

Caracterización de partículas virales en suspensión mediante métodos de inmunomicroscopía electrónica

LISSET LESCAILLE BUITRAGO¹ y CARLOS A. SANTIZO LESCAILLES²

1. Centro Nacional de Biopreparados, 212 No. 1914, Atabey, La Habana, Cuba

2. Laboratorio de Microscopía Electrónica, Unidad Analítica, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

INTRODUCCION

Las técnicas de inmunomicroscopía electrónica (IME) para la caracterización de partículas virales en suspensión se basan en la identificación visual directa de la interacción específica entre virus y anticuerpos (Almeida y Waterson, 1969).

Los trabajos de Anderson y Stanley (1941), quienes demostraron la unión específica del virus del mosaico del tabaco, iniciaron el desarrollo de esta metodología. Luego, con la aparición de las técnicas de contraste negativo (Brenner y Horne, 1959), se logró que la IME se constituyera en un criterio práctico para la identificación de virus, tanto en suspensiones purificadas como en asociación con material celular (Almeida y Howatson, 1963).

Desde entonces, las técnicas de IME han constituido una herramienta usual de la virología; de ellas se han derivado diferentes procedimientos metodológicos para lograr la caracterización de numerosas entidades virales que afectan al hombre, a los animales y a las plantas.

En el presente trabajo nos referiremos, de forma general, a algunas de las variantes fundamentales de las técnicas de IME, que suelen emplearse para el estudio de suspensiones virales. Haremos mención a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con dichas técnicas en el estudio de partículas virales tan pequeñas como las asociadas al virus de la hepatitis B.

Técnicas clásicas de inmunomicroscopía electrónica

La IME y la microscopía electrónica por observación directa, constituyen las llamadas técnicas clásicas para la determinación de las características ultraestructurales de diferentes virus. En los inicios de estas investigaciones, ellas dieron lugar a aportes tan importantes como la diferenciación entre el virus de la varicela y el de la variola (Peters, 1962; Nagington, 1964) y la caracterización de las partículas asociadas al virus de la hepatitis B (Bayer, 1968; Dane, 1970; Almeida, 1971).

A pesar de esto, estas técnicas tienen limitaciones cuando el número de determinaciones a realizar es alto, no solo por las necesidades de equipamiento adicional, sino también porque su reproducibilidad suele estar condicionada por la habilidad del microscopista para obtener inmunoagregados adecuados, con diluciones óptimas del antisuero específico para cada suspensión viral a investigar.

Empleando estos métodos para el estudio de rotavirus humano y bovino, virus de la hepatitis tipos A y B, y adenovirus, a partir de fluidos biológicos, hemos comprobado que también se presentan inconvenientes provocados por las frecuentes precipitaciones de agregados inespecíficos e impurezas de baja velocidad de sedimentación, que tienden a degradar la imagen microscópica y a complicar las interpretaciones, principalmente cuando se trata de estructuras virales carentes de morfología típica o con dimensiones variables (Santizo, 1987).

Variantes basadas en la inducción previa de inmunocomplejos

En un intento por superar las desventajas inherentes a los métodos convencionales, Anderson y Doane (1973) utilizaron superficies de agar para atrapar los inmunocomplejos formados entre virus y anticuerpos, y retener en dicho soporte las impurezas y otros elementos indeseables. De esa forma se esbozó la posibilidad de obtener resultados relativamente rápidos, con muestras sin purificación o ultracentrifugación. Aun así, el método del agar no es considerado una solución eficaz para resolver el problema de las impurezas, ni tampoco como una solución práctica para la simplificación de los períodos preparativos (Milne y Luisoni, 1975).

Ball (1974) desarrolló un método de agregados, que en esencia fue una versión de la técnica clásica, pero introduciendo algunas variantes como la reducción de los tiempos de incubación, la omisión de los pasos de ultracentrifugación y la eliminación de las impurezas mediante lavados de los complejos formados sobre la rejilla. Con este método se ha reportado la obtención de agregados de partículas con efectos visibles de decoración, y con un rendimiento diez veces superior en número de partículas, comparado con los procedimientos convencionales de microscopía electrónica (Ball y Brakke, 1968).

En ensayos realizados por nosotros con esta técnica, para la caracterización de rotavirus y virus de la hepatitis A en filtrados de heces fecales humanas, hemos obtenido resultados variables. Los resultados satisfactorios sólo se obtuvieron para aquellas muestras biológicas cuya elevada concentración de partículas virales permitió lograr cantidades suficientes de inmunocomplejos, como para poder ser observados después de los procesos de lavado a que fueron sometidas las rejillas.

Métodos de inmunomicroscopía electrónica con el uso de fases sólidas de anticuerpos específicos

En el marco de la valoración diagnóstica de virus de plantas, han sido desarrollados otros métodos rápidos y sencillos, basados en el uso de fases sólidas de anticuerpos.

Derrick (1972), logró demostrar que a la fina película soporte de formvar-carbón de las rejillas podían acoplarse moléculas de anticuerpos, con el objetivo de atrapar posteriormente, y con carácter específico, las partículas virales. También encontró que dichas rejillas podían ser sometidas a procesos de lavados consecutivos, para la eliminación de otros componentes inespecíficos.

Al comparar este método con los procedimientos convencionales de microscopía electrónica, se ha reportado que es posible obtener una cantidad de partículas virales, hasta cincuenta veces mayor.

En 1974, Brlansky y Derrick, utilizando fases sólidas de anticuerpos específicos para los virus del mosaico del tabaco y de la patata, encontraron una relación lineal entre el logaritmo del número de partículas atrapadas y la dilución de estas. Posteriormente, con los procedimientos de decoración de las partículas con anticuerpos específicos, se logró incrementar la sensibilidad

de la técnica (Milne y Luisoni, 1971). Su uso ha sido extendido al estudio de diferentes entidades virales en el humano (Lesemann, 1980; Nikolaieff, 1980).

A causa de las limitaciones de las técnicas clásicas de microscopía electrónica en la caracterización de las partículas asociadas al virus de la hepatitis B (VHB), a partir de muestras de suero positivas para el antígeno de superficie (HBsAg+), hemos empleado en este caso estas técnicas simples y rápidas.

Los resultados preliminares empleando fases sólidas preparadas a partir de antisueros alogénicos y xenogénicos específicos, nos permitió una valoración favorable preliminar sobre la factibilidad de uso cualitativo de estas técnicas. Sin embargo, desde el punto de vista cuantitativo, nuestros resultados fueron ciertamente discretos. Se estimó que un factor limitante de la sensibilidad era el uso de fases sólidas de anticuerpos a partir de fuentes no purificadas, especialmente en el caso de inmunosistemas donde los antisueros suelen tener bajas concentraciones de inmunoglobulina G (IgG) con actividad específica (Santizo, 1987).

Técnicas de inmunomicroscopía electrónica con el uso de fase sólida de proteína A

Entre las más recientes variantes de los métodos de IME, están aquellos que emplean como fase sólida la proteína A (Shukla y Gough, 1979). La proteína A es un componente estructural de la pared celular del *Staphylococcus aureus*, con una alta afinidad por el fragmento Fc de las moléculas de IgG (Forsgren y Sjoquist, 1966). Las fases sólidas de proteína A y anticuerpos específicos poseen una mayor funcionalidad, debida a que quedan espialmente disponibles las regiones Fab de estos últimos para acoplarse al antígeno.

El empleo de esta técnica ha sido extendido al estudio de adenovirus (Svenson y Von Bonsdorff, 1982); rotavirus (Gerna, 1984); virus Sendai (Katz y Straussman, 1984) y otros, señalándose en general por muchos investigadores un incremento de la sensibilidad aproximadamente de cien veces mayor, en relación con los métodos clásicos.

Sobre la base de estas experiencias hemos aplicado y normalizado un método de IME, utilizando fase sólida de proteína A y anticuerpos alogénicos purificados anti-HBs, para la evaluación de muestras de suero con vistas al estudio de virus de la hepatitis B. Nuestros resultados evidenciaron que la preparación de fases sólidas con las características anteriormente mencionadas no sólo favoreció una distribución más uniforme de las pequeñas partículas sobre la membrana, sino además permitió examinar la presencia de inmunocomplejos con determinantes antigénicos libres.

Por otra parte, se demostró la aplicación de este método en la caracterización de preparados con fines vacunales, al ofrecer información no solo acerca de la correlación del antígeno de superficie (HBsAg) presente en el producto biológico, sino también sobre las cualidades morfológicas de las partículas asociadas al VHB, aspecto este último de suma importancia para la obtención de criterios acerca de la infectividad e inmunogenicidad de dichos preparados (Santizo, 1987).

REFERENCIAS

- ALMEIDA, J. D. (1971). *Electron microscopic observations on Australia antigen*. Med. J. 47: 869.
 ALMEIDA, J. D. y A. HOWATSON (1963). *A negative staining method for cell-associated virus*. J. Cell. Biol. 16: 616-620.
 ALMEIDA, J. D. y A. P. WATFERNON (1969). *The morphology of virus-antibody interaction*. Adv. Virus Res. 15: 307.

- ANDERSON, N. y F. W. DOANE (1973). *Specific identification of enteroviruses by immuno-electron microscopy using a serum in agar diffusion method*. Can. J. Microbiol. **19**: 585.
- BALL, E. M. (1974). *Serological test for the identification of plant viruses*. Am. Phytopathology. Soc. St. Paul Minnesota.
- BALL, E. M. y M. K. BRAKKE (1968). *Leaf-dip serology for electron microscopic identification of plant viruses*. Virology, **36**: 152.
- BAYER, M. (1968). *Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with Leukemia, Down's syndrome and Hepatitis*. Nature **218**: 1057.
- BRENNER, S. y R. W. HORNE (1959). *A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses*. Biochem. Biophys. Acta **34**: 103-110.
- BRLANSKY, R. H. y K. S. DERRICK (1974). *Serologically specific electron microscopy detection and identification of tomato spotted with virus and icosahedral plant viruses in crude extracts*. Proc. Am. Phytopathol. Soc. **1**: 21 (abstract).
- DANE, D. S. (1970). *Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis*. Lancet, **1**: 995.
- DERRICK, K. S. (1972). *Immuno-specific grids for electron microscopy of plant virus*. Phytopathology, **62**: 753.
- FORSGRÉN, A. y J. SJOQUIST (1966). *Protein A from S. aureus. Pseudoimmune reaction with human globulin*. J. Immunol. **97**: 822.
- GERNA, G. (1984). *Rapid serotyping of human rotavirus strains by solid-phase immuno electron microscopy*. J. Clin. Microbiol. **19**: 273-278.
- KATZ, D. y Y. STRAUSSMAN (1984). *Evaluation of immuno-adsorbent electron microscopic techniques for detection of sindbis virus*. J. Virol. **48**: 257-264.
- LESEMANN, D. E. (1980). *The troping of tymovirus particles on electron microscope grids by adsorption and serological binding*. J. General Virol. **48**: 257-264.
- MILNE, R. G. y E. LUISONI (1975). *Rapid high resolution immunoelectron microscopy of plant viruses*. Virology **68**: 270-274.
- NAGINGTON, J. (1964). *Electron microscopy in differential diagnosis of poxvirus infections*. Br. Med. J. **2**: 1499-1500.
- NIKOLAIEFF, A. (1980). *Detection of rotavirus by serological troping on antibody coated electron microscope grids*. J. Clin. Microbiol. **12**: 101-104.
- PETERS, D. (1962). *Variola die Zuverlässigkeit der elektronen mikroskope chen Schenlldiagnostek*. Detsch. Med. Wochensche. **87**: 2240-246.
- SANTIZO, C. A. (1987). *Desarrollo y aplicación de los métodos de inmunomicroscopía electrónica en fase sólida para el estudio de las partículas asociadas al virus de la hepatitis tipo B*. Tesis para el grado científico de candidato a doctor en Ciencias Biológicas.
- SHUKLA, D. D. y K. H. GOUGH (1979). *The use of protein A from Staphylococcus aureus in immune electron microscopy for detecting plant viruses particles*. J. Gen. Virol. **45**: 533.
- SVENSON, L. y C. H. VON BONSDORFF (1982). *Solid phase immune electron microscopy by use of protein A and its applications for characterization of selected adenovirus serotypes*. J. Med. Virol. **10**: 243.