

Ensayo *in vitro* para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de trabajo

Georgina Pardo, Ernesto Almora, Odalys Fidalgo, Arelys Zamora, Niurka Rodríguez y Ela María Pérez.

Instituto Finlay. Centro de Investigación–Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail:gpardo@finlay.edu.cu

Actualmente las colecciones de cultivos de tejidos son consideradas valiosas fuentes de material biológico para la investigación, diagnóstico y producción, sin embargo se hacen realmente útiles cuando las mismas están bien organizadas, caracterizadas y manipuladas como Bancos Celulares Maestros y de Trabajo, en dependencia de la dirección de los objetivos de trabajo. Las agencias reguladoras en todo el mundo consideran el establecimiento de Bancos Celulares Maestros y de Trabajo siguiendo las Buenas Prácticas de Fabricación vigentes y los “Puntos a Considerar en la Caracterización de Líneas Celulares utilizadas en la Producción de Biológicos”. El objetivo de este trabajo fue determinar que un Banco Celular de Trabajo (BCT) obtenido en nuestro laboratorio estaba libre de agentes adventicios, para lo cual se realizó la observación a través del microscopio óptico y electrónico para visualizar morfología y presencia de retrovirus, se verificó la ausencia de contaminación bacteriana, fúngica y de micoplasmas; además se buscó presencia de otros agentes adventicios utilizando tres sistemas de cultivo celular. La morfología de las células fue pseudofibroblástica como está reportado para esta línea, el Banco Celular está exento de bacterias, hongos y micoplasmas y los resultados de la prueba de agentes extraños fueron negativos, la observación al microscopio electrónico no reveló partículas tipo A y tipo C de retrovirus. Como conclusión podemos decir que el Banco Celular de Trabajo cumple con las regulaciones establecidas y pudiera ser empleado en la producción de vacunas veterinarias.

Palabras claves: Banco Celular de Trabajo, BHK- 21, caracterización.

Introducción

El amplio uso de las líneas celulares y su utilización para la producción de biológicos es cada vez más creciente, por lo que se hace necesario tener un mayor conocimiento de estos substratos (1).

Dentro de los aspectos más interesantes de los controles que se plantea realizar a las líneas celulares, se encuentran la determinación de la presencia de bacterias, hongos, micoplasmas, virus extraños, morfología, viabilidad y la multiplicación de la línea en las condiciones de almacenamiento establecidas (2, 3).

La línea celular BHK-21 C13 se derivó en 1961 de riñones de cinco hámster sirio recién nacidos. Como características fundamentales esta línea posee rápido crecimiento, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo como la mayoría de las líneas de células continuas. Está constituida por células pseudo fibroblásticas y es una línea pseudodiploide con tetraploidia al 4% ($2n=44$). La BHK-21 es un excelente substrato para la producción de varios virus como el adenovirus, vaccinia, herpes simplex, estomatitis vesicular y rabia, entre otros (4).

Materiales y Métodos

Banco Celular de Trabajo (BCT): Se conformó por 150 ámpulas que corresponden al pase 85 de la línea celular BHK-21 C-13 provenientes del pase 76 de esta línea en la Colección Americana de Cultivos Celulares (ATCC).

Disociación de las monocapas: Fue empleado el método de dispersión enzimática utilizando tripsina al 0,25% en solución al 0,02% de ácido etiléndiamino tetracético (5).

Conteo de células viables: El porcentaje de viabilidad de las células se determinó por el método de exclusión con tripán azul al 0,4% en solución salina fisiológica al 0,85%, y se contaron utilizando una cámara de Fusch Rosenthal y se determinó el porcentaje de viabilidad (6). Se le realizó a 7 ámpulas de células del BCT (aproximadamente 5% del total de ámpulas del BCT) (1).

Caracterización morfológica: Se sembraron frascos de cultivo de 75 cm² con células del BCT y se observaron diariamente al microscopio óptico, hasta que se obtuvo la confluencia de las monocapas.

Por otra parte, se sembraron células en tubos Leighton y a las 24 horas el medio sobrenadante fue descartado y se procedió a lavar las monocapas con Solución Salina Tamponada, se fijó con formalina y se tiñeron las células con hematoxilina-eosina y Giemsa (7), para estudiar su morfología y evidenciar cualquier anomalía celular.

Observación al microscopio electrónico: Se sembraron 107 células del BCT en frascos de cultivo con una superficie de crecimiento de 75 cm² y luego de 48 horas se procesaron las células para fijación e inclusión según la Técnica de Microscopía Electrónica de Transmisión descrita por Spurr (8). La observación de los cortes ultrafinos se realizó con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 2000 EX, a 80 kv. Las magnificaciones empleadas para las observaciones fueron de 4 000X, 5 000X, 8 000X y 15 000X.

Pruebas de esterilidad: 20 mL del sobrenadante de los cultivos celulares derivados de 6 ámpulas del BCT se probaron para determinar la ausencia de contaminantes tales como: bacterias, hongos y levaduras, siguiendo el Procedimiento Normalizado de Operación 12,020 del Instituto Finlay (9).

Determinación de micoplasmas: Para la realización de esta prueba se utilizó un volumen de 20 mL del sobrenadante de los cultivos celulares derivados de seis ámpulas del BCT mantenidos en cultivo durante 15 días sin antibióticos que fueron enviados al CENSA, donde se utilizaron el método directo de cultivo (medios líquido y sólido) (10) y el método indirecto por hibridación de ácidos nucleicos (11).

Determinación de agentes extraños

Procedimiento de lisis celular: Se utilizaron 107 células en suspensión de una mezcla de seis ámpulas pertenecientes al BCT, las cuales fueron congeladas y descongeladas sucesivamente tres veces, se centrifugaron a 100 g durante 20 min y el medio sobrenadante resultante fue utilizado para la inoculación de cada uno de los sistemas empleados para las pruebas *in vitro*. El sedimento formado por los detritus celulares fue desechado.

Pruebas *in vitro*

Células empleadas

- Se utilizaron monocapas confluentes de células BHK-21 C-13 pase 86 en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie, cultivadas en medio de crecimiento GMEM suplementado con SBF al 10% y Triptosa Fosfato al 10%.
- Monocapas confluentes de células Vero (riñón de mono verde africano, *Cercopithecus aethiops*) procedentes de la ATCC pase 119, crecidas en frascos de 25 cm² de superficie, cultivadas en medio de crecimiento 199 suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF).

- Monocapas confluentes de células MRC-5 (células diploides de pulmón humano) procedentes de la ATCC pase 28 crecidas en frascos de 25 cm² de superficie, en medio Eagle Diploide suplementado con 10% de SBF.

Determinación de virus citopáticos: Tres frascos de cada línea celular fueron inoculados con el producto de la lisis del BCT y otros tres frascos de cada línea con sobrenadante de las células del BCT cultivadas a 37 °C; se dejaron tres frascos de cada línea como control. La morfología de los cultivos celulares incluyendo los controles se observó durante dos semanas, buscando efecto citopático y cualquier otro cambio en las mismas.

Tres frascos de cada línea se inocularon con cepa Edmoston del virus de sarampión como control positivo y se incubaron durante seis días.

Determinación de virus hemaglutinantes y hemadsorbentes: Al final del período de observación de la aparición de efecto citopático (ECP), cada uno de los sobrenadantes de los frascos de cultivo se sometieron a la determinación de virus hemaglutinantes y las monocapas fueron utilizadas para la determinación de virus hemadsorbentes.

Para el ensayo de hemaglutinación se utilizaron eritrocitos de gallo Lohmann al 0,5%, eritrocitos de curiel Hartley al 1% y eritrocitos de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* al 0,5% según Jawetz, *et al* (12).

La determinación de virus hemadsorbentes, se procedió según lo descrito en el manual ATCC (3).

Determinación de retrovirus: Dos frascos de 75 cm² con monocapas confluentes de células de 48 horas de sembradas con aproximadamente 107 células totales del BCT se procesaron utilizando el procedimiento descrito anteriormente para la observación de la morfología por microscopía electrónica. Fundamentalmente se buscaron partículas tipo A y tipo C de retrovirus.

Resultados y Discusión

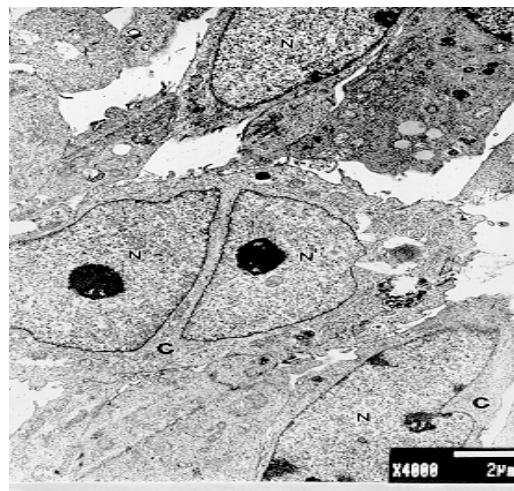
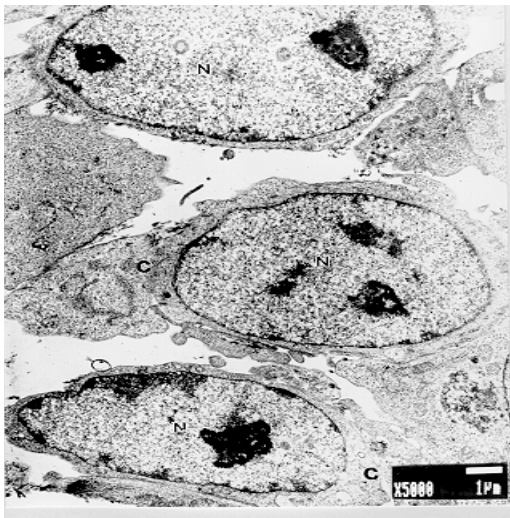
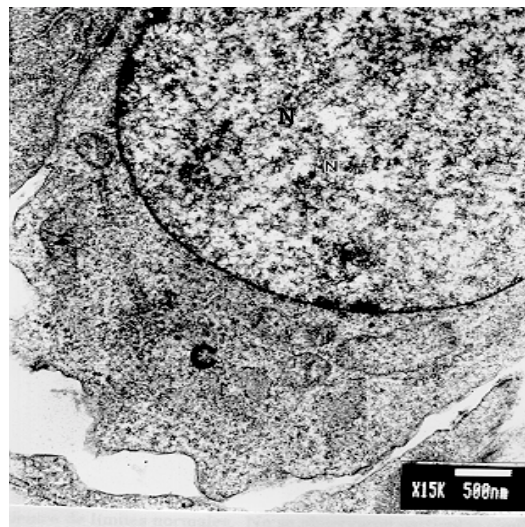
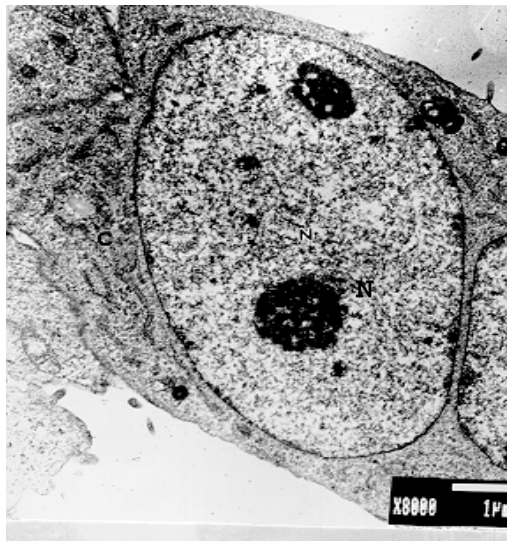
La viabilidad post-congelación del total de ámpulas de células BHK-21 probadas del BCT fue del 94%, que se encuentra en el rango planteado por Lubiniecki y May (13) para otra línea de mamífero; estos autores encontraron que el porcentaje de viabilidad determinado después de la congelación era del 95% durante un período de 18 meses mientras que lo reportado por la ATCC en 1994 plantea que la viabilidad de esta línea celular es de un 85% (4).

La morfología de las células tanto al microscopio invertido fue seudofibroblástica como es característico de esta

línea y concuerda con lo reportado por la ATCC en 1994 (4), evidenciándose por igual en las tinciones de Hematoxilina-eosina y Giemsa y en concordancia con lo registrado en el Manual de Laboratorio de Histoquímica en su edición de 1985, para las coloraciones de núcleo y citoplasma (7).

No se observaron inclusiones nucleares, ni intracitoplasmáticos compatibles con acúmulos virales en ninguno de los casos.

Figura 1. Observación de diferentes magnificaciones de las células BHK-21 por M.E. donde se evidencia la ultraestructura de la misma (N: núcleo, Nu: nucleolo, C: citoplasma, retículo endoplásmico rugoso: RER y M: mitocondrias) y la ausencia de partículas virales



La microscopia electrónica demuestra la presencia de núcleos bien definidos con su membrana nuclear; con varios nucleolos no definidos, excéntricamente localizados, los cuales se encuentran dispersos en la matriz nuclear. El citoplasma se observó como material

granuloso y fino. Dentro de la matriz citoplasmática se pueden observar diferentes organelos, tales como: mitocondrias, complejo de Golgi y retículo endoplasmático rugoso (RER); la presencia de numerosas mitocondrias y RER indica un metabolismo

celular activo en las células (Figura 1). Estos resultados coinciden con los reportados por Kourí, *et al*, en 1971 (14) quienes determinaron las características ultraestructurales de la línea BHK-21, por el método de fijación e inclusión. Se conoce que las características ultraestructurales varían con cada tipo de célula, estableciéndose diferentes patrones para cada línea celular (14-16), encontrándonos en nuestras observaciones con el patrón descrito para la línea estudiada.

Los medios de cultivo específicos, utilizados para el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras están incluidos dentro de los recomendados por la USP XXII de 1990 para la realización de pruebas de esterilidad (17) y no revelaron la presencia de los mismos, obteniéndose como resultado que nuestro BCT está libre de estos contaminantes. Así mismo esta prueba está acorde con los Requerimientos para las Líneas Celulares Continuas utilizadas en la Producción de Sustancias Biológicas (18).

No se evidenció la presencia de micoplasmas en la siembra directa, ni utilizando la técnica de hibridación de ácidos nucleicos.

En los tres sistemas celulares utilizados: BHK-21, Vero y MRC-5, se obtuvieron resultados similares. No hubo ECP en las células inoculadas con el medio sobrenadante de las células cultivadas, ni en las células inoculadas con el producto de la lisis celular.

Por otra parte, los controles utilizados en la prueba se comportaron como se esperaba. En el caso del control positivo donde se empleó la cepa Edmonston del virus del sarampión se pudo apreciar el ECP característico del virus (formación de sincitios). Por el contrario en el control negativo no se observó ningún cambio morfológico; por lo que podemos plantear que el BCT se encuentra libre de virus que producen ECP.

No hubo hemaglutinación en los sobrenadantes de las células bajo estudio y este mismo resultado fue obtenido en el control negativo (sin inocular). Por el contrario se pudo observar hemaglutinación en el sobrenadante de las células inoculadas con la cepa Edmonston del virus del sarampión utilizado como control positivo.

No fue observada hemadsorción en ninguna de las monocapas donde se realizó la prueba excepto en los controles positivos donde se utilizó un virus de sarampión, pudiendo asegurar que en los tres sistemas

celulares utilizados, las células del BCT no expresan virus hemadsorbentes.

Estos resultados concuerdan con los resultados alcanzados por otros autores (5), quienes utilizan la prueba de hemadsorción y hemaglutinación para determinar virus extraños *in vitro*. La Farmacopea Europea recomienda determinar estos virus en las líneas celulares que serán utilizadas en la producción de vacunas para uso veterinario (19), tanto los hemaglutinantes como los hemadsorbentes; según la OMS, en sus requerimientos para las líneas de células continuas recomiendan para la determinación de virus extraños la utilización de la prueba de virus hemadsorbentes solamente (18).

Los retrovirus endógenos y la mayoría de los retrovirus exógenos no producen transformación o efecto citopático en células infectadas, permaneciendo generalmente no detectables, excepto por el empleo de la Microscopia Electrónica de Transmisión entre otros métodos (13).

Al microscopio electrónico se corroboraron los resultados obtenidos en las anteriores pruebas para detectar virus extraños *in vitro*. No se detectaron partículas virales en las células ni en el sobrenadante de las mismas y no se detectó la presencia de partículas de retrovirus tipo A (no oncogénicos) intracelularmente ni tipo C (oncogénicos) extracelulares; estas mismas partículas han sido observadas en células CHO-K1 (20). Este método es utilizado para detectar retrovirus en células (13) ya que la mayoría de ellos no producen transformación o efecto citopático en células infectadas, e incluso cuantificar éstos en el sobrenadante de estas líneas de células cultivadas (21).

Por todo lo anterior podemos decir que el BCT cumple con los requisitos para ser empleado en la producción de vacunas veterinarias.

Agradecimientos: Queremos agradecer a las Licenciadas Graciela Bolaños y Rafaela Quintero y a la Dra. Viviana Amat del Instituto Finlay, así como a la Dra. Vivian Falcón del CIGB por su valiosa colaboración para la realización de este trabajo.

Referencias

1. Steuer A, Ostrove M. Establishing Cell Bank under Current Good Manufacturing Practices. *BioPharm*. 1996; 9:40-44.
2. Lee CK. Issues of Biological Assays for Viral Vaccines. *Dev Biol Stand*. 1996; 88:41-47.

3. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines Eds. Hay, RJ, Caputo, J, Macy, ML; 1994.
4. ATCC Cell Lines and Híbridos. 8ª Edición. Eds. Hay, RJ, Caputo, J, Macy, ML; ATCC CCI-10. 1994; 10.
5. Montes de Oca H. High Yield Method for Kidney Tissue. En Kruse PF, JR and MK Patterson, JR. eds. *Tissue Culture Methods and Applications*. 1973; 8-12.
6. Bird , Forrester F. Basic Laboratory Techniques in Cell Culture. Atlanta: U.S.Department of Health and Human Services; Centers for Diseases Control. 1981.
7. Vacca LL. *Laboratory Manual of Histochemistry*. New York: Raven Press; 1985.
8. Spurr AR. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastructural Research*. 1969; 26:31-46.
9. Procedimiento Normalizado de Operación. PNO 12.020 Instituto Finlay ;1998.
10. Mc.Garrity GJ, Steiner T y Gamon L. Prevention, detection and control of mycoplasma infection of cell culture. En: Kilbey BJ, Legator M, Nichols W, *et al*, edis. Handbook of mutagenicity test procedures. 2da. Ed. 1984:823.
11. Fernández C. Development of rDNA Probes for Detection and Identification of Porcine and Avian Mycoplasmas. En: Tesis presentada en opción por el Grado de Master en Ciencias: Uppsala; Swedish University of Agricultural Sciences.; 1993.
12. Jawetz E, Melnick J L, Adelberg E A. Manual de Microbiología Médica. 9ª ed.;1985.
13. Lubiniecki AS, May LH: Cell Bank Characterization For Recombinant DNA Mammalian Cell Lines. *Dev. Biol. Stand.* 1985; 60:141-146.
14. Kourí J, Kourí G, Bravo E, Rodríguez P and Aguilera A. Ultrastructure of BHK-21 cells as revealed by freeze-etching and fixation methods. *J Microscopy* 1971; 11:331-338.
15. Pérez E. Obtención y caracterización de la línea celular CRT-2. Tesis presentada en opción al Título de Candidato a Dr en Ciencias. La Habana: CENSA;1983.
16. Warburton MJ, Ormerod EJ, Monaghan P et al. Characterization of myoepitelial cell line derived from a neonatal rat mammary gland. *J Cell Biol* 1981; 91(3): 827.
17. USP XXII NF XVII: The United States Pharmacopeia, The National Formulary. 1990:1483-88
18. WHO Technical Report Series (TRS), Annex 1. Requeriments for Biological Substances No.50. In: Final Draft. Requeriments for use of animal cells as *in vitro* substrates for the production of biological. 1997 (March).
19. European Pharmacopeia: Cell Culture for the production of Veterinary Vaccines. 1998.
20. Petricciani JC, Salk PL, Salk J and Noguchi PD. Theoretical considerations and practical concerns regarding de use of continuous cell lines in the production of biologics. *Deve Biol Stand.* 1992; 50:15-25.
21. Losikoff AM, Poiley JA, Raineri R, et al. Industrial experience with detection of retroviruses. *Dev. Biol. Standard.* 1992; 76:187-2002.

***In vitro* assay to determine the presence of adventitious agents in a Working Cell Bank**

Abstract

At present tissue culture collections are considered valuable sources of biological material for research and production, nevertheless they are really useful when they are well organized, characterized and handled as Master Cell Banks and Working Cell Banks, depending on the objectives of the work. Regulatory agencies all over the world consider that the establishment of Master Cell Banks and Working Cell Banks follows good manufacturing practices in effect and the "Points to consider in the Characterization of Cell Lines used for the Production of Biologicals". The objective of this work was to determine if a Working Cell Bank (WCB) obtained in our laboratory was free of adventitious agents. To achieve this, optical and electronic microscopy were carried out looking for the morphology or presence of retrovirus. Absence of bacterial, fungi and micoplasma contamination was also verified. Also the presence of other adventitious agents tested using three cell culture systems. The cell morphology was pseudo fibroblastic as reported for this cell line. The Cell Bank is free of bacteria, fungi and micoplasma. The results of the test for adventitious agents were negative, electronic microscopy observation didn't reveal type A or C retroviral particles. As a conclusion we may say that the Working Cell Bank complies with the regulations established and can be used in the production of veterinary vaccines.

Keywords: Working Cell Bank, BHK- 21, characterization