

Producción del antígeno viral para la vacuna de la Encefalomiocarditis Porcina en un cultivo en suspensión de la línea BHK21 C13 - Viral antigen production for the vaccine of Swine encephalomyocarditis in a suspension culture of BHK21 C13 cell line

Leiva Peláez, Osney: LABIOFAM| **Lorenzo Rocha Freddy:** LABIOFAM| **Calderón Garrigó Rayda:** LABIOFAM| Empresa de Producciones Virales y Bacterianas UP7, Grupo Empresarial LABIOFAM. Email: osneylp@infomed.sld.cu

Resumen

La alta demanda de la producción de vacunas en la industria requiere de sistemas de bioproducción estables y de alto rendimiento, así como de la implementación de nuevas tecnologías. Las suspensiones celulares ofrecen ventajas como sistema de propagación masiva por las altas tasas de multiplicación que presentan. El objetivo de este estudio fue evaluar la replicación del Virus de la Encefalomiocarditis Porcina (V-EMC) producido en las células de la línea BHK21 C13 en suspensión. Se utilizó el medio de cultivo MEMgaane suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) y bicarbonato de sodio, y el tiempo entre los pases del cultivo fue de 24 horas. También se realizó la adaptación de las células al crecimiento suplementado con Suero de Ternero sin Calostro (ST/SC) a través de pases crecientes. Se estudió el crecimiento celular monitoreando la concentración de células viables a través del método de exclusión de Tripán Azul durante 120 horas. Para la titulación de los lotes experimentales se titularon muestras mediante el método de Reed y Muench. Se obtuvo una sublínea celular en suspensión de BHK21 C13 entre el tercer y cuarto subcultivo efectuado en volumen de 80 mL. Se logró la adaptación del cultivo al crecimiento con ST/SC. Además fue posible obtener títulos virales semejantes a los logrados por el método de cultivo estacionario (entre $10^{8.5}$ y 10^9 DICT₅₀/mL) ya que los mismos oscilaron entre $10^{8.64}$ y $10^{8.86}$ DICT₅₀/mL a las 72 horas en los lotes experimentales realizados. En conclusión las células de la línea BHK21 C13 son cultivadas satisfactoriamente utilizando sistemas en suspensión, los cuales permiten una alta replicación viral debido a la susceptibilidad de la biomasa celular que producen. Anualmente se ahorran por el método de cultivo celular en suspensión 34507.8

pesos en moneda nacional y 3437.16 pesos en moneda convertible. Esta es la primera vez que se reporta un estudio con el virus de la Encefalomiocarditis Porcina en células de la línea BHK21 C13 en suspensión.

Palabras clave: BHK21 C13| cultivo suspensión| virus EMC

Abstract

The high demand for the vaccine industrial production requires stable bioproduction systems, high performance, and the implementation of new technologies. Cell suspensions offers advantages like mass propagation systems due to its high rates of multiplication. The aim of this study was to evaluate the replication of the Porcine Encephalomyocarditis Virus (V-EMC) produced in the suspension cell line BHK21 C13. Was used the MEMgaane culture medium supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) and sodium bicarbonate, and the time between the passes of the cell culture was 24 hours. In addition was carried out the adaptation of cells to growth in the medium supplemented with calf serum without colostrum (ST / SC) through growing passes. Cell growth was studied by monitoring the concentration of viable cells by the Trypan Blue exclusion method during 120 hours. For titration of the experimental lots were titrated samples by the Reed and Muench method. It was obtained a suspension cell subline of BHK21 C13 between the third and fourth subculture made in volume of 80 mL. Growth adaptation in suspension of the cells to ST / SC was achieved. It was also possible to obtain viral titers similar to those achieved by the stationary cell culture method (between $10^{8.5}$ and 10^9 DICT₅₀/mL) since they ranged between $10^{8.64}$ and $10^{8.86}$ DICT₅₀/mL at 72 hours in the experimental lots made. In conclusion, the cells of BHK21 C13 cell line are grown successfully using suspension systems, which allow a high viral replication due to the susceptibility of the cell biomass produced. Annually are saved by the method of cellular cultivation in suspension 34507.8 pesos in national currency and 3437.16 pesos in convertible currency. This is the first reported study with swine encephalomyocarditis virus in BHK21 cell line C13 in suspension.

Keywords: BHK21 C13 cell line| suspensión growth| virus EMC

1-Introducción

La Encefalomiocarditis Porcina viral (EMC) es una enfermedad producida por un virus perteneciente al género *Cardiovirus* de la familia *Picornaviridae* (Regenmortel y cols., 2000). Los animales más afectados son los cerdos. El Virus de la Encefalomiocarditis (V-EMC) presenta una distribución mundial, con reportes de aislamientos en los Estados Unidos de Norteamérica, Colombia, Uganda, Gran Bretaña, Países Bajos, Alemania, India, Australia, Nueva Zelanda y Cuba (Acha y Szyfres, 1986); provenientes de animales como chimpancés, orangutanes, caballos, cerdos, leones y otros animales silvestres. Estudios previos de seroprevalencia en humanos, indican que las infecciones con V-EMC son relativamente comunes considerándose muchos de los casos como asintomáticos o indiferenciados y solo casos muy esporádicos clínicamente manifestados (Castillo R., 2010).

Las líneas celulares en suspensión se forman de células libres y agregados celulares distribuidos en un medio de cultivo líquido agitado. Los cultivos de líneas celulares en suspensión ofrecen múltiples ventajas con respecto a los sistemas de cultivo estacionarios: la tasa de crecimiento es mayor, se tiene un mejor control de los componentes del medio de crecimiento, el efecto de cualquier sustancia que se añada es más evidente pues la mayoría de las células están rodeadas por el medio, generalmente el material es fisiológicamente más uniforme y se pueden tener posibilidades de automatización (Hermoso y Menéndez, 2000).

El V-EMC puede causar pérdidas económicas muy graves en brotes de animales de granja (Castillo R., 2010) por la alta mortalidad y los abortos que puede producir (Campos y cols., 2010). A pesar de que ha sido reportado en múltiples países como patógeno en cerdos desde 1960 presentándose brotes cíclicos de la enfermedad (Guajardo U., 1990), no hay una marcada estrategia de vacunación. En la actualidad solo existen en el mundo dos vacunas reconocidas contra el V-EMC: una cubana y otra norteamericana. Ambas vacunas se producen en cultivo celular estacionario y el virus es inactivado en la elaboración de las mismas. Sin embargo, la vacuna cubana se obtuvo primero y fue patentada por Laura Gómez y colaboradores en el año 1996, comenzando su producción industrial en la EPVVB desde el año 1995.

En la mayoría de los países la prevención de la enfermedad se basa en tratar de impedir o aminorar la infección con medidas generales como desinfecciones frecuentes, desratizaciones, manejo adecuado (Zimmerman J., 1993) etc, así como de un estricto control sanitario o cuarentenario de los animales sospechosos. Aunque Cuba posee programas periódicos de control sanitario en todas las unidades

porcinas, no ha sido posible controlar totalmente el vector fundamental (ratas, ratones). Tampoco ha sido posible eliminar de forma efectiva la aparición de brechas sanitarias relacionadas con el control de los animales de los trabajadores de dichas unidades.

La EMC viral fue reportada por primera vez en Cuba en 1975 y comenzó a difundirse por la mayoría de las provincias (Campos y cols., 2010) por lo cual es considerada una enfermedad enzoótica (Lorenzo F., Resultado no Publicado). De ahí surge la importancia de contar con un programa de vacunación de la masa porcina, tanto estatal como privada, ya que social y culturalmente esta es una de las principales fuentes proteicas a la que tiene acceso la población, evitando así la pérdida económica que representaría un brote de EMC en cualquier unidad porcina.

Se señala que quizás los roedores son el principal reservorio, aunque con certeza se desconoce qué especie animal es el reservorio que mantiene el virus en la naturaleza, cuáles son las fuentes de infección y en qué circunstancias se originan los brotes en los cerdos o se han originado en los casos humanos (Suárez M. y cols., 2010). La transmisión hacia los vertebrados se efectúa por vía oral (Kluivers y cols., 2006).

La alta demanda de la producción de vacunas en la industria requiere de sistemas de bioproducción estables y de alto rendimiento, así como de la implementación de nuevas tecnologías (Slivac y cols., 2006), ya que las células de plantas y animales son más sensibles a las condiciones de cultivo que los microorganismos (Che T., y cols., 2010).

Debido a la importancia que tiene para la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas UP7, del Grupo Empresarial LABIOFAM, Ciudad Habana, la obtención de altos rendimientos en la producción del antígeno V-EMC para la producción de esta vacuna veterinaria, nos trazamos como objetivo general:

Objetivo General

- Evaluar la replicación del Virus de la Encefalomiocarditis Porcina (V-EMC) en una sublínea en suspensión de BHK21 C13.

Objetivos Específicos

1. Adaptar las células de la línea BHK21 C13 al crecimiento en suspensión en el medio MEMGaane y al crecimiento suplementado con suero de ternero sin calostro (ST/SC).
2. Realizar un Banco Maestro y un Banco de Trabajo de las células de la sublínea de BHK21 C13.

3. Evaluar el perfil de crecimiento en suspensión de las células de la sublínea BHK21 C13.
4. Titular la replicación del Virus Encefalomiocarditis Porcina (V-EMC) en la sublínea BHK21 C13 en suspensión.

2. Materiales y Métodos

2.1 Cultivo de la línea celular BHK21 C13 CCL-10.

La línea celular empleada en este estudio fue de riñón de hámster sirio recién nacido (BHK21 C13 CCL-10), obtenida y certificada por la ATCC (American Type Culture Collection) en el pase 56; la cual es conservada en nitrógeno líquido en el Departamento de Cultivos Celulares de la Empresa Productora de Vacunas Virales y Bacterianas (EPVVB), LABIOFAM.

Las células fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial con glutamina y aminoácidos no esenciales (MEMgaane) suplementado con Caldo Triptosa Fosfato (CTF) al 10 %, L-glutamina 1 %, Bicarbonato de sodio 1 % y Suero Bovino Fetal (SBF, Fetal Bovine Serum) 10 % (SIGMA) en los inicios del estudio y posteriormente con Suero de Ternero Sin Calostro (ST/SC) al 10 % (Matanzas, Cuba) una vez adaptadas las células al crecimiento con el mismo. El medio contiene rojo fenol como indicador de pH. No se usaron antibióticos.

La esterilidad durante todo el estudio fue controlada inoculando 1 mL de la suspensión celular en cada uno de los pases o subcultivos realizados en los medios de cultivo Caldo Triptona de Soya y Tioglicolato de Sodio (SIGMA), los cuales fueron observados durante 15 días consecutivos. La muestra inoculada en el Caldo Triptona de Soya se mantuvo a temperatura ambiente mientras que la inoculada en el medio Tioglicolato de Sodio fue incubada a 37°C.

2.2 Adaptación al cultivo en suspensión de la línea BHK21 C13.

Se utilizó el método descrito por Mather y Roberts (2002) con algunas modificaciones. Para ello, monocapas celulares de la línea estacionaria BHK21 C13 provenientes de un frasco roux de 225 cm² fueron desprendidas empleando el método de dispersión enzimática, utilizando tripsina al 0,25 % en solución con Versene (EDTA) al 0,02 % (SIGMA). Estas fueron las células con las cuales se comenzó el proceso de adaptación.

Primeramente fueron sembradas en medio de cultivo en agitación con un volumen inicial de 10 mL en frascos roux de cultivo celular estéril de 25 cm² de área hasta alcanzar a través de los diferentes subcultivos un volumen final de 80 mL en frascos erlenmeyer de cristal pyrex. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes:

volumen final de 80 mL, temperatura de incubación de 37⁰C, velocidad de agitación a 200 rpm con barra magnética (Equipo de agitación Retomed, Cuba), pH de 7.2 y el tiempo entre los distintos pases o subcultivos fue de 24 horas. Para los pases o subcultivos la concentración inicial de células fijada en cada pase fue de 1 x 10⁶ células/mL, se desechaba el medio de cultivo agotado y se resuspendían nuevamente las células en medio de cultivo fresco. Las muestras fueron tomadas diariamente para realizar la determinación de la concentración y viabilidad celular. Cuando fue necesario se almacenaron los cultivos a 4⁰C.

2.3 Análisis de la presencia de micoplasmas en las células de la sublínea de BHK21 C13.

Se chequeó la posible contaminación por micoplasmas de esta nueva sublínea celular una vez adaptadas las células al crecimiento en suspensión. El análisis se realizó en el Laboratorio de Control de Micoplasmas (MYCOLAB) del Centro de Sanidad Agropecuaria (CENSA) según protocolo establecido en el PNO-BI-020: Cultivo de las muestras de Sueros, cultivos celulares y productos biofarmaceuticos, (Tully y cols., 1983; Farmacopea Británica, 1998) y el Instructivo para la reacción en cadena de la polimerasa en MYCOLAB, perteneciente al IT-217 el cual describe el procedimiento a seguir para la realización de la técnica de PCR según lo establecido en la Farmacopea Europea del 2007, relacionado con la detección de micoplasmas en sueros, cultivos de células y productos biofarmacéuticos de aplicación biomédica, además de lo relacionado en la NC:ISO/IEC 17025:2007 y las buenas prácticas de laboratorio.

2.4 Desarrollo de un Banco de células para su conservación en nitrógeno líquido de la sublínea de BHK21 C13.

Lograda la adaptación de las células BHK21 C13 al crecimiento en suspensión, las mismas fueron cultivadas nuevamente en las condiciones descritas en el acápite 2.2 para amplificar la cantidad de células durante 48 horas y congelarlas a -196⁰C en nitrógeno líquido. (Ver Anexo I: Técnica de congelación celular). Además en Anexo II se puede observar como se realiza un banco celular; y la idea de Banco Maestro y de Trabajo.

2.5 Conteo celular.

Para la determinación de la concentración y viabilidad celular las células fueron contadas en Cámara de Neubauer usando el método de exclusión de Tripán Azul y la determinación de la densidad celular fue realizada en el Espectrofotómetro Pharmacia LBK Ultrospec III. Las células viables son impermeables al Tripán Azul por lo que se observan sin teñir al microscopio mientras que las células no viables

se observan teñidas de azul. Se aplicó la Ley de la Volumetría para calcular la concentración inicial del inóculo del siguiente pase:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

Donde: C_1 : Concentración inicial

C_2 : Concentración final

V_1 : Volumen inicial

V_2 : Volumen final

La velocidad específica de crecimiento μ (h^{-1}) fue estimada siguiendo la siguiente ecuación:

$$\mu = (\ln X - \ln X_0) / t - t_0$$

Donde: X: Células viables por mL de la muestra final

X_0 : Células viables por mL de la muestra inicial

t: Tiempo en que se tomó la muestra final

t_0 : Tiempo en que se tomó la muestra inicial

2.6 Adaptación de las células al crecimiento con Suero de Ternero sin Calostro (ST/SC).

Para lograr la adaptación de las células de la línea BHK21 C13 al crecimiento en el medio de cultivo MEMgaane con Suero de Ternero sin Calostro fueron realizados pases en suspensión de las mismas en el medio de cultivo suplementado con Bicarbonato de sodio (1 %) y suero animal (10 %). La distribución de los sueros entre los distintos pases fue la siguiente:

1. SFB (75 %) + ST/SC (25 %)
2. SFB (50 %) + ST/SC (50 %)
3. SFB (25 %) + ST/SC (75 %)
4. ST/SC (100 %)

Durante este nuevo período de adaptación las células de la línea BHK21 C13 fueron mantenidas bajo las mismas condiciones de cultivo celular descritas anteriormente en el acápite 2.2.

2.7 Crecimiento celular de la sublínea de BHK21 C13.

Para el estudio del perfil de crecimiento celular en suspensión de las células de la sublínea de BHK 21 C13 fue inoculado un frasco erlenmeyer con 80 mL de medio de cultivo, a una concentración inicial celular de 1×10^6 células/ml. Este frasco erlenmeyer fue mantenido bajo las mismas condiciones de cultivo celular descritas anteriormente en el acápite 2.2, solo que el tiempo de incubación fue extendido hasta 120 horas. Se determinó la concentración y viabilidad celular cada 24 horas.

2.8 Replicación y titulación del V-EMC en la sublínea de BHK21 C13.

Las células de la sublínea de BHK 21 C13 adaptadas al crecimiento en suspensión en el medio MEMGaane fueron sembradas en frascos erlenmeyer con volúmenes de 400 mL a una concentración inicial de 4×10^6 células/mL durante 24 horas. Se mantuvieron las condiciones de cultivo descritas en el acápite 2.2. La inoculación del V-EMC se realizó a través de dos tratamientos: un frasco se inoculó con 2 mL de la dilución 10^{-1} del virus y otro con 0.5 mL del virus sin diluir. En ambos fueron tomadas muestras a las 24, 48 y 72 horas para realizar estudios de viabilidad y concentración celular. Los ensayos se realizaron por duplicado en días diferentes bajo las mismas condiciones.

Debido a que para el registro de nuevas vacunas e incluso para sus estudios de estabilidad son requeridos la realización de al menos tres lotes experimentales satisfactorios según los Ensayos de estabilidad de nuevos productos biológicos y/o biotecnológicos medicinales veterinarios del año 2000, en este estudio realizamos tres lotes experimentales. Las células de la sublínea de BHK 21 C13 fueron cultivadas en botellones con volúmenes de 20 L, a una concentración inicial de 4×10^6 células/mL, para inocularlas a las 24 horas con 100 mL de la dilución 10^{-1} del V-EMC y ser mantenidas a 37°C con una velocidad de agitación de 300 rpm usando barra magnética (Retomed, Cuba). Fueron tomadas muestras a las 24, 48 y 72 horas para realizar estudios de titulación viral.

Para efectuar los cálculos de titulación viral en tubos de gradilla de los tres lotes experimentales elaborados se utilizó el método descrito por Reed y Muench en 1938. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras tomadas a las 24, 48 y 72 horas de inoculadas las células con el virus (desde 10^{-6} hasta 10^{-9}), inoculando 1 mL de cada dilución (tres tubos por dilución) para calcular la Dosis Infecciosa Media en Cultivo de Tejidos (DICT₅₀/mL). Las gradillas se observaron a través de un microscopio de lente invertida (OLYMPUS) durante 5 días para determinar la aparición de los efectos citopáticos del virus en las células.

El V-EMC utilizado en este estudio fue gentilmente donado por el Departamento de Cepas y Semillas de la EPVVB, LABIOFAM, luego de ser replicado anteriormente en la línea celular BHK21 C13. Este virus fue aislado en el Laboratorio Central de Diagnóstico Veterinario del Instituto de Medicina Veterinaria y compararlo con la cepa 8KR referente de Colombia (Lorenzo F., 2002)

2.8 Análisis Estadístico.

Los valores medios y errores estándar de los datos en los estudios de adaptación al crecimiento celular en suspensión de la línea BHK21 C13, de la adaptación al crecimiento celular con suero de ternero, del estudio de crecimiento de las células y de la concentración celular alcanzada durante la replicación del V-EMC. La normalidad de los datos se comprobó mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Posteriormente, los valores medios fueron comparados respecto a los controles considerados en cada caso utilizando un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls con una significación del 95 %.

3. Resultados y Discusión

3.1 Adaptación al crecimiento celular en suspensión.

Para la adaptación de las células de la línea BHK21 C13 al crecimiento en el medio líquido agitado se realizaron pases o subcultivos de las mismas con aumento creciente del volumen de medio hasta 80 mL en frascos erlenmeyer. Esta adaptación se logró a partir del tercer pase en un volumen de 80 mL, ya que desde este momento no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$, Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls) con respecto a la concentración final alcanzada por las células de la sublínea BHK21 C13 entre los distintos pases del cultivo, ni tampoco hubo más cambios en la morfología celular observada hasta el momento (Figura 3).

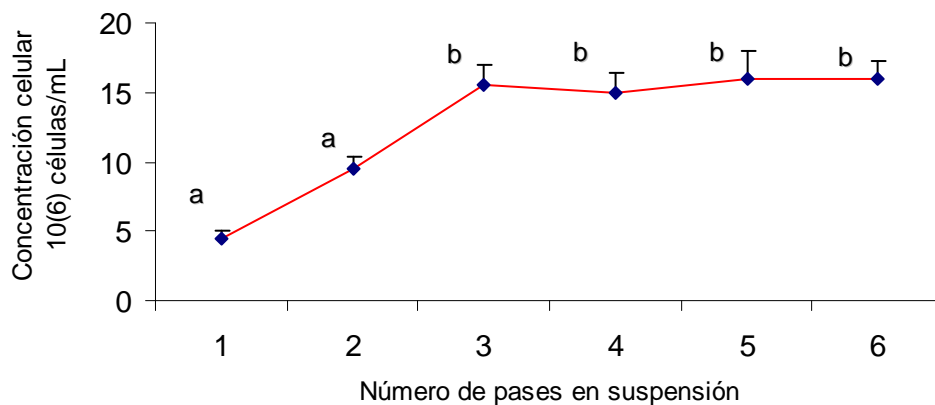


Figura 3. Adaptación de la línea celular BHK21 C13 al cultivo en suspensión. Son presentados los valores medios y sus errores estándar correspondientes a dos experimentos independientes.

(a,b) significativo para una $p < 0.05$ en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls.

Los procedimientos utilizados en este estudio permitieron la adaptación de la sublínea de BHK21 C13 ya que se obtuvo a partir de una selección celular producto de la modificación del sistema de crecimiento estacionario de dicha línea a través de un proceso de adaptación (Freshney, 2005).

Es importante destacar que durante los primeros pases realizados en frascos de cultivo celular con volúmenes de 10 mL no predominaron las agrupaciones celulares ni tampoco se adhirieron en grandes cantidades a la superficie del frasco, lo cual no concuerda con lo reportado por Davis y colaboradores en 1970, ya que dichos autores plantearon la formación de clusters o racimos celulares durante varios pases del cultivo. Sin embargo esto pudo estar influenciado por los medios de cultivos empleados y la cantidad de células inoculadas en cada pase debido al volumen final de medio de cultivo empleado por dichos autores, el cual fue de 400 mL desde el inicio del estudio. En este trabajo una vez aumentado el volumen de medio de cultivo a 80 mL y posteriormente a 400 mL, tampoco apareció una marcada adherencia celular al cristal del frasco erlenmeyer. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por múltiples autores que han adaptado la línea celular BHK21 C13 al crecimiento en suspensión a lo largo de los años para la replicación de diferentes virus (Capstick y cols., 1962; Radlett y cols., 1985; Perrin P. y cols., 1995; Gaurina y cols., 2004). Este estudio sería el primer caso donde se reporte a la comunidad científica el uso de células de BHK21 C13 en suspensión para el cultivo del V-EMC, no solo en Cuba sino en el mundo.

La proliferación celular observada fue adecuada y el medio de cultivo no se acidificó producto del metabolismo celular, entre otros factores al pH establecido en el medio de cultivo (pH=7.2) desde el inicio del estudio. Nuestros resultados difieren de los reportados por Akatov y colaboradores en 1991, ya que estos autores plantearon que la proliferación de las células en suspensión de la línea BHK21 C13 en presencia de bicarbonato ocurre a un valor medio de pH 6.76 +/- 0.02. Quizás esto pudo deberse a que como las células fueron obtenidas mediante un sistema de selección celular, una vez finalizado el mismo ya estaban adaptadas a multiplicarse eficientemente en el valor de pH prefijado en el trabajo desde el comienzo del estudio.

3.2 Desarrollo de un Banco de células en nitrógeno líquido y detección de micoplasmas.

Se obtuvo un banco de células viables de la sublínea BHK21 C13 congeladas en nitrógeno líquido que se encontraban creciendo en suspensión en medio MEMgaane suplementadas al 10% SFB (Banco Maestro y de Trabajo). Las células resultaron negativas al control efectuado en el CENSA para la detección de micoplasmas lo cual

concuenda con lo establecido para el uso de materiales biológicos en la producción de medicamentos veterinarios según el Código de Regulaciones Federales (CRF, 2002).

3.3 Adaptación de las células al crecimiento celular con ST/SC.

Para lograr la adaptación de las células de la sublínea BHK21 C13 al crecimiento en el medio de cultivo MEMgaane con Suero de Ternero sin Calostro fueron realizados pases en suspensión sustituyendo de esta forma el uso de Suero Fetal Bovino.

Se puede apreciar que desde la primera vez que se suplementó el medio de cultivo con suero de ternero al 25 % del total del suero animal utilizado, se obtuvo diferencias significativas ($p < 0.05$ en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls) en cuanto al crecimiento celular final alcanzado con respecto al control celular suplementado solo con suero fetal bovino (Figura 4).

La composición del medio de cultivo es hasta ahora el factor más importante en el cultivo de células animales. Las principales funciones de los medios de cultivo celulares son mantener el pH y la osmolaridad esenciales para la viabilidad celular y aportar los nutrientes y energía necesarios para el crecimiento y la multiplicación celular. La mayoría de los medios basales para cultivos celulares (como el MEMgaane) no permiten el crecimiento de células por sí mismos y es práctica común suplementarlos con sueros animales.

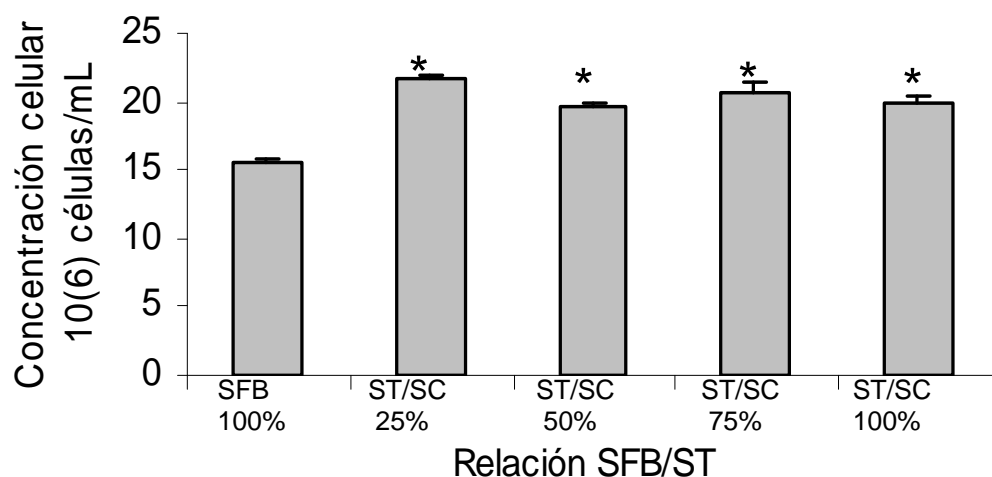


Figura 4. Efecto del Suero de Ternero Sin Calostro en el crecimiento celular en suspensión de

BHK21 C13. Son presentados los valores medios y sus errores estándar correspondientes a dos experimentos independientes.

(*) Significativo para una $p < 0.05$ en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls.

Estos suplementos son necesarios para añadir factores no identificados, pero esenciales para lograr un crecimiento celular eficiente (Cartwright, 1995). Desde 1981 Bird y colaboradores señalan que el suero de los animales más jóvenes promueve una mejor proliferación celular y es menos probable que contengan sustancias que interfieran en dicho crecimiento. El SFB es el más empleado en la EPVVB y el mundo, debido a que no contiene inmunoglobulinas y por tanto no inhibe la replicación de los virus en células cultivadas en medios que lo contienen. El medio de crecimiento debe contener, como regla general, 10 % de suero (Cartwright, 1995).

Los medios de cultivos celulares, como el usado en este estudio, pueden ser complementados con sueros de varias especies de animales, siendo los más utilizados los de la especie bovina (fetal, recién nacido o adulto), el de caballos, o el suero humano. Estos sueros difieren en sus composiciones y características y pueden tener efectos variables sobre las propiedades de las células cultivadas con ellos. Además, el suero varía de un animal a otro, por cambios en la dieta, y en temporada. Por lo tanto, existe una alta variabilidad de un lote a otro de los sueros disponibles en el mercado (Mathers y Roberts, 2002).

Si tenemos en cuenta la importancia de los sueros animales como suplemento de los medios de cultivos celulares y analizamos el porcentaje en gramos de proteínas totales aportadas por cada uno de los sueros animales empleados en este estudio: SFB (3-4.5 g) y ST/SC (4.5-6 g) (Catálogo Sigma-Aldrich, 2009), entonces los resultados obtenidos en este trabajo tendrían una mejor explicación. Se conoce que el suero aporta entre las proteínas totales factores nutritivos, hormonales y de crecimiento, imprescindibles para el mantenimiento del cultivo celular (Reina, 2003). Estos datos concuerdan con lo reportado por Mathers y Roberts en el año 2002 de la composición general de los sueros animales, planteando que la mayoría: proporcionan hormonas y factores de crecimiento necesarios para las funciones celulares, factores de adhesión (por ejemplo, la fibronectina, vitronectina, fetuína, etc), actúan como estabilizadores de pH, se unen e inactivan o secuestran materiales tóxicos, por ejemplo, compuestos orgánicos, metales traza, productos secretados por las células, etc., contienen proteínas de enlace que estabilizan y / o entregan hormonas y nutrientes a las células, proveen nutrientes, contienen inhibidores de proteasas, contienen

factores de diferenciación y apoyan el crecimiento de muchos tipos de células, incluyendo fibroblastos.

Este resultado está en concordancia con otros autores que han obtenido cultivos en suspensión de la línea BHK21 C13 suplementados con suero de ternero (Davis y cols., 1971; Prodafikas y cols., 2000; Pardo y cols., 2000).

Esta adaptación permite disminuir los costos de la producción ya que un frasco de SFB (inactivado a 56°C durante media hora) en presentación de 500 mL cuesta aproximadamente 308.20 USD, es decir, 268.13 CUC según Catálogo Sigma-Aldrich, 2009, necesitando para un envase de las células 1600 mL del suplemento celular. El suero de ternero utilizado en la EPVVB es un producto nacional que se obtiene a razón de 159.8 pesos equivalentes a 19.0 CUC y 140.8 MN para 800 mL del producto. Un envase de la sublínea celular de BHK21 C13 con suero de ternero ahorra entonces 766.39 CUC.

3.4 Crecimiento celular de la sublínea de BHK21 C13.

El estudio del perfil de crecimiento de las células de la sublínea BHK21 C13 comenzó con la propagación de las mismas en frascos erlenmeyer con 80 mL de medio. Se alcanzó la fase exponencial de crecimiento y continuó la misma hasta la aparición de la fase estacionaria o de meseta. La concentración celular inicial en el volumen de 80 mL fue de 1×10^6 células/mL. El estudio se extendió durante 120 horas obteniendo una curva típica de crecimiento en las condiciones experimentales establecidas (Figura 5).

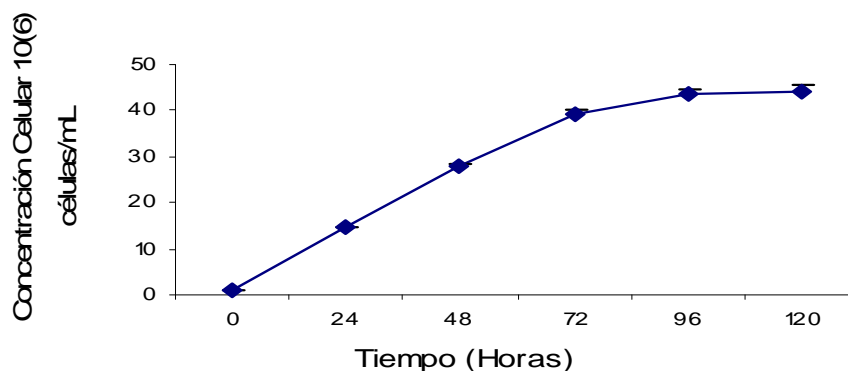


Figura 5. Crecimiento del cultivo en suspensión de BHK21 C13. Son presentados los valores medios y sus errores estándar correspondientes a dos experimentos independientes

La concentración celular aumentó aproximadamente hasta las 72 horas con una velocidad específica de crecimiento de 0.0275 h^{-1} manteniendo la fase exponencial, para comenzar la aparición de una aparente fase estacionaria o de meseta donde la concentración final máxima alcanzada fue de 44×10^6 células/mL. Este período de tiempo pudiera utilizarse para obtener las células del inóculo de los próximos envases ya que en este momento el número de células que mueren no es significativo con las que se están dividiendo al incrementar la población celular. Las células tomadas en esa fase de crecimiento muestran un período de latencia menor al ser subcultivadas porque no necesitan nueva síntesis de enzimas para el aprovechamiento de los nutrientes extracelulares ya que el medio de cultivo es el mismo (MEMgaane). Este resultado no difiere de lo reportado por otros autores, quienes también observaron similar comportamiento de células en suspensión de BHK21 C13 (Prodafikas y cols., 2000; Slivac y cols., 2006). Se conoce que las líneas celulares provenientes de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación (Mather J. and Roberts P., 2002).

La agitación del cultivo parece prolongar la fase logarítmica de crecimiento y posponer la fase estacionaria, debido a que disminuye el problema de la depresión temprana de la concentración de oxígeno disuelto y, probablemente, permite la oxidación de los ácidos orgánicos de desecho y la elevación del pH. Durante la realización de este trabajo no se realizó el control del pH; sin embargo, éste se mantuvo cercano a 7,2 según el control visual del color alcanzado por el medio de cultivo. Obregón y colaboradores, 1984, plantearon que el control de pH no es necesario en fermentadores pequeños, pero sí en fermentadores de mayor capacidad.

3.5 Replicación y titulación del virus EMC en la sublínea de BHK21 C13.

Para el estudio de la susceptibilidad viral de las células de la sublínea de BHK21 C13 en suspensión ante la replicación del V-EMC las mismas fueron cultivadas a una concentración inicial de 4×10^6 células/mL en un volumen de cultivo de 400 mL manteniendo las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Una vez tomadas las muestras de células a las 24, 48 y 72 horas y ser analizada la concentración de células viables en cada una de ellas, se evidenció que la misma comenzó a disminuir a partir de las 24 horas post infección lo cual está en concordancia con diversos autores que han replicado otros virus animales en este mismo tipo de células (Gaurina V. y cols., 2004; Slivac I. y cols., 2006).

Se obtuvo una disminución significativa de la concentración celular (p< 0.05 en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls) a partir de las 48 horas de la inoculación viral con respecto al control, no siendo así entre los dos tratamientos aplicados (dilución 10⁻¹ de V-EMC y V-EMC sin diluir) (Figura 6 y Tabla 3).

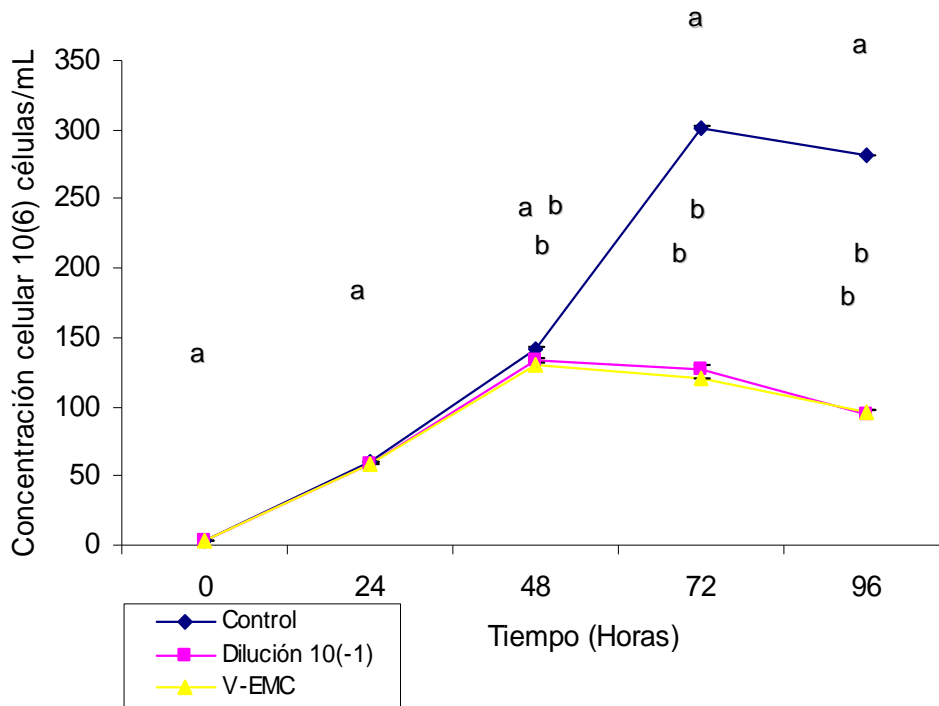


Figura 6. Concentración celular alcanzada durante replicación del V-EMC. Son presentados los valores medios y sus errores estándar correspondientes a dos experimentos independientes.

(a,b) significativo para una p< 0.05 en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls.

Tabla 3. Concentración celular (en 10⁶ células/mL) durante la replicación del virus EMC. Son presentados los valores medios correspondientes a dos experimentos independientes.

(a,b) significativo para una p< 0.05 en un Test de Comparación Múltiple Newman-Keuls

Tratamiento	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
Control negativo	60 ^a	142 ^a	301 ^a	281 ^a
Dilución 10 ⁻¹ Virus EMC	58 ^a	133.5 ^b	127.5 ^b	94 ^b

Virus EMC sin diluir	59 ^a	131 ^b	120.5 ^b	96 ^b
----------------------	-----------------	------------------	--------------------	-----------------

A las 24 horas la viabilidad celular disminuyó con respecto al control al 96.6 % para el tratamiento de la dilución 10⁻¹ del V-EMC y al 98.3 % para el tratamiento del V-EMC sin diluir, a las 48 horas disminuyó al 94 % y al 92.2 %, a las 72 horas al 42.3 % y al 40 %, mientras que a las 96 horas disminuyó al 33.4 % y 34.1 % para uno y otro tratamiento respectivamente.

Debido a la no aparición de diferencias significativas en el estudio de la concentración celular alcanzada entre los tratamientos aplicados (dilución 10⁻¹ de V-EMC y virus sin diluir), los estudios de titulación viral se realizaron con el tratamiento de la dilución 10⁻¹ del V-EMC en botellones de cristal de 20 L. Las Tablas 4, 5 y 6 corresponden a la aparición de los efectos citopáticos en los lotes experimentales del estudio una vez efectuadas las titulaciones virales en tubos de gradilla por el método de Reed y Muench (1938). La tabla 7 se corresponde con los títulos virales alcanzados por las diferentes muestras tomadas en dichos lotes durante el estudio.

Tabla 4. Aparición de los efectos citopáticos en las células de BHK21 C13 producto de la dilución 10⁻¹-del virus EMC en el primer lote experimental.

Muestra	Diluciones	Tiempo de observación			
		24h	48h	72h	96h
24h	-6	---	--+	+++	+++
	-7	---	---	--+	--+
	-8	---	---	---	---
	-9	---	---	---	---
48h	-6	---	-++	+++	+++
	-7	---	--+	-++	-++
	-8	---	---	--+	-++

	-9	---	---	---	---
72h	-6	+++	-++	+++	+++
	-7	-++	-++	+++	+++
	-8	--+	-++	+++	+++
	-9	--+	--+	-++	+++

+: Positivo
 -: Negativo

Tabla 5. Aparición de los efectos citopáticos en las células de BHK21 C13 producto de la dilución 10^{-1} del virus EMC en el segundo lote experimental.

		Tiempo de observación			
Muestra	Diluciones	24h	48h	72h	96h
24h	-6	---	-++	+++	+++
	-7	---	--+	+++	+++
	-8	---	---	-++	+++
	-9	---	---	---	--+
48h	-6	--+	-++	+++	+++
	-7	---	-++	+++	+++
	-8	--+	+++	+++	+++
	-9	---	---	-++	+++
72h	-6	-++	+++	+++	+++
	-7	--+	-++	+++	+++
	-8	--+	-++	+++	+++

	-9	---	-++	+++	+++
--	----	-----	-----	-----	-----

+: Positivo
 -: Negativo

Tabla 6. Aparición de los efectos citopáticos en las células BHK21 C13 producto de la dilución 10^{-1} del virus EMC en el tercer lote experimental.

Muestra	Diluciones	Tiempo de observación			
		24h	48h	72h	96h
24h	-6	--+	+++	+++	+++
	-7	---	---	+++	+++
	-8	---	---	+++	+++
	-9	---	---	---	--+
48h	-6	+++	+++	+++	+++
	-7	-++	-++	+++	+++
	-8	---	-++	+++	+++
	-9	---	---	-++	-++
72h	-6	+++	+++	+++	+++
	-7	-++	+++	+++	+++
	-8	---	-++	-++	+++
	-9	--+	--+	+++	+++

+: Positivo
 -: Negativo

Tabla 7. Títulos virales alcanzados en los lotes experimentales expresados en DICT₅₀/mL.

Lote 1	Título viral	Lote 2	Título viral	Lote 3	Título viral
Muestra a 24 horas	10 ^{8.26} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 24 horas	10 ^{8.28} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 24 horas	10 ^{8.39} DICT ₅₀ /mL
Muestra a 48 horas	10 ^{8.76} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 48 horas	10 ^{8.86} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 48 horas	10 ^{8.50} DICT ₅₀ /mL
Muestra a 72 horas	>10 ^{8.83} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 72 horas	>10 ^{8.64} DICT ₅₀ /mL	Muestra a 72 horas	>10 ^{8.86} DICT ₅₀ /mL

El título viral alcanzado hasta las 48 horas de la dilución 10⁻¹ del V-EMC en la muestra celular tomada durante el primer lote experimental, expresado en DICT₅₀/mL fue de 10^{8.76}. Se determinó a partir de la aparición en las células BHK21 C13 de los efectos citopáticos del virus, el cual provoca redondeamiento celular y eliminación de la adherencia del tejido a la superficie, mientras que el de la muestra tomada a las 72 horas fue de 10^{8.83} DICT₅₀/mL. En ambos casos el título alcanzado es mayor al obtenido originalmente en el Virus Semilla de Trabajo (10^{8.49} DICT₅₀/mL). En el caso del segundo y tercer lote experimental, los títulos virales alcanzados luego de la inoculación en las muestras de células tomadas a las 48 y 72 horas respectivamente también fueron mayores al título del Virus Semilla de Trabajo.

Este es un dato interesante pues plantea que a las 48 horas de inoculado el virus en el sistema en suspensión ya existe un número de células suficientes para soportar la replicación del agente biológico hasta alcanzar un título que esté acorde con la norma establecida para la producción de esta vacuna inactivada en cultivos estacionarios en la Tecnología de Producción de la misma en la empresa (Lorenzo F., 2002), el cual es $\geq 10^7$ DICT₅₀/mL.

Los títulos infecciosos de los antígenos obtenidos en las células en suspensión de BHK21 C13 fueron semejantes, lo cual indica que el ciclo de replicación del virus fue muy similar en los lotes experimentales para las muestras tomadas a las 48 y 72 horas. Este

resultado podría ser útil en la producción del antígeno EMC de la empresa al emplear el tratamiento de la dilución 10^{-1} . Esto representaría un ahorro en el Virus Semilla Maestro y el Virus Semilla de Trabajo, así como coleccionar el antígeno obtenido a las 48 o las 72 horas debido a la semejanza observada entre los títulos virales alcanzados y porque además cumplen con los requisitos de la norma de producción, lo cual está en concordancia con lo establecido por Laura Gómez y colaboradores en el año 1996 al patentizar la vacuna cubana bivalente inactivada de EMC y Aujeszky en cultivos estacionarios de BHK21 C13.

3.6 Beneficio económico de la aplicación de la sublínea BHK21 C13.

El plan anual de la vacuna EMC en Cuba es de 200000 dosis según indicaciones de los programas de inmunización del Instituto de Medicina Veterinaria (IMV). Cada lote producido de la vacuna EMC en la EPVVB aporta 40000 dosis por lo que se realizan 5 lotes anuales. Las células de la línea BHK21 C13 utilizadas para la replicación del virus EMC en cultivo estacionario son producidas en el Departamento de Cultivo de Tejidos. Esta producción es rutinaria realizándose tres envases semanales de la línea celular en frascos rolantes de poliestireno de 850 cm² de área (60 frascos por envase). El costo de producción de un frasco roller de células BHK21C13 por el método de cultivo estacionario está fijado en la Ficha Para Precios y sus Componentes en Pesos Convertibles (Anexo IV) en 50.7352 pesos equivalentes a 9.4892 CUC y 41.2460 MN.

La ficha de precios propuesta para la producción de un envase de la sublínea de BHK21 C13 en suspensión, en la presentación de botellones de cristal de 20 litros, plantea que producir un botellón cuesta 1779.29 pesos equivalentes a 454.78 CUC y 1324.78 MN. Analizando entonces el costo de la producción de un envase de las células por ambos métodos de cultivo se tiene que se ahorran en cada envase por el método de cultivo celular en suspensión 1264.71 pesos equivalentes a: 1150.26 MN y 114.572 CUC (Tabla 8). Anualmente serían: 34507.8 MN y 3437.16 CUC.

Tabla 8. Costo de producción de un envase de células de BHK21 C13.

	Consumo Total por envase	Equivalente en MN	Equivalente en CUC
Método tradicional	3044	2474.76	569.352

Método suspensión	1779.29	1324.50	454.78
-------------------	---------	---------	--------

Este ahorro se puede analizar de mejor manera comparando los Conceptos de Gastos de las Fichas de Precios de los envases de la línea BHK21 C13 por ambos métodos en diferentes apartados como por ejemplo el destinado al Consumo de Materias Primas y Materiales Fundamentales (Tablas 9 y 10):

Tabla 9. Consumo Materias Primas y Materiales Fundamentales en el envase de la línea celular BHK21 C13.

Consumo Materias Primas y Materiales Fundamentales							
Producto: Línea Celular BHK21C13							
Presentación: frascos de 2000ml/400ml							
INSUMO	UM	Cant. a Elaborar	NOR BRUT		PRECIOS		TOTA L
			MN	CUC	MN	CUC	
MEM A Frascos de 1000ml/ 900ml	U	30	22,9875	12,45 94	689,62 50	373,78 20	1063,4 07
Suero de ternero S/C Frascos de 1000ml/ 800ml	U	7	140,834 1	19,03 57	985,83 87	133,24 99	1119,0 88
Sol. Bicarbonatada 7,5% Frascos de 100ml	U	2,000	0,9358	0,492 8	1,8716	0,9856	2,8572
Solución PBS Frascos de 500ml/ 500ml	U	6,000	18,0847	0,839 1	108,50 82	5,0346	113,54 28
Tripsina + Versene 100 ml con 80 ml	fco	4,000 0	13,4377	2,404 2	53,750 8	9,6168	63,367 6
Tripan Azul	Lts	20	2,0009	0,266 7	40,018 0	5,3340	45,352 0
Combiótico Frascos de 100ml /60ml	fco	5	2,0154	3,086 7	10,077 0	15,433 5	25,510 5
Sub Total materias primas					1889,6 893	543,43 64	2433, 125
Total unitario materias primas					26,995 6	7,7634	34,75 89

Tabla 10. Consumo Materias Primas y Materiales Fundamentales en el envase de la sublínea celular BHK21 C13.

Consumo Materias Primas y Materiales Fundamentales							
Producto: Sublínea Celular BHK21C13							
Presentación: Botellón de cristal 20 litros de suspensión							
	Cant. a Elaborar				1		
INSUMO	UM	NOR BRUT	PRECIOS		IMPORTE		TOTAL
			MN	CUC	MN	CUC	
MEM A Frascos de 1000ml/ 900ml	U	23	24,247	14,05 43	557,68	323,25	880,93
Suero de ternero S/C Frascos de 1000ml/ 800ml	U	2	135,181 7	30,24 34	310,92	69,56	380,48
Sol. Bicarbonatada 7,5% Frascos de 100ml	U	2,000	7,3487	1,056 9	14,70	2,11	16,81
Combiótico Frascos de 100ml /60ml	fco	4	8,8721	4,999 4	35,49	20,00	55,49
Sub Total materias primas					918,78 47	414,92 01	1333,704 8
Total unitario materias primas					918,78 47	414,92 01	1333,704 8

En este ahorro económico de la producción de células también influyen otros apartados de la Ficha Para Precios y sus Componentes en Pesos Convertibles como son: Salario, Consumo de Energía, Combustible y Lubricantes, Consumo de Agua, Otros Gastos de Elaboración, Coeficientes y Otros Gastos Directos como por ejemplo el uso disminuido de: gasa, papel kraft, cono de hilo, formaldehído, permanganato de potasio, alcohol, papel cromado, propilenglicol, cloruro de benzalconio, fregado de frascos, detergente para cultivo celular, guantes quirúrgicos y algodón.

Además esta variante permite obtener en una semana el número de células necesarias que soporten la replicación viral para la formulación de dos lotes de vacuna, mientras que por el método de cultivo estacionario tradicional la obtención de las células para formular dos lotes de vacuna demora entre 5 y 6 semanas. El cálculo de la productividad en la formación de células de BHK21 C13 utilizando ambos métodos de cultivo fundamenta estos resultados.

Productividad = $\Delta X/\Delta t$

Donde: X= Concentración biomasa celular

t= tiempo de producción (horas)

Método tradicional: Pr = 0.075×10^6 células mL⁻¹/h

Método suspensión Pr = 2.9×10^6 células mL⁻¹/h

De estos resultados se desprende que existe una mayor productividad en la formación de células de la línea BHK21 C13 mediante el cultivo en suspensión en comparación con el método de cultivo estacionario tradicional. Esta diferencia está fundamentada en la diferencia del número celular, mejor regulación del pH y mejor mezcla del oxígeno disuelto (Slivac I. y cols., 2006). De esta manera podrían obtenerse en un mes las células necesarias para cumplir con el plan anual de producción de la vacuna EMC y comenzar entonces la producción de los planes de otras vacunas del área en la EPVVB, LABIOFAM.

5. Discusión General

La Encefalomiocarditis Porcina viral (EMC) es una enfermedad producida por un virus perteneciente al género *Cardiovirus* de la familia *Picornaviridae* (Regenmortel y cols., 2000). El Virus de la Encefalomiocarditis (V-EMC) presenta una distribución mundial y puede causar pérdidas económicas muy graves en brotes de animales de granja (Castillo R., 2010). En Cuba la EMC viral es considerada una enfermedad enzoótica (Lorenzo F., Resultado no Publicado), por lo cual es obligatorio contar con un programa de vacunación de toda la masa porcina nacional (estatal y del sector privado), evitando así la pérdida económica que representaría un brote de la enfermedad.

La alta demanda de la producción de vacunas en la industria requiere de sistemas de bioproducción estables y de alto rendimiento, así como de la implementación de nuevas tecnologías (Slivac y cols., 2006). Las líneas celulares continuas o establecidas pueden crecer en suspensión para la producción a gran escala lográndose mejor adaptación (Martínez V., 2007).

En este trabajo se evaluó la replicación del (V-EMC) en una sublínea en suspensión de BHK21 C13 como una alternativa para la obtención de mayores volúmenes del antígeno viral para la formulación de la vacuna EMC. Este estudio sería el primer caso donde se reporte a la comunidad científica el uso de células de BHK21 C13 en suspensión para el cultivo del V-EMC, no solo en Cuba sino en el mundo. Para lograr el cumplimiento de este objetivo fue necesario adaptar las células de la línea BHK21 C13 al crecimiento en suspensión en el

medio MEMgaane y al crecimiento suplementado con suero de ternero sin calostro (ST/SC), evaluar el perfil de crecimiento en suspensión de las células de la sublínea BHK21 C13 y titular la replicación del Virus de la Encefalomiocarditis Porcina (V-EMC) en las mismas.

Las células de BHK21 C13 fueron adaptadas satisfactoriamente al crecimiento en suspensión en el medio MEMgaane aproximadamente a partir del tercer subcultivo realizado. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores que han adaptado la línea celular BHK21 C13 al crecimiento en suspensión a lo largo de los años para la replicación de diferentes virus de animales (Capstick y cols., 1962; Radlett y cols., 1985; Perrin P. y cols., 1995; Gaurina y cols., 2004).

Las células de BHK21 C13 fueron adaptadas también al crecimiento en suspensión suplementado con Suero de Ternero Sin Calostro lo que nos permite ahorrar 766.39 CUC por envase al sustituir el uso del Suero Fetal Bovino. Este resultado concuerda con los reportados por otros autores que han obtenido cultivos en suspensión de la línea BHK21 C13 con este tipo de suero pero para suplementar el crecimiento de virus diferentes al V-EMC (Davis y cols., 1971; Prodafikas y cols., 2000; Pardo y cols., 2000).

Las células de la sublínea BHK21 C13 mantuvieron un crecimiento exponencial en suspensión durante 72 horas con una velocidad específica de crecimiento de 0.0275 h^{-1} para comenzar la aparición de una aparente fase estacionaria o de meseta. La concentración final máxima alcanzada fue de 44×10^6 células/mL en 80 mL de medio lo que las hace útiles para obtener grandes biomasas celulares para la producción de antígenos virales. Este período de tiempo pudiera utilizarse para obtener las células del inóculo de los próximos envases. Las células tomadas en esa fase de crecimiento muestran un período de latencia menor al ser subcultivadas porque no necesitan nueva síntesis de enzimas para el aprovechamiento de los nutrientes extracelulares ya que el medio de cultivo es el mismo (MEMgaane). Este resultado no difiere de lo reportado por otros autores, quienes también observaron similar comportamiento de células en suspensión de BHK21 C13 (Prodafikas y cols., 2000; Slivac y cols., 2006). Con este nuevo método de cultivo celular se puede obtener en una semana el número de células necesario para realizar dos lotes de la vacuna inactivada contra el V-EMC.

Los títulos infecciosos de los antígenos obtenidos en las células en suspensión de BHK21 C13 fueron semejantes, lo cual indica que el ciclo de replicación del virus fue muy similar en los lotes experimentales para las muestras tomadas a las 48 y 72 horas. A las 48 horas de inoculado el virus en el sistema en suspensión ya existe un número de células suficientes que permiten la replicación del agente biológico hasta alcanzar títulos acordes con la norma de

producción establecida para esta vacuna inactivada en cultivos estacionarios en la Tecnología de Producción de la misma en la EPVVB (Lorenzo F., 2002), la cual es $\geq 10^7$ DICT₅₀/mL.

Los títulos virales alcanzados a las 72 horas de realizados los lotes experimentales estuvieron entre $10^{8.64}$ y $10^{8.86}$ DICT₅₀/mL. El antígeno para formular la vacuna EMC se pudiera colectar a las 48 o las 72 horas en la EPVVB, LABIOFAM, utilizando para la replicación deL virus células en suspensión de la sublínea de BHK21 C13.

La aplicación de estos resultados permitirá ahorrar una considerable suma de dinero por concepto de la no utilización de materiales y reactivos necesarios en la producción de cultivos celulares por métodos de cultivo estacionarios (34507.8 MN y 3437.16 CUC anuales). Además se podría lograr un aumento en la productividad, ya que disminuiría a una semana el tiempo de producción de las células necesarias para la realización de 2 lotes de vacuna contra la Encefalomiocarditis Porcina cuando por el método tradicionalmente usado se requieren 6 semanas.

Con el incremento en la producción del antígeno viral EMC en la EPVVB aumentaría proporcionalmente la formulación de esta vacuna. Esto podría permitir con una adecuada distribución del producto abastecer al sector estatal nacional y también a aquellos agricultores privados que normalmente no obtienen la vacuna. Por otro lado el costo de la vacuna pudiera disminuir haciéndola más accesible a los posibles compradores. Así la enfermedad se pudiera mantener controlada de una mejor manera, con una baja incidencia y sin provocar pérdidas económicas significativas.

Anexo I "Técnica de Congelación"

- Rotular cada ampula de congelación señalando:

Nombre de la línea celular

Subcultivo

Fecha

Persona que realiza la congelación.

- Tomar del frasco muestra para analizar viabilidad y concentración celular en Cámara de Neubauer.
- Realizar cálculos para congelar las células entre $2-4 \times 10^6$ células/ mL aplicando Ley de la Volumetría.
- Añadir a las células el ST/SC y el agente criopreservante DMSO (dimetilsulfóxido) al 10 % del volumen final.

- Homogenizar al añadir el ST/SC.
- Añadir el DMSO con pipeta, dejándolo caer gota a gota sobre el frasco (suspensión de células) agitando y en hielo.
- Homogenizar y distribuir 1 mL por ampula.
- Colocar las ampulas 30 minutos en el congelador de refrigerador.
- Colocarlas en una poli espuma recubierta a temperatura de -80°C por 24 horas.
- Al día siguiente pasarlas a nitrógeno líquido.

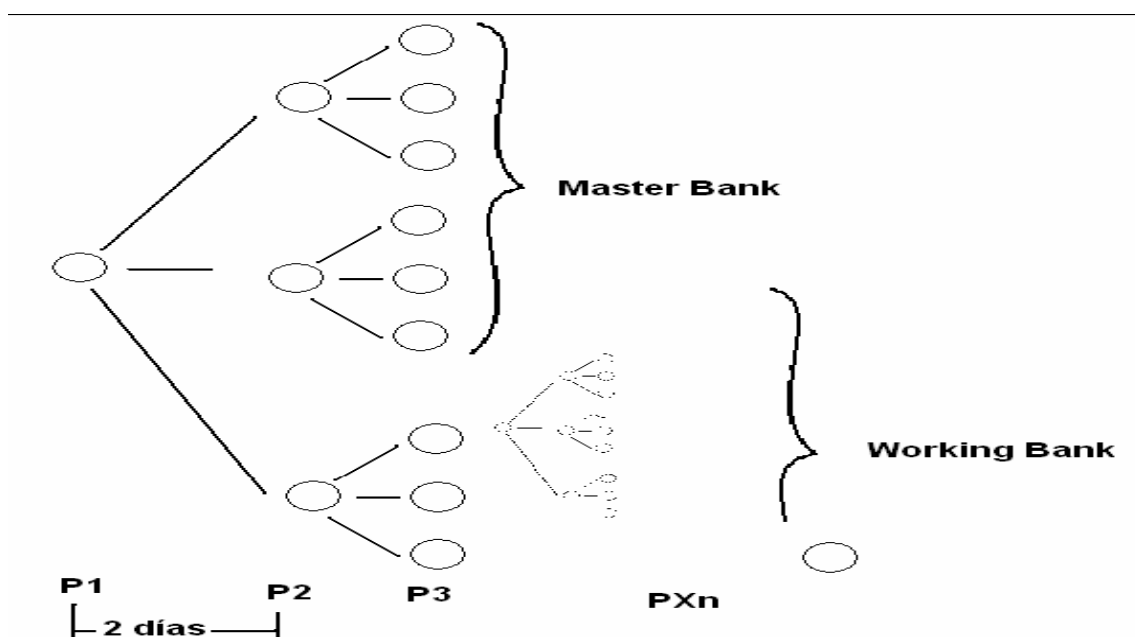
Registrado en la libreta de congelaciones del laboratorio:

- Nombre de la línea
- Sub-cultivo
- Fecha
- Persona que realiza la congelación.
- No. de ampulas
- Ubicación en el tanque de nitrógeno

Nota: Dejar 0.1 mL de suspensión para prueba de esterilidad. (Añadir 0.1 mL en caldo tioglicolato, incubar a 37 °C durante 2-3 semanas y observar)

Anexo II "Realización de banco de células"

En la figura a continuación se observa la idea de subcultivo y congelamiento con el fin de obtener un Banco Maestro (el que se guarda) y un Banco de Trabajo (que corresponde a las células que se van descongelando cuando son necesarias); las células del Banco de Trabajo son de un mayor pasaje que las del Banco Maestro.



Referencias Bibliográficas

1. Acha, P., Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, Washington, Segunda Edición, 1986, pp. 361-363.
2. Agirre A., Barco A., Carrasco L. Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. J Biol Chem., 2002; 277:40434-40441.
3. Aldabe R., Barco A., Carrasco L. Membrane permeabilization by poliovirus proteins 2B and 2BC. J Biol Chem., 1996; 271:23134-23137.
4. Animals and animal products. Code of Federal Regulations, 2002, Volume 1, January 1.
5. Atmar RL, Englund JA. Laboratory methods for the diagnosis of viral diseases. En: Evans AS, Kaslow RA, eds. Viral Infections of Human Epidemiology and Control. 4ta ed. New York: Plenum Medical Book; 1997; pp. 59-88.
6. Barco A., Carrasco L. Identification of regions of poliovirus 2BC protein that are involved in cytotoxicity. J Virol 1998; 72:3560-3570.
7. Bird BR, Forrester FT. Basic laboratory techniques in cell culture. Atlanta: US Department of Health and Human Services (CDC); 1981.
8. Camire J. Chinese hamster ovary cells for the production of recombinant glycoproteins. Art to Science 2000; 19(1):4-6.
9. Campos T., Acosta P., Moreno S., Peña X., Calderón R., González S. Importancia de la producción nacional de productos biológicos para la sostenibilidad de los programas de control en la prevención de epizootias. Rev. LABIOFAM; 2010; Numero 1, pp. 8-12.
10. Cartwright T., Shan GP. Culture media. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford: Oxford University Press; 1994; pp.57-91.
11. Castillo R. Detección del virus de encefalomiocarditis en roedores de diferentes zonas del Perú. Tesis para optar al grado académico de Magíster en Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima-Perú, 2010.
12. Che T., Wen W., Hu W., Jian J. Bioreactors, Cell Culture, Commercial Production. Enciclopedia de Biotecnología Industrial: Bioprocesos, Bioseparación y Tecnología celular. Wiley Online, 15 April 2010.
13. David M. and Peter M. Fields Virology. 5th Edition, 2007, Volume one, pp.280.
14. David M. and Peter M. Fields Virology. 5th Edition, 2007, Volume one, pp. 802.

15. David M. and Peter M. Fields Virology. 5th Edition, 2007; Volume one, pp. 826.
16. De Robertis EPD, De Robertis E. M. F. Biología celular y molecular. La Habana: Edición Revolucionaria; 1998; pp. 1-5.
17. Echeverri A., Banerjee R., Dasgupta A. Amino-terminal region of poliovirus 2C protein is sufficient for membrane binding. *Virus Res*; 1998; 54:217-223.
18. European Pharmacopeia 5.8: Mycoplasmas. Appendix 2.6.7;2007.
19. Farmacopea Británica, Appendixx XVI B; 1998,pp: A17 a A19 .
20. FDA. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. USA: FDA; 1993.
21. Forss S., Schaller H. A tandem repeat gene in a picornavirus. *Nucleic Acids Res.*,1982; 10:6441-6450.
22. Freshney I. Culture of Animal Cells: a manual of basic technique. Alan R. Liss, 1987; pp. 134.
23. Gaurina V., Cajavec S., Sladic D. and Kniewald Z. BHK 21 C13 cells for Aujeszky's disease virus production using the multiple harvest process. *Cytotechnology*, 2004; 45: 101-106.
24. Gómez L., Trujillo N., Lorenzo F., Louis K. Patente cubana de la Vacuna bivalente inactivada de EMC y Aujeszky. Publicación # CU22464 A1, 1996.
25. González ME, Carrasco L. Viroporins. *FEBS Lett.*, 2003; 552:28-34.
26. Grachev V: "World Health Organization attitude concerning the use of continuous cell lines as substrate for production of human virus vaccines", in Mizrahi A (ed): *Advances in Biotechnological Processes Viral Vaccines*. Wiley-Liss, 1990; 14: 37-67.
27. Guajardo U. Encefalomiocarditis viral porcina. *Monografías de Medicina Veterinaria*, 1990; Vol.12 (2).
28. Hahn H., Palmenberg AC. Encephalomyocarditis viruses with short poly(C) tracts are more virulent than their mengovirus counterparts. *J Virol* 1995; 69:2697-2699.
29. Hermoso L., Menéndez A. Multiplicación masiva del café (coffea arabica L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Cient. Venezolana*; 2000; 51(2):90-95.
30. Hernandez R. and Brown D. Growth and Maintenance of Baby Hamster Kidney (BHK) Cells. *Current Protocols in Microbiology*, 2010, May.
31. Herold J., Andino R. Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell*, 2001; 7:581-591.
32. Huber SA. VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells. *J Virol.*, 1994; 68:3453-3458.

33. Jawest E, Melnick J, Adelberg E, Brooks G, Butel J, Ornston N. Microbiología Médica. Decimo cuarta Edición, Ed El Manual Moderno. Mexico, D.F., 1996. pp. 505-521.
34. Jurgens CK, Barton DJ, Sharma N, et al. 2Apro is a multifunctional protein that regulates the stability, translation and replication of poliovirus RNA. *Virology*, 2006; 345:346-357.
35. Klein M., Hadaschik D., Zimmermann H., et al. The picornavirus replication inhibitors HBB and guanidine in the echovirus-9 system: the significance of viral protein 2C. *J. Gen. Virol.*, 2000; 81:895-901.
36. Kluivers M., Maurice H., VYT P., Koenen F., Nielen M. Transmission of encephalomyocarditis virus in pigs estimated from field data in Belgium by means of R0. *Vet. Res.*, 2006, Vol. 37, 757-766.
37. Lama J., Sanz MA, Carrasco L. Genetic analysis of poliovirus protein 3A: characterization of a non-cytopathic mutant virus defective in killing Vero cells. *J Gen Virol.*, 1998;79 pp:1911-1921.
38. Lee YF, Nomoto A, Detjen BM. A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74:59-63.
39. Leibovitz, A. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere, *Am. J. Hyg.* 1963; 78:173-180.
40. López D. Obtención de la sublínea CLA-HT. Estudio de su sensibilidad para el aislamiento y multiplicación de los virus del dengue. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Master en Virología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí", 2010.
41. Lorenzo F. Tecnología de Producción de la Vacuna Inactivada contra la Encefalomiocarditis viral (EMC-V). LABIOFAM, 2002, hoja 19.
42. Lorenzo F. Tecnología de Producción de la Vacuna Inactivada contra la Encefalomiocarditis viral (EMC-V). LABIOFAM, 2002, hoja 26.
43. Macpherson I., Stoker M. Polyoma transformation of hamster cell lines, an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology* 1962; 16:147-151.
44. Martínez V. Optimización del cultivo de células HEK 293 en suspensión para su crecimiento y producción de adenovirus. Univ Chile, Dpto Ing. Qca y Biotec., Agosto 2007.
45. Mather J. and Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. Genentech Inc. South San Francisco, California, 2002; pp. 1-3.
46. Mather J. and Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. Genentech Inc. South San Francisco, California, 2002; pp. 53.

47. Mather J. and Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. Genentech Inc. South San Francisco, California, 2002; table 8.1, pp. 130.
48. Mather J. and Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. Genentech Inc. South San Francisco, California, 2002; pp. 182.
49. Mather J. and Roberts P. Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and Technique. Genentech Inc. South San Francisco, California, 2002; pp. 183.
50. Morier L, Camacho DE, Guzmán MG, Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue 2 en líneas celulares de mosquitos. Rev. Cubana Med. Trop, 2000; 52(3): 215-9.
51. Morier L, Gómez M, Rodríguez Juan J, Pérez L. obtención Y caracterización de una línea celular diploide de riñón humano. Rev. Cubana Med. Trop. 2004; 56(1): 42-8.
52. Murrey P., Rosenthal K., Kobayashi G., Pfaller M. Microbiología Médica, cuarta edición, Ed Elsevier. Barcelona España. 2002; pp. 503-513.
53. Obregón J., Ramos P., Aponte J., Conde N. Cultivo de células BHK₂₁ Clon 13 en suspensión: construcción y operación de un fermentador experimental. Veterinaria Tropical 1984; 09: 3-15.
54. Obregón J., Ramos P. Producción de antígenos inactivados del Virus de Estomatitis Vesicular a partir de cultivos celulares de BHK 21 C13 en suspensión. Veterinaria Tropical 1997; 22(1): 13-29.
55. Pardo G., Almora E., Fidalgo O., Zamora A., Rodríguez N. y Pérez E. Ensayo in vivo para determinar agentes extraños en células BHK-21 empleadas en la obtención de biológicos. VacciMonitor. 2000; 28 Abril-junio.
56. Perrin P., Madhusudana S., Gontier C., Petres S., Tordo N., Merten O. An experimental rabies vaccine produced with a new bhk-21 suspension cell culture process : use of serum-free medium and perfusion-reactor system. Vaccine, 1995; vol. 13, pp. 1244-1250.
57. Prodafikas G. and Plasvic M. Effects of medium supplements on BHK21 cell growth and bluetongue virus production. Focus, 2000, vol: 22, numero: 2.
58. Puck T. and Marcus P. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: The use of x-irradiated cells to supply conditioning factors, Proc. Natl. Acad. Sci. 1955; USA 41:432-437.
59. Radlett P., Pay T. and Garland A.J. The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot and mouth disease vaccines over a twenty year period. Develop. Biol. Standard. 1985; 60: 163-170.
60. Reed, L. and Muench M. A simple method for stimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg. 1938; 27:493-497.

61. Stability testing of new biotechnological/biological veterinary medicinal products. VICH GL17(stability 4), june 2000.
62. Suárez H., Jacome R., Delgado M., Lorenzo F., Peláez R., Peláez C. Encefalomiocarditis en la provincia Ciego de Ávila, Cuba. Rev. Avances en ciencias Veterinarias, 1995; Vol. 10, No. 2.
63. Van Regenmortel M., Fauquet C., Bishop D., Carstens E., Estes M., Lemon S., Maniloff J., Mayo M., Mc Geoch D., Pringle C., Wickner R. Virus Taxonomy, 7th edition, Academic Press, USA, 2000; pp. 667–669.
64. Sing KRK. All culture derived from larvae of Aedes aegyptis (L). Current Science 1967; 19, pp. 506-508.
65. Slivac I, Gaurina V, Radošević K. Aujeszky's disease virus production in disposable bioreactor. Biosci. 2006; 31(3), September, pp.363–368.
66. Pérez M. Preparación y caracterización de un Banco Maestro de células CHO para la producción de Eritropoyetina Humana Recombinante. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Master en Virología, Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 2007.
67. Shafren DR, Dorahy DJ, Ingham RH, et al. Coxsackie virus A21 binds to decay-accelerating factor but requires intercellular adhesion molecule 1 for cell entry. J Virol. 1997; 71:4736-4743.
68. Suárez M., R. Jacome, Delgado M., F. Lorenzo, Peláez R., Peláez C. Encefalomiocarditis en la provincia Ciego de Ávila, Cuba. Rev. Avances en Ciencias, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, 2010.
69. Tully, J. Gand Razin, S. Methods in Mycoplasmaology. Iiedition Academic Press. New York and London, 1983; 155 - 203.
70. Van Kuppeveld FJ, Galama JM, Zoll J. Coxsackie B3 virus protein 2B contains cationic amphipathic helix that is required for viral RNA replication. J Virol 1996; 70:3876-3886.
71. Van Kuppeveld FJ, Melchers WJ, Kirkegaard K. Structure-function analysis of coxsackie B3 virus protein 2B. Virology 1997; 227:111-118.
72. Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Virus Taxonomy 2008. Disponible en: <http://www.ictvonline.org/index.asp>.
73. Waymouth, C. Major ions, buffer systems, pH, osmolality, and water quality, in: The Growth Requirements of Vertebrate Cells in Vitro (C. Waymouth, R. Ham, and P. Chapple, eds.), 1981; pp. 105-117, Cambridge University Press, New York.
74. Wigley CB. The cell culture laboratory. En: Davis JM, ed. Basic cell culture: a practical approach. Oxford University Press, 1994; pp. 1-26.

75. WHO Technical Report series N^o745. Annex 3. Requirements for continuous cell lines used for biological production, in WHO Expert Committee on Biological Standardization. Thirty-sixth Report. Geneva, World Health Organization 1987.
76. WHO Technical Report series N^o747. Acceptability of cell substrates for production of biological. Report of a WHO Study Group. Geneva. World Health Organization 1987.
77. WHO Technical Report series N^o878. Annex 3. Requirements for the use of animal cell as in vitro substrates for the production of biologicals. World Health Organization 1998.
78. Reigosa M. y Rodríguez A. Historia de los Cultivos de Tejidos. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Asociación Ciencia Hoy, 1999; Vol. 9, Nº 52 Mayo/Junio.
79. Zambrano Y., Ventura R. y Demey R. Tiempo óptimo para el cambio de medio en suspensiones celulares de cuatro cultivares de caña de azúcar *Saccharum spp.*: B6749, CP5659, V58-4 y V64-10. *Agronomía Trop.*, 1994; 2: 147-202.
80. Zimmerman J., Schwartz K., Simonson R., Carlson J. Influence of dose and route on transmission of encephalomyocarditis virus to swine. *J Vet Diagn Invest.*, 1993; 5:317-321.

REDVET: 2013, Vol. 14 Nº 2

Recibido 22.12.2011 / Ref. prov. DIC11119B_RED VET / Revisado 17.05..2012
Aceptado 03.08.2012 / Ref. def. 021321_RED VET / Publicado: 01.01.2013

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010113.html>
concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n020213/021310.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET®-
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet>