO DE SUSPENSIONES DE VIRUS CON TRICLOROTRIFLUORETANO PARA LA PRODUCCION DE VACUNA ANTIAFTOSA EN SISTEMA INDUSTRIAL

G.C. DARSIE¹, R.G. CUNHA², I. GOMES¹

¹Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS)

Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense,

Rua Vital Brazil Filho 64, 24220 Niterói RJ, Brasil

Resumen. Suspensiones del virus de la fiebre aftosa se trataron a escala industrial con 1% v/v de triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo para determinar la viabilidad de su uso como agente alternativo para la purificación parcial de antígenos vacunales. En las suspensiones tratadas con cloroformo hubo una disminución media del 50,4% del contenido proteico total, mientras que en aquellas tratadas con TTE la reducción fue del 33,4%. Las vacunas formuladas con los antígenos tratados con cualquiera de las soluciones no presentaron diferencias significativas en la inducción de inmunidad cuando se evaluaron por la expectativa porcentual de protección (EPP) en bovinos jóvenes primovacunados. No se observaron inconvenientes en la manipulación del TTE ni aparecieron reacciones posvacunales indeseables.

El virus de la fiebre aftosa es un representante de la familia *Picornaviridae* y con sus siete serotipos representa el género *Aphthovirus*. Su virión está formado por una cadena simple de ácido ribonucleico revestida por un capsídeo proteico sin envoltura (3) que le confiere la característica de resistencia a solventes orgánicos como el cloroformo (26) y los fluorocarbonos (16).

Las vacunas antiaftosa, aplicadas conjuntamente con otras medidas, han sido una gran arma de combate para el control de la enfermedad. Los antígenos se obtienen por replicación del virus en cultivos celulares *in vitro*. Debido a la característica lisogénica de su ciclo de replicación, el virus mata, al final del cultivo, a las células utilizadas como sustrato. Los restos celulares ricos en proteínas, lípidos y otros componentes son dispersos en el medio y, si no se les retira, se incorporan a la vacuna

como antígenos. Por ese motivo, se hace necesaria una purificación parcial de las suspensiones virales con 1% de cloroformo, bajo agitación o a través de un homogeneizador, seguido de clarificación, filtración o centrifugación continua (7).

Aunque eficaz, la utilización de cloroformo es problemática por la turbidez que ocasiona en las suspensiones obtenidas a partir de cultivos celulares que utilizan suero bovino tratado con polietilenglicol (PEG) para remover los anticuerpos (1), así como por el desgaste que provoca en los equipos, los riesgos de accidentes por intoxicación aguda y las dificultades crecientes para adquirirlo en algunos países debido a su utilización clandestina en la purificación de drogas.

En la búsqueda de un solvente para substituir el cloroformo como agente purificador de suspensiones virales a nivel industrial se planteó la posibilidad de usar triclorotrifluoretano (TTE). No se encontraron referencias relacionadas con la estabilidad de los antígenos durante su almacenamiento, ni de la de vacunas oleosas producidas con

Solicitar separatas al:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa (OPS/OMS).

estos, como tampoco sobre la posible ocurrencia de reacciones posvacunales indeseables en bovinos.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de estas incógnitas, además de los relacionados con la reducción significativa de la concentración de uso.

MATERIALES Y METODOS

En el marco de la rutina de producción de antígenos en la Planta Piloto de Producción de Vacunas del Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, se prepararon nueve suspensiones monovalentes de 300 litros de volumen cada una. Cinco fueron de la cepa O₁ Campos-Br/58 (OCAM); dos de la cepa A₂₄ Cruzeiro-Br/55 (ACRU); una de la cepa A-79 Venceslau-Br/76 (AVEN); y otra de la cepa C₃ Indaial-Br/71 (CIND).

Se cultivaron células BHK₂₁ C13 en tanques con capacidad de 120 a 600 litros. Como sustrato se utilizó medio Eagle con 8% de suero bovino tratado con PEG y esterilizado por filtración en cartucho con membrana de 0,22 µm de retención (8). Los cultivos destinados a la producción de virus en suspensión tuvieron el medio de crecimiento decantado después de la sedimentación de las células. Aquellos que se destinaban a la producción en botellas rolantes se diluyeron a la concentración de $0,2 \times 10^6$ cél/ml en medio Eagle adicionados con 8% de suero sin tratar, y el medio se retiró después de 72 horas de crecimiento.

Los cultivos celulares se inocularon con semillas de virus de bajo pasaje en células BHK₂₁ C13, a una proporción de 0,02-0,06 partículas virales infectantes por célula, en medio Eagle sin suero que contenía 30% de una solución 0,2M de Tris-hidroximetilaminometano.

Al final del período de replicación viral, las suspensiones se enfriaron a 4°C. Volúmenes de 10 litros se trataron con 1% de cloroformo bajo agitación con barra magnética por 30 minutos en balones de vidrio. El resto se trató con 1% de TTE empleando un homogeneizador en circuito cerrado, a 3500 rpm por 1 hora. Después del período de reposo de 18 horas a 4°C, los sobrenadantes se centrifugaron a 7680 g.

Todas las suspensiones se inactivaron en etilnimina binaria (6) a una concentración final de 3mM durante 24 horas a 26°C. El inactivante se hidrolizó con tiosulfato de sodio 1M, inmediatamente antes de la utilización de los antígenos.

Durante la producción, todo el proceso se controló a través de pruebas biológicas y físico-químicas de rutina (11). Para evaluar la eficiencia de los tratamientos, en algunas suspensiones se determinó el contenido proteico total antes de la adición del solvente, y después de la clarificación (9).

Con los nueve antígenos monovalentes tratados con TTE o cloroformo se elaboraron 18 vacunas pareadas para pruebas de potencia, inocuidad y estabilidad inmunogénica con 300 días de almacenamiento a 4°C. Volúmenes de dos antígenos monovalentes OCAM y de dos monovalentes ACRU se conservaron por 240 días a 4°C y tras ese período, se produjeron ocho vacunas pareadas para prueba de potencia.

Todas las vacunas se formularon con adyuvante incompleto de Freund (2,15), según metodología descripta por Abaracón *et al.* (2).

La influencia de los tratamientos sobre la inmunogenicidad de los antígenos se evaluó mediante la prueba de expectativa porcentual de protección (EPP), con base en los índices de anticuerpos en el suero de bovinos primovacunados, determinados por seroprotección en ratones lactantes, o seroneutralización en cultivo celular (24,28).

Todos los resultados se sometieron a análisis estadístico por la prueba de Tukey o por análisis de varianza con $P > 0,05$ (24,28).

RESULTADOS

En este trabajo se presentan los hallazgos referentes a la acción del TTE como agente para la purificación parcial en comparación con el cloroformo, así como la estabilidad inmunogénica de las vacunas producidas con los antígenos tratados. El Cuadro 1 presenta los resultados referentes a la purificación parcial de las suspensiones estudiadas.

Estos valores indican que hubo una media de 33,4% del contenido proteico total en las suspensiones tratadas con TTE y de 50,4% en las tratadas con cloroformo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Los resultados obtenidos con las 18 vacunas pareadas probadas luego de su producción (0 DPP) se presentan en el Cuadro 2.

Se puede constatar que las respuestas inmunogénicas son alternadas, lo que favorece uno u otro antígeno de la misma cepa, pero sin caracterizar el predominio de influencia de los tratamientos. Para las ocho vacunas conservadas a 4°C por 300 días (300 DPP), los resultados presentados en el Cuadro 3 indican una disminución de la respuesta inmunitaria con relación a los datos obtenidos con 0 DPP.

CUADRO 1. Contenido proteico total (mg/ml) en suspensiones virales tratadas con 1% de triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Suspensión	Proteínas totales (mg/ml)			% reducción	
	Sin tratar	TTE	CLO	TTE	CLO
A	0,41	0,28	0,20	31,7	51,2
B	0,35	0,23	0,18	34,3	48,6
C	0,45	0,30	0,22	34,0	51,5

Para las vacunas producidas con los antígenos almacenados a 4°C por 240 días (240 DPP), los resultados también indican una disminución de la respuesta (Cuadro 4) con relación a 0 DPP, aunque de intensidad menor que en los observados con 300 DPP.

CUADRO 2. Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) alcanzados por la vacunas formuladas con antígenos recién producidos ("Cero" DPP), tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Vacunas		EPP "CERO" DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	78,7	87,5
OCAM	1602	91,3	93,0
OCAM	1605	85,0	84,6
OCAM	1606	89,6	86,8
OCAM	1607	96,1	95,6
ACRU	1613	83,2	88,4
ACRU	1622	96,4	94,6
AVEN	1604	84,3	90,8
CIND	1603	98,5	99,0

*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55; AVEN-A-79 Venceslau-Br/76; CIND-C3 Indaial-Br/71.

CUADRO 3. Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) alcanzados por vacunas conservadas a 4°C por 300 días posproducción (300 DPP) con antígenos tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO).

Vacunas	EPP 300 DPP	
	TTE	CLO
OCAM* 1599	67,5	65,6
OCAM 1602	81,5	83,3
ACRU 1613	80,5	83,9
ACRU 1622	82,4	86,1

*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

El análisis de varianza aplicado en los resultados revela diferencias significativas en las EPPs obtenidas en los diferentes tiempos estudiados, así como entre las cepas utilizadas. No hubo diferencia significativa entre las respuestas inmunitarias inducidas por las vacunas formuladas con antígenos tratados con TTE o cloroformo.

En el experimento se vacunaron 622 terneros y en ningún caso se presentaron reacciones posvacunales indeseables.

CUADRO 4. Valores del límite inferior de confianza de expectativa porcentual de protección (EPP) obtenidos por vacunas formuladas con antígenos tratados con triclorotrifluoretano (TTE) o cloroformo (CLO) y almacenados a 4°C por 240 días posproducción (240 DPP).

Vacunas		EPP 240 DPP	
		TTE	CLO
OCAM*	1599	77,8	89,0
OCAM	1602	79,1	79,9
ACRU	1613	80,4	80,9
ACRU	1622	90,0	83,0

*OCAM-O1 Campos-Br/58; ACRU-A24 Cruzeiro-Br/55.

En la práctica, se observa que hubo una evidente disminución en el tiempo de sedimentación de los restos celulares y que no ocurrió turbidez en las suspensiones tratadas con TTE, en comparación con aquellas tratadas con cloroformo. Tampoco se observaron inconvenientes en cuanto a su manipulación, tales como olores tóxicos o daños en los equipos.

DISCUSION

En este estudio se obtuvo una reducción media de 33,4% del contenido proteico en las suspensiones del virus de la fiebre aftosa, cuando estas se trataron solo con 1% de TTE en un ciclo único. En las referencias bibliográficas consultadas se encuentra información sobre altos grados de purificación de suspensiones virales, pero usando hasta 50% de clorofluorocarbonos (16), y después de un número elevado de ciclos alternados de tratamiento y centrifugación (14). El excelente desempeño registrado se puede atribuir al proceso de mezcla mediante un homogeneizador de alta potencia, que proporcionó una mejor dispersión e interacción del solvente. Cabe resaltar que Manson *et al.* (23) obtuvieron resultados semejantes en estudios con poliovirus después de dos ciclos en la proporción de 50%.

La utilización de fluorocarbonos líquidos en procesos biológicos se inició con Gessler (16), purificando suspensiones de virus de la viruela y del sarcoma de Rous. Otros procesos se desarrollaron para purificar virus de poliomiélitis, adenovirus y colifago T5 (23), para eliminar factores anticomplementarios de las suspensiones de virus de poliomiélitis (20) y Coxsackie (18), y para la disociación de complejos formados por virus de la poliomiélitis y anticuerpos (19).

El TTE es un clorofluorocarbono líquido incoloro, no inflamable, y de bajo grado de toxicidad, utilizado en la industria electrónica como agente de limpieza de componentes de alta tecnología. Existen referencias sobre su uso en la purificación del virus de la fiebre aftosa para identificar partículas virales por microscopía electrónica (5), así como en estudios sobre la actividad fijadora del complemento (25), la disociación de complejos virus-anticuerpos (29,31), la purificación para concentrar por PEG (13), y para la producción de vacunas de diferentes tipos (4,10,14,21,22,27).

Al comparar con el tratamiento hecho con cloroformo, el TTE mostró una desventaja, aunque esta situación se puede disminuir y hasta revertir, utilizando una mayor proporción de TTE o un número mayor de ciclos de tratamiento.

En relación a la respuesta inmunológica inducida por las vacunas examinadas, los resultados indican que no hubo perjuicio en la capacidad

antigénica de las suspensiones tratadas con TTE en comparación con aquellas tratadas con cloroformo. Esto confirma los hallazgos de otros autores (10,14,22,27), y reafirma la posibilidad de la utilización alternativa del TTE para el tratamiento industrial de suspensiones de virus de la fiebre aftosa.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Prof. Elizabeth B.B. Pereira, a los Drs. Raúl Casas Olascoaga, Vicente M. Astudillo, Ubiratan Mendes Serrão y Alberto Knust Ramalho por la colaboración recibida.

Este trabajo fue presentado por el autor principal a la Universidad Federal Rural de Rio de Janeiro en cumplimiento parcial de los requisitos para el título de *Magister Scientiae* en Patología Veterinaria en el área de concentración de Medicina Veterinaria Preventiva.

REFERENCIAS

1. ABARACON, D., GIACOMETTI, H. Vacunas contra la fiebre aftosa con virus producido en cultivos celulares con suero bovino tratado por polietilenoglicol. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 21-22: 44-48, 1976.
2. ABARACON, D., MESQUITA, J.A., SALLUA, S., PEREZ RAMA, R. Emulsificante montanide 888 para la preparación de vacunas antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 45-46: 51-53, 1982.
3. ANDREWES, C.H. *Viruses of vertebrates*. 5ª ed., London, 1989. p. 121-143.
4. AUGÉ DE MELLO, P., ASTUDILLO, V., GOMES, I., CAMPOS GARCIA, J.T. Aplicación en el campo de vacuna antiaftosa oleosa y inactivada: vacunación y revacunación de bovinos jóvenes. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 19-20: 31-37, 1975.
5. BACHRACH, H.L., BREESE, S.S. Purification and electron microscopy of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 97: 659-665, 1958.
6. BAHNEMANN, H.G. Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, 47: 47-56, 1975.

7. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A. Vacuna antiaftosa con adyuvante oleoso. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 53: 19-24, 1987.
8. BAHNEMANN, H.G., MESQUITA, J.A., ASTUDILLO, V., DORA, F. The production and application of an oil adjuvant vaccine against foot-and-mouth disease in cattle. In: *8th Meet. Europ. Soc. for Anim. Cell Technol. Modern Approaches to Animal Cell Technology*. Butterworths, Butterworth & Co., 1987. p. 628-639.
9. BRADFORD, M.M. Rapid scientific methods for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248, 1976.
10. BROWN, F., CARTWRIGHT, B. Purification of the virus of foot-and-mouth disease by fluorocarbon treatment and its dissociation from neutralizing antibody. *J. Immunol.*, 85: 309-313, 1960.
11. CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA. *Manual de procedimientos para el control de vacuna antiaftosa*. Rio de Janeiro, PANAFTOSA, 1980. 47 p. (Ser. Man. Técnicos, 2).
12. 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.*, 19: 243-267, 1957.
13. FAYET, M.T. Concentration du virus de la fièvre aphteuse par le polyéthylène glycol. *Ann. Inst. Pasteur*, 118: 356-366, 1970.
14. FAYET, M.T., ROUMIANTZEFF, M., DUBOUCARD, C., FONTAINE, J. Utilisation d'un fluorocarbène comme méthode d'étude du virus de la fièvre aphteuse. *Ann. Inst. Pasteur*, 109: 652-662, 1965.
15. FREUND, J., THOMPSON, K.M. A simple rapid technique of preparing water in oil emulsion of penicilin, drugs and biologicals. *Science*, 101: 468-469, 1945.
16. GESSLER, A.E. A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 18, Ser. II, (8): 701-703, 1956.
17. GOMES, I., ASTUDILLO, V. Foot-and-mouth disease: evaluation of mouse protection test results in relation to cattle immunity. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 17-18: 9-16, 1975.
18. HAMPARIAN, V., MÜLLER, F., HUMMELER, K. Elimination of nonspecific components from viral antigens by fluorocarbon. *J. Immunol.*, 80: 468-475, 1958.
19. HUMMELER, K., KETLER, A. Dissociation of poliomyelitis virus from neutralizing antibody. *Virology*, 6: 297-299, 1958.
20. HUMMELER, K., HAMPARIAN, V. Removal of anticomplementary activity and host antigens from viral preparations by fluorocarbon. *Science*, 125: 547-548, 1957.
21. KLIMOV, N.M., MALAKHOV, A.G., GRIBANOV, V.N. Chemical purification of lapinized foot-and-mouth disease virus and trials of its antigenic and immunogenic properties. *Trudy Vsesoyus. Inst. Eksp. Vet.*, 24: 208-214, 1961.
22. MACKOWIAK, C., FONTAINE, J. Utilisation de virus traités au fluorocarbène pour la préparation du vaccin antiaphteux. In: *XVIII Congrès Mondial Vétérinaire*, Paris, 17-22 Jul. 1967. p. 383-386.
23. MANSON, L.A., ROTHSTEIN, E.L., RAKE, G.W. Purification of poliovirus with fluorocarbon. *Science*, 125: 546-547, 1957.
24. PIMEMTEL GOMES, F. *Curso de estatística experimental*. Piracicaba, SP, USP/ESALQ, 1971, 621 p.
25. POLATNICK, J. Studies on the small particle complement-fixing antigen of foot-and-mouth disease virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103: 27-31, 1960.
26. PYL, G. Chloroform treatment of brain material infected with neurotropic viruses. *Exp. Vet. Med.*, 5: 1-5, 1951.
27. ROUMIANTZEFF, M., FONTAINE, J., DUBOUCARD, C. Évaluation du pouvoir immunogène du virus aphteux par mesure du pouvoir fixant le complément après traitement par un fluorocarbène. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 261: 598-601, 1965.
28. SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. *Statistical methods*. 6^a ed. Ames, Yowa State Univ., 1972. 593 p.
29. SUTMÖLLER, P., COTTRAL, G.E. Improved techniques for the detection of foot-and-mouth disease virus in carrier cattle. *Arch. ges. Virusforsch.*, 21: 170-177, 1967.
30. SUTMÖLLER, P., GOMES, I., ASTUDILLO, V. Estimación de potencia de vacunas contra la fiebre aftosa de acuerdo con los resultados de pruebas de anticuerpos. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, 49-50: 27-30, 1984.
31. TESSLER, J. Reactivation of antibody-neutralized foot-and-mouth disease virus by organic chemicals and inhibition by 1-butanol. *Am. J. Vet. Res.*, 119: 917-922, 1966.