



Código: PICyDT-CAyT-02-2018

“DESARROLLO LOCAL DE UNA PLATAFORMA DE CULTIVO CELULAR Y USO DE ADYUVANTE PARA PRODUCCIÓN DE VACUNAS ANTIRRÁBICAS”

Director: PEREZ, Oscar

Integrantes: RIVA, Diego; AMBILLAGA, Sofia; LOVERA,
Tania; GARANZINI, Debora; MICUCCI, Matias

Año: 2022



Informe Final de Proyectos de Investigación Universidad Nacional de Moreno

Identificación del proyecto

Tipo de proyecto y año de convocatoria:	PICYDT UNM 2018
Nombre completo del proyecto:	DESARROLLO LOCAL DE UNA PLATAFORMA DE CULTIVO CELULAR Y USO DE ADYUVANTE PARA PRODUCCIÓN DE VACUNAS ANTIRRÁBICAS.
Director/a:	LIC. OSCAR PÉREZ
Lineamiento prioritario ¹	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA Bioprocesos
Fecha de inicio:	01/04/20
Fecha de finalización:	30/06/22
Unidad de localización:	LIC. EN BIOTECNOLOGÍA.
Departamento/centro/ Programa	DEPARTAMENTO DE CIENCIAS APLICADAS Y TECNOLOGÍA PROGRAMA ACADÉMICO PARA LA INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA
Resumen: <i>a(máx. 300 palabras)</i>	La rabia es una enfermedad de curso agudo que, una vez presente la sintomatología típica, tiene una altísima mortalidad. El único tratamiento eficaz es la vacunación. Las respuestas humoral y celular inducidas por vacunas antirrábicas son consideradas mecanismos importantes para la protección contra la rabia, sin embargo, se han reportado diferencias en la respuesta celular inducida por vacunas atenuadas o inactivadas. Estas últimas son denominadas de segunda generación y producidas por amplificación viral sobre sustrato celular y posterior inactivación del virus obtenido. El Bacilo Calmette-Guérin (BCG), una de las vacunas más ampliamente usada a nivel mundial, se encuentra entre los inmunomoduladores usados para mejorar el efecto de la vacunación. BCG produce una respuesta inmune que incluye reacción de hipersensibilidad retardada, producción de interferón gamma y diversas interleukinas para dar una respuesta de tipo Th1.

¹ Según Resolución CS 326/17 Líneas de investigación científica y desarrollo tecnológico prioritarias 2016-21/ó Res. R 449/18 Lineamientos estratégicos generales de Investigación y transferencia 2019/21 del CEDET

	En este proyecto, se propone desarrollar una plataforma de cultivo en suspensión con medios libre de suero de células BHK, susceptibles a infección con virus rábico (VR) y virus recombinante MVA (modified Virus Ankara), portador del gen de la glicoproteína rábica (candidato vacunal recombinante). Este desarrollo implica la puesta a punto del sistema de cultivo optimizando parámetros y variables definidos, para luego ver la productividad viral en cada caso. Luego, para cada stock viral se evaluará su potencia antigénica frente al desafío frente a virus rábico en el modelo murino. En esta etapa se evaluará el rol del agregado de BCG como inmunomodulador, analizando si existe un mejoramiento de la respuesta in vivo, traducido como aumento en la potencia de cada inmunógeno.
Palabras claves:	Vacunas, Rabia, BCG, adyuvante.

Parte I

Informe de resultados para el repositorio²**1. Introducción y objetivos (mínimo 1 página- máximo 2 páginas)**

- Realizar una presentación general del estudio (tema/problema) y una justificación de su relevancia (motivos para estudiarlo, aportes potenciales).
- Indicar el objetivo general de la investigación y los interrogantes efectivamente trabajados en el proyecto.

La rabia es una enfermedad que, una vez presente la sintomatología típica, tiene una altísima mortalidad. Generalmente, tiene impacto sanitario en poblaciones pobres y vulnerables que no disponen o no tienen fácil acceso a las vacunas humanas e inmunoglobulinas. Actualmente, la baja disponibilidad de vacunas, especialmente de uso humano, es una señal de alarma para el Ministerio de Salud de la Nación (MSAL), en su objetivo de controlar esta zoonosis que, de ocurrir un evento en humanos, el único tratamiento eficaz es la administración de estos inmunobiológicos. Por este motivo, en un contexto de soberanía sanitaria y de estímulo de la producción pública de medicamentos, es de importancia estratégica dotar al estado de una tecnología de producción de vacunas con el objetivo de contribuir a cubrir la demanda nacional de este biológico, tanto de uso humano como veterinario.

En la actualidad, existe una tendencia a eliminar componentes de origen animal en los medios de cultivo en los que crecen las células empleadas como sustrato para la replicación viral, ya sea para vacunas de segunda como de tercera generación. Esta restricción se fundamenta en la potencial presencia de priones en los componentes de tales medios, por ejemplo en el suero utilizado como aditivo. En tal sentido, se propone establecer un protocolo de producción en el cual se utilice medio de cultivo libre de dicho componente (Serum Free Medium SFM). Este insumo es de origen comercial y están diseñados específicamente para cada línea celular. Por otro lado, la demanda de vacunas de calidad y eficacia avanza en el sentido de las innovaciones tecnológicas. Tanto en los países de Europa como América del Norte se utilizan vacunas recombinantes para controlar la rabia silvestre y/o doméstica, pero nuestro país no dispone de este tipo de productos. Consideramos que es de interés estratégico el desarrollo de una plataforma para dotar al MSAL con de este tipo de vacunas. La Universidad Nacional de Moreno (UNM), en el marco de desarrollo de la carrera de Lic. en Biotecnología, se propone en llevar a cabo líneas de investigación tecnológica entre las cuales, la vacunología viral es un área temática de interés. En tal sentido, se inició un convenio de colaboración con el SVAR. Como consecuencia del mismo, el proyecto que aquí se describe involucra la necesidad de implementar tecnologías de cultivo celular a escala para optimizar la elaboración de vacunas virales. Este nuevo proyecto complementa el anterior enfocado en el desarrollo de tecnologías downstream.

Hipótesis: Las células BHK son capaces de crecer en suspensión con medio libre de suero a una densidad celular que correlacione con una alta productividad viral, luego de ser infectadas tanto con virus rábico como con el vector recombinante MVA-RG. Objetivo General: Desarrollar una plataforma de producción de dos tipos de vacunas antirrábicas veterinarias con medio libre de

² Se solicita brindar información detallada en los campos que componen esta Parte I, ya que será publicada en el Repositorio online de la UNM. Esto permitirá difundir de manera amplia la investigación, sus resultados y visibilizar la labor de los miembros del equipo de investigación.

suelo, utilizando virus rábico inactivado o un vector recombinante, portador de la glicoproteína viral. Objetivos específicos: 1). Poner a punto un sistema de crecimiento de células BHK en suspensión con medio libre de suero. 2). Optimizar el proceso de infección de las células obtenidas en el objetivo 1) con virus rábico (objetivo 2) o con el vector recombinante MVA-RG (objetivo 3). 4). Evaluar el efecto adyuvante de distintas dosis de BCG para vacunas antirrábicas de segunda (objetivo 4) o tercera (objetivo) generación.

2. Marco de referencia (mín. 2 páginas- máx. 5 páginas)

Describir en qué campo (temático, disciplinar) se inserta la investigación, indicando:

- estudios antecedentes (propios o no) sobre el tema, avances y áreas de discusión.
- marco teórico o encuadre de referencia de la investigación: con qué enfoque, conceptos, dimensiones o modelos se abordó el tema/problema.

La rabia es una enfermedad viral zoonótica, que produce una encefalitis aguda casi siempre mortal una vez que han aparecido los síntomas clínicos. En hasta el 95% de los casos humanos, el virus de la rabia es transmitido por perros domésticos. La rabia afecta a animales domésticos y salvajes de sangre caliente y habitualmente se propaga a las personas por inoculación de saliva a través de mordeduras. La rabia está presente en todos los continentes, excepto en la Antártida, aunque más del 90% de las muertes humanas se registran en Asia y África. Se estima un número de 50 000 muertes anuales en todo el mundo. La rabia ocurre en dos formas epidemiológicamente diferentes: rabia urbana, con el perro como reservorio y transmisor y la rabia silvestre, con diferentes especies de vida silvestre actuando como reservorios o transmisores. El agente causal de la enfermedad de la rabia es el virus rábico (RABV), miembro del género *Lyssavirus* perteneciente a la familia *Rhabdoviridae*. El genoma del RABV está constituido por una molécula de ARN de cadena simple, no segmentada, de polaridad negativa, de aproximadamente 12 Kilobases (Kb). Los genes N, P, M, G y L codifican para la nucleoproteína, la fosfoproteína, la proteína de matriz, la glicoproteína y la proteína Large, respectivamente. Todas estas son proteínas estructurales. Los cinco genes están separados por secuencias intergénicas no codificantes compuestas por un dinucleótido entre los genes N y P, dos pentanucleótidos entre los genes P y M y M y G y una secuencia de 423 nucleótidos (entre G y L), que son únicos para los *lyssavirus*. La proteína G es la única proteína viral glicosilada. Produce las proyecciones triméricas tipo espigas o peplómeros en la superficie de la envoltura viral. La molécula de G está glicosilada con oligosacáridos de cadena ramificada, que representan el 10-12% de la masa total de la proteína. Es responsable de la adsorción del virus a su receptor específico presente en la superficie de las células blanco. La proteína G es el principal antígeno viral contra el que están dirigidos los anticuerpos neutralizantes producidos por la respuesta inmune del huésped. Se estima que hay alrededor de 400 trómeros de glicoproteína G, distribuidos en la superficie exterior de cada virión. La vacunación es la herramienta principal para la prevención y control de la enfermedad. Sin la administración de vacuna, la progresión de la infección por RABV lleva a la muerte del individuo. La primera generación de vacunas humanas utilizadas se basaba en la amplificación de cepas vacunales virales en tejido nervioso animal (cabra, conejo, ratón lactante, rata lactante) y una posterior inactivación por métodos físicos como la luz ultravioleta. Hay una tendencia mundial para discontinuar su producción y, por ende, su utilización dado que, por su naturaleza, existe registro de aparición de eventos adversos de síndromes tipo Guillain-Barré. La presencia de mielina presente en el tejido nervioso utilizado como sustrato, puede generar la aparición de anticuerpos contra la mielina propia de los individuos vacunados, con la consecuente respuesta

autoinmune. Otra desventaja de estas vacunas es que se necesitaban un número muy alto de administraciones para lograr la inmunización (el último esquema aprobado abarcaba 14 dosis en el rango de 1 mes). Es por estos motivos que la OMS/OPS ha recomendado la utilización de vacunas de segunda generación, que en lugar del tejido nervioso, la amplificación viral se realiza sobre cultivos celulares y son inactivadas por métodos químicos. Este tipo de vacunas son las más ampliamente elegidas como tratamiento tanto pre como postexposición a nivel mundial. Tienen un mejor perfil de seguridad y una mayor potencia que la generación anterior, con la consecuente disminución de dosis necesarias para obtener un título de anticuerpos protectores: 3 dosis en un período de un mes. Si bien estas vacunas son efectivas, presentan ciertas desventajas relacionadas con su obtención y administración. Esto se debe a que la producción requiere la utilización y el sacrificio de un gran número de animales, o la manipulación de grandes cantidades del patógeno en plantas productoras, con estrictas condiciones de bioseguridad. Esto implica que el personal debe estar específicamente entrenado y poseer inmunidad, con un título de anticuerpos protectores validado. Entre las desventajas inherentes a su aplicación podemos mencionar la aparición de reacciones adversas locales asociadas a los adyuvantes presentes en la formulación y la posibilidad de transmisión de patógenos no detectados (virus, bacterias, priones). La necesidad de disponer a nivel mundial de vacunas antirrábicas seguras, efectivas y de bajo costo ha llevado al desarrollo y evaluación de nuevos inmunógenos desde hace aproximadamente tres décadas. En este sentido, existen numerosos informes en la bibliografía que describen la utilización de vectores virales (replicativos o no) para el clonado y la expresión de la glicoproteína G del RABV, principal antígeno responsable de inducir inmunidad celular y humoral protectora en el hospedador. De este modo, se obtuvieron virus recombinantes basados en adenovirus canino y humano, en herpesvirus canino, en virus rábico no replicativo, en virus de la pseu-dorabia y en los siguientes poxvirus: vaccinia virus vaccinia modificado, cepa Ankara (Modified vaccinia virus: MVA) racoonpox, fowlpox y canarypox (CNPV). La inmunización de ratones y otras especies con estos vectores confirió protección frente al desafío letal con virus rábico. En Argentina, ocurrió un caso de rabia humana tanto en 2021 como en 2022, cuando el último caso databa de 2008 en la provincia de Misiones. La rabia canina está restringida a las provincias del norte, pero controlada, gracias a la intervención de los estados nacional, provincial y municipal con campañas de vacunación y de promoción y prevención de la salud. La rabia parda abarca una mayor zona de influencia llegando ya al norte de la Patagonia, consecuencia de la migración y distribución de murciélagos hematófagos, el reservorio más importante del RABV en la actualidad en nuestro país.

El Servicio Vacuna Antirrábica (SVAR) perteneciente al Instituto Nacional de Producción de Biológicos (INPB) en el ámbito de la Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (ANLIS) "Dr. Carlos G. Malbrán" tiene vasta experiencia en el desarrollo de vacunas antirrábicas de segunda generación, basadas en amplificación viral sobre distintos tipos de cultivos celulares y su posterior inactivación (Tesis de Maestría de Javier De Filippo). También realiza trabajos en cooperación con el Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO) del Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas pertenecientes al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Como resultado de esta interacción se desarrollaron vectores recombinantes que expresan la glicoproteína del virus rábico, específicamente un virus vaccinia modificado, cepa Ankara (Modified vaccinia virus: MVA) (tesis doctoral de la Lic. Débora Patricia Garanzini), que son potenciales candidatos a vacunas de tercera generación. Las respuestas humoral y celular inducidas por vacunas antirrábicas son consideradas mecanismos importantes para

la protección contra la rabia, sin embargo, se han reportado diferencias en la respuesta celular inducida por vacunas atenuadas o inactivadas. El Bacilo Calmette-Guérin (BCG), una de las vacunas más ampliamente usada a nivel mundial, se encuentra entre los inmunomoduladores usados para mejorar la vacunación. BCG produce una respuesta inmune que incluye reacción de hipersensibilidad retardada, producción de interferón gamma y diversas interleukinas que conducen a una respuesta inmune de tipo Th1. Se ha sugerido que la inmunidad mediada por células desempeña un papel importante en la defensa del huésped contra ciertas infecciones virales.

3. Métodos y técnicas (min. 2 páginas- máx. 4 páginas)

Indicar el trabajo de campo, documental y/o de laboratorio realizado, la forma de recolección de datos y sus fuentes. Al respecto, describir los métodos, técnicas, instrumentos y materiales utilizados para indagar el problema de investigación. Explicitar las unidades de análisis, los criterios de selección de muestras o casos. Indicar asimismo las formas de procesamiento y análisis de los datos recolectados.

En el momento de inicio del proyecto, a partir de marzo 2020, se decretó el aislamiento social, preventivo y obligatorio impuesto a nivel nacional en el contexto de la pandemia COVID-19, provocando limitaciones en la disponibilidad del personal abocado a este proyecto. A pesar de ello, se pudo avanzar con el cronograma propuesto, pero no cumpliendo todos los objetivos, tal como fuera informado en reuniones del Consejo Asesor.

Puesta a punto de plataforma de cultivo celular en suspensión:

Se disolvió polvo para preparar CD BHK-21 Production Medium (Gibco) en agua calidad mili y formulado según indicaciones del proveedor. 10 L de medio fueron esterilizados por filtración en cartucho de nylon 0,2 µm (Pall technologies) y alícuotado en botellas tipo Schott de 1 L. Se realizó un control de esterilidad según Farmacopea Argentina en caldos tioglicolato, tripticosa-soya y sabureaud, en el que se evalúa la presencia de microorganismos contaminantes durante 14 días (a 37 °C y los restantes a temperatura ambiente)

Para iniciar la puesta a punto del sistema de crecimiento celular en suspensión con el medio formulado estéril, se descongeló una ampolla de células BHK del banco trabajo del SENASA (anclaje dependiente) conservada en nitrógeno líquido (-196 °C) en un frasco de cultivo de 250 cm³ con 10 ml de medio constituido en un 20% por el medio CD BHK-21 y 80% por un MEM-D suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), de forma de ir adaptando las células al nuevo entorno. Se incubaron 48 hs a 37 °C y luego se trataron con tripsina 0,25% para amplificar la biomasa celular a 2 frascos de cultivo de 250 cm³ con 10 ml de medio, esta vez con una relación 1:1 entre ambos medios. Luego de 48 hs de incubación a 37 °C, se amplificaron, tripsinización mediante, a 2 frascos de cultivo de 100 cm³. Nuevamente, tras 48 hs de incubación, al llegar a un 80% de confluencia, se tripsinizaron ambos frascos para desanclar las células y traspasarlas a un botellón de vidrio borosilicato, con sistema de agitación de 1 L de capacidad (volumen de trabajo de 500 ml) con medio CD BHK-21. El desarrollo celular se evaluó por conteo de células viables, en cámara de Neubauer en alícuotas tomadas cada 24 horas, renovando el 10% del medio cada 24 hs.

Producción de virus rábico inactivado (VRI):

Una ampolla de células BHK conservada en nitrógeno líquido (-196 °C) fue descongelada en un frasco de cultivo de 250 cm³ con 10 ml de MEM-D suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Se incubaron 24 hs a 37 °C y luego se trataron con tripsina 0,25% (con EDTA) para amplificar la biomasa celular a 1 frasco de cultivo de 100 cm³ con 10 ml de medio. Luego de 48 hs a 37 °C, se tripsinizaron las células y fueron transferidas a un spinner flask de 125 ml conteniendo

0,3 g de microcarriers Cytodex 3 (Pharmacia) en 100 ml de MEM-D SFB 10 Se incubó a 37 °C y con una agitación de 30 rpm. Se procedió a realizar un conteo de células viables en cámara de Neubauer cada 24 hs para evaluar el crecimiento celular. Cuando la densidad celular fue de alrededor de 1 × 10⁶ células/microcarrier se produjo la infección con 10 ml de virus rábico (VR) cepa CVS-BHK (título 10^{6,4} DL /ml) a una multiplicidad de infección de 0,3 durante 30 minutos a temperatura ambiente y luego incubados a 33 °C con la adición de 10 ml de MEM-D suplementado con 2 SFB. Se cosechó por decantación de los microcarriers el sobrenadante, renovando cada vez el volumen de medio (100 ml aproximadamente) a las 48 hs de inicio de la infección, (C1), y luego cada 24 hs (C2, C3 y C4), cosechando un total de 4 sobrenadantes de cultivo.

Cada cosecha fue sometida a control de esterilidad y titulación viral por ensayo de neurovirulencia en ratón. Este ensayo consiste en inocular intracerebralmente 0,03 ml de diluciones seriadas en base 10 de cada suspensión viral a grupos de 10 ratones para evaluar la dosis que mata al 50% de los ratones (DL 50). Se observaron y registraron manifestaciones clínicas o muerte de los ratones compatibles con infección rábica durante 14 días luego de la inoculación. El análisis estadístico se realizó según método Reed-Muench.

Se polearon aquellas cosechas que resultaron estériles y con un título superior a 10⁴ DL /ml y se inactivaron con betapropiolactona 1:4000 durante 48 hs a 2-8 °C, obteniendo virus rábico inactivado (VRI). Luego se procedió a agregar thimerosal 1:20000 como conservante y llevado a pH de 7. Finalmente se realizó una clarificación por centrifugación durante 1000 rpm durante 10 min para eliminar debris celulares. El producto final VRI, fue controlado mediante ensayos de esterilidad e inocuidad en ratón sobre el VRI. Este último ensayo consiste en inocular 0,03 ml de la suspensión de VRI en 20 ratones para evaluar la presencia de virus residual no inactivado. Se observaron y registraron si ocurrieron manifestaciones clínicas o muerte de los ratones compatibles con infección rábica durante 21 días luego de la inoculación.

Producción de MVA-RG:

Un stock viral de MVA-RG de 10⁷ UFP/ml crecido sobre cultivo primario de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) se adaptó al crecimiento cultivo con MEM-D SFB 10 en monocapa de células BHK por pasajes en ciego cada 48 hs hasta presencia de efecto citopático en al menos 50% de las células. Luego de pasajes, se cosechó en sobrenadante de cultivo y se sometió a 3 ciclos de congelado (- 80 °C)/descongelado. Para titular el stock viral obtenido, se realizaron diluciones seriadas al décimo de la suspensión viral. Monocapas de FEP 80% confluentes, crecidas en placas de 6 pocillos (P6) se lavaron con PBS y se infectaron con 300 µL de las diluciones virales correspondientes. Luego de 4 h de adsorción a 37 °C, con agitación cada 1 min, los inóculos se descartaron y las monocapas se lavaron nuevamente. Posteriormente, se agregaron 3 ml de medio de placa semisólido. Se dejó solidificar a temperatura ambiente durante 20 min y luego se incubó en estufa gaseada hasta la visualización de las placas de lisis (3-5 días posteriores a la infección). En ese momento, se agregaron 2 ml de medio de placa semisólido con sustrato y las células se incubaron hasta la visualización de placas de lisis azules. El título del stock viral se expresó como unidades formadoras de placas de lisis (UFP) por ml, eligiendo la dilución viral donde se pudieran contar 10-30 placas de lisis/ pocillo de P6.

Con este stock viral, se infectaron con una moi de 0,1, 4 frascos de cultivo de 125 cm² de células BHK (1 ml de inóculo c/u), incubándose a 37 °C, durante 3 días, hasta presencia de efecto citopático. Los sobrenadantes de cultivos se polearon y fueron sometidos a ensayos de esterilidad y titulación en FEP.

Producción de BCG (Bacilo de Calmette-Guerin):

La BCG intravesical utilizada en el tratamiento del cáncer de vejiga y que será utilizada como adyuvante vacunal en este proyecto, es una suspensión de micobacterias vivas de Bacillus Calmette-Guerin. Su producción se realiza a partir de cultivos estáticos, es decir, el bacilo crece formando una película sobre la superficie del medio de cultivo Sauton (Van Deinse et al. 1950). El proceso se inició con la siembra de un lote de trabajo obtenido a partir del lote semilla secundario de la cepa Pasteur 1173 P2 en cultivo estacionario, sobre el medio bifásico Sauton-papa contenidos en tubos Roux. Los mismos se incubaron a 37°C entre 20 y 30 días. En este tiempo el crecimiento bacilar en el medio sólido (papa) se extiende en forma de velo fino sobre el medio líquido.

Luego, pequeñas cantidades de este velo fueron transferidos a Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo medio Sauton, con ayuda de un ansa espiralada (primer pasaje a medio líquido o S1) de forma tal que la película haya quedado flotando en el medio. Se trasladaron cuidadosamente a cámara de 37 °C para evitar que la película se moje o hunda, para incubarlos por el término de 7 a 10 días. Al cabo de ese tiempo, se realizó un nuevo pasaje (segundo pasaje o S2) en las mismas condiciones que en el S1, tomando esta vez un inóculo mayor para ser transferido a 450 ml de Sauton contenidos en Erlenmeyer de 1000 ml. Luego de 7 u 8 días incubados a 37 °C la película desarrollada fue cosechada.

Los velos del cultivo Sauton, de 7-8 días, fueron seleccionados por sus características de crecimiento normal (película rugosa que trepó aproximadamente 1 cm por encima de la pared del Erlenmeyer) y ausencia de contaminación de otros microorganismos.

Los mismos fueron filtrados a través de un embudo Birkhaug que retiene la biomasa celular que se colecta en condiciones de esterilidad. Este material contiene un émbolo con una graduación (medidas Birkhaug) que permite estimar el peso húmedo aproximado de masa microbiana de BCG. Cada medida Birkhaug equivale aproximadamente a 6,66 gramos de peso húmedo de BCG. Luego de escurrido libremente el medio de cultivo, se presionó el émbolo del embudo Birkhaug para liberar el resto de medio. De esta forma se obtuvo una pastilla compacta que era necesario disgregar y homogeneizar, para obtener bacilos sueltos y en pequeños grumos.

La disgregación se realizó haciendo una molienda de la masa bacilar en un kitasato con bolillas de acero inoxidable de 7 mm de diámetro, haciéndolo rotar a 30-40 vueltas por minuto por un periodo de 30 minutos en un rotor mecánico.

Por último, los bacilos se suspendieron en glutamato de sodio (excipiente protector de la viabilidad de BCG, no tóxico en humanos), a una concentración de 200 mg/ml.

En este punto se realizaron los siguientes controles para evaluar la calidad del producto obtenido

Pureza: Para determinar la ausencia de microorganismos contaminantes, la pureza de los cultivos fue ensayada en placas de agar Trypticase soya (TSA) y tubos con Caldo Trypticase soya (TSB) y tioglicolato. Todos fueron incubados a 35°C + 2°C y a 22°C+ 2°C por el término de 14 días (Farmacopea Argentina).

Identidad: Para la identificación de BCG Pasteur se realizó una PCR múltiple que identifica distintas regiones de diferencia presentes o ausentes en las diferentes sub cepas de BCG. La PCR múltiple amplifica 6 regiones genómicas diferentes.

Grado de agrupación: Las muestras obtenidas fueron coloreadas por la técnica Ziehl Neelsen para observar su agrupación en los campos microscópicos examinados. Los bacilos deben presentar una coloración roja debido a la fucsina básica después de la decoloración con alcohol-ácido

Viabilidad: 1. Ensayo de TT: 100 µl de diluciones seriadas de muestra fueron colocadas por sextuplicado en una placa de 96 wells de fondo plano (NUNC). Además, se utilizó 100 µl de medio Sauton como blanco del reactivo, por triplicado. Por último, 25 µl de una solución de TT 3mg/ml (conteniendo 0.1% de menadiona sodio bisulfito trihidrato de MP Biomedicals, Inc) se agregaron por triplicado a cada muestra de BCG y al blanco de reactivo. El resto de los wells sin reactivo de

TT representó la turbidez de cada muestra sembrada. La placa se incubó durante 3 hs a 37°C al resguardo de la luz. Las densidades ópticas fueron medidas a una longitud de onda de 450 nm usando un lector Labsystems Multiskan Reader. El número de bacterias viables por ml fue determinado por la ecuación de una curva de calibración establecida con una suspensión de BCG patrón, donde se relaciona la absorbancia (450 nm) en función de las Unidades Viables/ml, previo establecimiento de la correlación entre este método (TT) y el de conteo de UFC en medio sólido Middlebrook. La relación es lineal y responde a la ecuación: $ABS(450nm) = 0,441 UFC/ml - 0,1073$ con la cual se calcula el valor de unidades viables por ml. 2. Conteo de colonias en medio sólido: A una solución de 1 mg/ml de cada cultivo se le realizaron diluciones seriadas en medio Sauton: a) 1:1000 b) 1:2000 c) 1:4000 y d) 1:8000, 20 µl de las diluciones b y c se sembraron por quintuplicado y 20 µl de la dilución c en diez pocillos de una placa de 24 pocillos con medio Middlebrook 7H11 suplementado con OAD. La dilución "a" se sembró como control de crecimiento. Las placas se incubaron a 37°C y luego de 15 días, aproximadamente, se contaron las colonias con una lupa binocular. Para obtener el valor de UFC/ml al número de colonias contadas se lo multiplica por el factor de dilución y por 50 que es la conversión de los 20 µl (volumen sembrado) para llevarlo a mililitro. El resultado fue sometido a análisis estadísticos, la variación entre el conteo de colonias para una misma dilución es verificada por el test de Chi-cuadrado y las diferencias entre las medias obtenidas por diluciones consecutivas fue verificada por el test t-Student. Paralelamente se realizó el conteo de una BCG control o de referencia interna (OMS 1977).

Se procedió a la formulación del producto final, por dilución a una concentración bacilar final de 120 mg/ml con glutamato de sodio 1,5% y entre $0,5$ a $1,9 \times 10^9$ bacilos vivos/ml de producto.

Evaluación del efecto adyuvante

Para evaluar la mayor eficacia vacuna en las formulaciones con BCG como adyuvante, se realizó un ensayo de potencia relativa. Para ello, alícuotas de 6 ml tanto de VRI como de MVA-RG fueron suplementadas con un volumen mínimo (160 microlitros) de vacuna BCG de forma tal de tener concentraciones bacilares de 10^5 , 10^6 y 10^7 . Con esas alícuotas, se inmunizaron en forma intraperitoneal grupos de 10 ratones con 2 dosis de 0,5 ml de cada una con 7 días de diferencia. Se largaron controles negativos para evaluar el efecto de la BCG per sé, con 6 ml de PBS y las mismas concentraciones de BCG y, también, ambas vacunas sin adyuvante. A los 7 días de la primera dosis, se procedió a realizar un desafío intracerebral con 0,03 ml de virus rábico fijo (cepa CVS-desafío al 10%) a todos los ratones. El virus desafío fue diluido de forma tal que se inocule entre 12 y 50 DL₅₀/ratón. Se observaron y registraron las manifestaciones clínicas o muerte de los ratones compatibles con infección rábica durante 14 días luego de la inoculación.

Finalmente, para evaluar con mayor profundidad el efecto producido en las formulaciones con BCG como adyuvante, se realizó un ensayo de potencia, según método NIH. Para ello, alícuotas de 6 ml de diluciones seriadas en base 5 de cada una de las vacunas fue suplementada con un volumen mínimo (160 microlitros) de vacuna BCG de forma tal de tener concentraciones bacilares de 10^5 , 10^6 y 10^7 . Se largaron controles negativos para evaluar el efecto de la BCG per sé, con 6 ml de PBS y las mismas concentraciones de BCG y, también, cada vacuna sin adyuvante. Con esas alícuotas, se inmunizaron en forma intraperitoneal grupos de 10 ratones con 2 dosis de 0,5 ml de cada una con 7 días de diferencia. En paralelo y bajo el mismo, se inmunizaron ratones con vacuna de referencia (provisita por SENASA, 1 UI/ml). A los 7 días de la primera dosis, se procedió a realizar un desafío intracerebral con 0,03 ml de virus rábico fijo (cepa CVS-desafío al 10%) a todos los ratones. El virus desafío fue diluido de forma tal que se inocule entre 12 y 50 DL_{50} /ratón. Se observaron y registraron las manifestaciones clínicas o muerte de los ratones compatibles con infección rábica durante 14 días luego de la inoculación. Se calculó la dilución protectora 50 (DP_{50}) de cada vacuna para luego compararla con la vacuna de referencia, quedando definido un valor antigénico para cada una. El análisis estadístico se realizó según método Reed-Muench.

4. Resultados y discusión (min. 5 páginas- máx. 15 páginas)

Desarrollar los resultados, en relación a los objetivos del proyecto, especificando (de ser posible) los siguientes aspectos:

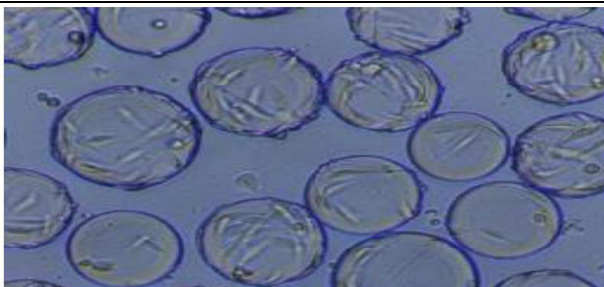
- nuevos conocimientos obtenidos sobre los casos o unidades bajo estudio.
- avances en materia de conocimiento científico sobre el tema bajo estudio, formulación de enfoques originales e innovadores (modelos, conceptos, etc.).
- Contribuciones para la resolución de problemas específicos y/o formulación de herramientas de intervención, diseño o mejora de productos y procesos.

Por último, desarrollar las conclusiones y reflexiones finales a las que se llegó luego de la investigación, en relación a los interrogantes y objetivos planteados.

Los controles de proceso de esterilización de medios de cultivo (CD BHK-21 Production Medium y MEM-D) por filtración en cartucho de 0,2 μm (Nylon Sealkleen; Pall) fueron satisfactorios, es decir, no hubo crecimiento microbiano durante los 14 días, resultando productos estériles.

En lo que respecta a la puesta a punto del cultivo de células BHK en suspensión, en los primeros 5 pasajes luego de descongeladas las células crecieron lentamente a densidades inferiores a 10^3 células/ml. En este punto, se detuvo el proceso de optimización del cultivo ante la falta de RRHH para poder continuarlo, motivado por el aislamiento preventivo y obligatorio decretado por el estado nacional al inicio de la pandemia. Lamentablemente, ante esta situación, y, de forma de retrasar lo menos posible el proyecto, se decidió suspender este objetivo y avanzar en la producción de stock viral de VRI sobre cultivo agitado de células crecidas sobre microcarriers y de MVA sobre cultivos celulares estáticos.

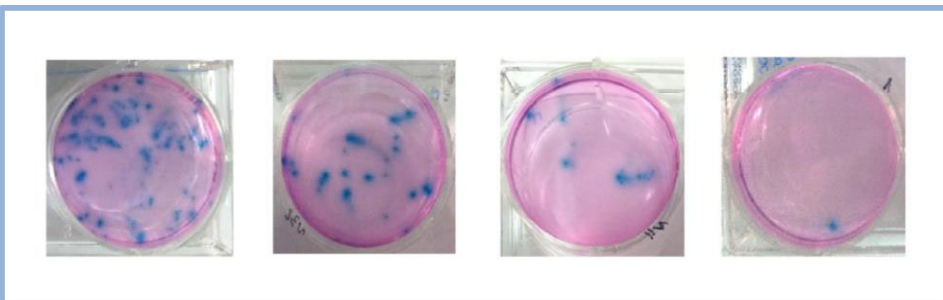
Foto 1: Células BHK crecidas sobre microcarriers a las 48 hs post-siembra (aumento 400)



Para la producción del stock de VRI se polearon las cosechas C2 y C3 que resultaron satisfactorias para los ensayos realizados: estériles y títulos de $10^{7,2}$ DL₅₀/ml y $10^{7,5}$ DL₅₀/ml, respectivamente. El volumen final fue de 200 ml, ajustados a un pH final de 7,4. El título del pool de ambas cosechas fue $10^{7,4}$ DL₅₀/ml. Luego de la inactivación y formulación, los ensayos de inocuidad en ratón y esterilidad realizados resultaron satisfactorios, demostrando que el proceso de inactivación fue correctamente realizado. A partir de este momento, el producto pudo ser manipulado sin condiciones de bioseguridad.

El título de MVA-RG producido fue $1,8 \times 10^6$ UFP/ml y el control de esterilidad fue satisfactorio.

Foto 2: Formación de placas coloreadas según dilución del stock viral para cálculo del título.



El volumen final fue de 200 ml aproximadamente.

El stock de BCG producido fue de 50 ml de suspensión de una concentración bacilar final de 120 mg/ml con glutamato de sodio 1,5% y entre $0,5$ a $1,9 \times 10^9$ bacilos vivos/ml de producto.

Foto 3: Producción de BCG



Los controles de pureza, identidad y grado de aglomeración resultaron satisfactorios. Los resultados de los ensayos in vivo realizados se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 1: Potencia relativa

	s/BCG		BCG 10 ⁵		BCG 10 ⁶		BCG 10 ⁷	
	V	M	V	M	V	M	V	M
MVA-RG	7	3	0	10	2	8	0	10
VRI	9	1	10	0	10	0	9	1
PBS	0	10	1	9	0	10	0	10

V = ratones que sobrevivieron al ensayo
M = ratones que murieron durante el ensayo o tuvieron
sintomatología compatible con rabia al último día del mismo
ND = no determinado
REF = vacuna de referencia DILAB-SENASA (1 IU/ml)

Con estos resultados, podemos afirmar que la BCG en ninguna concentración produce respuesta inmune inespecífica que proteja a los ratones contra el desafío con virus rábico. En lo que respecta a VRI, se evidencia que no existe diferencia significativa comparando la vacuna sin adyuvante con las diferentes concentraciones de BCG. El MVA-RG solo induce una menor protección al desafío con el virus rábico, pero cuando se agregan las distintas concentraciones de BCG, se produce un efecto contrario al que se pensaba, ya el nivel de protección desciende significativamente, al punto de morir casi todos los ratones.

Tabla 2: Potencia VRI

	s/BCG		BCG 10 ⁵		BCG 10 ⁶		BCG 10 ⁷	
	V	M	V	M	V	M	V	M
VRI 1/5	10	0	10	0	10	0	10	0
VRI 1/25	8	2	9	1	9	1	9	1
VRI 1/125	7	3	7	3	7	3	6	4
PBS	0	10	0	10	0	10	0	10
REF 1/5	10	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/25	8	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/125	4	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/625	10	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND

DP₅₀ REF = 1:74,9
DP₅₀ VRI = 1:153,3
DP₅₀ VRI BCG 10⁵ = 1:176,5
DP₅₀ VRI BCG 10⁶ = 1:176,5
DP₅₀ VRI BCG 10⁷ = 1:142,9
Valor antigénico VRI = 2,1 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁵ = 2,4 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁶ = 2,4 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁷ = 1,9 UI/ml

Al analizar el efecto de las distintas concentraciones de BCG sobre las distintas diluciones de VRI podemos afirmar que no existe un efecto significativo referente a la respuesta inmune frente al desafío con virus rábico. Esto se traduce en valores antigénicos similares, comparados con la potencia del VRI sin agregado de adyuvante.

Tabla 3: Potencia MVA-RG

	s/BCG		BCG 10 ⁵		BCG 10 ⁶		BCG 10 ⁷	
	V	M	V	M	V	M	V	M
MVA-RG 1/5	7	3	6	4	7	3	7	3
MVA-RG 1/25	3	7	2	8	2	8	3	7
MVA-RG 1/125	2	8	1	9	2	8	1	9
PBS	0	10	0	10	0	10	0	10
REF 1/5	10	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/25	8	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/125	4	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
REF 1/625	10	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND

DP₅₀ REF = 1:74,9
DP₅₀ MVA-RG = 1:14,1
DP₅₀ MVA-RG BCG 10⁵ = 1:9,4
DP₅₀ MVA-RG BCG 10⁶ = 1:12,1
DP₅₀ MVA-RG BCG 10⁷ = 1:12,5
Valor antigénico MVA-RG = 0,2 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁵ = 0,1 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁶ = 0,2 UI/ml
Valor antigénico VRI BCG 10⁷ = 0,2 UI/ml

El efecto antagónico observado en el ensayo de la Tabla 1, se ve sólo cuando el MVA-RG no se diluye. En esta tabla, al igual que con VRI, las distintas concentraciones de BCG no muestran diferencia alguna sobre el nivel de protección que provoca la vacuna sin adyuvante. Por otro lado, el título del stock de MVA-RG producido genera una protección claramente menor al VRI, y mucho menor a lo esperado.

En conclusión, no se pudo cumplir el objetivo de puesta a punto de una plataforma de crecimiento de células BHK en suspensión por motivos ajenos al proyecto. Se decidió solucionar esta dificultad de forma tal de tener vacunas para evaluar el efecto adyuvante de la BCG sobre el desafío in vivo con virus rábico, considerando que el antígeno producido es idéntico en ambos sistemas (crecimiento celular en suspensión vs. estático). Este proyecto proponía demostrar que

la productividad tanto de MVA-RG como de virus rábico en células no adheridas sería mayor, generando vacunas de mayor eficacia.

El efecto de la BCG como adyuvante de estas vacunas no mostró diferencias significativas en los ensayos in vivo, con lo cual podemos concluir que el agregado de BCG en las concentraciones evaluadas no mejora la respuesta inmune de los ratones desafiados con virus rábico.

5. Nuevos interrogantes y líneas de investigación a futuro

Consignar si la investigación hizo surgir nuevos interrogantes o si emergieron potenciales líneas de investigación a desarrollarse en el futuro a partir de los hallazgos.

Queda pendiente poder poner a punto una plataforma de cultivo de células en suspensión para el escalado y mayor productividad viral.

La performance del VRI fue muy satisfactoria, considerando que el antígeno no fue sometido a procesos de purificación y concentración, sentando un horizonte de eficacia muy promisorio. Al ser un antígeno utilizado en la formulación de vacunas de uso veterinario es que los requerimientos de calidad son menores que las de uso humano.

El título de MVA-RG fue menor que el obtenido en los trabajos previos. Para generar una respuesta inmune protectora, debe ser, como mínimo, de 10^7 UFP/ml. No encontramos en bibliografía información que sustente el efecto antagonista de las distintas concentraciones de BCG sobre la vacuna. Suponemos que la respuesta celular producida por el bacilo puede interferir con la infección del MVA-RG en las células target.

Las concentraciones de BCG evaluadas fueron decididas en función de un análisis bibliográfico. Lamentablemente, los resultados de este proyecto son concluyentes respecto del efecto que producen para este tipo de vacunas.

6. Bibliografía (min. 2 página- máx. 4 páginas)

Consignar los textos y fuentes utilizados en la redacción de los campos anteriores.

- Rabies 3rd Edition; Jackson A-
- Virología Médica; Oubiñas J Carballal G
- Guía para la prevención, vigilancia y control de la rabia en Argentina. 2018. Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.
- Laboratory techniques in rabies, 4rd Edition, 1996 Geneva WHO; Kaplan MM, Koprowski H
- Nonspecific Protection of Mice against Influenza Virus Infection by Local or Systemic Immunization with Bacille Calmette-Guerin; THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES. VOL. 136, NO.2. AUGUST 1977; Spencer J, Ganguly R, Waldman R
- Effect of vaccination and the immunomodulators "bacillus of Calmette-Guerin, Avridine and Propionibacterium acnes" on rabies in mice; Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases 21 (1998) 305-318; Megid J et al.
- Expression of the B-cell and T-cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein in *Mycobacterium bovis* BCG and induction of an humoral response in mice; Vaccine 20 (2002) 731-736; Da Cruz F et al.
- The Vaccine Formulation Laboratory: A platform for access to adjuvants; Vaccine 29S (2011) A37- A39; Collin N, Dubois P

- Highly Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Replicates in Baby Hamster Kidney Cells, a Potential Host for Virus Propagation, but Not in Various Human Transformed and Primary Cells; *our a o e 79(2): 347–52* 1998; Drexler I et al.
- Recombinant MVA Expressing Secreted Glycoprotein D of BoHV-1 Induces Systemic and Mucosal Immunity in Animal Models. *ira mmu24 (4): 301–39* 2011; Ferrer MF et al.
- *ri ci es o iro o y Mo ecu ar io o y at o e esis a d tio*. Edited by ASM Press. 2nd ed. 2003; Flint SJ et al.
- Recombinant Veterinary Vaccines Against Rabies: State of Art and Perspectives.” In *mer i a d eemer i ,225–42; Del Médico Zajas MP et al.*
- Modified Vaccinia Virus Ankara Exerts Potent Immune Modulatory Activities in a Murine Model; Edited by Olivier Neyrolles. *o 5 (6): e11400*. 2010; N rder M et al.
- Viral Vectors as Vaccine Platforms: Deployment in Sight. *urre t i io i23 (3): mmu o o 377–82* 2011; Rollier C et al.
- Oral Vaccination of Dogs with Recombinant Rabies Virus Vaccines. *irus ese111 (1): 101–5* 2005; Rupprecht C et al.
- Safety of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) in Immune-Suppressed Macaques. *acci 19 e (27): 3700–3709*.2001; Stittelaar K et al.

Parte II

Dimensiones de cumplimiento del Plan de Trabajo

1. Balance de cumplimiento del Plan de Trabajo

Describir el grado de cumplimiento de las actividades planeadas. Dificultades encontradas y qué reorientaciones o soluciones se adoptaron para desarrollar el plan de trabajo. Actividades no planificadas.

Como ya fue mencionado, el contexto pandémico impidió cumplir el objetivo de poner a punto el cultivo en suspensión de células BHK. Para enfrentar esta dificultad, se produjeron stocks virales sobre cultivos celulares en monocapa. Las actividades no planificadas se realizaron en función de la solución planteada.

2. Consolidación del equipo de investigación

Apellido y Nombre	DNI	Fecha de nacimiento	Máximo nivel educativo alcanzado	Categorización docente investigador	Rol ³	Pertenencia
Pérez, Oscar	13852329	14/03/1960	Universitario	No categorizado	Director	UNM/AN-LIS
Riva, Diego	25558097	03/11/1976	Doctorado	No categorizado	Co-director	UNM
Arribi-llaga, Sofía	29193150	26/11/1981	Maestría	No categorizado	Docente investigadora	UNM/AN-LIS

³ Director/a/Co director/a/ investigador/a/ Auxiliar docente/ Becario graduado/Becario estudiante/Auxiliar estudiante. Si es becario/a, consignar institución otorgante y tipo de beca (de iniciación, estímulo, doctoral, postdoctoral, etc.)