

Métodos de purificación y concentración viral utilizando cromatografía de intercambio iónico

Y. SELIVANOV

Laboratorio de Virología C.N.I.C., Habana

Recibido en: Noviembre de 1970

RESUMEN. Se hace un estudio de purificación y concentración viral empleando el método de cromatografía de intercambio iónico AE-celulosa y TEAE-celulosa. Los resultados indican la utilidad de este método para la obtención de virus en alta concentración y grado adecuado de pureza. Se confirman estos resultados utilizando Microscopía Electrónica. Se comprueba la acción de los detergentes Dodecilsulfato sódico y Dexoxicolato sódico, así como el éter sobre los mixo-virus. Para la obtención de Hemaglutinina purificada se describe un esquema general para su preparación.

ABSTRACT. A study was made of virus purification and concentration using the method of AE-cellulose and TEAE-cellulose ionic exchange chromatography. Our results supported the effectiveness of this method for obtaining virus of high concentration and adequate purity. Electron microscopy examination confirmed these results. The action of the detergents Dodecylsulphate of sodium and Dexoxicolate of sodium on the mixo-virus, as well as that ether, was confirmed. A general scheme for the obtention of purified Hemaglutinine is described.

INTRODUCCION

El estudio sobre todo virus se empieza por la elaboración de los métodos de su obtención analítica y después la obtención preparativa. Actualmente existen distintos métodos para la purificación y la concentración de virus.

Los métodos empleados pueden ser divididos convencionalmente en 2 grupos: los químicos y los físicos. Los últimos comprenden:

- 1) La adsorción por los adsorbentes moleculares.
- 2) La adsorción por los intercambiadores iónicos.
- 3) La Gel-filtración.
- 4) La adsorción por los eritrocitos.

En este informe nos ocuparemos de los métodos físicos-químicos. Con ayuda de los métodos enumerados se puede conseguir la purificación perfecta de los preparados virales y utilizarlos en lo sucesivo en forma de vacunas de distintos tipos.

Partiendo de que hasta ahora no se prestó bastante atención a los problemas de la cromatografía de intercambio iónico de virus, en particular, de los mixo-virus nos hemos planteado el objetivo de elaborar la metodología para la obtención analítica y preparativa de los preparados purificados y concentrados con el fin de utilizar ulteriormente las subunidades de los mixo-virus en calidad de vacunas sin ácido nucleico.

Así pues, los métodos físico-químicos se basan en el fraccionamiento: es decir, en la separación de una o varias fracciones nativas, y entre éstas, las fracciones virales. En calidad de adsorbentes se utilizaron en el pasado los *adsorbentes moleculares* del tipo del Kaolin, óxido e hidróxido de magnesio, calcio, aluminio, sales inorgánicas (fosfato de calcio, de bario), silicagel, los intercambiadores iónicos: Sawex, Amberlit y otros. Actualmente se usan más los de base de celulosa.

Con ayuda de adsorbentes se puede realizar la purificación y fraccionamiento de suspensiones virales.

Hablando de adsorbentes moleculares hay que hacer notar que solamente en algunos de ellos se encontró un empleo práctico. Esto se debió a la purificación insuficiente o la incapacidad de la elución y la dilución de virus en el proceso de separar éste del adsorbente. En lo que se refiere al problema de la utilización de los ionitos en los estudios sobre virus, hay que hacer notar que éstos no responden a las exigencias planteadas. La utilización de los intercambiadores iónicos está limitada por: 1) La cantidad relativamente baja de la resina para la adsorción de las partículas virales. 2) El riesgo de la inactivación del virus. Dichas deficiencias fueron superadas después de creados por Paterson y Sober los intercambiadores iónicos (1956), que se basan en la celulosa. En éstos, los grupos de la ionización se encuentran unos de otros, por término medio, a una distancia de 50\AA , a diferencia de los ionitos alrededor de 10\AA). Por ello, las moléculas albuminosas polivalentes se fijan al intercambiador con un número menor de sus grupos funcionales. Además, gracias al gran tamaño de "orificios" en la red matrix, los grupos en ionización del intercambiador son más accesibles para las proteínas.

Peterson y Sober (1956) obtuvieron un producto adecuado para la cromatografía, utilizando el entonces más conocido derivado etéreo de la celulosa. La Carboximetil-Celulosa.

Los mismos autores crearon un intercambiador iónico en forma de polvo (DEAE/Celulosa) y demostraron que éste era útil para la cromatografía de proteínas. Un año más tarde, (1957) sobre la base de DEAE-Celulosa la TEAE-Trietilaminoetil celulosa. DEAE-Celulosa y TEAE-Celulosa son los cambiadores aniónicos. A éste pertenecen también AE-Celulosa, un intercambiador más débil aún, y otros. Los intercambiadores catiónicos están presentados por KM-Celulosa, FosfoCelulosa y otros.

DEAE-Celulosa se empleó con más éxito en el fraccionamiento de varias cepas de adeno-virus (*Imperer y Pereira, 1959; Philipson, 1960 y Zdanov y col., 1963*).

Con ayuda de DEAE-celulosa fue eliminado alrededor de un 90% de proteína de lastre del líquido vesicular infectado por virus-aftoso conservando la infección del virus y fijación de complemento de la actividad de la fijación (*Brown y Cartwright, 1959*).

La DEAE-celulosa fue utilizada exitosamente en la purificación y el fraccionamiento de NDV, además de la purificación de virus, acertó a separar fracciones con actividad hemolítica de otras con actividad hemaglutinante.

Así pues, los métodos de la adsorción, debido a su sencillez, bajo costo y gracias, principalmente a las condiciones suaves de la interrelación, en las que se conservan las proteínas, brindan las posibilidades para la separación fina de los objetos biológicamente importantes, en particular, virus. La utilización de estos métodos reviste un gran interés científico y práctico, para la virología moderna.

En nuestro trabajo experimental en calidad de investigaciones fueron utilizadas las cepas de mixo-virus humano del tipo A₂ (cepa Altay, 4/6) y A cepa WSN).

Como material inicial utilizamos el líquido alantoideo de embriones de pollo después de infectarlos con la dosis de virus de 10 000 EID₅₀.

Después de establecer la caracterización de la adsorción-elución de tales intercambiadores como anionitos: DEAE-celulosa, ecteola-celulosa, IRA-120; cationitos: fosfo-celulosa, sulfoetil-celulosa, Dawcx 50, IRC50, hemos utilizado intercambiadores como anionitos: DEAE-celulosa, ecteola-celulosa, IRA-120; cationito base fibrosa. El líquido alantoideo portavirus fue filtrado previamente a través de 6-8 capas de gasa, y en el caso de utilizar AE-celulosa, este líquido fue filtrado por Sefadex en una columna (100 × 3 cm) para bajar la fuerza iónica inicial

de la disolución a la columna. Luego la columna con el virus adsorbido, fue lavada con una solución de tapón de fosfato 0.5 M de pH 7.2.

La elución de virus de la AE-celulosa se realizaba en volúmenes de 5 ml y utilizando soluciones de NaCl 0.1; 0.2; 0.3; y 0.5 M en tapón de fosfato 0.05 M con pH 7.0-7.2.

La adsorción y la elución de virus se llevaba a cabo a temperatura de 4°C.

RESULTADOS Y DISCUSION

En las fracciones con virus se estudió su actividad biológica ELD50 y hemaglutinantes, la cantidad de proteínas y se determinó espectro-fotométricamente la adsorción con 240 milimicras y 280 milimicras; además, se midió el volumen del líquido alantoideo inicial del líquido después de la adsorción del virus, de la solución para lavar y de las fracciones recogidas. Se calculó la cantidad total de hemaglutininas y se determinó la cantidad total de proteínas y unidades ópticas con 260 milimicras. Esto nos permitió tener criterio sobre la dinámica de la adsorción, el rendimiento y las pérdidas de virus, así como del grado de su purificación del ácido nucleico y las proteínas (*Lowry y cols., 1951*).

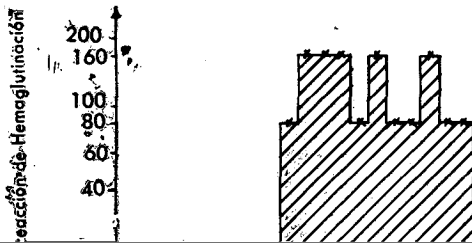
Los estudios ultramicroscópicos sobre el virus purificado se llevaron a cabo con la ayuda del microscopio electrónico, JEM-6c con una magnificación de 100,000. El virus se colocó en una película de hidrofól carbónico (*Chopin y Stoeckenues, 1964*) haciendo el post-contraste con una solución de ácido fosfórico volframita, llevado hasta pH 7.2.

Hemos ensayado con 9 intercambiadores iónicos (5 anionitos y 4 cationitos) para conocer su capacidad absorbente y de eludir el virus. Entre los intercambiadores estudiados en polvos, los más aceptables, es decir, que aseguran prácticamente la adsorción completa del virus del líquido alantoideo, con el 100% de elución ulterior realizada con una solución de NaCl, 1 M, resultaron ser la AE-celulosa y la TEAE-celulosa.

La eficacia de la adsorción depende en gran medida de la concentración de sales en el material aplicado al intercambiador: es decir, el material inicial en el cual se lleva a cabo la adsorción, debe tener una fuerza iónica relativamente baja. Es de desear que la proteína de la cromatografía sea igualada con la disolución del Tampón que lavó la columna del cambiador iónico. Eso se puede conseguir utilizando Sefadex. La filtración a través del Gel de Sefadex se emplea para

el mismo fin, que el de diálisis: para la desalinización. La Fig. 1 ilustra precisamente la Gel-filtración del líquido alantoideo portavirus inicial a través de Sefadex G-25, igualado por 4.45 M-disolución de fosfato de Tampón de fosfato pH 7.0-7.2.

Como resultado de la Gel-filtración, el volumen de la disolución portavirus aumentó en 2 veces.



tran el grado de adsorción de la suspensión librada de sales. La masa principal de virus se eluía por soluciones 0.1 y 0.5 M de ClNa.

Así pues, la eliminación en el material viral de las sales y de albúminas de bajo peso molecular permitieron elevar de 16 a 20 veces el grado de la adsorción del virus en AE-celulosa.

Así pues, la eliminación en el material viral de las sales y de albúminas de bajo peso molecular permitieron elevar de 16 a 20 veces el grado de la adsorción del virus en AE-celulosa.

Nuestro objetivo siguiente fue determinar la capacidad de la adsorción de AE-celulosa (Fig. 2).

Es sabido que resultados exactos del fraccionamiento cromatográfico pueden ser obtenidos sólo bajo la condición de la saturación óptima del adsorbente por el virus. La cantidad del preparado que satura la columna, depende del tamaño de la misma, así como de la estabilidad de la fijación con el intercambio iónico de la proteína en estudio. Los experimentos respecto a la adsorción en el intercambiador del material viral filtrado (más de 1 litro, que contiene 140.000 unidades hemaglutinantes.

Se puede ver que en el curso de la saturación de la AE-celulosa que la curva se eleva, y cuando el volumen de la fracción alcanza 1000 ml. el título de virus en el líquido que sale de la columna llega a ser casi igual al título de virus que entra en la columna. eso quiere decir, que la saturación del intercambiador está terminada.

La elución del virus fue realizada por fracciones, con concentraciones crecientes de NaCl en tampón de fosfato 0.05 M.

La Fig. 3 refleja los materiales correspondientes. A través de la columna saturada de virus se hizo pasar en volúmenes de 50 ml. solución de NaCl de distintas concentraciones. El eluato que salía se recogía en fracciones de 5 ml. y en cada fracción se determinaba el título de virus en la reacción de hemaglutinación. En la figura 3 se ve que el virus se eluía de la AE-Celulosa en varios máximos correspondientes a distintas concentraciones de la sal.

Los resultados del estudio de las características biológicas y la cromatografía del virus eluido, están representados en la Fig. 4. Como se ve, el fraccionamiento cromatográfico de la suspensión viral determinó dos máximos evidentes en la actividad viral. Los viriones de los máximos correspondientes se distinguían por su propiedades biológicas y morfológicas.

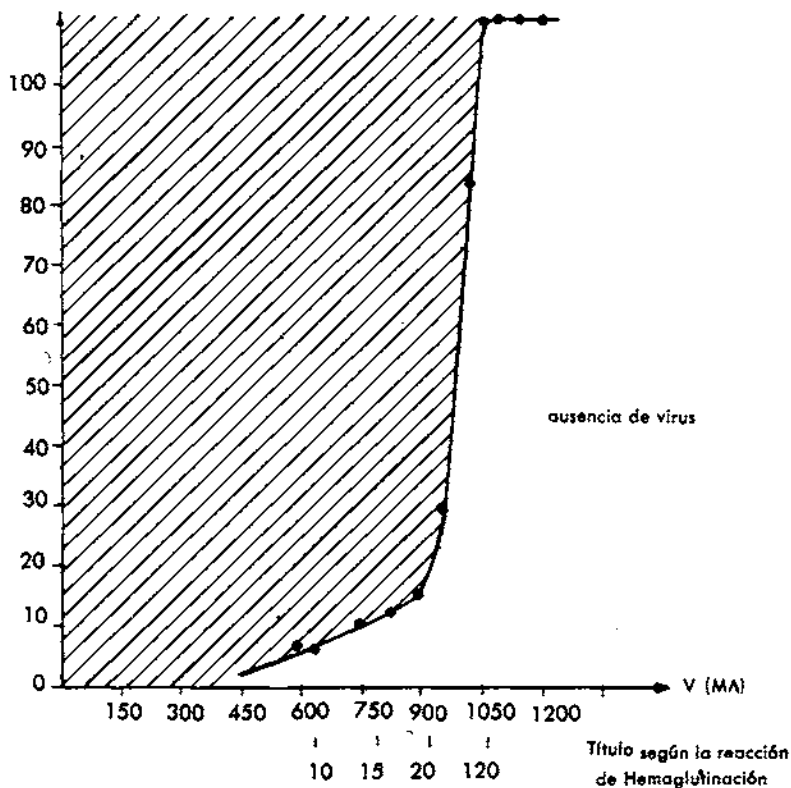


FIG. 2. Determinación de la capacidad adsorbente de EA-Celulosa.

El virus eluido por una solución 0.1 M de NaCl se caracterizó por altos títulos infectivos y de hemaglutinación, mientras que las fracciones de virus eluido por una solución 0.5 M de NaCl presentaron un alto título infectivo pero una actividad hemaglutinante menos marcada. Junto con esto habría fracciones, en las cuales la presencia de virus no se podía determinar con ayuda de la HA y se revelaba solamente inoculando embriones de pollo con el material. El estudio en microscopía electrónica del virus de los dos máximos demostró que los 2 tipos de viriones se pueden distinguir también por su morfología.

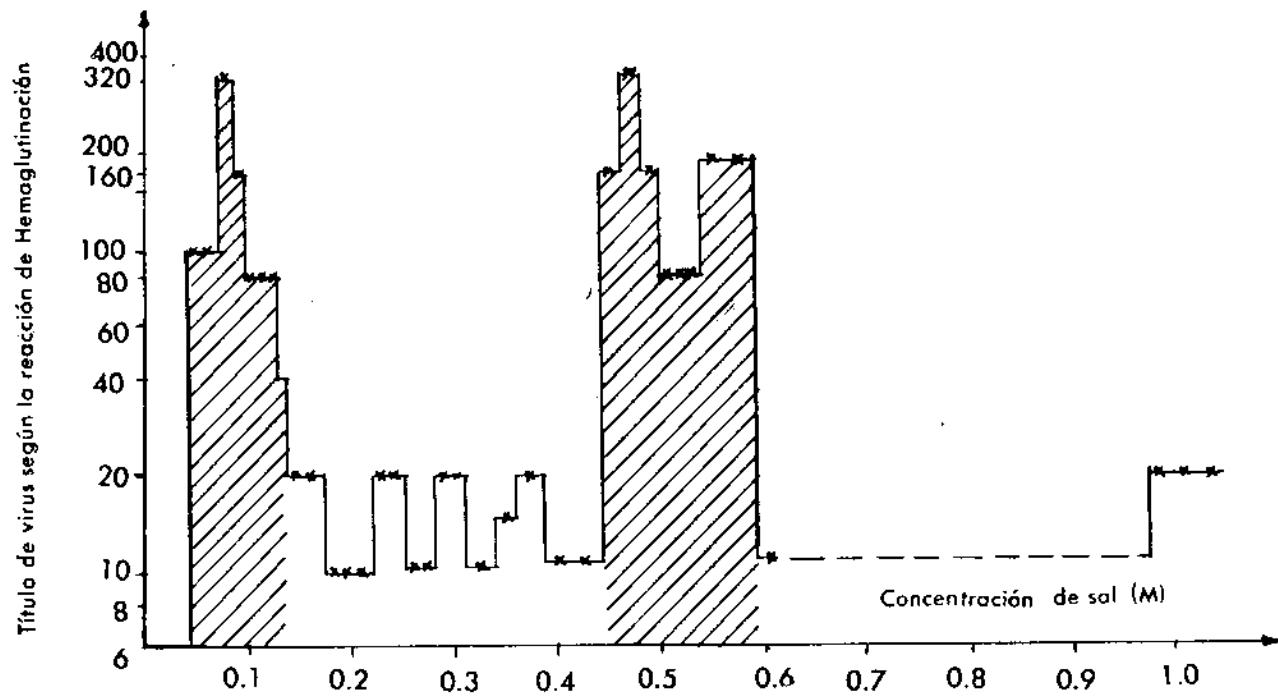


FIG. 3. Elución de virus A2 de la AE-Celulosa por concentraciones crecientes de NaCl.

Los experimentos efectuados demostraron que la población de mixo-virus se componen de viriones distintos biológicamente. Esta diferencia se evidencia por un grado distinto de actividad hemaglutinante de las partículas virales eluidas por las soluciones 0.1 y 0.5 M de NaCl. Los dos tipos de partículas que se distinguieron por el grado de la actividad hemaglutinante poseían infectividad.

En este trabajo no planteamos el problema de estudiar las propiedades biológicas de la población viral. Por ello, en lo sucesivo, para la elución completa del virus de la columna, hemos utilizado solamente la solución 0.5 M de NaCl que permite eludir prácticamente todo el virus adsorbido en el intercambiador iónico.

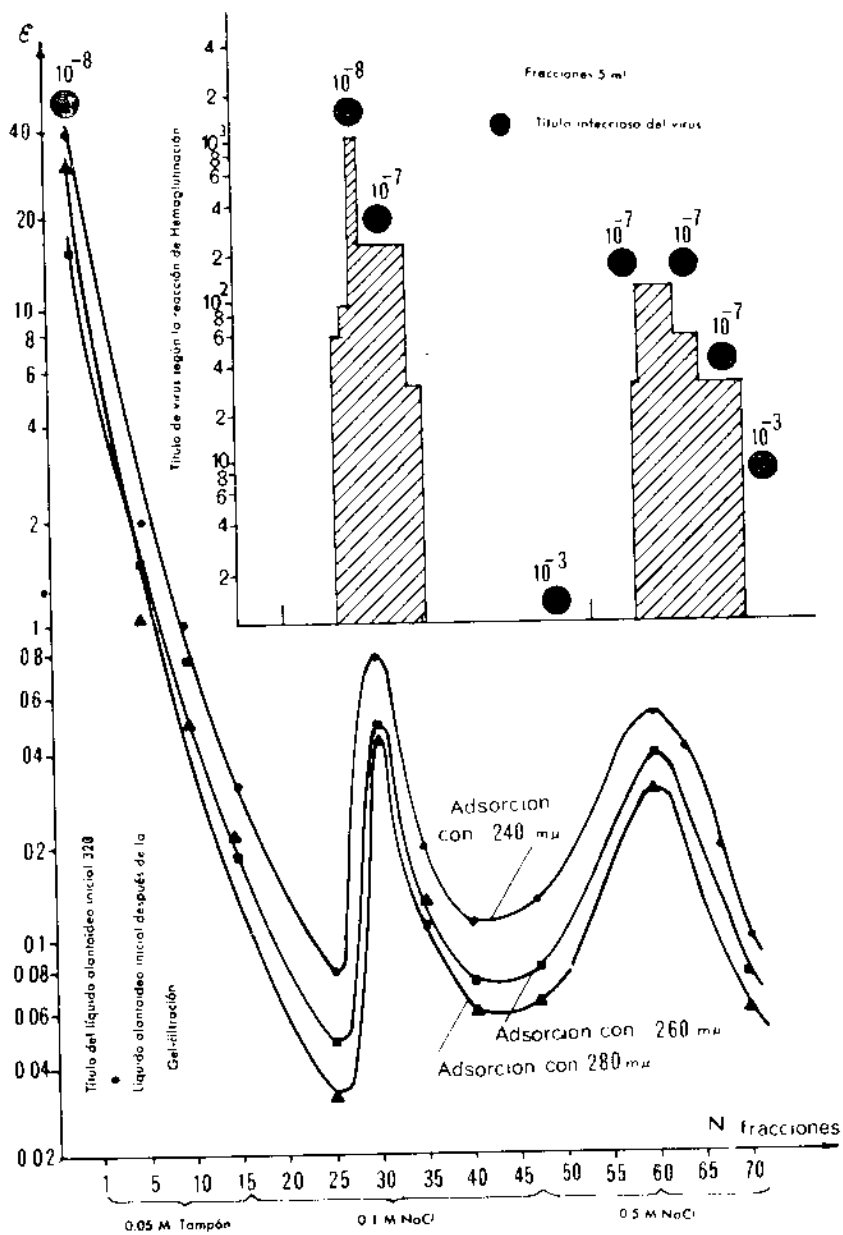
Los materiales correspondientes están presentados en la Fig. 6. El gráfico presentado testimonia que el virus se eluia en un solo máximo (por hemaglutinación), el que coincidía con el máximo de la densidad óptica y se concentraba en un volumen 5 veces menor del inicial.

Así, pues, fue establecida la posibilidad de la purificación y fraccionamiento de virus con ayuda del cambiador aniónico sobre la base de celulosa en polvo, y fueron elaboradas condiciones necesarias para la obtención del material con fines analíticos. Sin embargo, el método basado en la utilización de intercambiadores en polvo no puede ser recomendada ampliamente, pues en ellos la velocidad de paso de las soluciones es muy baja. Esto excluye la posibilidad de la utilización de anionitos en polvos del tipo AE-celulosa para trabajar grandes volúmenes de suspensiones virales. Así, pues se planteaba el problema de elaboración de condiciones para la obtención preparativa de los mixo-virus purificados.

TABLA I

DATOS COMPARATIVOS DE LA ADSORCION DEL MATERIAL VIRAL

<i>Material</i>	<i>Volumen ml</i>	<i>Título de virus reacción de hemaglutinación</i>	<i>Cantidad general de Hemaglutinina adsorbida</i>	<i>La cantidad de Hemaglutinina adsorbida</i>	<i>El porcentaje de adsorción</i>
Líquido alantoideo inicial	34	1:640	21.760	8.000	36.00
El mismo después de la filtración	1.000	1:140	140.000	130.000	93.0



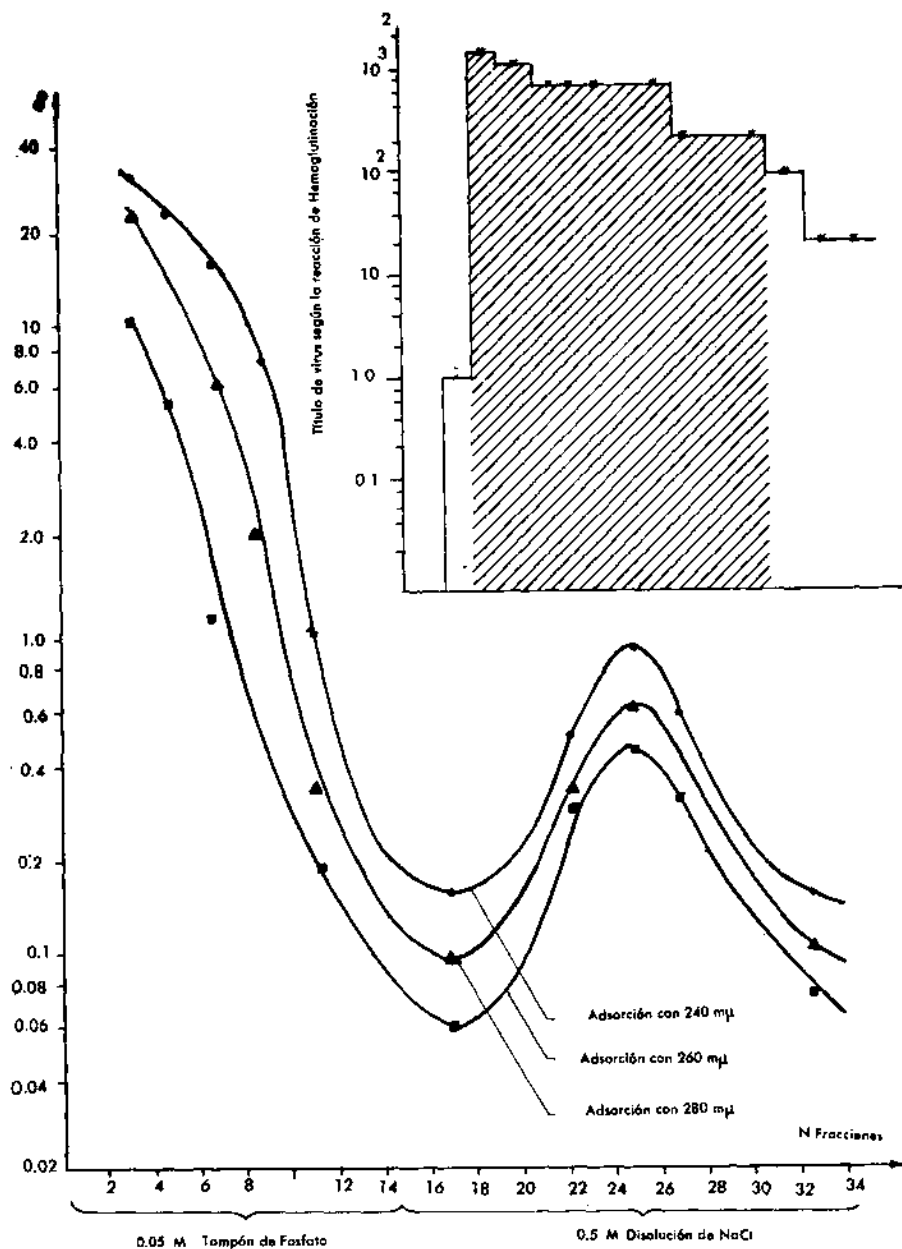


FIG. 6. Perfil cromatográfico obtenido al eluir A2 de la AE-Celulosa por disolución de NaCl 0.5 M.

TEAE-celulosa, sintetizada especialmente para este fin sobre la base de la celulosa fibrosa, se distinguía de la AE-celulosa por la alta capacidad de paso para las soluciones de sales concentradas y podía utilizarse con éxito con el fin de la separación preparativa de virus.

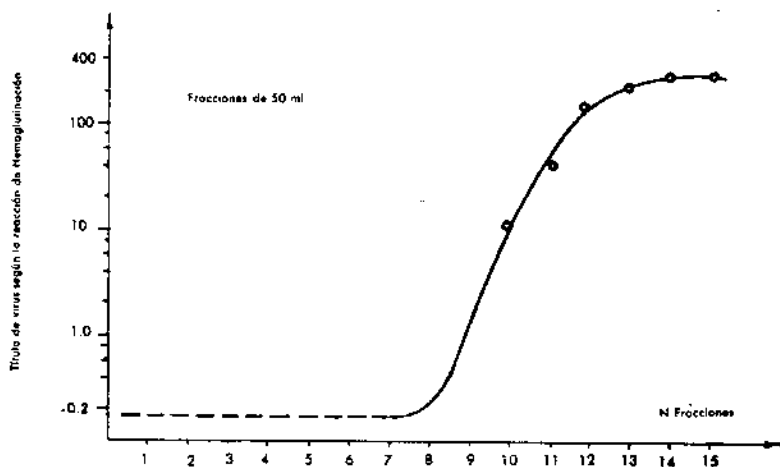


FIG. 8. Determinación de la capacidad adsorbente de TEAE-Celulosa (2 gr.)

En primer lugar, había que establecer la capacidad de adsorción del TEAE-celulosa fibrosa. Los datos sobre la saturación de intercambiadores iónicos están presentados en la Fig. 8. Se puede ver, que a partir de la 2da. fracción el título de virus llega a ser casi igual al inicial (1:320) es decir continuar la adsorción del material viral en la columna carece de sentido.

Partiendo de objetivos de trabajo, hemos realizado la elución de virus por solución 0.5 M de Na Cl.

La tabla II ilustra el proceso del experimento cromatográfico en la columna con TEAE-celulosa fibrosa.

Al pasar 13,00 ml del líquido portavirus a través de la columna en el intercambiador iónico se adsorbía alrededor de un 94% del virus inicial. El lavado por la solución 0.05 M de Tampón de fosfato libró no más del 0.6% de virus. La adsorción en TEAE-celulosa con la elución ulterior de virus realizada con solución 0.5 M de NaCl permitió conservar en un volumen pequeño hasta el 61% del virus inicial con una concentración promedio entre 8-16 veces.

TABLA II
 ABSORCION - ELUCION DE MIXOVIRUS EN TEAE
 CELULOSA FIBROSA (10 g)

<i>El material en prueba</i>	<i>Volumen en mls.</i>	<i>Número de unidades hemaglutinantes</i>	<i>El número de dosis infectivas</i>	<i>El porcentaje de virus eluido respecto al virus inicial</i>	
		<i>El volumen indicado</i>		<i>Según hema- glutinina</i>	<i>Según la in- fección E/50</i>
Virus inicial	1300	832.000	1,3.10 ¹¹	6	---
Virus después de la adsorción	1250	50.000	—	—	—
Solución p/lavar 0.05 M tampón de fosfato	500	5.000	---	0.6	—
Eluatos N: 1-5	75	1.500	—	0.18	—
6-12 (Vértice)	100	512.000	1.10 ¹⁰	61.5	7.7
13-23 (Cola)	150	24.000	---	3	—

NOTA: Los resultados de la purificación respecto a proteínas y ácidos nucleicos del virus, así como los resultados de la determinación del porcentaje de la purificación, calculado de acuerdo con los datos sobre la cantidad de proteínas que corresponde a la unidad hemaglutinante, están presentados en la Tabla 7.

Los resultados de la purificación respecto a proteínas y ácidos nucleicos del virus, así como los resultados de la determinación del porcentaje de purificación, calculado de acuerdo con los datos sobre la cantidad de proteínas que corresponden a 1 unidad hemaglutinante, están presentes en la tabla III.

Los datos de numerosos experimentos, resumidos en la tabla III, testimonian que la cantidad de virus eluidos, según los datos de la reacción de hemaglutinación constituía aproximadamente un 74%.

La purificación del ácido nucleico viral constituía el 98.9-99.0%, y la purificación respecto a la proteína alcanzaba el 93-95%.

La utilización de la columna con TEAE-celulosa aseguraba la obtención del virus purificado en cantidades necesarias, lo que permitía llevar las investigaciones teóricas y prácticas. El control ultramicroscópico sobre los virus purificados demostró la presencia en las preparaciones de estructuras exclusivamente virales. Los viriones conservan su integridad, y en muchos de ellos se ve claramente la nucleoproteína.

Todo el trabajo ulterior de la destrucción de partículas de virus se llevaba con los eluatos virales purificados.

TABLA III

LOS DATOS SOBRE LA PURIFICACION DE VIRUS EN LA COLUMNA CON TEAE-CELULOSA FIBROSA (2 gr.)

Material	Volumen en ml	Cantidad de virus		Unidades de la densidad óptica con 260 m μ		Cantidad de proteínas s/Lowry		Cantidad de proteínas (en mcg) X unidad hemaglutinante	Purificación calculando la unidad hemaglutinante con respecto al % del virus inicial
		Cantidad general de hemaglutinina	% respecto a virus inicial	Total de Uds. de D. O.	% respecto a virus inicial	Cantidad total (en mg.)	% respecto inicial		
El líquido alantoidico inicial	325	208 000	100	8287.5	100	734.5	100	3.5	---
El líquido alantoidico después de adsorción	315	12 600	6	5709.38	76	557.5	69	--	—
Solución p/lavar 0.05 M tapón de fosfato	500	—	—	2438	18.4	135.37	39.2	—	—
Eluatos N4-8 (vértice)	55	140 800	67.7 73.7	117.15	4 5	29.15	1 1.2	0.24	93
N9-18 (cola)	160	12 800	6	19.92	1	8.48	0.2	--	—

Los datos de numerosos experimentos en la Tabla 3, testimonian que la cantidad de virus *eluido* según reacción de la hemaglutinación con su fraccionación cromatográfica constituía aproximadamente un 74%. La purificación del virus del ácido nucléico de portador constituía el 98.8 - 99.0%, y la purificación respecto a la proteína alcanzaba el 93 - 95%.

Hemaglutininas de Mixo-Virus

Las investigaciones de los últimos años demostraron la gran perspectiva de estudio sobre los componentes de mixo-virus de antígenos V y S. La utilidad de estas investigaciones se determina por la posibilidad de estudio amplio sobre los caracteres biológicos y bioquímicos de dichos antígenos, así como la creación de vacunas sin ácido nucleicos anti-mixo-virus de hemaglutininas virales purificadas. Ha sido comprobado el carácter de acción sobre virus parte de los detergentes: Dodecilsulfato sódico, Desoxicolato sódico, así como con éter.

TABLA IV

LA INFLUENCIA DE DODECISULFATO SODICO SOBRE LOS TITULOS DE LA HEMAGLUTINACION DE LAS FRACCIONES DE VIRUS A₂

Duración de contacto con DDS (en min.)	Concentración de DDS (en %)	Títulos de la hemaglutinación con los eritrocitos			ED/ 50/01 ml
		gallinas	curiel	humano grupo 0	
<i>Virus inicial</i>		2560	5120	5120	108.0
10	0,01	640	10240	2560	0
10	0,05	640	10240	2560	0
10	0,1	240	20	1920	0
10	0,5	160	10	480	+
10	1,0	240	20	160	+
10	2,0	160	10	40	+
60	0,01	640	2560	1920	+
60	0,1	240	20	1920	+
60	0,5	160	10	320	—

Los resultados están presentados en las tablas IV y V. Los datos obtenidos testimonian que después de una exposición de 10 minutos frente al Dodecilsulfato sódico, el aumento del tiempo de contacto no altera los resultados.

TABLA V

INFLUENCIA DE DODECILSULFATO SODICO SOBRE TITULOS DE HEMAGLUTINACION DE FRACCIONES DE MIXOVIRUS A

Duración de contacto con DDS (en min.)	Concentración de DDS (en %)	Títulos de la hemaglutinación con los eritrocitos			ED/ 50/01 ml
		gallinas	curiel	humano grupo 0	
	<i>Virus inicial</i>	1560	960	3840	108,0 108.0
10	0,01	160	5120	640	0
10	0,05	40	5120	640	0
10	0,1	20	—	—	0
10	0,25	40	—	—	0
10	0,5	40	—	—	+
10	1,0	20	—	—	+
10	2,0	40	—	—	+
60	0,01	160	5120	960	+
60	0,05	80	10240	1280	+
60	0,1	20	—	—	+
60	0,5	20	—	—	—

Denotaciones:

- x Títulos de la hemaglutinación que están expresadas en magnitudes inversas y representan el promedio de una serie de titulaciones de varios experimentos.
- + Presencia de título infeccioso.
- Ausencia del título.
- 0 La reacción no se realizó.

El estudio sobre la acción de mixo-virus por parte de un detergente desoxicolato sódico se realizó utilizándolo en concentraciones del 0.25% al 2%, y el tiempo de contacto con el virus equivalía a 10 minutos.

Los datos de estos estudios están presentados en las tablas VI y VII.

TABLA VI

LA INFLUENCIA DE DESOXICOLATO SODICO SOBRE LOS TITULOS DE LA HEMAGLUTINACION DE FRACCIONES DE VIRUS A₂

<i>Concentración de DOX en %</i>	<i>Títulos de hemaglutinación con los eritrocitos</i>			<i>El D 50/0, 1 ml</i>
	<i>gallinas</i>	<i>curiel</i>	<i>humano grupo 0</i>	
<i>Virus inicial</i>	2560	2560	5120	108.0 108.0
1,0	320	5120	1980	+
0,25	1280	7680	10240	+
0,5	1280	7680	10240	+
2,0	Hemolisis	Hemolisis	Hemolisis	0

TABLA VII

LA INFLUENCIA DE DESOXICOLATO SODICO SOBRE LOS TITULOS DE LA HAMGLUTINACION DE FRACCIONES DE VIRUS A

<i>Concentración de DOX en %</i>	<i>Títulos de hemaglutinación con los eritrocitos</i>			<i>El D 50, 1 ml</i>
	<i>gallinas</i>	<i>curiel</i>	<i>humano grupo 0</i>	
<i>Virus inicial</i>	5120	1280	7680	108.0 108.0
0,25	480	15360	1280	+
0,5	40	15360	80	+
1,0	80	10240	40	0
2,0	Hemolisis	Hemolisis	Hemolisis	0

Veamos la acción de éter sobre mixo-virus A₂ y A. Las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio iónico se trataron 2 veces con 1/2 volumen de éter a temperatura ambiente durante distintos intervalos de tiempo. En las tablas VIII y IX y en las figuras 12 y 13 respectivamente están mostradas la influencia de la duración del tratamiento por éter sobre los títulos de hemaglutininas realizados con eritrocitos de gallinas, curici y hombres del Grupo O.

TABLA VIII

TRATAMIENTO DE LAS FRACCIONES DE MIXOVIRUS A₂ POR ETHER

<i>El tiempo de la destrucción (en ha)</i>	<i>Título de hemaglutinación con eritrocitos</i>			<i>ED 50/0 1 ml</i>
	<i>gallinas</i>	<i>curiel</i>	<i>humano grupo 0</i>	
<i>Virus inicial</i>	5120	61440	10240	108.0
15 mins	2560	61440	10240	+
1 hora	2560	81920	10240	—
2 horas	2560	81920	10240	—
3 horas	3840	122880	15360	—
5 horas	2560	81920	10240	—

TABLA IX

TRATAMIENTO DE LAS FRACCIONES DE MIXOVIRUS POR ETHER

<i>El tiempo de la destrucción (en ha)</i>	<i>Título de hemaglutinación con eritrocitos</i>			<i>ED 50/0 1 ml</i>
	<i>gallinas</i>	<i>curiel</i>	<i>humano grupo 0</i>	
<i>Virus inicial</i>	20480	5120	20480	108.65
15 mins	3840	81920	2560	—
1 hora	2560	122880	3840	—
2 horas	2560	81920	2560	—
3 horas	2560	81920	3840	—
5 horas	2650	81920	2560	—

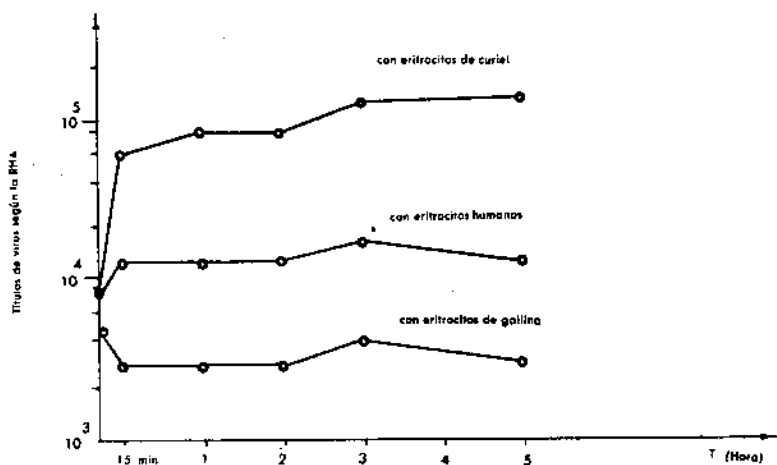


FIG. 12. Influencia de la duración del tratamiento de virus A2, por éter sobre la reacción de hemaglutinación con eritrocitos de distintas especies de animales y humanos.

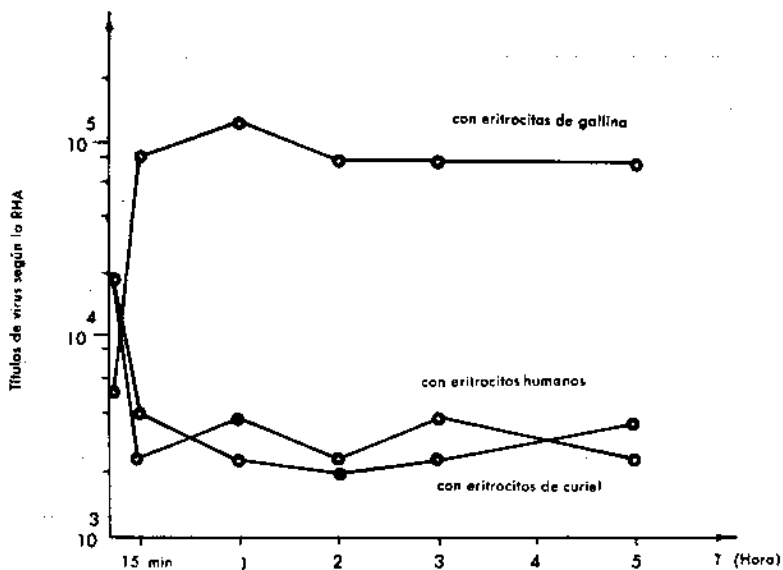


FIG. 13. Influencia de la duración del tratamiento de virus A por éter sobre FHA con eritrocitos de distintas especies de animales y humanos.

Como se ve de lo expuesto, la acción de factores de distinto tipo sobre la partícula viral se acompañó de la destrucción considerable de viriones, caída de la infectividad, elevación o haja de títulos de la hemaglutinación con eritrocitos de gallinas, curiel y humano con la liberación del antígeno.-V.

En la tabla X están presentados los resultados de experimentos con respecto a la obtención de la fracción de hemaglutinina.

Los experimentos preliminares sobre el estudio comparativo de la interrelación entre virus A₂ y A destruidos por éter y eritrocitos nos permitieron establecer los intervalos de tiempo óptimos de la influencia de éter sobre el virus.

TABLA X

CAMBIOS DE TITULOS DE LA HEMAGLUTINACION DE MIXOVIRUS A₂
Y A DURANTE EL PROCESO DE LA PREPARACION DE LA FRACCION
DE HEMAGLUTAINACION PURIFICADA

<i>El material</i>	<i>Duración del tratamiento con éter</i>	<i>Títulos de la hemaglutinación con eritrocitos</i>				
		<i>CURIEL</i>			<i>GALLINAS</i>	
	<i>Material inicial</i>	<i>Después del éter Antes de acetato de lantano</i>	<i>Después del acetato de lantano</i>	<i>El material</i>	<i>Después de éter Antes de acetato de lantano</i>	<i>Después de acetato de lantano</i>
Fracciones de mixovirus A ₂	5.120	2.560	640	5.120	81.920	20.480
Fracciones de mixovirus A	2.560	320	40	640	7.680	960

El esquema general de la preparación de la Hemaglutinina purificada es el siguiente:

ESQUEMA GENERAL SOBRE LA PREPARACION DE LA HEMAGLUTININA PURIFICADA

1.

Cromatografía de intercambio iónico de mixo-
virus en TEAE , celulosa fibrosa



Las fracciones portavirus eluidas desde el intercambiador
por solución 0.5 m de NaCl en tampón de fosfato 0.05 M.

2.

El tratamiento de fracciones portavirus por éter (1/2 volumen
de éter dos veces a temperatura ambiente)



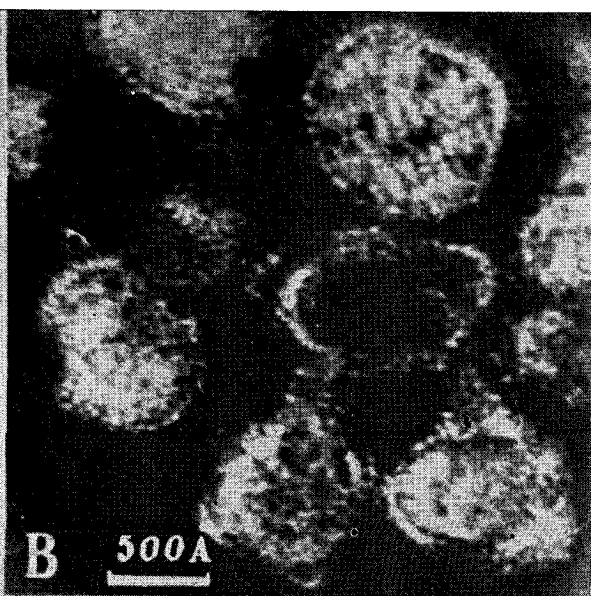
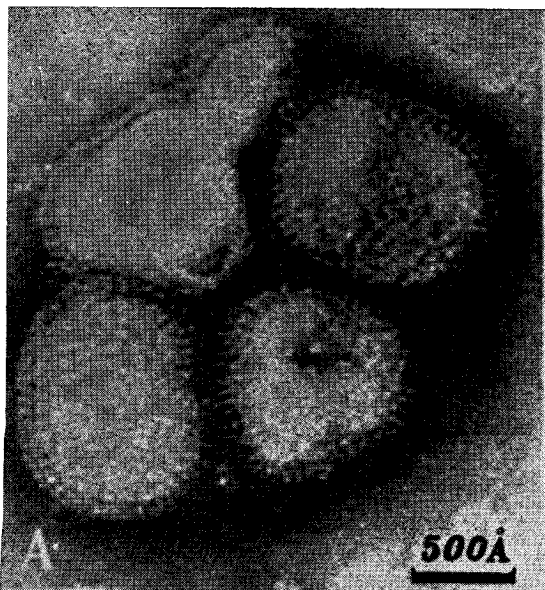
S-antígeno interno y V-antígeno externo

3.

Precipitación de S-antígeno con ayuda de acetato de lantano (1.5%)
y su separación de la solución.



Fracciones de hemaglutinina purificada.



Propiedades de las fracciones de la Hemaglutinina purificada

Todas las fracciones Hemaglutinadoras (FHA) obtenidas de los virus en estudio fueron inactivadas, aglutinaban los eritrocitos de gallina y curiel: FHA del virus A₂ hasta el título - 1:320 y 1:10240 respectivamente, FHA de virus A hasta títulos 1:20 y 1:640; podían ser adsorbidas en eritrocitos de gallinas, pero eran privados de la capacidad hemaglutinante. En las figuras 15 y 14 se demuestran los espectros de adsorción de la suspensión de las subunidades, la cual es una mezcla de antígenos S y V, después del tratamiento del material con éter, así como de las fracciones de hemaglutinina o Antígeno V del virus A₂ y A.

En las fracciones de hemaglutininas o antígeno V se puede ver, que el espectro de adsorción de rayos ultravioletas de la suspensión de sub-unidades de virus A₂ tuvo máximo con 240 milimicras y mínimo con 260 milimicras, esto indica la presencia de proteínas en la suspensión.

En conclusión hay que señalar que un interés indudable reviste el estudio sobre propiedades inmunológicas de Hemaglutininas virales. A base de datos experimentales fue establecido que la vacunación de hombres, realizada con sub-unidades de virus asegura la formación de un alto nivel de antihemaglutinina y anticuerpos neutralizantes. Este nivel supera el de vacunación con el virus intacto. Además el preparado obtenido demostró otras ventajas: ausencias de reacciones secundarias, es posible la inmunización a niños de temprana edad y a mujeres embarazadas.

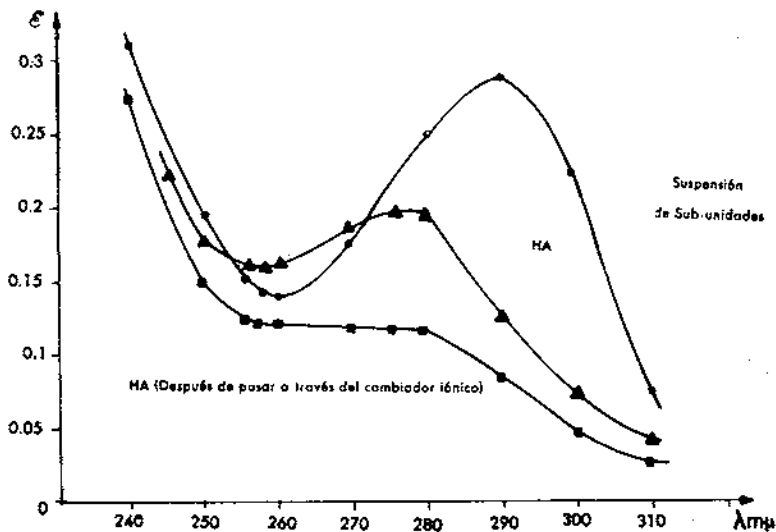


Fig. 14. Espectros de adsorción ultravioleta de la suspensión de sub-unidades y hemaglutinina del virus A₂.

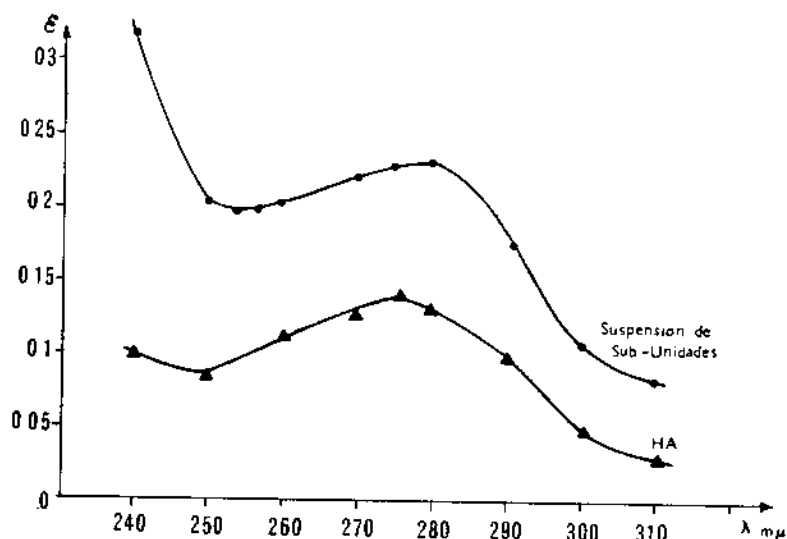


FIG. 15. Espectros de adsorción ultravioleta de la superación de sub-unidades y hemaglutinina de virus A.

En conclusión se puede constatar que la utilización de la cromatografía de intercambio iónico en estudios virales encierra grandes perspectivas para la resolución de problemas teóricos e indudables ventajas prácticas.

REFERENCIAS

- BROWN F. Y CARTWRIGHT. Fractionation of the virus of Food and Mouth disease by chromatography on DEAE-cellulose. *Biochim. Biophys. Acta* 33, 343, 1959.
- KLEMERER H. G. Y FERREIRA H. G. Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE-cellulose. *Virology*, 9, 536, 1959.
- LOWRY O. H. ROSENBOUGH N. J. Y COLS. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- PETERSON E. A. Y SOBER H. A. Chromatography of proteins. I: Cellulose Ion-exchange absorbents. *J. Am. Chem. Soc.* 78, 751, 1956.
- PHILIPSON L. Separation of DEAE-cellulose of components associated with adenovirus reproduction. *Virology*, 10, 459, 1960.
- ZHDANOV V. M., DREISIN R. S. Y COLS. Ysuchenie swoistw adenovirusow ich agglutininov chromatographii na DEAE-cellulose. *Voprosi Virusologii* 6, 688, 1963.