

ELABORACION DE SUEROS DE ORIGEN ANIMAL IRRADIADOS CON Co^{60} , EMPLEADOS PARA CULTIVOS CELULARES

JOSE ERNESTO WEIMERSHEIMER RUBI*

HUMBERTO RAMIREZ MENDOZA*

ANABELLE MELGAREJO BAÑOS*

El problema que representa encontrar en el mercado sueros de origen animal de buena calidad para utilizar en cultivos celulares data de hace mucho tiempo. Años atrás, la importación de éstos a costos muy elevados, era la única solución y a partir de 1983 se prohibió su entrada al país por problemas de divisas. Aunado a este problema existían otros, ya que algunos sueros no estaban en su totalidad libres de agentes infecciosos (Lawrence y col., 1953) lo que ocasionaba serios problemas tanto a la investigación como a la producción de biológicos. Otro factor importante en la producción de sueros, es la cantidad de inmunoglobulinas que interfieren en la replicación viral por lo que se obtienen bajos títulos en la elaboración de vacunas, conjugados y falsos resultados en pruebas de diagnóstico.

Ante esta situación el Departamento de Investigación en Producción de Biológicos del Sector Pecuario del INIFAP ha trabajado en la elaboración de suero de origen animal (ternera, caballo y cerdo), ya que la utilidad de este producto beneficia diferentes nive-

* Proyecto Biotecnología en Salud Animal, Sector Pecuario, INIFAP-SARH. Carr. México-Toluca Km. 15.5, México, D.F., C.P. 05110.

les, tales como: investigación básica, producción de biológicos, farmacéutica y cosmetología. Se ha estandarizado el sistema de producción con lotes de buena calidad, libre de agentes bacterianos y hongos, por filtración e inactivación a $56^{\circ}C$ durante media hora.

Esto no es suficiente para trabajar cultivos de tejidos, ya que se tienen problemas de desarrollo celular en algunos lotes por presencia de agentes virales propios de cada especie (Polley, 1962). Dada la dificultad de contar con un lote de animales libres de agentes virales; por problemas de manutención, locales con las condiciones requeridas y el volumen que por lo regular se produce; se buscó la forma de eliminar los virus que con frecuencia se encuentran en nuestros sueros. Se ha notificado que la forma de eliminar estos agentes virales es la ultrafiltración o por medio de la radiación gamma (CO^{60}) (Jordan y Kempe 1956). Cabe mencionar que la sangre se obtiene a nivel rastro, con todos los inconvenientes que implica la falta de control sanitario sobre los animales sacrificados y la toma de sangre se hace en un recipiente limpio, con el

objeto de producir la menor hemólisis posible. La ultrafiltración se descartó por ser incosteable, la obtención final es de poco volumen y hay pérdida de proteínas útiles.

El objetivo es demostrar que los sueros de origen animal después de ser sometidos a la radiación gamma (2.5 Mega Rads, dosis mundial de esterilización bacteriana, según OMS, 1966) quedan libres de los virus que por lo general afectan a la especie animal de la que se obtuvo el suero. Otra ventaja es que después de la radiación no se altera su calidad nutritiva y puede con un alto margen de confiabilidad, utilizarse en cultivos celulares y trabajos de investigación que requieran suero de calidad y estar libres de todo tipo de agentes contaminantes.

Una vez terminado un lote de suero, en este caso de ternera (40 litros envasados en 100 frascos con 400 ml cada uno), se tomaron muestras de diferentes frascos, antes y después de irradiar.

Se corrieron pruebas de inmunofluorescencia directa (Mar, 1981) para detección de virus de diarrea viral bovina, rinotraqueitis viral bovina y parainfluenza 3.

Se realizaron pruebas de inmunoelectroforesis (Arriaga y Ruiz-Navarrete, 1986) para la detección de posibles cambios protéicos.

Estas pruebas se hicieron con sueros no irradiados, e irradiados a 2.5 Mega Rads y se comparó con los cultivos celulares en los que se usó suero fetal bovino con las mismas características de irradiación. Las líneas celulares utilizadas para la cuantificación del desarrollo celular fueron las 13S c17 (línea derivada de la BHK-21, bovine hamster Kidney 21) y MDBK (bovine Kidney). Se usaron 10 botellas de dilución de leche para cada línea celular y se efectuaron 10 pases de cada una de ellas con los diferentes sueros. Se inactivaron antes de usarse a 56°C durante media hora. La cuantificación del crecimiento celular fue hecha según la descripción del manual de producción de la vacuna V-319 Acatlán.

Por último a un frasco con suero de ternero, del lote 84-1, se le agregó virus de Aujeszky en una dilución final de 1:100, el cual era capaz de producir 100% de efecto citopático a las 48 horas en células PK-15, sembradas en tubos de Leighton.

Este frasco, enseguida de agregarle el virus ya mencionado, se llevó en refrigeración al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, a irradiar a 2.5 Mega Rads.

Para los cuatro tipos de suero, los resultados fueron negativos a la presencia de partículas virales con la

LINEA CELULAR 13Sc17.		
PRODUCTO	NO IRRADIADO	IRRADIADO
	<u>0.0 Megarads</u>	<u>2.5 Megarads</u>
TERNERO.	$\bar{X} = 4.620.000 \text{ cels} \times \text{ml.}$	$\bar{X} = 3650.000 \text{ cels} \times \text{ml.}$
FETAL BOVINO	$\bar{X} = 3.319.200 \text{ cels} \times \text{ml.}$	$\bar{X} = 3660.000 \text{ cels} \times \text{ml.}$
Se aceptó la hipótesis nula de no diferencia ($P > 0.05$ en cuanto a crecimiento celular con la línea 13Sc1-7 con suero de ternero y fetal bovino irradiado y no irradiado.		

LINEA CELULAR MDBK		
PRODUCTO	NO IRRADIADO	IRRADIADO
	<u>0.0 Megarads</u>	<u>2.5 Megarads</u>
TERNERO	$\bar{X} = 4.620.000$ cels x ml	$\bar{X} = 3.560.000$ cels x ml.
FETAL BOVINO	$\bar{X} = 2.915000$ cels x ml	$\bar{X} = 4.305.000$ cels x ml.
Se aceptó la hipótesis nula de no diferencia ($P \neq 0.05$) ya que esta es mínima para nuestros requerimientos en esta línea celular con los dos tipos de suero irradiado y no irradiado.		

técnica antes mencionada.

Tampoco hubo cambio en las líneas de precipitación en la prueba de inmunoelectroforesis con suero irradiado y no irradiado, se aceptó que no fueron afectadas las de proteínas séricas, ya que esta prueba reúne los requisitos generales para manifestarlo así.

El suero infectado con virus de Aujeszky e irradiado no produjo efecto citopático alguno en la línea celular PK-15, lo que demuestra que la exposición a radiación gamma destruyó al virus; esto propone una alternativa para la destrucción viral de sueros empleados para cultivos celulares.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, su colaboración para el desarrollo de este trabajo.

SUMMARY

Calf serum and fetal calf serum (Gibco) was irradiated with a dose of Cobalt⁶⁰ (2.5 Mega Rads) and a comparison in cell development with a not irradiated serum of the same lot. Aujeszky virus, in the dilution cytopathic effect in PK-15 cells. The proteins of the serum didn't change in his conformation with the irradiation, as evaluated by the immu-

noelectrophoresis test. With the fetal calf serum and the calf serum, we probe that the hypothesis in this case was null ($P > 0.05$), for not modification in the development of cells with irradiated calf serum and not irradiated calf serum. The same occur with the fetal calf serum.

The serum irradiated with Aujeszky virus was used in the developing of PK-15 cell which grew without cytopathic effect.

LITERATURA CITADA

ARRIAGA de M.C. y RUIZ-NAVARRETE, A. 1986. Inmunoelectroforesis. Manual de Inmunología, Ed. Diana, México, D. F. p. 66.

JORDAN, R.T and KEMPE, L.L. 1956. Inactivation of some animal viruses with gamma radiation from Cobalt. Proc. Soc. Biol. Med. pp 91, 212 y 215.

LAWRENCE, C.A. BROWNELL, L.E. and GRAIKOSKI, J.T. 1953. Effect of Cobalt⁶⁰ gamma radiation on microorganism. Nucleonics. 11:9.

MAR, C.R. 1986. Inmunofluorescencia. Manual de Inmunología, Ed. Diana, México, D. F. p. 96.

OMS (Organización Mundial de la Salud). 1966. Bases técnicas para la legislación referente a los alimentos irradiados. Informe de un comité mixto FAO/OIEA/OMS de expertos. Serie de Informes técnicos No. 316 Ginebra, Suiza.

POLLEY, V.R. 1962. The use of gamma radiation for the preparation to viruses, Canad. J. Microbiol., 8:445.