



## EVALUACIÓN DE ENSAYOS *IN VITRO* PARA COMPROBAR LA FUNCIONALIDAD DEL SUERO FETAL BOVINO EN EL CRECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES FRHL-2 Y VERO C-76.

### AUTORES

Limao, Melina D.; Mingo, Noelia; Bottale, Alejandro J.; Maiza, Andrea S.; Riera, Laura M.C.

### INSTITUCIÓN

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui". (INEVH-ANLIS). mlimao@anlis.gob.ar.

### INTRODUCCIÓN

Control de Calidad debe probar la capacidad e idoneidad del Suero Fetal Bovino (SFB) para garantizar que el insumo cumpla su rol en el crecimiento de cultivos celulares.

En la planta de producción del INEVH se fabrica la vacuna a virus vivo atenuado Candid#1, que previene la fiebre hemorrágica argentina. El sustrato para la replicación viral es la línea celular FRhL-2. Por otra parte, la línea celular Vero C-76 es utilizada en el control de calidad de la vacuna.

El objetivo fue determinar el ensayo más adecuado para comprobar la funcionalidad y despeño de lotes comerciales de SFB en la preparación y mantenimiento de estos cultivos de células adherentes.

### DESARROLLO: MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 3 ensayos. Se utilizaron lotes certificados de células FRhL-2 y Vero C-76. Los medios de cultivo fueron suplementados con lotes comerciales de SFB al 10% v/v. Lotes de SFB ya probados sirvieron como control. La incubación fue a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

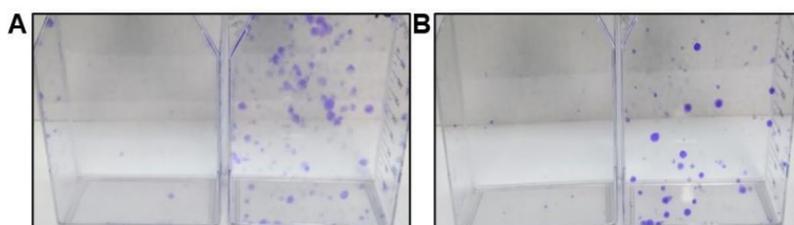
1. Análisis clonal según ATCC: se utilizaron botellas de cultivo de 75 cm<sup>2</sup>. Se realizaron diluciones 1/10 de las 2 líneas celulares, y se sembraron por separado partiendo de 106 células/ml hasta 1 célula/ml. Se incubó 14 días. Los cultivos se tiñeron y se contaron clones de células macro y microscópicamente.
2. Ensayo clonal según USP: se realizó un plaqueo de 50 células/cm<sup>2</sup> para ambas líneas celulares. Se incubó 14 días. Los cultivos se tiñeron y se contaron colonias macroscópicamente discretas.
3. Promoción de crecimiento: en botellas de 25 cm<sup>2</sup> se sembraron 180.000 células/ml individualmente. Se realizaron 4 pasajes a nuevas botellas manteniendo la concentración inicial, con una frecuencia de 2 pasajes semanales. Se contaron las células en cámara de Neubauer.

### RESULTADOS

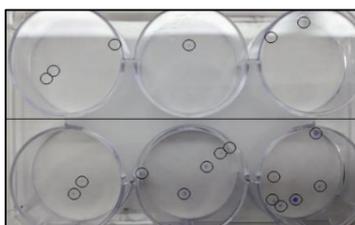
1. El análisis clonal según ATCC arrojó recuentos heterogéneos en número y tamaño de colonias, con una alta variabilidad entre operadores, lo que impidió establecer criterios uniformes de aceptación. (Imagen 1).
2. En el ensayo según USP, la línea Vero C-76 mostró eficiencias de plaqueo (EP, porcentaje de colonias por área sobre células sembradas) entre 0,5% y 10%. En cambio, la línea FRhL-2 no presentó crecimiento detectable con este nivel de inóculo. (Imagen 2)
3. En el ensayo de promoción de crecimiento, los recuentos celulares por ml de cada pasaje se compararon con los valores promedio y  $\pm 3$  desviaciones estándar (DE) obtenidos de un lote control. Se estableció como criterio de aceptación que los cultivos suplementados con SFB comercial al 10% v/v presentaran valores dentro del rango de  $\pm 3$ DE. (Imagen 3)

### CONCLUSIÓN

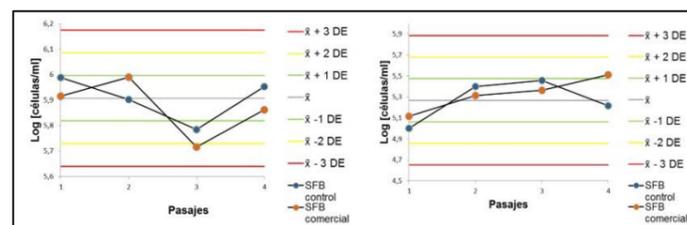
Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el ensayo de promoción de crecimiento como el método para evaluar la funcionalidad de los lotes comerciales de SFB.



**Imagen 1) A):** clones de FRhL-2. Siembra de 10<sup>-4</sup> células/ml. Izquierda: SBF control, 54 clones. Derecha: SBF comercial, 87 clones. **B)** Clones de Vero C-76. Siembra de 10<sup>-3</sup> células/ml. Izquierda: SBF control, 87 clones. Derecha: SBF comercial, 233 clones.



**Imagen 2)** Clones de Vero C-76. Siembra de 50 células/cm<sup>2</sup>. Pocillos superiores: SFB control,  $\bar{x}$  de 2 clones, EP 0,5%. Pocillos inferiores: SBF comercial,  $\bar{x}$  de 4 clones. EP 1%.



**Imagen 3)** Recuentos resultantes de cultivos suplementados con un lote comercial de SFB vs. lote control. Izquierda, línea Vero C-76. Derecha, línea FRhL-2.