

Artículo de investigación

## Estandarización de un protocolo para obtención de inóculo inactivado de adenovirus aviar serotipos 4 y 8b en células LMH

### *Protocol standardization for obtaining inactivated inoculum of avian adenovirus serotypes 4 and 8b in LMH cells*

Juan Carlos Flores-Santos<sup>1</sup>, Juana Quispe<sup>1</sup>, Yosef Daniel Huberman<sup>2\*</sup>, Alfredo Mendoza-Espinoza<sup>1</sup>,  
Melanie Caballero-García<sup>1</sup><sup>1</sup>Quimtia S.A. Desarrollo e investigación. Laboratorio de Virología Molecular. Lima, (CP15073) Perú.<sup>2</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Laboratorio de Bacteriología. RN 226 Km 73.3 Balcarce (CP07620), Buenos Aires, Argentina.

\*e-mail: melanie.caballero@quimtia.com

(Recibido 9 de junio 2022; aceptado 1 de agosto 2022)

#### RESUMEN

Adenovirus aviar tipo 1 (FAdV) es considerado un patógeno de importancia para la industria avícola. Los serotipos 4 (FAdV-4) y 8b (FAdV-8b) son responsables de hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH) y síndrome de hidropericardio (HHS) en pollos y son prevalentes en el Perú. El objetivo del presente trabajo fue establecer un protocolo estandarizado de obtención de inóculos virales inactivados de FAdV-4 y FAdV-8b producidos en células de hepatoma de pollo (LMH). Para ello, células LMH al 70 % de confluencia, crecidas en medio DMEM con 10 % de suero fetal bovino, fueron infectadas con FAdV-4 o FAdV-8b para evaluar el valor de multiplicidad de infección (MOI) y tiempo de cosecha óptimos. Luego, se realizó la producción de 1L de ambos serotipos considerando un MOI de 10 y tiempo de cosecha de 96 h post-infección (hpi). Seguidamente, ambas cosechas virales fueron clarificadas y concentradas mediante ultrafiltración tangencial (UFT) en membrana de 100kDa e inactivadas con 30mM de etilenimina binaria (BEI) a 37°C por 18 h. La pérdida de infectividad fue corroborada por el cálculo de dosis infecciosa del 50 % de cultivo de células (TCID<sub>50</sub>). Nuestros resultados mostraron que con un MOI de 10 y cosecha de 96 hpi se alcanzó el mayor título viral (> 1x10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL). Además, se mostró que la UFT permitió concentrar 10 veces la cantidad de virus con una recuperación del 91% y que la inactivación con BEI fue eficiente. Los inóculos inactivados obtenidos pueden ser utilizados en la formulación de una vacuna para prevenir IBH y HHS en pollos de forma segura.

**Palabras clave:** FAdV, hepatitis por cuerpos de inclusión, inóculo viral, LMH

#### INTRODUCCIÓN

Adenovirus aviar (FAdV) pertenece a la familia *Adenoviridae* y al género *Aviadenovirus*, se clasifica en 5 especies o genotipos (A – E), y según ensayos de

#### ABSTRACT

Avian adenovirus type 1 (FAdV) is considered an important pathogen for the poultry industry. Serotypes 4 (FAdV-4) and 8b (FAdV-8b) are responsible for Inclusion Body Hepatitis (IBH) and Hydropericardium Syndrome (HHS) in chickens and are prevalent in Perú. The objective of this work was to establish a standardized protocol for obtaining inactivated viral inoculum of FAdV-4 and FAdV-8b produced in chicken hepatoma (LMH) cells. For this, LMH cells at 70 % confluence, grown in DMEM medium with 10 % fetal bovine serum, were infected with FAdV-4 or FAdV-8b to evaluate the optimal multiplicity of infection (MOI) value and harvest time. Then, the production of 1L of both serotypes was carried out considering an MOI of 10 and a harvest time of 96 h post-infection (hpi). Next, both viral harvests were clarified and concentrated by tangential ultrafiltration (UFT) on a 100kDa membrane and inactivated with 30mM Binary Ethyleneimine (BEI) at 37°C for 18 h. Loss of infectivity was corroborated by calculating the 50 % cell culture infectious dose (TCID<sub>50</sub>). Our results showed that with an MOI of 10 and a harvest time of 96 hpi, the highest viral titer was reached (> 1x10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL). In addition, it was shown that UFT allowed concentrating 10 times the amount of virus with a 91% recovery rate and that inactivation with BEI was efficient. The inactivated inoculum obtained can be used in the formulation of a vaccine to safely prevent IBH and HHS in chickens.

**Keywords:** FAdV, inclusion body hepatitis, viral inoculum, LMH

reconocimiento de antigenicidad (virus neutralización o análisis de secuencia) se subdivide en 12 serotipos<sup>1</sup>. Algunos serotipos inducen hepatitis por cuerpos de inclusión (IBH), síndrome de hepatitis-hidropericardio (HHS) o erosión de molleja adenoviral (AGE)<sup>2</sup>. Este virus

ocasiona pérdidas económicas muy sustanciales en la avicultura, debido a la alta mortalidad observada por IBH o HHS y el retraso del crecimiento en relación con IBH y AGE<sup>2,3</sup>.

En recientes investigaciones se ha establecido el papel emergente de algunas de las cepas de FAdV como patógenos primarios, principalmente en pollos. Así, las cepas de FAdV serotipo 1 (FAdV-1) clasificado dentro del genotipo A está asociado a AGE; las cepas de FAdV-4 (genotipo C) causan HHS, mientras que los genotipos D (serotipos 2 y 11) y E (serotipos 8a y 8b) son los principales agentes causales de IBH<sup>4,5</sup>.

En el Perú se han reportado los serotipos FAdV-4, FAdV-7, FAdV-8a, FAdV-8b, FAdV-9 y FAdV-11<sup>6-8</sup>; en España se reportaron FAdV-2, FAdV-8b y FAdV-11<sup>9</sup>; en Brasil se reportaron los serotipos FAdV-8a, FAdV-8b y FAdV-11<sup>10</sup>; en México se identificó un FAdV-4 altamente virulento<sup>11</sup>; en Turquía, se mostró los serotipos FAdV-8b y FAdV-11<sup>12</sup> y finalmente, en China se reportó predominancia del serotipo FAdV-4, en comparación a FAdV-8a y FAdV-8b<sup>13</sup>. Por otro lado, hay reportes de desplazamiento de la dominancia de serotipos, por ejemplo, en Corea del Sur, el serotipo FAdV-8b desplazó la predominancia de FAdV-4<sup>14</sup>. Para el control de estas enfermedades la vacunación resulta una herramienta preventiva ampliamente utilizada. La literatura científica indica que la protección cruzada entre los serotipos es parcial, es decir, mientras que existe cierta protección cruzada entre serotipos incluidos en un mismo genotipo, dicha protección es menos probable entre serotipos incluidos en genotipos diferentes<sup>15</sup>. De hecho, se ha reportado que las vacunas contra FAdV-4 carecen de protección cruzada contra FAdV-8b en el campo y concluyen que FAdV-8b sea incorporado en la vacunas comerciales<sup>14</sup>. Por ello se valora el desarrollo de vacunas inactivadas de tipo polivalentes.

Las vacunas inactivadas que contienen FAdV, tradicionalmente se obtienen utilizando huevos embrionarios libres de patógenos específicos; no obstante, esta plataforma de producción implica ciertas desventajas: disponibilidad de huevos, logística laboriosa, generación de residuos biológicos y adaptación de virus a huevos<sup>16,17</sup>. Considerando lo anterior, el cultivo celular es considerado como una buena tecnología para el cultivo y aislamiento viral, siendo más preciso y sensitivo para la identificación del virus. Se han descrito el uso de células de fibroblastos de pollos, células embrionarias de riñón o hígado de pollo, células de fibroblasto de codorniz y células de hepatoma, conocida como células LMH<sup>2</sup> para aislamiento y propagación de partículas virales de FAdVs, las cuales causan efectos citopáticos luego de 5 a 6 días post-inoculación<sup>18</sup>. Además, en comparación con vacunas utilizando inóculo viral producido desde embrión de pollo, las vacunas derivadas de cultivo celular requieren de menor logística para su fabricación.

En este trabajo se presenta una estrategia de producción de un inóculo viral inactivado de FAdV-4 y FAdV-8b usando células LMH como plataforma cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Línea Celular

La línea celular inmortalizada LMH (del inglés, *Leghorn Male Hepatoma*) fue obtenida desde CLS (Cell Lines Service, Alemania) y cultivada a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), con 10 % de suero fetal bovino (SFB; Sigma Aldrich Co.,

St Louis, Missouri, USA) inactivado por calor y con el agregado de solución antibiótico-antimicótico (Sigma Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA).

### Cepas del Virus

Adenovirus aviar tipo 1 serotipo 4 y 8b (FAdV-4 y FAdV-8b) fueron aislados de hígado de pollos de engorde infectados naturalmente en los años 2003 y 2019, respectivamente, en granjas ubicadas en Lima. Dichas cepas fueron identificadas por análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos del hexón en el Poultry Diagnostic Research Center (Atlanta, GA, USA), y fueron agrupados como serotipo 4 y serotipo 8b. Estas cepas se mantienen conservadas a -80°C en el cepario viral del laboratorio de Investigación y Desarrollo de Quimtia S.A. (Lurín, Lima, Perú).

### Infección viral con diferentes valores de MOI

La determinación de los parámetros de infección para la producción de FAdV-4 y FAdV-8b se realizó mediante la evaluación de diferentes valores de multiplicidad de infección (MOI). Se usaron células LMH, crecidas por 72h en medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) y antibiótico-antimicótico, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Al alcanzar el 70 % de confluencia, las células fueron infectadas con MOI de 2 y 10. Para la infección viral de las células LMH, se aspiró el sobrenadante del cultivo de LMH, se lavó la monocapa con buffer fosfato salino de Dulbecco, (DPBS, Sigma Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA), se adicionó el inóculo viral y se incubó durante 1 h a 37°C agitando el cultivo suavemente cada 15 min. Finalizado el tiempo de incubación, se lavó nuevamente la monocapa con DPBS, se adicionó medio de cultivo fresco y se incubó a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. A las 48, 72, 96 y 120 h posterior a la infección (hpi) se tomó una muestra del sobrenadante para determinar el título viral mediante la técnica del cálculo de la dosis infectiva de 50 % de cultivos celulares (TCID<sub>50</sub>).

### Producción de FAdV-4 y FAdV-8b

Una vez establecido el MOI adecuado de infección se realizó la producción de 1 L de inóculo viral de cada serotipo (FAdV-4 y FAdV-8b). Células LMH fueron sembradas en frascos T-225 (225 cm<sup>2</sup>), 7 x 10<sup>6</sup> células en cada T-225, conteniendo 50 mL de medio DMEM suplementado con 10 % de SFB y antibiótico-antimicótico. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70%, se realizó la infección con FAdV-4 o FAdV-8b con un MOI de 10, según corresponda, y se incubó a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante 96 h. Se realizó la cosecha del virus y el cultivo se recuperó en frascos estériles. Se centrifugó a 4000 RPM durante 30 min a 4°C. Luego, el sobrenadante clarificado fue filtrado a través de una membrana de 0.2µm.

### Concentración por ultrafiltración tangencial

Las cosechas de FAdVs (volumen de 1 L por cada serotipo) fueron sometidas a ultrafiltración tangencial, lo que permitió reducir el volumen. Se trabajó con una presión de alimentación (P<sub>inlet</sub>) de 0.5 bar y presión transmembrana (TMP) constante de 0.4 bar. Para ello se usó el equipo SARTOFLOW® Advanced (Sartorius, Alemania) empleando el casete Sartocon® Slice Hydrosart® (Sartorius, Alemania), con un tamaño de poro de 100 kDa y un área de membrana de 0.1 m<sup>2</sup>. El producto final (concentrado) fue esterilizado por filtración en membrana de 0.2 µm y conservado a 4°C hasta su inactivación.

### Titulación de FAdV-4 y FAdV-8b

La muestra viral fue titulada mediante TCID<sub>50</sub> por el método de Reed-Muench<sup>19</sup>, siguiendo las indicaciones de Chen<sup>20</sup>. Se preparó diluciones seriadas del virus desde 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-10</sup> en medio DMEM con 10 % de SFB y antibiótico-antimicótico. Luego, se realizó la mezcla de 100µL de cada dilución viral con 100µL de una suspensión de células LMH de 3 x 10<sup>5</sup> células/mL por pozo en una placa de 96 pozos. Se realizaron 8 réplicas por cada dilución seriada y se incubó a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> durante 7 días. Se contó el número de pozos infectados por presencia del efecto citopático y se realizó el cálculo del TCID<sub>50</sub>/mL.

### Inactivación viral con Etilenimina Binaria (BEI)

Para la inactivación viral se siguió el método de Bahnemann con modificaciones<sup>21</sup>. Brevemente, se preparó una solución de BEI mediante la ciclación de 0.58M de bromhidrato de 2-bromoetilamina (Sigma Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) mezclado con una solución de NaOH de 0.5M a 37°C durante 1 h. La reacción se controló siguiendo la caída del pH debido a la formación de BEI y se filtró en esterilidad en membrana de 0.2µm. La preparación de BEI se añadió a la suspensión viral (FAdV-4 o FAdV-8b) para una concentración final de BEI de 30 mM. Se incluyó un control viral sin adición de BEI, el cual ante un estudio de control de la inactivación (ensayo de pérdida de infectividad) debería mantener su capacidad de causar efecto citopático en células. Las suspensiones de virus se incubaron a 37°C durante 18h. El BEI residual se hidrolizó mediante la adición de una solución estéril de tiosulfato de sodio (Sigma Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) de 1.26 M al 10 % del volumen del BEI utilizado.

### Ensayo de pérdida de infectividad

Se realizó el ensayo de TCID<sub>50</sub> con la muestra viral inactivada con diluciones seriadas entre 10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>, y luego de 7 días se evaluó la presencia de efecto citopático. Adicionalmente, se sembró 5x10<sup>5</sup> células en un frasco T-25 (25 cm<sup>2</sup>) con 5mL de medio DMEM con 10 % SFB y antibiótico/antimicótico, e incubó por 24 h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego de este periodo, el cultivo fue inoculado con 100 µL de muestra viral inactivada e incubado por 5 días a 37°C y 5 % CO<sub>2</sub>. Ausencia de efecto citopático se consideró como pérdida total de infectividad. Para los controles se usaron una muestra viral sin inactivar (control positivo) y solución de BEI neutralizada (control negativo).

## RESULTADOS

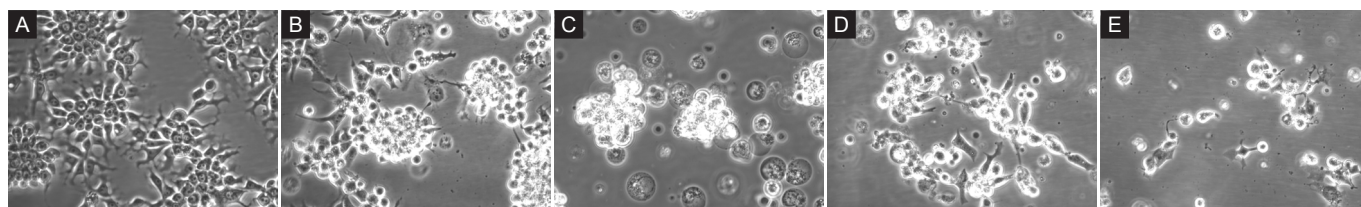
El cultivo LMH infectado por adenovirus aviar serotipo 4 (Figura 1) y serotipo 8b (Figura 2) fue visualizado microscópicamente. En ambos casos, a las 24 hpi (Figura 1B y 2B) se observaron alteraciones en algunas células: formación de aglomeraciones de células redondeadas y refringencia en algunos puntos de la monocapa; progresivamente, estas características fueron más evidentes a las 48 hpi con pérdida de la monocapa en algunos puntos, aparición de células redondeadas e hinchadas con citoplasma granular, mayor formación de aglomeraciones celulares y presencia de restos celulares. A las 72 hpi (Figuras 1C y 2C), se observaron una pérdida casi total de la morfología y monocapa celular, gran cantidad de cuerpos celulares en suspensión y restos celulares. No se observaron diferencias en el estado microscópico entre las 72 hpi y 96 hpi, en ambas infecciones.

Los resultados del título viral por el cálculo de TCID<sub>50</sub> en dos valores de MOI, a las 72 y 96 hpi, se presentan en Figura 3. Se observó mejores títulos a las 96 hpi comparado a las 72 hpi. El MOI de valor 10 a las 96 hpi alcanzó el mejor título de 1.8 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, que representó 4 veces más título que un MOI de 2 en el mismo periodo de infección.

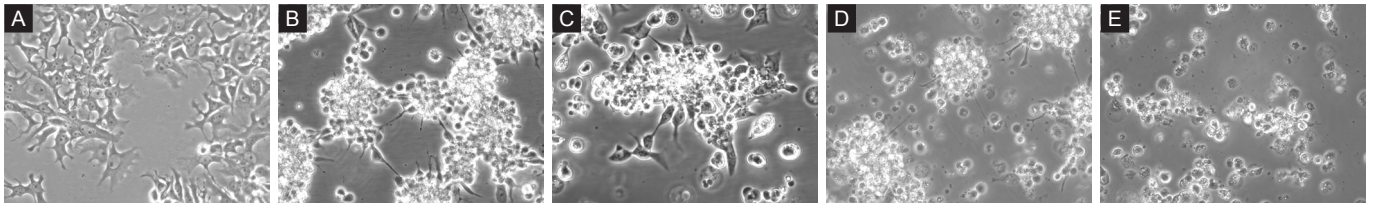
La evolución del título viral alcanzado en el cultivo de LMH, luego de la infección con virus FAdV-4 o FAdV-8b durante 120 h, está presentada en la Figura 4. Se observó que en ambas infecciones el título alcanzó sus mejores valores a las 96 hpi: 2.1 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL y 4.7x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL para serotipos 4 y 8b, respectivamente. Entre las 96 hpi y 120 hpi, no se observaron diferencias en los títulos virales.

El título viral luego de la ultrafiltración tangencial con membrana de 100 kDa se muestra en la Tabla 1. Para FAdV-4 se obtuvo 10 veces una reducción del volumen inicial con un rendimiento de recuperación de 91%, mientras que FAdV-8b se obtuvo 9 veces la reducción del volumen inicial con 83.2% de rendimiento de recuperación.

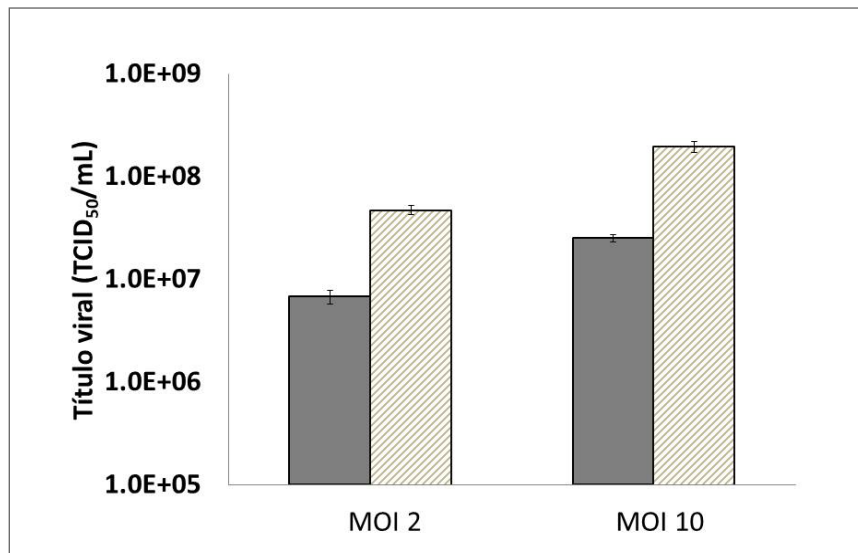
En las figuras 5 y 6 se puede observar una vista microscópica de cultivos de LMH en contacto con los virus inactivados FAdV-4 y FAdV-8b, respectivamente. Se observó que las muestras virales tratadas con BEI no causaron alteración de la morfología o monocapa de las células LMH (Figura 5A y 6A), y presentaron similares características a los cultivos de control negativo de infección (Figura 5B y 6B). Las muestras sin inactivar (Figura 5C y 6C) causaron alteración de la morfología y pérdida total de la monocapa.



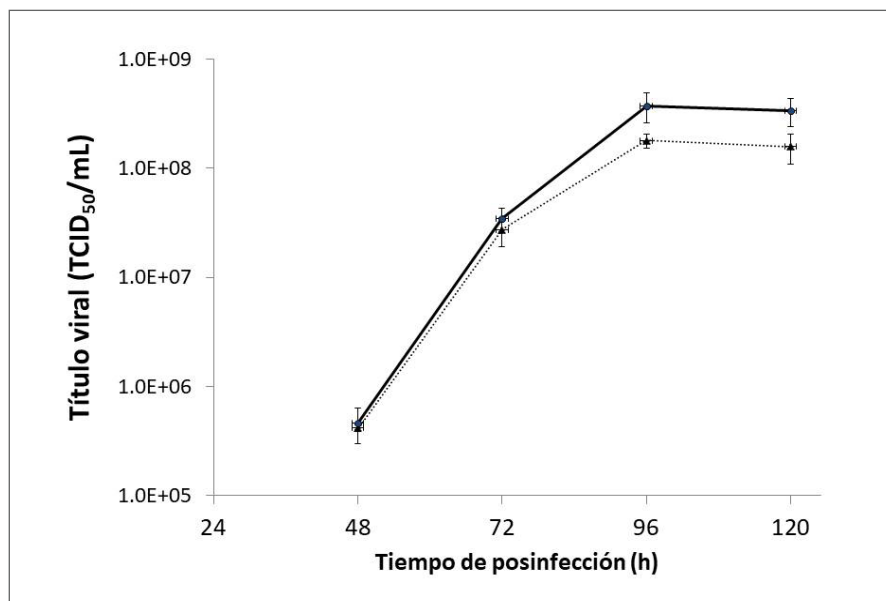
**Figura 1.** Evolución del efecto citopático causado por FAdV serotipo 4 en células LMH. Antes de la infección (A); 24 horas posterior a la infección (hpi) (B); 48 hpi (C); 72 hpi (D); 96 hpi (E).



**Figura 2.** Evolución del efecto citopático causado por FAdV serotipo 8b en células LMH. Antes de la infección (A); 24 horas posterior a la infección (hpi) (B); 48 hpi (C); 72 hpi (D); 96 hpi (E).



**Figura 3.** Titulo viral obtenido luego de 72 hpi (barras sólidas) o 96 hpi (barras entramado) usando dosis infectiva de 50 % de cultivos celulares ( $TCID_{50}$ ). Células LMH fueron infectadas usando virus FAdV-4 con valor de 2 o 10 de multiplicidad de infección (MOI).

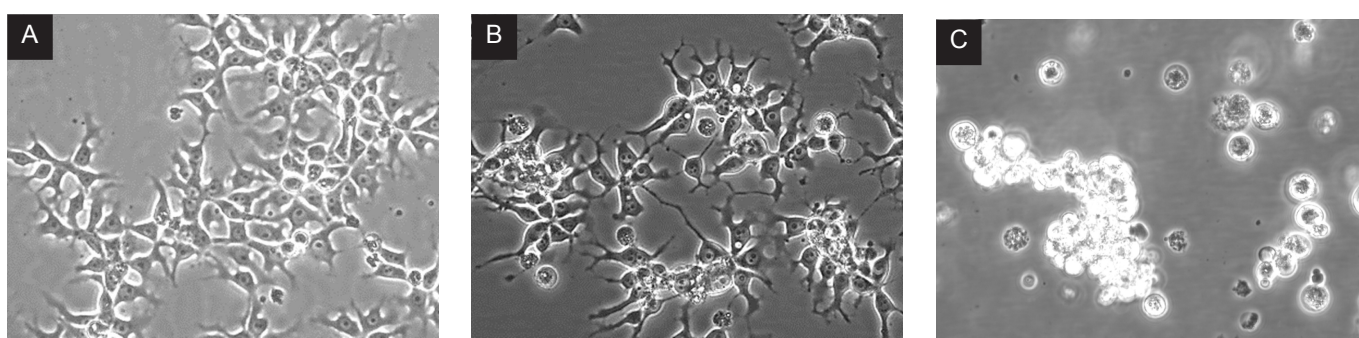


**Figura 4.** Seguimiento del título viral obtenido células LMH infectadas usando virus FAdV-4 (línea punteada, triángulo) o FAdV-8b (línea sólida, círculo) con multiplicidad de infección (MOI) de 10.



**Tabla 1.** Título (dosis infectiva de 50 % de cultivos celulares; TCID<sub>50</sub>) concentrado por ultrafiltración tangencial (UFT).

	FAdV-4		FAdV-8b	
	Título (TCID <sub>50</sub> /ml)	Volumen (L)	Título (TCID <sub>50</sub> /ml)	Volumen (L)
Antes de UFT (cosecha)	1,1 X 10 <sup>8</sup>	1,0	4,1 X 10 <sup>8</sup>	1,0
Final de UFT (concentrado)	1,0 X 10 <sup>9</sup>	0,1	3,1 X 10 <sup>9</sup>	0,11
Recuperación (%)	91	-	83,2	-

**Figura 5.** Comparación de efecto citopático en cultivo LMH usando virus FAdV-4 inactivado (A), cultivo sin infectar - control negativo (B) y virus activo FAdV-4 (C).**Figura 6.** Comparación de efecto citopático en cultivo LMH usando virus FAdV-8b inactivado (A), cultivo sin infectar - control negativo (B) y virus activo FAdV-8b (C).

## DISCUSIÓN

Los cultivos LMH infectados por FAdV-4 y FAdV-8b (Figura 1) mostraron efecto citopático, desde las 24 hpi, esta gradual alteración ocurrió de manera similar a lo descrito por Gao y col.<sup>22</sup>. Esta pérdida de la monocapa y posterior lisis sería la última fase de un comportamiento inducido de apoptosis, que fue descrito para células LMH infectadas con FAdV-4<sup>23</sup>, lo cual podría facilitar el proceso de replicación viral. Desde las 48 hpi se observaron restos celulares que indicaría que las células infectadas completaron su ciclo de replicación y fueron lisadas. Este comportamiento es considerado uno de los puntos críticos para un proceso que pretende obtener el mayor rendimiento de título viral, porque si el cultivo entra en lisis de manera rápida implicaría una reducción en la cantidad de células viables que permitieran la multiplicación del virus.

Para establecer las mejores condiciones de desempeño de producción, se evaluaron valores de MOI y tiempos de infección en cultivos de LMH. El mejor resultado fue obtenido usando un MOI de 10 en comparación al valor de MOI de 2 (Figura 3). Como comentado por Shabram y Aguilar (2000)<sup>24</sup>, adenovirus tiene baja difusión en una solución y muchas partículas virales no entran en contacto con las células, por ello gran cantidad de células mueren o sobrecrecen antes de ser infectadas. Un MOI de 10 significa que por cada célula hay 10 unidades del agente de infección lo que promueve una infección sincrónica del cultivo. En la literatura científica se encuentran valores de MOI de FAdV-4 desde 0.01 hasta 10<sup>22,25,26</sup>, y se reportan títulos mayores a 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL entre las 72 y 96 hpi<sup>26</sup>, aunque con recambio de medio de cultivo al inicio de la infección. En este trabajo se alcanzaron los mejores títulos a las 96 hpi en serotipo 4 (4.7 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) y serotipo 8b (2.1 x 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL) con un único medio de cultivo, el cual fue usado desde la fase de propagación de células LMH, lo que permite reducir el costo de producción de los inóculos, disminuir el riesgo de contaminación por una menor manipulación y facilitar el manejo del cultivo.

Luego de 120 hpi, se observó que hay una reducción del título viral, que se explicaría porque la totalidad de células LMH fueron lisadas y las partículas víricas liberadas probablemente pierden estabilidad en las condiciones de cultivo (pH 7.1 y 37°C) y por lo tanto su capacidad infectiva. En tal sentido, se recomienda la cosecha a las 96 hpi para conseguir el más alto rendimiento de virus, en ambos serotipos.

Además, en este tipo de cultivo considerar que uno de los factores limitantes son los nutrientes del medio de cultivo, específicamente la presencia de suero bovino fetal, por su compleja composición de aproximadamente 1800 proteínas y 4000 metabolitos<sup>27</sup>, presenta variación entre lotes de producción o productor, y ello podría tener repercusión en nuestro proceso de obtención del inóculo viral. Por ello se sugiere su reemplazo por medios de cultivo químicamente definidos. Asimismo, se requiere evaluar la variabilidad de la línea celular LMH en sus pasajes para conocer su susceptibilidad a la infección de

FAdV, como se ha mostrado en un estudio con FAdV-1 en células embrionarias de hígado de pollo o células CEL, donde el título viral de producción aumentó más de 1000 veces luego del pasaje 24<sup>28</sup>.

La producción de 1L de inóculo viral en células LMH fue realizada en las condiciones establecidas de MOI de 10, confluencia al 70 % y 96 hpi. La cosecha fue titulada y concentrada por ultrafiltración tangencial con membrana de 100 kDa. El proceso de ultrafiltración tangencial obtuvo una concentración en 7.6 y 9.1 veces el título viral inicial para serotipo 8b y 4, respectivamente (Tabla 1). Se obtuvo un alto porcentaje de recuperación (entre 83 y 91%) lo que indica un procedimiento que minimiza la pérdida de estabilidad y es adecuado para la concentración viral, ello debido a sus características favorables por ser un virus sin envoltura, tamaño entre 70-90nm y relativa estabilidad<sup>2</sup>, tomando en consideración que durante la ultrafiltración tangencial la temperatura fue menor a 21°C en los 10 min que demoró este procedimiento. Por otro lado, la ultrafiltración tangencial redujo entre 9 y 10 veces el volumen inicial de inóculo viral, que favorece en la etapa de inactivación, pues un pequeño volumen permitiría optimizar las condiciones para su completa inactivación.

La inactivación fue realizada con etilenimina binaria, BEI, un compuesto usado en la inactivación de varios tipos de virus (FMDV, RRV, viruela ovina, HIV, virus Nipah, HNV, PRRSV, etc.) y conserva los epítomos virales luego de su tratamiento<sup>29</sup>, e incluso se le atribuye tener una mejor eficiencia en la respuesta inmune cuando son usadas en vacunas<sup>30</sup>. La inactivación en adenovirus aviar serotipo 2 fue relatada por contacto de 10 mM de BEI durante 72h a 37°C<sup>31</sup>. En este trabajo, la inactivación viral de FAdV-4 y FAdV-8b se realizó en 18 horas y fue corroborada por el ensayo de pérdida de infectividad (Figuras 4 y 5), en la cual la monocapa y células no fueron afectadas cuando se inoculó con virus en contacto con el inactivante BEI. Ello le confiere a este producto un gran potencial para su posterior uso en la formulación de una vacuna.

## CONCLUSIÓN

Se estableció un método estandarizado para la obtención de un inóculo viral de FAdV-4 y FAdV-8b en células de hepatoma de pollo o LMH con un título mayor a 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/mL, la concentración por ultrafiltración tangencial de ambos con un rendimiento de hasta el 91% y su inactivación completa con BEI en 18 horas. Dichos inóculos tendrían el potencial para ser usados en la formulación de una vacuna para prevenir IBH y HHS en pollos en forma segura.

## Conflictos de interés

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## FINANCIAMIENTO

Quimtia S.A. y ProCiencia. Contrato de Préstamo N°033-2019-Fondecyt-BM-INC.INV

## REFERENCIAS

1. International Committee on Taxonomy of Viruses. ICTV 9th Report: Adenoviridae [Internet]. 2011
2. Fitzgerald SD. Adenovirus Infections: Introduction. In: Swayne D, editor. Diseases of Poultry., 13th ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2017; pp 289–90.
3. Ojkic D, Martin E, Swinton J, Vaillancourt JP, Boulianne M, Gomis S. Genotyping of Canadian isolates of fowl adenoviruses. Avian Pathol. 2008;37(1):95–100.

4. Kichou F, Zro K, Mouahid M, Berrada J. Emerging and reemerging fowl aviadenovirus infections. In: Ennai MM, editor. *Emerging and Reemerging Viral Pathogens*. Academic Press; 2019; pp 781–803.
5. Kiss I, Homonnay ZG, Mató T, Bányai K, Palya V. Research Note: An overview on distribution of fowl adenoviruses. *Poult Sci*. 2021;100(5):1–5.
6. Caballero M, Rojas R, Ascanio S, Mendoza-Espinoza A. Adenovirus aviar, identificación de los serotipos prevalentes en el Perú. *Actual Avípecuaria*. 2017;10(65):54–7.
7. Chumbe A, Tataje-Lavanda L, Izquierdo-Lara R, Best-Cuba I, Saravia-Cahuana L, Zavaleta-Apéstegui M y col. Presencia de las especies C, D y E de Fowl adenovirus (FAdV) en el Perú identificadas por PCR-RFLP y filogenias moleculares durante el periodo 2009-2011. XXIII Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. 2012; p 2.
8. Silvera M, Rodríguez J, Alvarado A, Koga Y, Tinoco R. Estudio de brotes de HCl en pollos de carne y la presencia de serotipos. *Actual Avípecuaria*. 2016;3–5.
9. Bertran K, Blanco A, Antilles N, Nofrarías M, Valle RM, Cobos Á, y col. A 10-year retrospective study of inclusion body hepatitis in meat-type chickens in Spain (2011–2021). *Viruses*. 2021;13(11):1–11.
10. De la Torre D, Nuñez LFN, Santander Parra SH, Astolfi-Ferreira CS, Piantino Ferreira AJ. Molecular characterization of fowl adenovirus group I in commercial broiler chickens in Brazil. *VirusDis*. 2018;29(1):83–88.
11. Vera-Hernández PF, Morales-Garzón A, Cortés-Espinosa D V., Galiote-Flores A, García-Barrera LJ, Rodríguez-Galindo ET y col. Clinicopathological characterization and genomic sequence differences observed in a highly virulent fowl Aviadenovirus serotype 4. *Avian Pathol*. 2016;45(1):73–81.
12. Şahindokuyucu İ, Çöven F, Kiliç H, Yılmaz Ö, Kars M, Yazicioğlu Ö y col. First report of fowl aviadenovirus serotypes FAdV-8b and FAdV-11 associated with inclusion body hepatitis in commercial broiler and broiler-breeder flocks in Turkey. *Arch Virol*. 2020;165(1):43–51.
13. Chen L, Yin L, Zhou Q, Peng P, Du Y, Liu L y col. Epidemiological investigation of fowl adenovirus infections in poultry in China during 2015-2018. *BMC Vet Res*. 2019;15(271):1–7.
14. Lai VD, Min K, Lai HTL, Mo J. Epidemiology of fowl adenovirus (FAdV) infections in South Korean chickens during 2013–2019 following introduction of FAdV-4 vaccines. *Avian Pathol*. 2021;50(2):182–189.
15. Steer PA, O'Rourke D, Ghorashi SA, Noormohammadi AH. Application of high-resolution melting curve analysis for typing of fowl adenoviruses in field cases of inclusion body hepatitis. *Aust Vet J*. 2011;89(5):184–192.
16. Babar MM, Riaz SM, Zaidi UN, Farooq MS. Production of avian influenza virus vaccine using primary cell cultures generated from host organs. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2013;40:625–632.
17. Trombetta CM, Marchi S, Manini I, Lazzeri G, Montomoli E. Challenges in the development of egg-independent vaccines for influenza. *Expert Rev Vaccines*. 2019;18(7):737–750.
18. Niczyporuk JS, Czekaj H. A comparative pathogenicity analysis of two adenovirus strains, 1/A and 8a/E, isolated from poultry in Poland. *Arch Virol*. 2018;163(11):3005–3013.
19. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol*. 1938;27(3):493–7.
20. Chen L, Yin L, Peng P, Zhou Q, Du Y, Zhang Y y col. Isolation and Characterization of A Novel Fowl Adenovirus Serotype 8a Strain from China. *Virol Sin*. 2020;35(5):517–527.
21. Bahnmann HG. Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*. 1990;8(4):299–303.
22. Gao J, Zhao M, Duan X, Wang Y, Cao H, Li X y col. Requirement of cellular protein CCT7 for the replication of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV-4) in Leghorn male hepatocellular cells via interaction with the viral hexon protein. *Viruses*. 2019;11(2).
23. Zhao M, Duan X, Wang Y, Gao L, Cao H, Li X y col. A novel role for PX, a structural protein of fowl adenovirus serotype 4 (FAdV4), as an apoptosis-inducer in Leghorn Male hepatocellular cell. *Viruses*. 2020;12(2):1–15.
24. Shabram P, Aguilar-Cordova E. Multiplicity of infection/multiplicity of confusion. *Mol Ther*. 2000;2(5):420–421.
25. Wu N, Yang B, Wen B, Wang T, Guo J, Qi X y col. Interactions Among Expressed MicroRNAs and mRNAs in the Early Stages of Fowl Adenovirus A serotype 4-Infected Leghorn Male Hepatocellular Cells. *Front Microbiol*. 2020;11:1–18.
26. Yuan F, Hou L, Wei L, Quan R, Wang J, Liu H y col. Fowl Adenovirus Serotype 4 Induces Hepatic Steatosis via Activation of Liver X Receptor- $\alpha$ . *J Virol*. 2021;95(6):1–22.
27. Gstraunthaler G, Lindl T, Van Der Valk J. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*. 2013 Oct;65(5):791–793.
28. Grafl B, Schachner A, Hess M. High Phenotypic Variation between an In Vitro-Passaged Fowl Adenovirus Serotype 1 (FAdV-1) and Its Virulent Progenitor Strain despite Almost Complete Sequence Identity of the Whole Genomes. *Viruses*. 2022 Feb;14(2):358.
29. Delrue I, Verzele D, Madder A, Nauwynck HJ. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: Merits, risks and challenges. *Expert Rev Vaccines*. 2012;11(6):695–719.
30. Habib M, Hussain I, Irshad H, Yang ZZ, Shuai JB, Chen N. Immunogenicity of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated infectious bursal disease virus in broiler chicks. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2006;7(8):660–4.
31. Junnu S, Lertwatcharasarakul P, Jala S, Phattanakulan S, Monkong A, Kulprasertsri S y col. An Inactivated Vaccine for Prevention and Control of Inclusion Body Hepatitis in Broiler Breeders. *Thai J Vet Med*. 2015;45(1):55–62.



Este artículo está bajo una Licencia Creative Commons. Atribución-No Comercial-Sin Derivadas 4.0 Internacional <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>