

MULTIPLICACIÓN DE CEPAS PATÓGENAS Y ATENUADAS DEL VIRUS DE LA ESTOMATITIS VESICULAR EN CULTIVOS CELULARES DE BHK21 C13 EN SUSPENSIÓN

Multiplication of patogen and attenuated vesicular stomatitis virus strains in suspension cultures of BHK21 C13 cells

José Magin Obregón Herrera

Instituto de Investigaciones Veterinarias. Apdo. 70
Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, (FONAIAP)
Maracay, Estado Aragua, Venezuela

RESUMEN

Cultivos celulares de BHK21 C13 en suspensión con un volumen de 100-600 ml y de una concentración celular de $2,0-2,5 \times 10^6$ cel/ml fueron inoculados con cepas patógenas y atenuadas del Virus de la Estomatitis Vesicular (VEV) a una multiplicidad de infección de 0,01-0,05 DL₅₀RL/célula, obteniéndose altos títulos de virus extracelular en 18-22 horas post-infección.

Los resultados preliminares indican que estos cultivos celulares pueden ser útiles para la producción de vacunas anti-VEV en gran escala.

Palabras claves: Producción vacunas, Virus Estomatitis Vesicular, BHK21 C13 suspensión.

ABSTRACT

Suspended cell cultures of BHK21 C13 with a volume of 100-600 ml and cellular concentration of $2.0-2.5 \times 10^6$ cell/ml were inoculated with patogen and attenuated strains of Vesicular Stomatitis Virus (VSV) at a multiplicity of infection of 0.01-0.05 SMID₅₀/cell, high titers of extracellular virus were reached in 18-22 hours after infection.

The preliminary results suggest that this cell cultures may be useful for large scale production of VSV vaccines.

Key words: Vaccine production, Vesicular Stomatitis Virus, BHK21 C13 suspension.

INTRODUCCION

La Estomatitis Vesicular (EV) es una enfermedad de origen viral patógena para bovinos, suínos y equinos; clínicamente produce vesículas y úlceras en la mucosa oral, pezones y patas. Los agentes causales están clasificados en el género Vesiculovirus de la familia Rhabdoviridae, conociéndose hasta el presente dos serotipos: New Jersey (NJ) e Indiana (Ind) [5].

Hace más de treinta años que la EV es enzoótica y cíclica en Venezuela, con un alto grado de prevalencia en ciertas áreas; no obstante su escasa mortalidad, su morbilidad genera pérdidas económicas importantes en la ganadería nacional de carne y leche [4]. Su perpetuación y modo de transmisión en la Naturaleza es desconocido.

En el laboratorio, el Virus de la Estomatitis Vesicular (VEV) se multiplica fácilmente en embriones de pollo, ratones y hamsters lactantes, además de una amplia gama de monocapas de cultivos celulares como fibroblastos de pollo, riñón de mono verde africano (Vero), carcinoma humano (HeLa) y riñón de hamster (BHK21 C13) [7], proporcionando altos títulos infecciosos.

En el Instituto de Investigaciones Veterinarias (IIV), el VEV ha sido multiplicado principalmente en embriones de pollo y monocapas celulares de las líneas estables Vero y BHK21C13, para la producción de antígeno viral co propósitos de diagnóstico, investigación y elaboración de vacuna anti-EV [3].

Sin embargo, cuando se considera la producción de suspensiones virales de cierta magnitud, estos métodos hacen muy laboriosa la obtención de volúmenes grandes de lotes virales con títulos homogéneos, incrementando el riesgo de con-

TABLA I

CEPAS DE VIRUS ESTOMATITIS VESICULAR ORIGINALES

Cepa	Tipo de virus	Título		
		DL ₅₀ RL(a)	DICC ₅₀ (b)	FC' ₅₀ (c)
No. 1	VEV NJ P-F007 patógeno bovino	6,80	7,30	1/6
No. 2	VEV NJ P-F062 patógeno suino	8,46	6,82	1/66
No. 3	VEV NJ P-S87001 atenuado	6,30	7,00	1/32
No. 4	VEV NJ P-195 (165-169) atenuado	6,80	7,42	1/20
No. 5	VEV Ind. BHK3-E13-BHK atenuado	7,40	8,30	1/16

a) Log₁₀ de DL₅₀RL/m

b) Log₁₀ de DICC₅₀/m

c) Fijación de complemento 50%

VEV: Virus de Estomatitis Vesicular

NJ: New Jersey

Ind: Indiana

taminación por múltiples manipulaciones, dificultan asimismo, un control eficaz de las condiciones ambientales de cultivo y presentando elevados costos de producción.

Capstick y col. [2] adaptaron la línea celular BHK21 C13 a cultivos en suspensión. Desde entonces, estas células han sido propagadas a escala industrial en volúmenes de hasta 2.000 litros, se han utilizado para estudios fundamentales y en la producción de antígenos para vacunas de uso veterinario contra la Rabia y Fiebre Aftosa.

La multiplicación del VEV en cultivos celulares en suspensión, simplificaría la producción en gran escala de antígeno para vacunas inactivadas o atenuadas. Suárez y Rodríguez [9] reportaron que el VEV atenuado proveniente de monocapas de BHK21 C13 es más estable en el tiempo, que el originado en embriones de pollo y señalaron las perspectivas para su producción industrial en cultivos celulares en suspensión.

Este trabajo describe las experiencias preliminares llevadas a cabo para la multiplicación de cepas patógenas ya atenuadas del VEV en cultivos de BHK21 C13 en suspensión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular y medio de cultivo

Los cultivos de BHK21 C13 fueron suministrados por el Laboratorio de Cultivos Celulares del IIV. Estos se propagaron y subcultivaron en frascos cilíndricos con barra magnética (Spinner-Bellco). El medio de crecimiento consistió en Medio Mínimo Esencial de Eagle (MME-E) con L-Glutamina, vitaminas, aminoácidos y antibióticos, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

Cepas y semillas virales

En las experiencias de infección se usaron cinco cepas de VEV, dos patógenas y tres atenuadas, TABLA I, seleccio-

nadas en base a su letalidad por inoculación intraperitoneal en ratones lactantes (DL₅₀RL), infecciosidad en monocapas celulares de BHK21 C13 (DICC₅₀) y título serológico por fijación de complemento (FC'₅₀) [1].

A estas cepas se le dieron dos pasajes en botellas rolan-tes con monocapas de BHK21 C13 adaptadas a suspensión y un pase en la misma línea celular en suspensión, la infecciosidad se calculó en DL₅₀RL y la comprobación serológica por FC'₅₀. Se diluyeron 1:2 en tampón de fosfatos (0.1 M) glicerinados al 50% pH 7.6-7.8, almacenándose en alícuotas a -70°C hasta su utilización como semilla viral, ver TABLA II.

Método de cultivo celular e infección

Las suspensiones fueron sembradas con una densidad de 5-6 x 10⁵ cel/ml y se incubaron a 37°C con agitación magnética (100-200 rpm). Al día siguiente se realizaron contajes celulares en una cámara de Neubauer y la viabilidad se calculó por tinción de azul tripán. Se cosechó parte de la suspensión almacenándola a 4°C. Se ajustó la concentración del cultivo madre a 5-6 x 10⁵ cel/ml con MME-E más 10% SFB y se incubaron en las condiciones antes indicadas, continuando el ciclo de producción hasta obtener suficiente población celular para su infección.

Las cosechas celulares se dejaron decantar por 24 horas a 4°C, descartándose el medio de crecimiento. Se resuspendieron en MME-E con 1% SFB a una densidad celular de 2.0-2.5 x 10⁶ cel/ml y se inocularon con las semillas virales a una multiplicidad de infección de 0.01-0.05 DDL₅₀RL/cel, incubándose a 37°C con agitación por barra magnética.

Cuando la viabilidad de la población celular disminuyó de 5-4 x 10⁵ cel/ml, las suspensiones se centrifugaron a 2.000 x g durante 15 minutos a 4°C, recolectándose el sobrenadante, se ajustó el pH a 7.6-7.8 con una solución NaHCO₃ al 7.5% y se conservaron a -20°C.

De cada lote viral se tomaron muestras para los ensayos

TABLA II

**TITULOS INFECCIOSOS EN RATON LACTANTE Y DE FIJACION DE COMPLEMENTO
DE LAS SEMILLAS DE VIRUS ESTOMATITIS VESICULAR**

Semilla	Tipo de virus	I Pasaje de suspensión	
		DL ₅₀ RL(a)	Título FC ₅₀ (b)
No. 1	VEV NJ patógeno bovino	7,50	1/42
No. 2	VEV NJ patógeno suino	8,46	1/33
No. 3	VEV NJ atenuado	6,80	1/16
No. 4	VEV NJ atenuado	6,36	1/2
No. 5	VEV Ind. atenuado	7,12	1/18

(a) Log₁₀ de DL₅₀RL/ml

(b) Fijación de complemento 50%

VEV: Virus Estomatitis Vesicular

NJ: New Jersey

Ind: Indiana

TABLA III

**RÉSUMEN DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS LOTES DE VIRUS ESTOMATITIS VESICULAR
PRODUCIDOS EN CULTIVOS DE BHK21 C13 EN SUSPENSIÓN**

Semilla	Tipo de Virus	Volumen por Lotes (ML)	No. de Lotes Producidos	Volumen Total de Lotes (ML)	Promedio de DL ₅₀ RL/ml (a)
No. 1	VEV NJ patógeno bovino	100	8	800	7.30
		600	2	1.200	7.90
No. 2	VEV NJ patógeno suino	600	6	3.600	7.00
No. 3	VEV NJ atenuado	100	4	400	6.60
No. 4	VEV NJ atenuado	100	5	500	6.20
No. 5	VEV Ind. atenuado	100	3	300	6.80

a) Log₁₀ de DL₅₀RL/ml

VEV: Virus Estomatitis Vesicular

NJ: New Jersey

Ind: Indiana

de infecciosidad por DL₅₀RL, identidad por FC₅₀ y esterilidad bacteriana y micótica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las densidades celulares máximas de los subcultivos obtenidos estuvieron en el rango de 1.1 a 1.6 x 10⁶ cel/ml en un lapso de 22.24 horas.

La TABLA III resume los resultados de 28 lotes experimentales producidos por la técnica de infección en suspensiones celulares con las semillas virales descritas. La mortalidad celular usualmente alcanzó el 70-80% entre las 18-22 horas post-infección.

Los cultivos celulares de BHK21 C13 en suspensión fueron muy sensibles a la infección por VEV tanto patógeno como atenuado desde el primer nivel de pasaje, sin embargo presentaron una acidificación pronunciada a las 18.-20 horas postin-

fección, lo que hizo necesario su corrección con NaHCO₃ al 7.5%; por lo tanto se considera que no se alcanzaron condiciones ambientales óptimas en las experiencias descritas. Un control estricto de las condiciones de cultivo permitirá obtener mayores concentraciones celulares y mejores títulos virales.

Las cepas patógenas proporcionaron títulos infecciosos más altos que las atenuadas, con una diferencia promedio de 1 log₁₀ DL₅₀RL/ml. Esta característica, ha sido observada en titulaciones de VEV en hamsters [8] y ratones lactantes así como en diversos cultivos celulares.

Además del uso de los antígenos para propósitos de diagnóstico e investigación, este método puede ser útil para la elaboración de vacunas inactivadas o atenuadas contra la EV. Los resultados reportados señalan que es posible lograr títulos víricos aceptables para la producción de inmunobiológicos.

Sin embargo, el probable valor de los cultivos de BHK21C13 en suspensión como sustrato para la producción

de antígenos vacunales contra la EV deberá esperar los resultados de experimentos en animales para relacionar los parámetros de multiplicación viral con su inmunogenicidad.

Experiencias pilotos a nivel de laboratorio [6] en la vacunación de ratones adultos sugieren, que una vacuna inactivada satisfactoria puede ser preparada a partir de virus obtenido en este tipo de cultivo celular.

Se prosiguen las investigaciones para refinar la técnica de infección descrita, tendientes a la obtención de antígeno viral en mayor escala y la determinación de su capacidad inmunizante en animales susceptibles.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alonso Fernández, A. Manual de diagnóstico de laboratorio de las enfermedades vesiculares. No. 15. Serie de manuales didácticos. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 1986.
- [2] Capstick, P.B.; Telling, R.C.; Chapman, W. and Stewart, D.L. Growth of cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the Virus of Foot-and-Mouth Disease. *Nature*. 95:1.163-1.164. 1962.
- [3] Castañeda, J.; Bernal, C.; Rodríguez de Domínguez, J.; Espinoza, M.; Ochoa de Chaurell, A.y Castro de Blanco, G. Desarrollo y uso de vacunas contra el virus de la Estomatitis Vesicular. *First Intern. Conf. Impact. Vir. Dis. Developm. Latin America*. 1:420-427. 1982.
- [4] Castañeda, J.; Novell de Adrián, M.; Ordóñez, J.; Aranda de Obando, M.; Campos de Llaneras, E. y Cárdenas, S. Impacto económico de las enfermedades vesiculares sobre la industria bovina y porcina en Venezuela. *First Intern. Conf. Impact. Vir. Dis. Developm. Latin America*. 1:203-213. 1982.
- [5] Hanson, R.P. Vesicular Stomatitis: Introduction and overview. En: J. Mason (editor), *Proceedings of an international conference on Vesicular Stomatitis*. Mexico City. U.S. Commission for the prevention of Foot-and-Mouth Disease. México City. pp. 1-13. 1984.
- [6] Lauerman, L.H.; Lincoln, S.; Giles, R.; Wieseahn, G.; Stevens, D.R. and Hoover, T.R. Potency, Stability and Efficacy of an Inactivated Vesicular Stomatitis Virus Vaccine. *Proceedings of an International Conference on Vesicular Stomatitis*. Mexico City. pp 583-590. 1984.
- [7] Macpherson, I.A. and Stoker, M.G.P. Polyoma transformation of hamsters cell clones - an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*. 16:147-151. 1962.
- [8] Reed, L.J. and Muench, M. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* 27:493-297. 1938.
- [9] Suárez, E. y Rodríguez de Domínguez, J. Estabilidad antigénica de una vacuna contra la Estomatitis Vesicular. *Ciencias Veterinarias*. 10 (1-2): 1.415-1.421. 1981.