

Ensayo *in vivo* para determinar agentes extraños en células BHK-21 empleadas en la obtención de biológicos

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

La controversia sobre los parámetros de calidad de las células de línea como substrato para la obtención de productos farmacéuticos ha sido un tema de interés desde 1987. Las pruebas realizadas a las células, generalmente siguen las recomendaciones de los "Puntos a considerar en la Caracterización de Líneas Celulares empleadas para la Producción de Biológicos" entre las que se encuentra que estén libres de agentes adventicios. En este estudio al clon 13 de células BHK-21 procedente de riñón de hámster sirio recién nacido, se le determina la presencia de agentes extraños *in vivo*; así como su inocuidad en animales de experimentación. La prueba *in vivo* incluyó la inoculación de embriones de pollo por cavidad alantoidea y saco vitelino, ratones lactantes y adultos, curieles y conejos. Todos los animales fueron observados para determinar signos clínicos de infección viral. En los embriones se observó la viabilidad. En todos los casos se mantuvo el 100% de los embriones y animales vivos y saludables durante el período de observación. Las células del banco estaban libres de virus hemaglutinantes y hemadsorbentes, virus de la coriomeningitis linfocítica y coxsackie. Los pesos de los animales inoculados fueron mayores que los de los animales controles. Las células no presentaron evidencia de agentes extraños en los ensayos *in vivo* y fueron bien toleradas e inocuas en los animales de experimentación.

Palabras claves: Caracterización, células BHK-21, agentes extraños, animales de experimentación

Introducción

El uso de las líneas celulares para la producción de biológicos se ha hecho cada vez más creciente, tanto para la producción de vacunas para uso humano como para uso veterinario se necesita que los substratos empleados cumplan los requerimientos establecidos por los organismos regulatorios correspondientes (1, 2, 3).

En la actualidad se disponen de numerosos tipos y variados orígenes de células, por lo que hay que poner énfasis en la selección de las mismas, para su utilización en la fabricación de cualquier biológico, ya sea una vacuna, un anticuerpo monoclonal para uso terapéutico, una hormona, etc. En dependencia del producto que se quiera fabricar y el uso al cual sea destinado, será la selección del substrato, así como las regulaciones que deban cumplir los mismos.

La línea original se derivó de los riñones de cinco hámsters de sexo no determinado, en 1961 (4); la misma tiene vida infinita y posee las características beneficiosas de la mayoría de las líneas de células continuas: rápido crecimiento, pases ilimitados y alta eficiencia de plaqueo. Las BHK-21 son excelentes substratos para la producción de varios virus como el

adenovirus, vaccinia, herpes simplex, estomatitis vesicular y rabia, entre otros.

El clon 13 de células de riñón de hámster sirio recién nacido (BHK-21 C13) ha sido utilizado en la producción de vacunas para uso veterinario, ya que el mismo posee los requerimientos que exigen los organismos internacionales para este tipo de producto. La utilización de estas células para diferentes estudios y producciones data de la década de los 60 (5-11). Con el empleo de esta línea se han producido millones de dosis de vacuna contra la fiebre aftosa en cultivos en suspensión (13) y de vacuna antirrábica para uso veterinario (7, 18, 19).

Las agencias regulatorias en todo el mundo consideran el establecimiento de Bancos Maestros Celulares y de Trabajo siguiendo las Buenas Prácticas de Fabricación vigentes como primer paso para el aseguramiento de la calidad de estos productos.

Por la importancia que tiene la caracterización de los substratos celulares para la producción de biológicos nuestro laboratorio se propuso comprobar, mediante pruebas que empleen biomodelos experimentales, que

el Banco de Trabajo Celular (BTC), a partir de células BHK-21 C13, está libre de agentes extraños.

Materiales y Métodos

Células empleadas: Células BHK-21 C13 (riñón de hámster sirio recién nacido) certificadas de la ATCC en el pase 76.

Medio de cultivo: Glasgow Minimal Essential Medium (GMEM) (ICN FLOW), suplementado con Suero Bovino Fetal (SBF Sigma) y Caldo Triptosa Fosfato (CTF) al 10% (SIGMA).

Disociación de la monocapa. Fue empleado el método de dispersión enzimática (18) utilizando tripsina al 0,25% en solución con Versene (EDTA) al 0,02% (ICN-FLOW).

Banco de Trabajo Celular (BTC)

Se confeccionó a partir de un Banco Maestro Celular en el pase 79, utilizando frascos de cultivo de 75 cm² (Nunclon), GMEM, SBF y Tripsina-Versene. Se realizaron dos subcultivos con una razón de pases de 1:10 y un tiempo de confluencia de cinco días, obteniéndose 150 ámpulas con una concentración de 5 x 10⁶ células/mL en el pase 81.

Pruebas in vivo: Se realizaron según los "Requerimientos Para el Uso de Células Animales Como Substrato para la Producción de Biológicos" (1).

Los huevos embrionados como todos los animales utilizados en este ensayo procedían del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), avalados por un certificado de calidad, salud y zootecnia. Las características morfológicas, fisiológicas y conductuales estaban acordes con la línea, criados y mantenidos en ambiente de forma convencional.

La dieta suministrada a cada especie consistió en pienso y agua *ad libitum*. Se garantizaron las condiciones higiénico-sanitarias, para asegurar un buen estado de salud de los animales y las medidas epizootiológicas correspondientes. Además los animales fueron manipulados según las "Guías para el cuidado y uso de animales de experimentación" (16).

Inoculación de huevos embrionados

Saco vitelino: Se utilizaron 40 huevos embrionados con 7 días de incubación, de los cuales se inocularon 10

con 0,1 mL del producto de la lisis celular, 10 embriones con 0,1 mL de sobrenadante de las células del BTC, 10 embriones se dejaron como control sin inocular y otros 10 se inocularon con cepa de Influenza del grupo A2, tipo H3N2 como control positivo con un índice de multiplicidad de 0,1.

Cavidad alantoidea: Se utilizaron también 40 huevos embrionados con 11 días de incubación, distribuidos de forma similar; 10 embriones fueron inoculados con el producto de la lisis celular, 10 con sobrenadante de las células del BTC, como control se mantuvo 10 huevos sin inocular y se inocularon otros 10 embriones con cepa de Influenza del grupo A2, tipo H3N2 como control positivo. El volumen de inóculo en todos los casos fue de 0,1 mL e igual multiplicidad que la otra vía.

Todos los huevos fueron observados diariamente durante 7 días para comprobar la viabilidad.

Al final del periodo de observación se tomaron alícuotas de líquido alantoideo para determinar virus hemaglutinantes según lo descrito anteriormente para este ensayo en las pruebas *in vitro*.

Prueba de Hemaglutinación

Se realizó según el Manual de Microbiología Médica (17) con las modificaciones siguientes: Se utilizaron eritrocitos de gallo al 0,5%, eritrocitos de curiel al 1% y eritrocitos de mono al 0,5% en solución salina de Hanks libre de calcio y magnesio. La técnica se realizó en placas de 96 pocillos (Nunclon) las que se incubaron a 22 °C y 37 °C durante 30 min respectivamente y posteriormente a 4 °C otros 30 min.

Animales

- Ratones lactantes

Se utilizaron 50 ratones lactantes consanguíneos de la línea Oncis France cepa 1(O_F1) de menos de 24 h de nacidos. Los animales fueron distribuidos de la siguiente forma:

Grupo I: 10 ratones lactantes inoculados con el producto de la lisis celular por vía intracerebral con 0,01 mL.

Grupo II: 10 ratones lactantes inoculados con igual volumen y por la misma vía pero con sobrenadante de las células cultivadas del BTC.

Grupo III: 10 animales inoculados por la vía intramuscular (im) con 0,05 mL del producto de la lisis celular.

Grupo IV: 10 animales inoculados por la misma ruta y el mismo volumen con sobrenadante de las células cultivadas del BTC.

Grupo V: 10 animales sin inocular como control.

Todos los animales fueron observados diariamente durante las cuatro semanas que duró la prueba.

- Ratonos adultos

En el caso de los ratones adultos se utilizaron 50 animales consanguíneos de la línea OF1 (Oncins France cepa 1) clínicamente sanos, con un peso vivo entre 16 y 20 gramos (g). Los mismos fueron divididos de igual forma que los ratones lactantes.

- Curieles

Diez curieles de la línea Duncan Hartley, hembras, con un peso vivo entre 350-400 g, clínicamente sanos fueron divididos en dos grupos. El primer grupo constituido por cinco animales inoculados con 0,2 mL del producto de la lisis celular por vía intramuscular y el segundo grupo conformado por cinco animales control sin inocular. Todos los animales fueron observados diariamente durante cuatro semanas.

- Conejos

Los 10 animales de la línea F1 (semigigante blanco x Nueva Zelanda blanco) con un peso vivo entre 1,2-1,8 Kg utilizado fueron divididos en dos grupos. Los cinco animales pertenecientes al primer grupo recibieron 0,2 mL del producto de la lisis celular por vía intramuscular y los cinco animales restantes constituyeron el grupo control sin inocular. Ambos grupos se mantuvieron en observación diaria durante cuatro semanas.

Los ratones adultos, curieles y conejos fueron pesados semanalmente durante el período que duró el ensayo y se realizó la observación clínica diaria buscando reacciones locales en el punto de inoculación y otros signos de intolerancia como inflamación abdominal, con el objetivo de evaluar algún tipo de toxicidad de las células del BTC (18).

Una vez concluido el ensayo en estos mismos animales se procedió a la extracción de órganos como: corazón, pulmones, hígado y timo a los cuales se les realizó observación macroscópica con el fin de detectar la presencia de alguna patología que pudiera ser atribuible a las células.

En el caso específico de la especie curiel se buscó fundamentalmente la presencia de *Micobacterium tuberculosis* según lo recomendado por Lee (19).

Análisis Estadístico: Se utilizó estadística simple como media y desviación estándar.

Resultados y Discusión

Pruebas *in vivo*

Los resultados de las pruebas de agentes extraños son los siguientes:

- Huevos embrionados

Todos los embriones inoculados tanto por saco vitelino como por cavidad alantoidea, así como los que se mantuvieron como control sin inocular, mantuvieron su viabilidad durante el período de observación, por lo que podemos inferir que, al menos están exentos de virus de la plaga de las aves, enfermedad de newcastle, encefalomiélitis, eritroblastosis y algunos arbovirus que son capaces de provocar la muerte después de su multiplicación ocasional o regularmente según Blaskovic *et al* 1967, quien además plantea que la muerte de los embriones puede servir como prueba de infección con virus. Estos resultados se corresponden con las recomendaciones de la OMS en sus "Requerimientos para Células Continuas utilizadas en la Producción de Biológicos" (1), en las cuales se plantea que la prueba se considera válida si el 80% o más de los huevos embrionados permanecen saludables y sobreviven al período de incubación. En el caso de los huevos inoculados no se detectó la presencia de hemaglutininas en los líquidos alantoideos en ningún caso, excepto en el control positivo, ya que se obtuvo "botón" en el fondo de los pocillos lo que indica que no estaban presentes virus hemaglutinantes. Por el contrario en los controles positivos si se observó hemaglutinación en forma del enrejado característico que se observa cuando se ponen en contacto eritrocitos con virus hemaglutinantes.

Animales

Las características externas como pelaje, mucosa y movimiento de todos los animales que participaron en este ensayo se mantuvieron normales.

Durante el período que duró el ensayo en la especie ratón tanto en lactantes como en adultos inoculados por ambas vías no se observaron signos de intolerancia ni cambios conductuales que pudieran ser atribuidos a virus neurotrópicos u otros agentes capaces de provocar este tipo de cambios en la especie. Según Lee para las vacunas virales producidas en substratos

celulares, el ratón lactante se utiliza fundamentalmente para detectar una posible contaminación con virus Coxsackie del material a probar. En el caso del ratón adulto, el mismo es utilizado para detectar virus de la Coriomeningitis linfocítica (19). Al no manifestarse ninguno de los síntomas atribuibles a estos virus se pone en evidencia la no presencia de los mismos en el BTC.

En el caso de la especie curiel tampoco se manifestó ningún signo clínico ni patológico que demostrara la presencia del virus de la Coriomeningitis linfocítica ni *Micobacterium tuberculosis* que hayan provenido de las células. Lee en 1996, recomendó la utilización de esta especie para determinar estos microorganismos en la prueba de virus extraños (19).

En ninguno de los conejos que participaron en la prueba se presentaron signos de intolerancia. Tampoco

hubo evidencia de contaminación con virus B, buscado en esta especie en el caso de células de origen de primates, pero por disponer de los conejos y para descartar que nuestra línea no estuviera contaminada con una línea de primates se montó esta prueba obteniendo los resultados esperados (1).

En cuanto a la observación de los órganos, no se detectaron lesiones de valor diagnóstico en ninguno de ellos en las tres especies utilizadas.

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestra el análisis del comportamiento de la media del peso vivo y la desviación estándar en los ratones adultos, curieles y conejos durante los 30 días que duró el ensayo, tomando como base las medias de los pesos corporales de cada grupo en el día 0 (sin inocular).

Tabla 1. Comportamiento del peso corporal (g) de ratones adultos

Grupos	Día 0		Día 30		Diferencia3
	Media1	DS2	Media1	DS2	
I	16,78	1,32	23,48	1,99	6,7
II	17,56	1,43	23,56	2,46	6,0
III	18,76	0,86	25,66	1,69	6,9
IV	19,93	0,99	24,26	1,32	5,45
V	16,12	0,57	29,48	1,28	13,36

1. - Peso promedio de 10 animales.
2. - Desviación estándar.
3. - Diferencia entre el peso inicial y el peso final.

De forma general podemos plantear que la media del peso corporal final de todos los ratones adultos fue superior a la media del peso inicial. Estos valores oscilaron entre 23,48 y 25,66 g durante el tiempo que duró el ensayo, los cuales se corresponden con los reportados por las curvas ponderadas para esta especie (20) en las cuales se describen valores entre 22,5-30, 5 g para ratones con 8 semanas de edad.

Como se puede observar en nuestro estudio se obtuvieron medias entre 23,48-5,66 g del peso final.

Con respecto a la diferencia de peso los animales dejados como controles para ambas vías tuvieron un incremento de peso menor que los inoculados, de esto se podría inferir que el producto probado además de no producir reacciones adversas significativas sobre los parámetros de peso, alteraciones en el punto de inoculación, comportamiento zootécnico, nutrición y patológicos, no provocó ningún síntoma que alterara el estado de salud de los animales y que evidenciara la presencia de agentes extraños.

Tabla 2. Comportamiento del peso corporal (g) de curieles

Grupos	Día 0		Día 30		Diferencia3
	Media1	DS2	Media1	DS2	
I	381,08	20	481,4	37	100,06
II	357,62	17	452,62	28,5	95,00

1. Valor promedio de cinco animales.
2. Desviación estándar.

3. Diferencia entre el peso inicial y el peso final.

En la especie curiel la media del peso corporal osciló entre 452,62-481,4 g. En el Manual para los Animales de Laboratorio se reporta que este parámetro oscila entre 430-590 g para animales con 9 semanas de edad (20). Es de resaltar en este ensayo que la diferencia entre las medias del peso corporal fue superior en los

animales inoculados con el producto de la lisis celular que en los curieles controles sin inocular.

Este resultado nos confirma que las células inoculadas no contenían ningún agente extraño que pudiera influir en el peso de los animales inoculados.

Tabla 3. Comportamiento del peso corporal (kg) de conejos inoculados con las células a caracterizar

Grupos	Día 0		Día 30		Diferencia ³
	Media ¹	DS ²	Media ¹	DS ²	
I	1,4	0,3	1,94	0,05	0,46
II	1,56	0,26	1,78	0,17	0,22

1. Valor promedio de cinco animales.
2. Desviación estándar
3. Diferencia entre el peso inicial y el peso final.

La media del peso corporal en el caso de la especie conejo osciló entre 1,78 y 1,94 kg; los animales utilizados como controles tuvieron un incremento de peso menor que los inoculados, por lo que se corroboró que el producto a probar no presenta agentes extraños detectables en esta especie ni que provocará reacciones inespecíficas que intervinieran en el desarrollo físico de los mismos.

Con respecto a la diferencia de peso, los animales del grupo control incrementaron 0,2 kg menos que los inoculados, y se corroboró que el producto a probar no causó alteraciones del parámetro evaluado.

Por los resultados obtenidos en las pruebas realizadas para detectar virus extraños *in vivo*, podemos concluir que este banco está libre de los agentes virales para los cuales se realizaron los ensayos, tales como virus hemaglutinantes, virus de la plaga de las aves, enfermedad de newcastle, encefalomielitis, eritroblastosis y algunos arbovirus entre otros. También podemos concluir que las células a caracterizar fueron bien toleradas e inocuas en los animales que sirvieron para esta evaluación.

Referencias

1. WHO. Technical Report Series (TRS), Annex 1. Requirements for Biological Substances No. 50. Final Draft. Requirements for use of animal cells as in vitro substrates for the production of biological. Geneva: WHO;1997.
2. FDA. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. USA:FDA; 1993.
3. European Pharmacopoeia. Cell Culture for the production of Veterinary Vaccines; 1998.
4. Macpherson I. Stocker, M. Polyoma transformation of hamster cell clones- an investigation of genetic factor affecting cell competence. *Virology*. 1962; 16:147-151
5. Wiktor TJ, Sokol F, Kuwert E y Koprowski H. *Proc Soc Exp. Biol.* (N.Y.) 1969; 131:799.
6. Kouri J, Kouri G, Bravo E, Rodríguez P and Aguilera A. Ultrastructure of BHK-21 cells as revealed by freeze-etching and fixation methods. *J. Microscopie*. 1971; 11:331-338.
7. Sureau P. Rabies vaccine production in animal cell culture. *Advances in biochemical engineering and biotechnology*. 1987; 34:11-128.
8. Hay RJ, Caputo J y Macy ML. ATCC Quality Control Methods for Cell Lines 1992; 132 pp.
9. Kamrud KI, Powers AM, Higgs S., *et al.* The expression of chloramphenicol acetyltransferase in mosquitoes and mosquito cells using a packaged Sindbis replicon system. *Exp-Parasitol*. 1995; 81(3):394-403.
10. Nicholson KG. Cell culture vaccines for human use: General considerations. En: Meslin FX., Kaplan MM. and Koprowski H. Laboratory techniques in rabies. Fourth Edition. Geneva: WHO. 1996:271-279 .

11. Bieniasz PD, Erlwein O, Aguzzi A, Rethwilm A, McClure MO. Gene transfer using replication-defective human foamy virus vectors. *Virology*. 1997; 235(1):65-72.
12. Capstick PB, *et al.* Growth of a clone strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus foot-and-mouth disease. *Nature*. 1962; 195 (4847):1163-1164.
13. Reculard P. Cell culture vaccines for veterinary use. En Meslin FX, Kaplan MM and Koprowski H. Laboratory techniques in rabies: Fourth Edition. Geneva: WHO; 1996; 314-322.
14. Wilde H. Rabies 1996. *Int J Infect Dis*. 1997; 1:135-1429.
15. Montes de Oca H. High Yield Method for Kidney Tissue. En: Kruse PF, JR and MK Patterson, J R.eds. Tissue Culture Methods and Applications. 1973; 8-12.
16. Guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio; 1996.
17. Jawetz E, Melnick J L, Adelberg E A. *Manual de Microbiología Médica*. 9ª Edición 1985; 595 pp.
18. NC-26-67-83. Medicamentos. Prueba de inocuidad. Método de Control.
19. Lee CK. Issues of Biological Assays for Viral Vaccines. *Dev Biol Stand*. 1996; 88: 41-47.
20. IFFA CREDO: *Animaux de Laboratoire*. 1986; 72-73.

***In vivo* determination of adventitious agents in BHK-21 cells used in the production of biologicals**

Abstract

Acceptance of cell lines as a substrate for production of pharmaceuticals has been a controversial topic since 1987. The cells are generally tested according to the recommendations that appear in "Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals". They should be free from adventitious agents; among others *in vitro* and *in vivo* tests are recommended for this purpose. In this report BHK-21-cell clone 13 from new born Syrian hamster kidney cells is assayed *in vivo* to determine adventitious agents; it is also tested for non-specific innocuousness in experimental animals. *In vivo* tests included the inoculation of adult mice, suckling mice, guinea pigs, rabbits, and embryonated chicken eggs by the yolk sac and allantoic routes of inoculation. All animals were observed for clinical signs of viral infection. Egg viability was determined. The results showed that 100% of the animals and eggs remained healthy and survived the observation period. The cell bank was free of haemadsorbent, haemagglutinating, lymphocytic choriomeningitis and Coxsackie viruses. The weights of the tested animals were higher than the weights of the control animals. The cells did not present evidences of adventitious agents in the *in vivo* assays and they were well accepted by the experimental animals.

Key words: Characterization, BHK-21 cells, adventitious agents, experimental animals.