

Liofilización de hematíes estabilizados en glutaraldehído

Jehzabel Pendás, Tomás Moreira, Odalis Guerra,* Sheyla Abreu,* Aymara Nieto** y Eligio Sosa.*

Departamento de Procesos, Laboratorio de Criobiología y Liofilización, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990. *Departamento de Virología, Grupo de Colecciones, Instituto Finlay, Avenida 27 No. 19805, La Lisa, Apartado Postal 16017. **Departamento de Control de Calidad, Grupo de Virología, Centro de Inmunología Molecular, Calle 206 No. 1926, Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 8 de diciembre de 1998. Aceptado: 4 de febrero de 1999.

Palabras clave: hematíes, glutaraldehído, liofilización, hemaglutinación.
Key words: erythrocytes, glutaraldehyde, lyophilization, hemagglutination.

RESUMEN. Los hematíes de diferentes especies animales se emplean comúnmente en laboratorios de virología, para realizar la determinación del título viral en función de su afinidad específica. Para estas pruebas de hemaglutinación en Cuba, se utilizan los hematíes frescos o criopreservados, pero desde hace varios años, se ha insistido en la necesidad de disponer de este tipo de material liofilizado, elaborado en el país. Por su parte, el método tradicional de conservación a bajas temperaturas con adición de glicerol, da lugar a la realización de lavados sucesivos y las limitaciones de todo método que requiere mantener permanentemente el material en congelación. Con el fin de almacenar hematíes de diferentes especies para pruebas de hemaglutinación, se puso a punto una técnica de fijación de éstos con glutaraldehído, seguido de un proceso de liofilización. En el presente trabajo se muestra la eficacia del método para estabilizar hematíes de pollo Leghorn, mono Rhesus y cobayos, demostrándose que presentan un comportamiento similar al de los hematíes frescos, en la determinación del título viral de suspensiones de influenza A, sarampión y poliovirus respectivamente. Se demostró que los hematíes de gallos liofilizados, almacenados durante 5 meses a 4 °C mantenían inalterables sus características hemaglutinantes. Se propone la extensión del método de liofilización como alternativa ante el empleo de la criopreservación o de la utilización de hematíes frescos.

ABSTRACT. Due to their specific affinity with different viruses, red blood cells (RBC) from different species are commonly used in hemagglutination assay for the determination of viral titer. The practice in Cuba to use fresh or cryopreserved blood has the inconvenients related to the manipulation of a product that should be washed to obtain the erythrocytes as well as the use of high cost equipment for cryopreservation. In order to stabilize RBC, a glutaraldehyde stabilization combined with freeze-drying was employed. Leghorn chickens, Rhesus monkeys and guinea pigs' RBC were employed for influenza, measles and poliovirus detection respectively. RBC were obtained by successive centrifugation 3 000 r/min for 20 min after washing with a 10 mmol/L PBS solution. Fixation of RBC was obtained by means of gentle stirring of cells in contact with a 1 % glutaraldehyde solution during 30 min at 4 °C. Fixed cells were washed three times with a 0.15 mol/L NaCl solution and centrifuged to eliminate the excess of glutaraldehyde. A suspension of glutaraldehyde-fixed RBC in water was freeze-dried for 24 h. Water-reconstituted freeze-dried RBC were employed for viral titer determination. Viral titer is then obtained as the reciprocal of the highest dilution of virus that causes complete agglutination and is expressed as the number of hemagglutinating units per volume unit. Freeze-dried glutaraldehyde-fixed RBC exhibited the same behaviour as fresh RBC. Storage for 5 months at 4 °C did not influence the freeze-dried glutaraldehyde-fixed RBC effectiveness for agglutination assays.

INTRODUCCION

Todos los antígenos en forma de micropartículas como: bacterias, levaduras, leucocitos y eritrocitos pueden ser aglutinados por anticuerpos a determinantes antigénicos que se encuentran en la superficie de estos.

Este fenómeno ha sido ampliamente empleado en el estudio de antígenos de superficie de células y microorganismos o en la detección de anticuerpos.

Se reconoce que los hematíes son las partículas transportadoras más utilizadas en la aglutinación pasiva. Las partículas plásticas compuestas de poliestireno, poliácridamida o aminopoliestirenos son muy empleadas para la unión a proteínas; sin embargo, en las pruebas de aglutinación en las cuales se han utilizado son menos sensibles que la hemaglutinación, puesto que muestran menos desorción.

La principal dificultad de los hematíes empleados en las pruebas serológicas para el diagnóstico y la investigación, es el almacenamiento. En refrigeración a 4 °C con soluciones preservantes como el ALSEVER, sólo se pueden conservar una semana. La criopreservación tiene la desventaja que requiere de un proceso de lavado tedioso y que consume mucho tiempo. Por estas razones, se ha hecho necesario desarrollar otros procedimientos para la conservación.

La fijación de hematíes con aldehídos tiene como ventajas que

se obtienen preparaciones estables, uniformes, las cuales son insensibles al proceso de congelación-descongelación y a cambios de pH y de la osmolaridad. Liofilizados con formol tienen un período mayor que los no fijados, con la desventaja que aglutinan espontáneamente después de un prolongado almacenamiento de seis meses a -20°C .³ La fijación de eritrocitos con glutaraldehído se ha encontrado que es superior a la fijación con formol y requiere menos tiempo de fijación, es más reproducible y da lugar a células más estables.

Estas células fijadas con glutaraldehído pueden ser conjugadas a proteínas en presencia y ausencia de agentes acoplantes. Se conoce que estas células conjugadas a antígenos son estables como mínimo seis meses. Los hematíes fijados de este modo, son estables al menos un mes.

A pesar de los buenos resultados obtenidos por criopreservación, se requiere de equipos especiales para mantenerlos en tales condiciones. Por esta razón, se han buscado métodos de conservación, que no requieran del mantenimiento a bajas temperaturas y menos aún, del suministro frecuente de nitrógeno líquido.

La liofilización constituye un proceso en el que se deshidrata a bajas temperaturas. El disolvente, generalmente agua, se congela y se elimina por sublimación. Posteriormente, se aplica calor para completar la deshidratación. A través de este proceso, es posible almacenar las células por un período de tiempo largo —en el mejor de los casos a temperatura ambiente— y facilita la reconstitución para su posterior empleo. Aunque la aplicación de esta técnica en la conservación de hematíes para pruebas de hemaglutinación se practica en otros países. En Cuba no existen antecedentes de su empleo, por lo que el objetivo de este trabajo fue conservar en forma liofilizada los hematíes de diferentes especies para facilitar su utilización en laboratorios que emplean generalmente las técnicas de hemaglutinación para titular antígenos y cepas virales.

MATERIALES Y METODOS

Fijación de los eritrocitos en glutaraldehído

La sangre de cada una de las especies gallo Leghurn, mono Rhesus y cobayo, una vez extraída fue mezclada respectivamente con un volumen igual de disolución de ALSEVER y almacenada como máximo 72 h a 4°C .

Los eritrocitos se separaron por centrifugación a 3 000 r/min duran-

te 20 min a temperatura ambiente, eliminando el plasma y los leucocitos. Posteriormente, se efectuaron dos lavados con una disolución de NaCl 0,15 mol/L empleando el mismo esquema de centrifugación. Después del último lavado, se midió el volumen de glóbulos, se conservó a 4°C y se le añadió la disolución de fijación.

Para la fijación, se adaptó el método reportado por Bing D.H.⁴ El trabajo se realizó según el esquema de trabajo siguiente: Se diluyó el glutaraldehído (BDH 25 %) al 1 % con una disolución de composición: Na_3PO_4 0,15 mol/L pH 8,2; NaCl 0,15 mol/L; H_2O (1: 9:5) conservada a 4°C (disolución de fijación). El paquete globular al 2 % (v/v) se dejó incubar 30 min a 4°C con agitación ocasional. Una vez fijados, se separó por centrifugación el glutaraldehído no fijado, lavando cinco veces con NaCl 0,15 mol/L y con agua destilada respectivamente. Es necesario tener en cuenta que el volumen de lavado debe ser 1:10 (v/v) del correspondiente al volumen de células fijadas.

Los hematíes se resuspendieron a una concentración final del 30 % en agua destilada con tiomersal (100 ppm) y se almacenaron a 4°C hasta que se llevó a cabo la liofilización en el mismo día.

Caracterización termofísica y liofilización

Para la caracterización termofísica de la suspensión de los hematíes compuesta por glutaraldehído y la mezcla Na_3PO_4 :NaCl: H_2O destinada a la liofilización, se empleó un calorímetro diferencial de barrido DSC 2, (Perkin Elmer, UK) utilizando una velocidad de barrido de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para el enfriamiento y calentamiento. De este modo, fue posible establecer la temperatura (T_g) o temperatura de transición vítrea de la sustancia intersticial hiperconcentrada que se forma en la congelación.⁵

Para la liofilización se emplearon frascos 2R, que contenían 0,5 mL por frasco. La congelación se realizó por inmersión en $\text{N}_2(\text{l})$. Los frascos se colocaron en una liofilizadora (Telstar Cryodos, Francia) y atendiendo a la información brindada por las mediciones calorimétricas, se seleccionó un régimen de liofilización apropiado.

Titulación de virus de influenza, sarampión y poliomias por hemaglutinación

Para evaluar la calidad de los hematíes liofilizados, se utilizó la téc-

nica de hemaglutinación directa o pasiva.⁶

En la evaluación se empleó un lote congelado de los virus influenza (Mississippi, Victoria y Taiwan), sarampión (cepa Edmonston, ATCC vr-24) y poliomia (cepa LID-1 de ratón proveniente de la CC vr-252). Para cada virus se emplearon respectivamente los hematíes de gallo Leghurn, mono Rhesus y cobayo. Cada lote de virus se descongeló en baño María a 37°C y se mantuvo posteriormente, en otro de hielo. Se añadió 0,1 mL de disolución salina al 0,9 % en cada pocillo (de la fila 1 a la 11), en una placa de 96 pocillos con fondo en forma de U. Se adicionó entonces 0,1 mL del lote de virus, realizando diluciones dobles seriadas. No se añadió virus a la fila 12.

Los hematíes liofilizados se resuspendieron con disolución al 0,9 % de NaCl al volumen inicial antes de liofilizar y se diluyeron a una concentración del 0,5 % (p/p), añadiendo 0,1 mL de la de esta suspensión a todos los pozos.

Se realizó la comparación con los hematíes frescos, los cuales fueron lavados tres veces con disolución salina al 0,9 %, por centrifugación a 2 000 r/min durante 10 min. Del paquete de glóbulos obtenido, se preparó una disolución al 0,5 % (p/p), la que se dispuso en los pocillos a razón de 0,1 mL por pocillo.

La placa se mantuvo 45 min a 4°C hasta observar la formación de una trama característica de la aglutinación o de un pequeño botón indicador de la ausencia de aglutinación.

El título hemaglutinante se define como el recíproco de la última dilución del virus a la cual se observa la hemaglutinación completa y se expresa en unidades de hemaglutinación (UHA) por unidad de volumen.

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización termofísica y liofilización

En la curva correspondiente a la caracterización por DSC de la suspensión congelada, se observó la presencia de un ligero accidente térmico (cambio de pendiente) a $-33,5^{\circ}\text{C}$ (T_g) y posteriormente, un pico endotérmico representante de la fusión del hielo (Fig. 1). Esto permitió diseñar un régimen de liofilización apropiado consistente en realizar el secado primario a -38°C por 24 h y durante las restantes, se elevó la temperatura hasta 20°C para una duración del ciclo de liofilización de 48 h.

Titulación de virus de influenza, sarampión y poliomias por hemaglutinación

Los diferentes virus se probaron con hemáties liofilizados de distintas especies (Tabla 1).

Los títulos obtenidos con hemáties de gallo Leghorn liofilizados son idénticos a los controles (hemáties de sangre fresca) (Fig. 2). Además, el hecho de que el material liofilizado muestre del mismo modo que el no liofilizado las diferencias observadas entre los títulos correspondientes al virus clarificado (A) con relación al sin clarificar (B), hace pensar que el material liofilizado podría ser empleado para establecer criterios de pureza.

Comportamiento durante el almacenamiento

Se observó que los hemáties liofilizados almacenados mantenían igual título (suspensión viral de Influenza A) que los congelados almacenados y los frescos, lo que indica una buena estabilidad de este material (Fig. 3).

CONCLUSIONES

Los ensayos de hemaglutinación dieron resultados satisfactorios no apareciendo diferencias entre los hemáties liofilizados de cada especie y los controles no liofilizados para los virus o antígenos virales estudiados.

Después de cinco meses de conservación a 4°C, los eritrocitos liofilizados de gallo se mantienen viables para los ensayos de hemaglutinación. Se propone la extensión del método de liofilización como alternativa ante el empleo de la crioconservación o de la utilización de hemáties frescos.

AGRADECIMIENTOS

A Juan Francisco Núñez y Eduardo Gordillo, del vivario del grupo Evaluador de Procesos de la Dirección de Virología del Instituto Finlay, por su ayuda y por suministrar la sangre, materia prima fundamental para realizar este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

1. Catty D. Antibodies: A practical approach Vol. 1 (The practical approach series) Chapter 7, 169-173, 1989.
2. Daniel T.M. J. Immunol., 95, 100, 1965.
3. Brearley Ch.A., Hodges N.A., Olliff C.J. Criobiology, 29, 175, 1992.
4. Bing D.H., Weyand J.G.M. and Stavitsky A.B. Hemagglutination with Aldehyde-Fixed Erythrocytes for Assay of Antigens and Antibodies. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 124, 1166, 1967.
5. Hatley R.H.M. Develop. Biol. Standard, 74, 105, Karger, Basel, 1991.
6. Burlenson E.G., Chambers T.M. and Wiedbrauk D.L. Virology: A Laboratory Manual, Ed. Brauk, Chp. 18, 86-91, 1992.

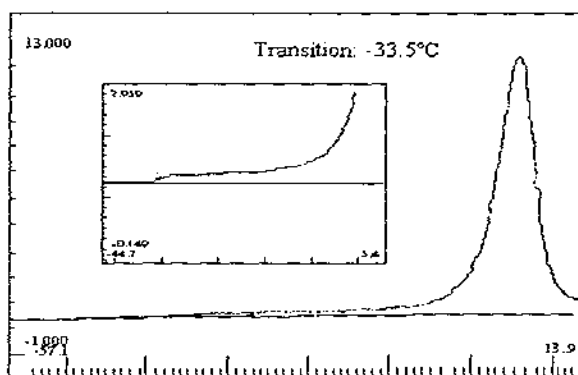


Fig. 1. Registro de la variación de entalpía durante el calentamiento de la muestra previamente congelada. Barrido de -60 a +20 °C. Aparece ampliada la zona donde se observa T_g .

Tabla 1. Título obtenido en la hemaglutinación al emplear hemáties frescos y liofilizados. Cada experimento fue realizado seis veces por triplicado.

Virus	Título (UHA/ 0.1 mL)	
	Hemáties	
	De sangre fresca	Liofilizados
Polioma	64	64
Sarampión	128	128
Influenza-A	64	64

UHA Unidades de hemaglutinación.

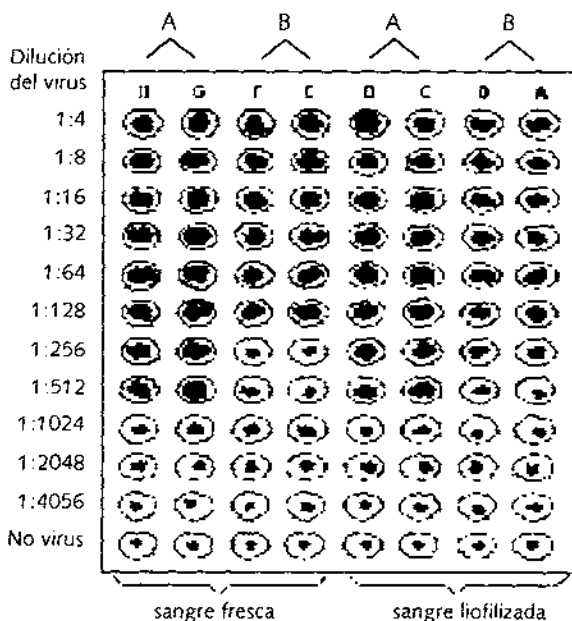


Fig. 2. Esquema de hemaglutinación de antígenos provenientes del virus Influenza A.

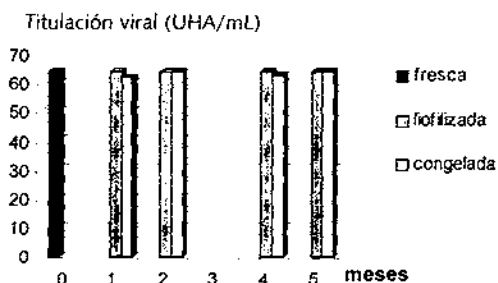


Fig. 3. Comportamiento de los hemáties de gallo liofilizados almacenados durante 5 meses a 4 °C.