

Adsorción del virus de la influenza por los núcleos de los glóbulos rojos de pollo

Por A. S. PARODI, S. LAJMANOVICH y N. MITTELMAN (*)

Hirst (1) demostró que el virus de la influenza tiene la propiedad de aglutinar los glóbulos rojos de pollo. Después se observó que esta propiedad también se presenta frente a otros glóbulos rojos nucleados: sapo, culebra, pato, paloma (2) y no nucleados: hombre, cobayo (3).

El virus es adsorbido por los glóbulos de pollo y se eluye en solución fisiológica o en el mismo líquido que lo contenía; la velocidad de la elución depende del tipo de virus usado y de la temperatura. Una vez eluído, los glóbulos son incapaces de adsorber más virus, pero en cambio éste, una vez eluído puede aglutinar nuevos glóbulos. Un triturado de glóbulos rojos, libre de substancias solubles, tiene propiedades análogas (4).

Un fenómeno semejante fué descrito con las células del aparato respiratorio del hurón (5).

Nos pareció de interés investigar si la substancia responsable del fenómeno estaba en los núcleos de los glóbulos rojos nucleados y si la adsorción presentaba las mismas características del glóbulo entero.

MATERIAL Y MÉTODO

Fueron usados glóbulos rojos de pollo recién extraídos. Estos fueron tratados con saponina según el método de Douce y Tien Ho Lan (6) quienes han dado pruebas suficientes como para asegurar la obtención de núcleos libres de estroma.

(*) De la Sección Virus del Instituto Bacteriológico «Dr. Carlos G. Malbrán» de la Dirección Nacional de Salud pública. Estos estudios fueron subvencionados en parte por una donación de la International Health Division de la Fundación Rockefeller.

Presentado para publicar el 21 de diciembre de 1943.

Veinte centímetros cúbicos de glóbulos previamente lavados fueron resuspendidos en solución fisiológica y se le agregó 0.8 de una solución de saponina al 3 % en una solución buffer pH 7. Se dejaron 15 minutos a 37° y luego fueron centrifugados y lavados 7 veces con solución fisiológica. Se agregó al sedimento de núcleos la cantidad de solución fisiológica necesaria para tener una suspensión de 1.800.000 núcleos por mm³.

El virus usado fué el tipo A (cepa 7) aislado durante una epidemia local de gripe. Fué inoculado a embriones de pollo de 11 días y luego de 48 horas de incubación se extrajo el líquido alantoideo. Este fué inmediatamente centrifugado y puesto luego en contacto con los núcleos.

Los sobrenadantes se titularon por aglutinación, según la técnica de Hirst.

EXPERIMENTOS

1º) Cantidad mínima de núcleos necesarios para adsorber el virus en la heladera a 4°C durante 18 horas. A cantidades variables de núcleos se les agregó 2 cm³ de virus (líquido alantoideo) y se los incubó 18 horas a 4°C. Se los centrifugó luego titulándose los sobrenadantes.

CUADRO 1

Tubo N° virus 2 c.c.	Cantidad de susp. de núcleos cc.		Títulos de sobrenadantes, luego de centrifugados. (Los números indican grado de sedimentación de 0 a 4)					
			1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
1	0,01	18 horas a 4° C	3	2	1	0	0	0
2	0,02		1	0	0	0	0	0
3	0,04		0	0	0	0	0	0
4	0,08		0	0	0	0	0	0
5	0,16		0	0	0	0	0	0
6	0,32		0	0	0	0	0	0
Control virus .	—		—	4	4	4	4	3

La cantidad mínima necesaria para adsorber el virus de 2 ml de líquido alantoideo fué de 0.04 cm³ de una suspensión madre que contenía 1.800.000 núcleos por mm³, lo cual representa un volumen de 2 % de núcleos con relación al virus.

2º) Elución del virus adsorbido por los núcleos.

A los mismos sedimentos del experimento anterior se le agregó 2 cm³ de solución fisiológica. Se agitaron y se dejaron 3 horas a 37°C. Luego se centrifugaron y se tituló el sobrenadante.

CUADRO II

Tubo N° Sedimentos de núcleos + solución fisiológica 2 cc.		Títulos de sobrenadantes luego de centrifugados (Los números indican grado de sedimentación de 0 a 4)					
		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
1	3 horas a 37° C	4	4	4	4	3	2
2		4	4	4	4	3	2
3		4	4	4	4	3	2
4		4	4	4	4	3	2
5		4	4	4	4	3	2
6		4	4	4	4	3	2

Las distintas cantidades de núcleos sedimentados resuspendidos en un volumen idéntico al de antes pero en solución fisiológica, eluyeron una cantidad similar de virus.

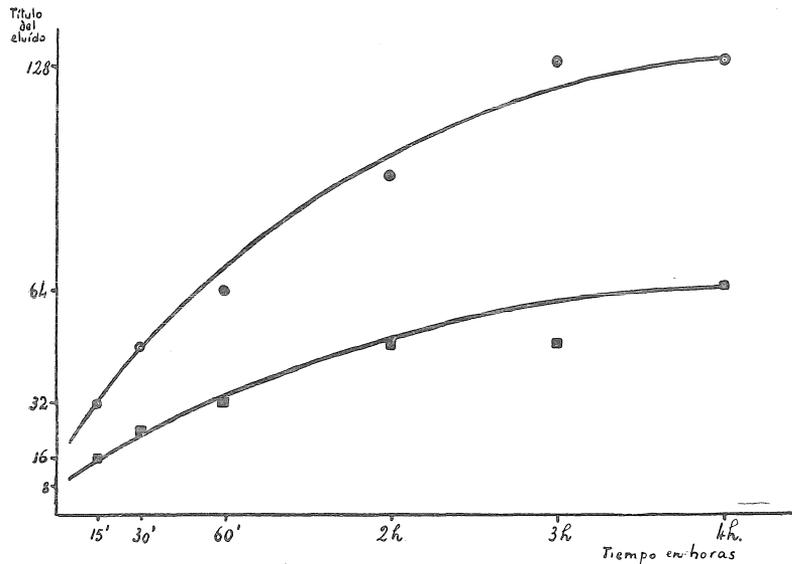


FIG. 1.— Curva de elución a 37°C del virus de influenza adsorbido sobre núcleos de glóbulos rojos de pollo. La adsorción se efectuó mezclando volúmenes iguales de líquido alantoideo cepa 7 de título 128-256 y de suspensión de núcleo, y centrifugando la mezcla después de 18 horas de estacionamiento a 4°C.

- adsorbido sobre suspensión de núcleos al 2,5 %.
- adsorbido sobre suspensión de núcleos al 5 %.

La figura N° 1 reproduce una típica curva de elución, que como puede verse, resulta en un todo similar a la descrita por Hirst (1942) para glóbulos enteros.

3º) Inutilización de los núcleos para adsorber más virus una vez que lo han eluído.

A los mismos núcleos de los experimentos anteriores se los centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Se agregó 2 cm³ de virus y se los dejó 18 horas a 4°C. Se hizo control con núcleos de la misma suspensión del experimento pero que no habían previamente adsorbido el virus y con virus sin núcleo.

CUADRO III

Tubo N° Núcleos usados sedimentados + virus		Título de sobrenadantes luego de centrifugar (Los números indican el grado de sedimentación, de 0 a 4)					
		1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
1	18 horas a 4°C	4	4	4	3	2	1
2		4	4	4	3	1	0
3		4	4	4	3	1	0
4		4	4	4	3	1	0
5		4	4	3	2	1	0
6		4	3	2	±	0	0
Control núcleos 0,1 de núcleos sanos (1) + 2 cc. de virus . .		0	0	0	0	0	0
2 cc. de virus (sin núcleos) .		4	4	4	3	2	1

(1) Fueron de la misma suspensión utilizada en el primer experimento conservados a 4°C.

Cuando la cantidad de núcleos sobrepasa en mucho la cantidad mínima suficiente para adsorber todo el virus (tubos 5 y 6), se nota una nueva adsorción del virus. Esto se explica suponiendo que un número grande de núcleos no han sido utilizados en la primera adsorción.

DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Es evidente que los núcleos tienen una capacidad similar a los glóbulos enteros para adsorber el virus de la influenza. Es probable que la substancia se encuentre en gran proporción en el núcleo, aunque no podemos eliminar la posible participación del estroma del glóbulo por no haber hecho ensayos de adsorción con el estroma solo. Es probable que sea una substancia que se encuentre diseminada en todo el glóbulo, pues los glóbulos no nucleados adsorben el virus, aunque el título es menor.

Independientemente de que otras partes del glóbulo intervengan en el fenómeno de adsorción-elución del virus de influenza, es indudable que los núcleos solos, presentan un comportamiento totalmente similar al de los glóbulos enteros. Esta similitud no es sólo cualitativa sino también cuantitativa. En efecto, para una adsorción mayor del 98 % se requieren 0.04-0.08 ml de suspensión de núcleos para 2 ml de virus, lo cual equivale a 36.000-72.000 núcleos por mm^3 , mientras que la suspensión de glóbulos que en condiciones análogas adsorbe el 99.5 % del virus, contiene alrededor de 135.000 glóbulos por mm^3 . Análogamente en el fenómeno de elución se nota (Fig. 1) que la misma es tanto más completa cuanto menor es la concentración de núcleos, cosa que también sucede para los glóbulos y finalmente tanto núcleos (cuadro 3) como glóbulos después de haber eluído el virus resultan incapaces de volver a adsorber virus.

Si se admite con Hirst, como hipótesis plausible la de la existencia de alguna substancia en los glóbulos, o en las células del aparato respiratorio, responsable del fenómeno, es indudable que los experimentos que anteceden, tienen importancia en el sentido de proveer un material de trabajo de fácil obtención y de constitución química relativamente sencilla.

RESUMEN

1º — Los núcleos de glóbulos rojos de pollo, desprovistos de estroma son capaces de adsorber el virus de la influenza.

2º — Una vez adsorbido el virus, los núcleos los eluyen de una manera similar a los glóbulos enteros.

3º — Los núcleos que han adsorbido y eluído virus son incapaces de volver a adsorber virus nuevamente.

4º — Se discute la similitud del proceso de adsorción entre los glóbulos enteros y núcleos sin estroma y se hacen consideraciones sobre la simplificación del problema de hallar la substancia responsable de la adsorción.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HIRST, G. K. — *Science*, 1941, **94**: 22.
- (2) PARODI, A. S. — Datos no publicados.
- (3) Mc CLELLAND, L., y HARE, R. — *Canad. Pub. Health J.*, Octubre 1941, pág. 530.
- (4) HIRST, G. K. — *J. Exp. Med.*, 1942, **76**: 195.
- (5) HIRST, G. K. — *J. Exp. Med.*, 1943, **78**: 99.
- (6) DOUNCE, A. L., y TIEN HO LAN. — *Science*, 1943, **97**: 584.