

UTILIZACION DE INACTIVANTES QUIMICOS EN EL SUERO BOVINO EMPLEADO COMO SUPLEMENTO EN CULTIVOS CELULARES*

María Cristina Ramírez D.**

Gustavo Arbeláez R.***

Víctor Vera A.**

Luis Carlos Villamil J.**

Gloria C. Ramírez N.**

RESUMEN

Se utilizó etilenimina binaria (BEI) para inactivar suero fetal bovino infectado con 1000, 5000 y 100.000 DICC₅₀ del virus de la diarrea viral bovina (DVB). La cinética de inactivación mostró la inactivación total del virus de la DVB. A las 9.21, 8.5 y 11.5 horas respectivamente, en cada uno de los sueros infectados.

Estos sueros fueron utilizados como suplemento en la replicación de células de la línea MDBK certificadas libres del virus de la DVB, mostrando una morfología normal durante varios pasajes, comprobándose la ausencia de virus de DVB, no toxicidad del inactivante y la efectividad del BEI en la inactivación del virus. La determinación de títulos de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la DVB, de sueros de bovinos de la Sabana de Bogotá, trabajados anteriormente por el ICA-CEISA, no mostraron diferencias estadísticas significativas al ser analizados por la técnica de microneutralización en placa utilizando esta línea celular. Se concluye que el empleo del inactivante químico es una alternativa viable para contribuir a la solución de los problemas causados por la contaminación de los sueros utilizados como suplemento en los cultivos celulares.

INTRODUCCION

Los cultivos celulares son derivados de células tomadas del cultivo original de un cultivo primario o de una línea o cepa celular disgre-

gados por medios enzimáticos o químicos (Freshney, 1987).

Los cultivos primarios consisten de células tomadas de un tejido u órgano, proveniente de un animal recién sacrificado. Poseen varias características que los diferencian de los demás como es el hecho de conservar una morfología celular similar a las de las células del órgano que les dio origen. Dentro de un mismo cultivo se encuentran por lo general diferentes tipos de células que conservan la distribución diploide de los cromosomas. Estos a diferencia de las líneas celulares no se propagan indefinidamente in vitro (Freshney, 1987).

Las líneas celulares se obtienen de los cultivos primarios mediante un cambio de fenotipo o transformación (Litelfield, 1964). Las líneas celulares continuas están formadas por células que se han diferenciado morfológica y genéticamente de las células de origen. Una característica típica de este tipo de cultivos es ser aneuploide y tener a menudo un complemento de cromosomas entre diploide y tetraploide. Un número considerable de líneas están asociadas con transformaciones malignas, como reducción en el requerimiento de suero, crecimiento en medio sólido y aneuploidia (Freshney, 1987).

Uno de los grandes problemas que presentan los laboratorios de diagnóstico o de investigación es el alto porcentaje de cultivos contaminados con el virus de la DVB como consecuencia de la infección intrauterina de los bovinos donantes, además las líneas celulares y los cultivos

primarios pueden contaminarse con el virus cuando son suplementados con el suero fetal contaminado (Raettig et al., 1955; Ruth, 1986).

El porcentaje de contaminación del suero fetal bovino comercial con el virus de la DVB está en el orden del 10 al 75% (Raettig et al., 1955; Ruth, 1986).

La inactivación consiste en transformar un antígeno infeccioso en otro sin capacidad de replicación mediante la acción de un agente físico o químico. El primer trabajo sobre la inactivación de los agentes infecciosos (bacterias o virus) fue realizado con etilenimina, sustancia básica de la aziridina identificada en 1955 por Raettig y Vecker (Raettig et al., 1955). El BEI (Etilenimina banaria) es un inactivante de primer orden que no reacciona con proteínas, por lo tanto puede ser utilizado para la inactivación de virus adventicios en preparaciones biológicas para uso en fluidos de tejidos animales y humanos.

Las aziridinas son altamente tóxicas y tienen que ser manejadas con precauciones especiales y a una concentración del 0.1 m (Bah-nemann, no publicado).

El propósito del presente trabajo fue el de mantener una línea celular libre del virus de la DVB mediante el uso de suero fetal bovino inactivado con BEI.

MATERIALES Y METODOS

Inactivante: El inactivante de elección fue la etilenimina binaria

(BEI), suministrado por la empresa Colombiana de productos Veterinarios (VECOL).

Preparación del BEI

Este inactivante fue preparado por Vecol, pues su manejo requiere condiciones especiales. En su preparación se utilizaron 20.5 g por litro de 2 bromoetilamina, la cual mediante un proceso de ciclización se convierte en etilenimina binaria. Se preparó una solución de 3 mm de bromohidrato de bromoetilamina (BEI) en hidróxido de sodio 0.2 m, la cual se colocó en baño de maría a 37°C, por 1 hora para obtener la ciclización del BEA con formación de BEI.

Inactivación del suero fetal bovino

Se tomaron 2000 cc. de suero fetal bovino comercial, el cual se encontró libre de bacterias y hongos y se sometió a la inactivación con BEI a una concentración de 3 mm al 3% durante 24 horas a una temperatura de 26°C, tiempo considerado óptimo para la inactivación del virus. Transcurridas las 24 horas, se adicionó tiosulfato de sodio 1m. al 1% para neutralizar los residuos de BEI (Bah-nemann, 1975).

Otras tres fracciones de 300 ml de suero cada una, fueron infectadas con 1.000, 5000 y 100.000 DICC₅₀ (dosis infectante cultivo celular 50) del virus de DVB de la cepa Singer de referencia. Estos sueros fueron inactivados con BEI siguiendo la metodología citada. Se tomaron alícuotas de 2 ml de cada fracción de suero a las 0, 1, 2,

* Esta investigación se realizó en el Postgrado de Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, con el apoyo financiero de la Corporación Andina de Fomento CAF proyecto: "Desarrollo, normalización y aplicación de Kits diagnóstico para el virus de la Diarrea Viral Bovina".

** Respectivamente: DMV. MSc.; DMV. MSc.; DMV. PhD. DMV. MSc. Profesores Universidad Nacional de Colombia.

*** DMV, PhD. Investigador Asociado ICA-CEISA, Ciudad Universitaria.

3, 5, 15 y 24 horas post inactivación para realizar la respectiva cinética de inactivación del virus.

Otra parte de suero fetal bovino se dejó como control sin ningún tipo de tratamiento.

Células: Se utilizó la línea celular MDBK certificada libre del virus de DVB y proporcionada por la Universidad de Guelph al programa de posgrado de Salud y Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional. Estas células se sometieron a pruebas de inmunofluorescencia indirecta e interferencia, comprobándose la negatividad de las mismas la presencia del virus de la DVB.

Las células MDBK fueron suplementadas con los diferentes sueros (tratado con BEI, infectado e inactivado con BEI y suero control). Estas células fueron congeladas en nitrógeno líquido, suplementadas con suero fetal bovino, normal e inactivado con BEI.

Evaluación de anticuerpos neutralizantes: Transcurridos dos meses de la congelación de las células MDBK, fueron replicadas, utilizando como suplemento suero fetal bovino normal inactivado con BEI y empleadas en una prueba de microneutralización en placa (Dubovi, 1990). Esta técnica fue ensayada para observar el comportamiento de las células, utilizando la cepa Singer de referencia (entre 100 y 1000 DICC₅₀) y 30 sueros de bovinos de la Sabana de Bogotá, con títulos neutralizantes conocidos contra el virus de la DVB.

Análisis estadístico: Para la comparación de los títulos neutralizantes de los sueros conocidos y los resultados de la presente evaluación se utilizó la prueba estadística de T-student (Thorner et. al., 1961).

RESULTADOS

Cinética de inactivación

Los sueros infectados con 1000, 5000 y 100.000 DICC₅₀ del virus de DVB, mostraron inactivación completa del virus a las 9,21, 8,907 y 11,5 horas post inactivación respectivamente, según muestra la curva de regresión (Figs. 1, 2 y 3).

Células

Las células MDBK suplementadas con los diferentes sueros, pre-

SUERO	TITULO CEISA*	SUERO EXPERIMENTO
1	3.3	3.3
2	3.0	2.7
3	2.7	2.7
4	1.2	1.2
5	2.4	2.5
6	3.3	3.0
7	1.5	1.5
8	1.2	1.2
9	1.9	1.8
10	0.9	0.9
11	2.4	2.4
12	2.7	2.7
13	2.4	2.1
14	1.5	1.5
15	2.7	2.7
16	3.3	3.3
17	3.6	3.6
18	2.4	2.4
19	1.5	1.5
20	1.2	1.2
21	0.45**	0.45
22	0.45**	0.45
23	0.45**	0.45
24	0.45**	0.45
25	0.45**	0.45
26	0.45**	0.45
27	0.45**	0.45
28	0.45**	0.45
29	0.45**	0.45
30	0.45**	0.45

* Logaritmo del recíproco de la dilución del suero que neutraliza 1000 DICC₅₀ del virus.

** Sueros sin título neutralizante.

sentaron una morfología normal durante varios pasajes.

Evaluación de anticuerpos neutralizantes

Los títulos neutralizantes de los sueros de los bovinos de la Sabana de Bogotá, fueron muy similares a

los títulos obtenidos previamente por el ICA CEISA en años anteriores, como puede observarse en la tabla 1. Los análisis estadísticos realizados por la prueba de T student no mostraron diferencias significativas entre las dos evaluaciones.

DISCUSION

La inactivación del virus de la DVB por el BEI fue completa a las 11,5 horas cuando se empleó el máximo de dosis infectante (100.000 DICC₅₀) en el suero. Este comportamiento es típico de los inactivantes de primer orden como es el caso de las aziridinas, al cual pertenece el BEI. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Estupiñán y Col en 1978 con el virus de la fiebre aftosa, quienes reportan la inactivación del virus en suspensiones de vacunas a las 3½ horas post inactivación. Las diferencias en tiempo podrían ser atribuidas al hecho de encontrarse el virus de la DVB sumergido en suero fetal bovino, el cual posee una gran cantidad de componentes proteicos, polipéptidos, hormonas, metabolitos y nutrientes, así como minerales e inhibidores de la proliferación celular, elementos estos que pueden retardar la acción del BEI, contrario a lo que ocurre con el antígeno viral de las vacunas, el cual permanece altamente concentrado en una solución relativamente pobre.

Las células MDBK, al ser descongeladas y replicadas con suero fetal bovino inactivado con BEI, presentaron una monocapa confluyente de células y la morfología observada fue predominantemente fibroblástica, hecho este que permite descartar el factor toxicidad que se pudiera derivar de la utilización del BEI, ya que la descongelación es una de las prácticas que mayor estrés puede ocasionar a las líneas celulares y por consiguiente la que puede producir mayor mortalidad.

Los títulos neutralizantes de los sueros de bovinos provenientes de la Sabana de Bogotá, que fueron titulados previamente en el laboratorio del ICA-CEISA, en el año de 1986 fueron similares a los hallados en el presente trabajo (demostrado por la prueba de t-student). Estos resultados indican que la línea celular MDBK a pesar de haber sido replicada con suero fetal bovino contaminado con virus de la DVB e inactivado con BEI, se mantuvo libre de virus durante el desarrollo de todo el experimento y que el suero conservó sus características propias como factor de crecimiento y multiplicación celular, pues según Barnes (1980), la alteración en la calidad de cualquiera de los componentes del suero y principalmente de las proteínas y

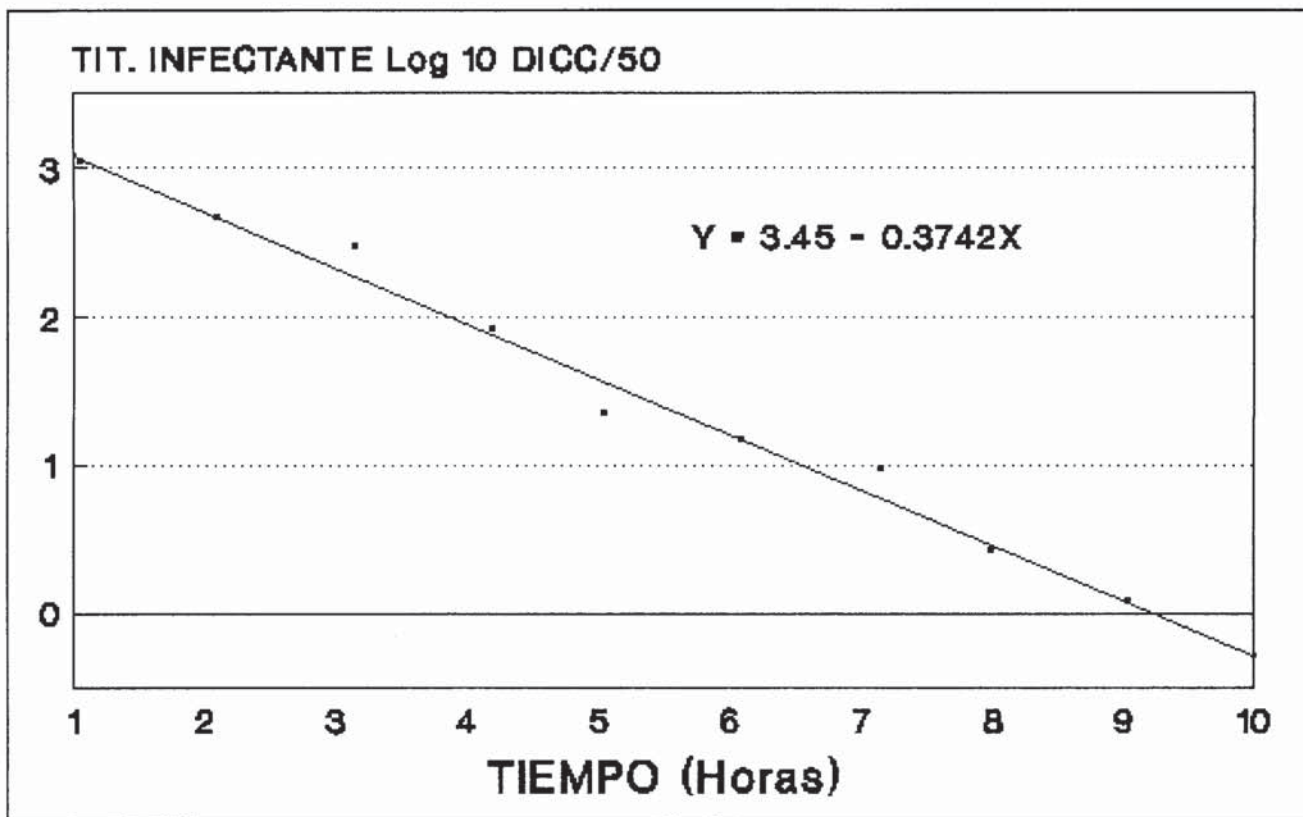


FIGURA 1. Curva de inactivación del VDV-B (1.000 DICCC/50) con BEI en células MDBK en monocapa.

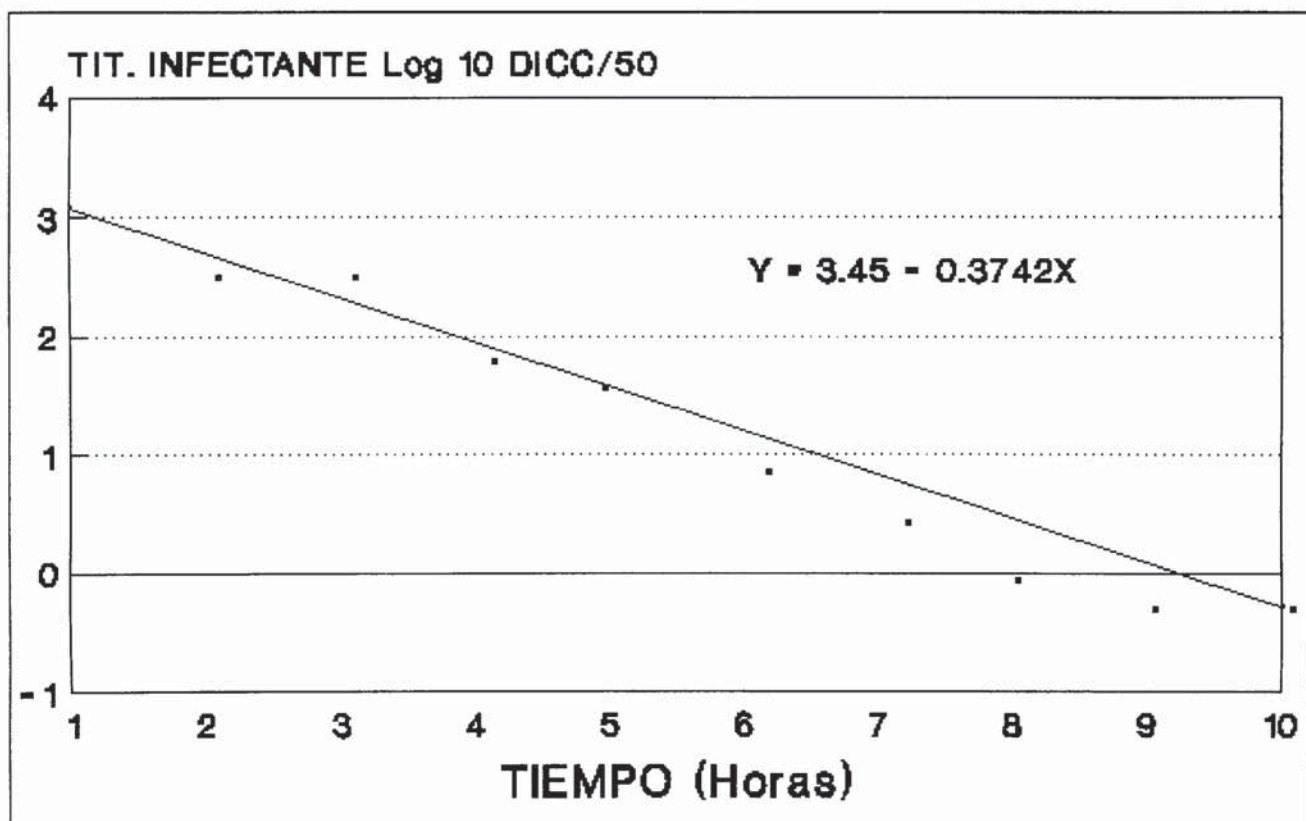


FIGURA 2. Curva de inactivación del VDV-B (5.000 DICCC/50) con BEI en células MDBK en monocapa.

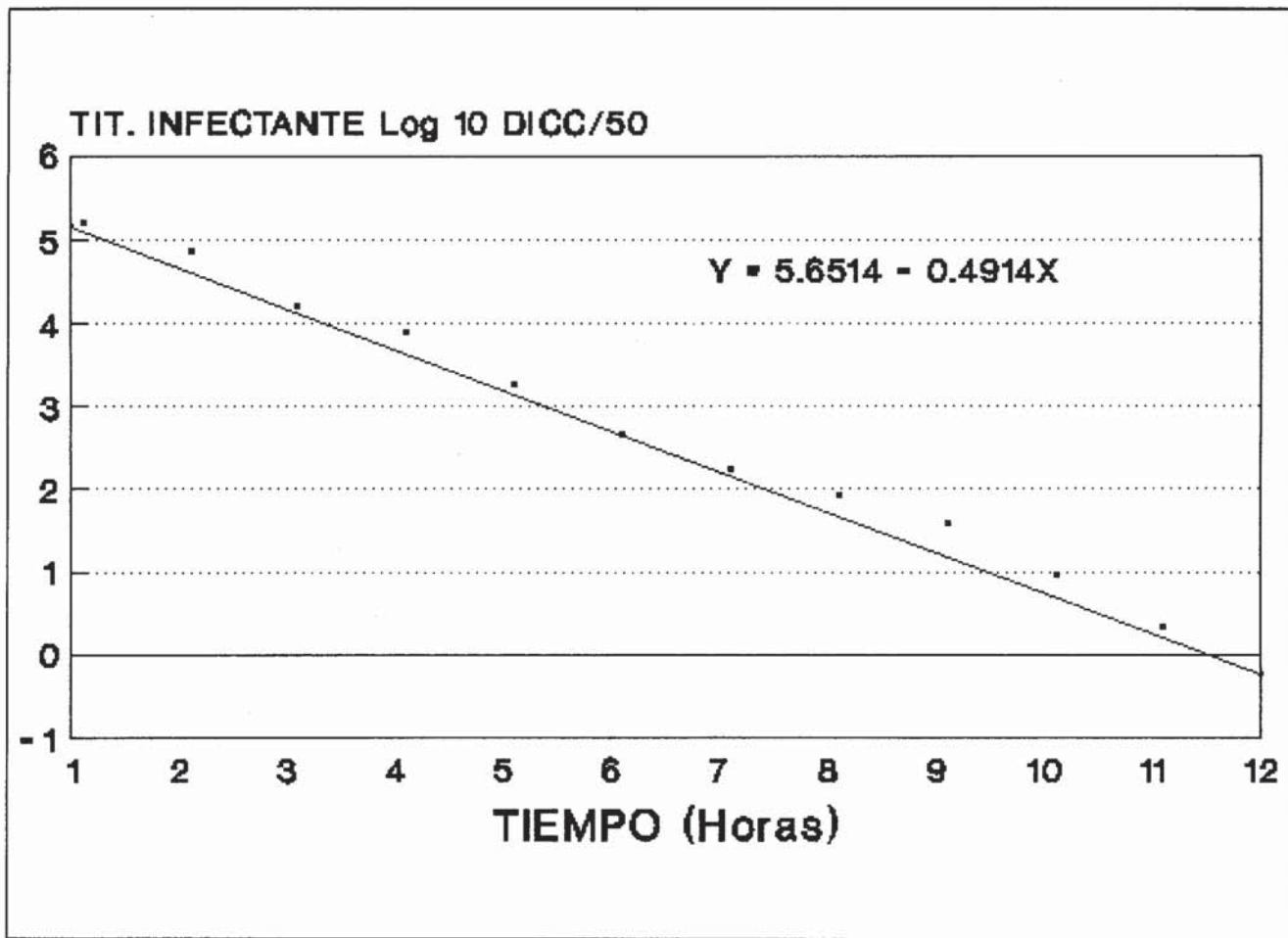


FIGURA 3. Curva de inactivación del VDV-B (100.000 DICC/50) con BEI en células MDBK en monocapa.

hormonas trae como consecuencia problemas en el crecimiento y replicación de las líneas celulares.

Se concluye que el empleo del inactivante químico es una alternativa viable para contribuir a la solu-

ción de los problemas causados por la contaminación de los sueros

utilizados como suplemento en los cultivos celulares.

REFERENCIAS

1. BAHNEMANN, H. G. Binary ethilenimine as an inactivant for foot-and-mouth- disease virus and its applications for vaccine production. Arch. virol 47, 1975.
2. BARNES, W. D. Methods for growth of cultured cells in serum free medium. Anal. Biochem. 102: 255-270, 1980.
3. DUBOV, E. J. Diagnosis of bovine viral diarrhea infection. Symposium on bovine viral diarrhea. Vet. Med. 1133-1139, 1990.
4. ESTUPIÑAN, J.; LOBO, C. A.; RUEDA, F.; ROCHA, J. R.; RESTREPO, G.; ARBELAEZ, G.; BARRERA, J.; GERARDINO, A.; QUINTERO, M. Manual de técnicas del programa de enfermedades vesiculares ICA. Dto de trabajo No. 2, 1-199, 1978.
5. FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Alan, R., Liss, Inc. 41 East. 1th street, N. York, NY 1-105, 1987.
6. LEVINGS, R. L., Bovine viral diarrhea virus contaminación of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines. Develop Biol. Stand, 75: 177-181, 1990.
7. LITELFIELD, J. W. Selection of hybrids from matings of fibroblastos in vitro and their presumed recombinante science. 145: 706-710, 1964.
8. RAETTIG, H.; VECKER, W. Inaktivierung von baktociophagen durch. Atch. and lenimide rivete. Naturwissensch. 42: 490, 1955.
9. RUTH, G. R., Bovine viral diarrhea. A difficult infection to diagnostic. veterinary medicine 81: 870-874, 1986.
10. THORNER, R. M., REMEIN, O. R. (1961) Principles and procedures in the evaluation of screening for disease public health monograph No. 67. Washington, D.C.