



48  
26j  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**CONCENTRACION Y PURIFICACION DEL VIRUS  
DE RUBEOLA POR: PRECIPITACION, ULTRA-  
CENTRIFUGACION Y GRADIENTES DE  
DENSIDAD**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A ;

**PATRICIA ANGELINA ZAMORA LARA**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**1988**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# I N D I C E

	PAG.
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
I .- INTRODUCCION	
1.1 IMPORTANCIA DE LA INFECCION POR VIRUS DE RUBEOLA.....	2
1.2 SINTOMATOLOGIA CLINICA DE LA RUBEOLA.....	2
1.3 METODOS DE DIAGNOSTICO CLINICO PARA LA INFECCION POR VIRUS DE RUBEOLA.....	3
1.4 PROPIEDADES QUIMICAS, FISICAS Y BIOLOGICAS DEL VIRUS DE RUBEOLA.....	5
1.5 METODOS PARA CONCENTRAR Y PURIFICAR VIRUS.....	8
1.6 METODOS DE CONCENTRACION .....	8
1.6.1 HIDROEXTRACCION.....	9
1.6.2 FILTRACION MOLECULAR.....	10
1.6.3 PRECIPITACION.....	10
1.6.4 ULTRACENTRIFUGACION.....	11
1.7 PURIFICACION DE VIRUS.....	12
1.7.1 ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTES DE DENSIDAD.....	12
1.7.2 TIPO DE VIRUS.....	13
1.7.3 MATERIAL UTILIZADO PARA GRADIENTES.....	13
1.7.4 MEDIO DE CENTRIFUGACION.....	14

	PAG.	
1.7.5	TECNICAS DE SEPARACION EN LA ULTRACENTRIFUGACION PREPARA- TIVA.....	18
1.7.6	TIPOS DE GRADIENTES.....	19
1.7.7	TIPOS DE ROTORES DISPONIBLES.....	20
1.7.8	PARAMETROS UTILES PARA ULTRACENTRIFUGACION.....	20
1.7.9	FRACCIONAMIENTO DE GRADIENTES.....	20
II.-	DISEÑO EXPERIMENTAL	22
III.-	MATERIAL Y METODOS .....	23
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	23
3.1.1.	OBTENCION DE ERITROCITOS DE POLLO.....	23
3.2	TITULACION DEL ANTIGENO POR HEMAGLUTINA- CION.....	24
3.3	CUANTIFICACION DE PROTEINAS.....	25
3.4	CLARIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA.....	26
3.5	CONCENTRACION DEL VIRUS.....	26
3.5.1	CONCENTRACION POR PRECIPITACION COM SULFATO DE AMONIO.....	26
3.5.2	CONCENTRACION DEL VIRUS POR UL- TRACENTRIFUGACION .....	27
3.6	PURIFICACION DEL VIRUS.....	28
3.6.1	POR GRADIENTE DE SACAROSA.....	28
3.6.2	POR GRADIENTE DE PERCOLL.....	28

	PAG.
IV.- RESULTADOS.	
4.1 CLARIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA.....	30
4.2 CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA.....	31
4.2.1 CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.....	31
4.2.2 CONCENTRACION DE VIRUS DE -- RUBEOLA POR ULTRACENTRIFUGACION.....	38
4.3 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA.....	42
4.3.1 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR GRADIENTE DE - SACAROSA.....	43
4.3.2 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR GRADIENTE DE - PERCOLL.....	48
V.- DISCUSION.....	55
VI.- CONCLUSIONES.....	58
VII.- RESUMEN.....	59
VIII.- APENDICE.....	60
IX.- BIBLIOGRAFIA.....	65

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

EN LA ACTUALIDAD EN NUESTRO PAÍS A LA INFECCIÓN POR EL - VIRUS DE RUBEÓLA NO SE LE HA PRESTADO LA ATENCIÓN DEBIDA. A PESAR DE QUE ÉSTA PUEDE PROVOCAR ENTRE OTROS PADECI -- MIENTOS, TRASTORNOS TERATOGÉNICOS. SU DETECCIÓN POR --- DIAGNÓSTICO CLÍNICO NO ES MUY CONFIABLE, POR LO QUE ES, - NECESARIO UTILIZAR PRUEBAS DE LABORATORIO. ENTRE ÉSTAS, LA MÁS UTILIZADA ES LA INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN. ESTA TÉCNICA SE REALIZA PRINCIPALMENTE CON EQUIPOS DIAG- NÓSTICOS DE IMPORTACIÓN, LO CUAL ORIGINA QUE SEA UNA --- PRUEBA COSTOSA. EL REACTIVO PRINCIPAL PARA ESTAS TÉCNI- CAS ES EL ANTÍGENO DE RUBEÓLA.

PARA QUE UNA DETERMINACIÓN SEA MUY SEGURA, UNO DE LOS -- REQUISITOS PRINCIPALES ES QUE EL ANTÍGENO ESTE PURO.

DEBIDO A ÉSTO ES NECESARIO CONTAR CON TÉCNICAS PARA LA - OBTENCIÓN DE ANTÍGENO PURIFICADO, QUE PUEDA EN UN FUTURO DESPLAZAR LOS REACTIVOS DE IMPORTACIÓN. LO ANTERIOR PODRÍA OCASIONAR UNA DISMINUCIÓN EN EL COSTO DE LA PRUEBA, HACIÉNDOLA MÁS ACCESIBLE. LO QUE PERMITIRÍA INCLUIRSE-- COMO PRUEBA DE RUTINA EN ANÁLISIS PRENUCIALES Y/O PARA- MUJERES EN EDAD DE CONCEBIR.

EN EL SIGUIENTE TRABAJO SE PRETENDE OBTENER UN MÉTODO -- PARA LA PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO DE RUBEÓLA.

## HIPOTESIS

EL VIRUS DE RUBEÓLA PUEDE PURIFICARSE POR MÉTODOS DE ULTRA CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE DENSIDAD (SACAROSA Y PERCOLL).

## INTRODUCCION

### 1.1 IMPORTANCIA DE LA INFECCION DEL VIRUS DE RUBÉOLA

LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE RUBÉOLA (VR) ES GENERALMENTE BENIGNA. SIN EMBARGO EN MUJERES EMBARAZADAS -- PUEDE OCASIONAR PROBLEMAS CONGÉNITOS EN LOS CUALES EL FETO SUFRE DAÑO CUANDO EL VIRUS PASA A TRAVÉS DE LA PLACENTA, PRODUCIÉNDOSE ABORTOS, MORTINATOS O EL NACIMIENTO DE NIÑOS CON EL SÍNDROME DE RUBÉOLA CONGÉNITA (SRC).

### 1.2 SINTOMATOLOGIA CLINICA DE LA RUBÉOLA

LA INFECCIÓN POR VIRUS DE RUBÉOLA DURANTE LA INFANCIA O LA ETAPA ADULTA SE PRESENTA GENERALMENTE COMO UNA - ENFERMEDAD BENIGNA CARACTERIZADA POR LEVES SÍNTOMAS - RESPIRATORIOS SUPERIORES, UN RASH ERITEMATOSO Y LINFADENOPATÍA SUBOCCIPITAL. EN LOS ADULTOS JÓVENES, SIN EMBARGO LA ENFERMEDAD PUEDE COMPLICARSE CON ARTRALGIA O ARTRITIS TRANSITORIA, DESPUÉS DE LA ERUPCIÓN DESAPARECE. LAS COMPLICACIONES SEVERAS COMO ENCEFALITIS Y PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA SON RARAS (16) (19) (25) (28). LA INFECCIÓN DEL FETO DURANTE EL PRIMER TRIMESTRE DE EMBARAZO PUEDE PROVOCAR RUBÉOLA CONGÉNITA LO CUAL ES MENOS FRECUENTE EN EL SEGUNDO O TERCER TRIMESTRE. EL SRC SE CARACTERIZA POR: SORDERA NEUROSENSITIVA, ANOMALÍAS CARDIACAS, CATARATAS, PESO SUBNORMAL, LESIONES VISCERALES, RETARDO DEL CRECIMIENTO Y SÍNTOMAS ENCEFÁLICOS. ESTAS CARACTERÍSTICAS PUEDEN APARECER SOLAS -

O EN DIFERENTES COMBINACIONES. EL PERÍODO DE INCUBACIÓN DE LA RUBÉOLA AGUDA ES DE 14 A 21 DÍAS (22) (25) (28) (54).

### 1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO PARA LA INFECCIÓN POR RUBÉOLA.

EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR RUBÉOLA ES DIFÍCIL DE ESTABLECER EN BASE AL CUADRO CLÍNICO. LA ÚNICA MANERA DE ESTABLECER UN DIAGNÓSTICO SEGURO DE RUBÉOLA ES COMPROBÁNDOLO MEDIANTE PRUEBAS DE LABORATORIO.

LOS PRINCIPALES MÉTODOS UTILIZADOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR RUBÉOLA SON: NEUTRALIZACIÓN (N); FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC); HEMAGLUTINACIÓN (HA) E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IHA). EXISTEN OTRAS TÉCNICAS QUE SE HAN DESARROLLADO EN FORMA RECIENTE -- COMO: HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA (HI) Y AGLUTINACIÓN EN LATEX (AL); ENSAYO INMUNOENXIMÁTICO (ELISA); ENSAYO DE INMUNOFLUORESCENCIA (IFA); Y RADIO INMUNOENSAYO (RIA).

LA TÉCNICA DE HA SE BASA EN LA CAPACIDAD QUE TIENE EL VIRUS DE RUBÉOLA DE AGLUTINAR ERITROCITOS DE DIFERENTES ESPECIES ANIMALES. SI SE PONEN CANTIDADES CONSTANTES DE UNA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS CON DILUCIONES SERIADAS DEL VIRUS, EL TÍTULO ESTARÁ DADO POR LA MÁXIMA DILUCIÓN DONDE SE PRESENTE UNA AGLUTINACIÓN TOTAL - (11) (44).

LA IHA SE BASA EN LA CAPACIDAD DEL VIRUS DE RUBÉOLA DE AGLUTINAR ERITROCITOS DE CIERTAS ESPECIES ANIMALES. SI

EL SUERO DE UN PACIENTE CONTIENE ANTICUERPOS Y SE --  
MEZCLA CON EL VIRUS DE RUBÉOLA, LOS ANTICUERPOS BLO --  
QUEARÁN LA SUPERFICIE DEL VIRUS Y AL ADICIONAR LOS --  
ERITROCITOS LA AGLUTINACIÓN SE INHIBIRÁ. SE REALIZAN --  
DILUCIONES SERIADAS CON EL SUERO PARA DETERMINAR EL --  
TÍTULO DE ANTICUERPOS QUE ESTÁ DADO POR LA ÚLTIMA --  
DILUCIÓN QUE INHIBA LA HEMAGLUTINACIÓN (9) (11) (42).

EN EL ENSAYO DE AGLUTINACIÓN CON LÁTEX EL VIRUS DE --  
RUBÉOLA SE UNE PREVIAMENTE A PARTÍCULAS FINAS DE LÁ --  
TEX. CUANDO HAY ANTICUERPOS PRESENTES EN EL SUERO --  
ESTOS SE MEZCLAN CON LAS PARTÍCULAS Y LA AGLUTINACIÓN --  
SE HACE APARENTE EN FORMA DE GRANDES MASAS BLANCAS --  
(11) (42).

LA PRUEBA DE ELISA CONSISTE EN UNIR EL VIRUS DE RUBÉO --  
LA A UNA SUPERFICIE (MICROPLACAS DE PLÁSTICO O PEQUE --  
ÑOS CUERPOS GLOBULARES DE LA MISMA NATURALEZA). EL --  
SUERO DEL PACIENTE SE ADICIONA Y SI HAY ANTICUERPOS, --  
ÉSTOS SE UNEN AL VIRUS. EN SEGUIDA SE ADICIONAN ANTI --  
INMUNOGLOBULINAS HUMANAS, OBTENIDAS EN UN ANIMAL DE --  
LABORATORIO, ESTOS ANTICUERPOS PREVIAMENTE SE HAN CON --  
JUGADO CON UNA ENZIMA, AL AGREGARSE SE UNEN AL PRIMER --  
ANTICUERPO. FINALMENTE AL ADICIONAR UN SUSTRATO APRO --  
PIADO, LA ENZIMA ACTUARÁ SOBRE ÉSTE, TRANSFORMÁNDOLO --  
Y DESARROLLANDO UNA REACCIÓN COLORIDA, LA CUAL PUEDE --  
SER PERCIBIDA A SIMPLE VISTA Y CUANTIFICADA MEDIANTE --  
ESPECTOFOTOMETRÍA, DEBIDO A QUE LA CONCENTRACIÓN DEL --  
PRODUCTO PRESENTA UNA RELACIÓN DIRECTAMENTE PROPORCIO --  
NAL A LA UNIÓN DEL COMPLEJO ANTÍGENO-ANTICUERPO (42) --  
(53).

DE LAS PRUEBAS ANTES MENCIONADAS LA IHA ES LA MÁS -- UTILIZADA POR LA MAYORÍA DE LOS LABORATORIOS, SIN EMBARGO PRESENTA CIERTOS INCONVENIENTES COMO SON: ERRORES POR DILUCIÓN; TRATAMIENTO DE LOS SUEROS PARA RETI RAR INHIBIDORES NO ESPECÍFICOS; SE REQUIERE DE ALTAS- CONCENTRACIONES DE ANTÍGENO; ALGUNOS REACTIVOS EMPLEA DOS SON PERECEDEROS; DEBIDO AL TIPO DE REACTIVOS UTILIZADOS LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN DIFERENTES LABORA TORIOS SON DIFÍCILES DE COMPARAR (26) (44) (46).

POR OTRO LADO, LAS TÉCNICAS DE ELISA Y AL SON MÁS SEN SIBLES Y REPRODUCIBLES, SIN EMBARGO PARA REALIZARLAS- ES INDISPENSABLE CONTAR CON UN ANTÍGENO CONCENTRADO Y PURO.

#### 1.4 PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DEL VIRUS DE RUBEOLA.

EL VIRUS DE RUBÉOLA SE HA CLASIFICADO COMO MIEMBRO DE LA FAMILIA TOGAVIRIDAE, PERO LOS ESTUDIOS SOBRE SU -- ÁCIDO RIBONUCLEICO Y SUS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES LO - HAN DIFERENCIADO DE TODOS LOS DEMÁS MIEMBROS DE ESTA- FAMILIA DE LOS TOGAVIRUS, (25) (31). ES EL ÚNICO -- MIEMBRO DEL GÉNERO RUBIVIRUS, HASTA LA FECHA SÓLO SE CONOCE UN SEROTIPO DE ESTE VIRUS POR ANTICUERPOS POLI CLONALES, POSIBLEMENTE AL UTILIZAR ANTICUERPOS MONO-- CLONALES SE ENCUENTRE DIFERENCIA ENTRE LAS CEPAS VIRA LES.

EL VIRUS CONTIENE UNA MOLÉCULA DE RNA DE CADENA ÚNICA LINEAL DE 38 A 40 S. ESTE COEFICIENTE DE SEDIMENTA - CIÓN SUGIERE UN PESO MOLECULAR DE  $3.4 \times 10^6$  DALTONES,

6.

QUE ES CONSIDERABLEMENTE MENOR QUE EL RNA DE LOS PARA  
MOXOVIRUS Y DE LOS TOGAVIRUS (9) (25).

EL VIRUS DE RUBÉOLA SE INACTIVA RÁPIDAMENTE POR EL --  
ETER, CLOROFORMO Y EL DESOXICOLATO SÓDICO, AUNQUE EL  
VIRUS ES RELATIVAMENTE LÁBIL A 4°C, SU ESTABILIDAD --  
AUMENTA CONSIDERABLEMENTE DE -60° A -70°C, ALGUNAS -  
CARACTERÍSTICAS DEL VIRUS DE RUBÉOLA SE MUESTRAN EN -  
LA TABLA 1.1.

EL VIRUS DE RUBÉOLA ESTÁ COMPUESTO DE TRES PROTEÍNAS-  
E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> Y C CON PESOS MOLECULARES APARENTES DE 60K, --  
47K Y 33K RESPECTIVAMENTE. DOS DE ESTAS PROTEÍNAS E<sub>1</sub>  
Y E<sub>2</sub> SON GLUCOPROTEÍNAS DE MEMBRANA, MIENTRAS QUE C -  
ES UNA PROTEÍNA NO GLUCOSILADA RELACIONADA CON EL RNA  
INFECCIOSO, POR LO QUE ES UNA NUCLEOPROTEÍNA (29) (47)  
(51) (54).

LA PROTEÍNA E<sub>1</sub> ES LA MOLÉCULA MÁS GRANDE DE LAS DOS -  
GLUCOPROTEÍNAS A LA CUAL SE LE ASOCIA LA FUNCIÓN HEMA  
GLUTINANTE DEL VIRUS (29) (47) (51). EL ESQUEMA DEL-  
VIRUS SE PRESENTA EN LA FIGURA 1.1.



FIGURA 1.1

7.

LA HEMAGLUTININA CONSTITUYE UN COMPONENTE BÁSICO DEL VIRUS Y PERMANECE BIOLÓGICAMENTE ACTIVA DESPUÉS DE LA DISGREGACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL.

TABLA 1.1.

CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS DEL VIRUS DE RUBEOLA.

MORFOLOGIA	ESFÉRICO, CON UNA O MÁS PROTUBERANCIAS
TAMANO	60 A 70 NM DE DIÁMETRO
ACIDO NUCLEICO	RNA, CADENA SIMPLE CON UN PESO MOLECULAR DE $3,5 \times 10^6$ DALTONES.
ENVOLTURA	TIENE ENVOLTURA LIPÍDICA ADQUIRIDA AL PASAR A TRAVÉS DE LA MEMBRANA DE LA - CÉLULA HUÉSPED.
COEFICIENTE DE SEDIMENTACION	280 S
DENSIDAD DE FLOTACION	1.18 - 120 G/ML EN SACAROSA 1.25 G/ML EN CSCL.
RADIACION ULTRAVIOLETA	DESTRUYE INFECTIVIDAD
DISOLVENTES LIPÍDICOS	DESTRUYE INFECTIVIDAD
TRIPSINA	DESTRUYE INFECTIVIDAD
ESTABILIDAD DE PH	6.8 - 8.1 ESTABLE 5.9 ESTABILIDAD MENOR 2.0 INACTIVACIÓN COMPLETA
TEMPERATURA	SE INACTIVA CON 30 MIN. A 56° C ES ESTABLE 7 DÍAS A 4°C Y POR AÑOS A - 60° C.

### 1.5 MÉTODOS PARA CONCENTRAR Y PURIFICAR VIRUS

LOS VIRUS PROPAGADOS EN CULTIVOS CELULARES PRESENTAN MENOS PROBLEMAS DE PURIFICACIÓN EN COMPARACIÓN A LA PURIFICACIÓN A PARTIR DE SECRESIONES BIOLÓGICAS YA QUE SE TIENE UNA MENOR CONCENTRACIÓN DE RESTOS CELULARES Y PROTEÍNAS.

CADA VIRUS PRESENTA PROBLEMAS ESPECÍFICOS PARA SU CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN, ESTO SE SOLUCIONA CON LA COMBINACIÓN DE CENTRIFUGACIÓN, ULTRACENTRIFUGACIÓN, PRECIPITACIÓN, ULTRAFILTRACIÓN Y CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (32) (48).

PARA PODER INICIAR LA CONCENTRACIÓN VIRAL ES NECESARIO REALIZAR ANTES UNA CLARIFICACIÓN DE LA COSECHA VIRAL POR CENTRIFUGACIÓN A BAJAS VELOCIDADES CON LA FINALIDAD DE ELIMINAR LOS RESTOS CELULARES Y AGREGADOS PROTEÍNICOS (41).

### 1.6 MÉTODOS DE CONCENTRACION

LA CONCENTRACIÓN ES UNA DE LAS FASES MÁS IMPORTANTES DE LA PURIFICACIÓN DE VIRUS, YA QUE SE OBTIENEN LAS CANTIDADES REQUERIDAS DE VIRUS EN UN PEQUEÑO VOLUMEN EL CUAL DEBE SER SUFICIENTE PARA LLEVAR A CABO LA PURIFICACIÓN. DEBIDO A QUE LOS VIRUS SON PARTÍCULAS MUY PEQUEÑAS (GENERALMENTE MENORES DE 100 NM) LA CANTIDAD DE VIRUS QUE SE REQUIEREN PARA OBTENER MICROGRAMOS DE PROTEÍNA ES MUY ALTO.

ES MUY IMPORTANTE TENER EN CUENTA QUE LA MAYORÍA DE LOS VIRUS SON TERMOLÁBILES Y PIERDEN SUS PROPIEDADES BIOLÓGICAS RÁPIDAMENTE SI NO SE MANTIENE EN REFRIGERACIÓN. - TAN PRONTO COMO EL LÍQUIDO INFECTADO SE OB- TIENE ES IMPORTANTE REFRIGERARLO A 4°C PARA CONSERVARLO POR PERÍODOS CORTOS O CONGELARLO A -20°C Ó A -70°C SI - SE REQUIEREN PERÍODOS DE CONSERVACIÓN MÁS LARGOS.

LOS MÉTODOS MÁS UTILIZADOS EN LA CONCENTRACIÓN DE VIRUS SON: HIDROEXTRACCIÓN; FILTRACION MOLECULAR; PRECIPITA-- CION Y PRECIPITACION DIFERENCIAL (ULTRACENTRIFUGACION).

1.6.1 LA HIDROEXTRACCIÓN ES UN MÉTODO MUY SIMPLE PARA CONCENTRAR VIRUS, SE BASA EN LA EXTRACCIÓN DE AGUA Y MICROSO- LUTOS DEL CULTIVO CELULAR, CUANDO ÉSTE SE COLOCA EN UNA BOLSA DE DIÁLISIS (MEMBRANA POROSA DE CELULOSA) LA --- CUAL ESTÁ CUBIERTA POR UN COMPUESTO DE ALTO PESO MOLECU- LAR (32) (45) (52). EL MÉTODO ES APLICABLE A VOLUMENES MENORES DE UN LITRO Y PARA VIRUS QUE SON MUY RESISTEN - TES, PUES ESTE ES UN PROCESO LENTO QUE PUEDE TARDARSE - HASTA 24 HORAS.

LOS MATERIALES DE HIDROEXTRACCIÓN DEBEN SER HIGROSCÓPI- COS Y TENER UN PM SUFICIENTEMENTE ALTO PARA PREVENIR -- LA MIGRACIÓN DEL MATERIAL QUE HA SIDO EXTRAÍDO.

GENERALMENTE SE UTILIZA LA FORMA POLIMÉRICA DEL POLIETI- LENGLICOL: CARBOWAX 20,000. ES UN MATERIAL BARATO, -- MUY HIGROSCÓPICO Y NO AFECTA A LA MAYORÍA DE LOS VIRUS.

1.6.2 FILTRACION MOLECULAR: DURANTE LA FILTRACION MOLECULAR (ULTRACENTRIFUGACION) LAS MOLECULAS SON SEPARADAS DE ACUERDO A SU TAMAÑO. LAS MOLECULAS Y PARTICULAS SUSPENDIDAS SON ATRAPADAS POR LA MEMBRANA, LA CUAL TIENE POROS QUE PUEDEN RETENERLAS DEBIDO A QUE TIENEN UN DIÁMETRO MENOR QUE ESAS MOLECULAS Y PARTICULAS. ESTAS MEMBRANAS TIENEN POROS GENERALMENTE MENORES A LOS 10 NM. LOS VIRUS TIENEN UN PESO MOLECULAR ALTO Y UN DIÁMETRO SUPERIOR A 10 NM DEBIDO A ESTO NO PUEDEN PASAR A TRAVÉS DE LA MEMBRANA (32) (35).

EXISTEN DIVERSOS FABRICANTES QUE PRODUCEN MEMBRANAS DE ULTRAFILTRACION Y APARATOS ADECUADOS PARA LA CONCENTRACION DE VIRUS, ENTRE ESTOS PUEDEN MENCIONARSE: LOS FABRICADOS POR LA CASA AMICON QUE SON: AGITADOR CELULAR; SISTEMAS DE CANALES DELGADOS; SISTEMAS DE FIBRAS HUECAS Y MEMBRANAS. LOS FABRICADOS POR LA CASA MILLIPORE QUE SON: SISTEMAS DE FLUJO TANGENCIAL Y MEMBRANAS (32).

1.6.3 PRECIPITACION: ESTA SE BASA EN LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS VIRUS YA QUE ES POSIBLE CAMBIAR LA CARGA DE SU SUPERFICIE E INDUCIR UNA PRECIPITACION (32) - (52). PARA ESTA GENERALMENTE SE UTILIZA EL POLIETILEN GLICOL (PEG) Y EL SULFATO DE AMONIO.

A) EL MÉTODO PARA PRECIPITACION CON PEG DEBE SER ADAPTADO PARA CADA VIRUS PORQUE PRESENTAN DIFERENCIAS EN LAS CARGAS DE SU SUPERFICIE (40).

EL PEG PUEDE OBTENERSE EN DIFERENTES FORMAS POLIMERIZADAS, EL QUE TIENE UN PM DE 6,000 A 8,000 ES --

ADECUADO PARA LA PRECIPITACIÓN DE VIRUS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS.

LA MEZCLA DEL PEG Y LA COSECHA VIRAL SE DEJA REPOSAR DE 4 A 8 HORAS A 4°C, ÉSTO PERMITE LA FORMACIÓN DE PUENTES INTERPOLARES ENTRE LAS PROTEÍNAS VIRALES OCACIONANDO UNA PRECIPITACIÓN (32).

- B) EL SULFATO DE AMONIO SE UTILIZA PARA LA CONCENTRACIÓN DE VIRUS. ES EFICAZ PARA CONCENTRAR -- VOLUMENES PEQUEÑOS O GRANDES DE COSECHA VIRAL. -- LA MAYORÍA DE LOS VIRUS SE PRECIPITAN EN PRESENCIA DE UNA SOLUCIÓN DE SULFATO DE AMONIO AL --- 40%, DEBIDO A QUE EN ALTAS CONCENTRACIONES DE SALES LA MAYORÍA DE LAS PROTEÍNAS SE PRECIPITAN EN SOLUCIONES ACUOSAS. AL AGREGAR ALTAS CONCENTRACIONES DE SALES DISMINUYEN LAS ACTIVIDADES -- DE LAS MOLECULAS DEL AGUA, DEBIDO A QUE LA SAL-INTERACCIONA CON EL AGUA E IMPIDE LA UNIÓN DE -- ÉSTA CON LOS GRUPOS HIDROFÍLICOS ENTRE LAS MOLECULAS DE PROTEÍNA COLINDANTES HASTA OCACIONAR -- SU PRECIPITACIÓN, (6) (52).

- 1.6.4 PRECIPITACION DIFERENCIAL (CONCENTRACION POR ULTRACENTRIFUGACION): ES LA FORMA MÁS SIMPLE DE CENTRIFUGACIÓN; UN TUBO DE CENTRÍFUGA SE LLENA CON UNA MUESTRA -- UNIFORME DE VIRUS EN SUSPENSIÓN Y SE INICIA LA CENTRIFUGACIÓN A UNA VELOCIDAD Y TIEMPO PREDETERMINADOS DE -- PENDIENDO DEL COEFICIENTE DEL VIRUS. DE ESTA MANERA -- SE OBTIENEN DOS FRACCIONES: UN SEDIMENTO Y UN SOBRENADANTE CON EL MATERIAL QUE SE MANTIENE EN SUSPENSIÓN.

## 1.7 PURIFICACION DEL VIRUS

LA ULTRACENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD SE HA MANTENIDO COMO LA METODOLOGÍA MÁS UTILIZADA PARA OBTENER VIRUS PURO (32). ESTA METODOLOGÍA SIRVE PARA VARIOS PROPÓSITOS: CONCENTRAR, PURIFICAR PARTÍCULAS, ANALIZAR PARÁMETROS FÍSICOS COMO CONSTANTE DE SEDIMENTACIÓN ( $S_{20w}$ ) Y MEDIR DENSIDAD.

LA SEPARACIÓN POR ULTRACENTRIFUGACIÓN SE LOGRA COLOCANDO UNA MUESTRA EN UN TUBO Y SOMETIÉNDOLO A UN CAMPO GRAVITACIONAL MUY ALTO, DONDE CADA PARTÍCULA SEDIMENTARÁ A UNA VELOCIDAD QUE ES PROPORCIONAL A LA FUERZA APLICADA; SIGUIENDO LA LEY DE STOKES: A UNA FUERZA CENTRÍFUGA Y VISCOSIDAD DADA, EL ÍNDICE DE SEDIMENTACIÓN ES PROPORCIONAL AL PM DE LA PARTÍCULA Y A LA DIFERENCIA DE LAS DENSIDADES ENTRE LA PARTÍCULA Y LA SOLUCIÓN.

1.7.1 ULTRACENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DENSIDAD: LA CENTRIFUGACIÓN DIFERENCIAL ES UNA FORMA MUY LIMITADA PARA LA PURIFICACIÓN DE VIRUS, DEBIDO A QUE TODAS LAS PARTÍCULAS CON COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN SIMILAR SEDIMENTAN JUNTAS, EN BASE A LO ANTERIOR BRAKE (2) (3) (4) INTRODUCIÓ UN MÉTODO MEJOR: LA ULTRACENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD. ESTE MÉTODO HA LLEGADO A SER UNA DE LAS HERRAMIENTAS MÁS PODEROSAS PARA LA PURIFICACIÓN DE VIRUS. SE BASA EN COLOCAR UNA SUSPENSIÓN DE VIRUS EN UNA COLUMNA DE LÍQUIDO QUE TIENE UNA DENSIDAD MAYOR QUE LA DEL VIRUS AL CENTRIFUGAR, EL VIRUS MIGRA DE ACUERDO CON SU TAMAÑO ( $S_{20w}$ ), HASTA QUE ALCANZA UNA DENSIDAD IGUAL A LA SUYA EN LA COLUMNA DEL LÍQUIDO ÉSTE SE SEDIMENTA AL FONDO DEL TUBO (32). EXIS

TEN CUATRO ASPECTOS MUY IMPORTANTES PARA LA ULTRACENTRIFUGACIÓN POR GRADIENTE DE DENSIDAD: TIPO DE VIRUS, EL MEDIO EN EL QUE SE VA A CENTRIFUGAR, LOS ROTORES Y LOS TIPOS DE GRADIENTES.

- 1.7.2 TIPO DE VIRUS: LOS VIRUS ESTÁN COMPUESTOS ESENCIALMENTE DE MATERIAL GENÉTICO (DNA O RNA) ENVUELTOS EN UNA CUBIERTA DE PROTEÍNAS; LA CÁPSIDE. ADEMÁS UNA GRAN CANTIDAD DE VIRUS, TAMBIÉN POSEEN UNA ENVOLTURA QUE ES DERIVADA DE LA MEMBRANA CELULAR DEL HUÉSPED. LA PRESENCIA DE ESTA ENVOLTURA AFECTA SUS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DURANTE LA ULTRACENTRIFUGACIÓN.

SE CONSIDERAN DOS TIPOS DE PARTÍCULAS VIRALES PARA LA SEPARACIÓN: ENVUELTOS Y DESNUDOS: LOS VIRUS ENVUELTOS SE HAN REPORTADO DENTRO DE UNA DENSIDAD DE 1.18 A 1.25 G/ML, MIENTRAS QUE LOS VIRUS DESNUDOS TIENEN DENSIDADES MAYORES A ÉSTOS: 1.28 A 1.60 G/ML.

- 1.7.3 EL MATERIAL UTILIZADO PARA GRADIENTES: ESTE DEBE CUMPLIR CON CIERTAS CARACTERÍSTICAS: (13) (15).
- CUBRIR UN INTERVALO DE DENSIDAD NECESARIO PARA PODER SEPARAR LA PARTÍCULA VIRAL DE OTRAS PARTÍCULAS.
  - FORMAR SOLUCIONES DE BAJA FUERZA IÓNICA, CON BAJA VISCOSIDAD E ISOSMÓTICAS, DE ESTA MANERA NO SE DAÑA AL VIRUS.
  - NO AFECTAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS VIRUS (INFECTIVIDAD, ACTIVIDAD HEMAGLUTINANTE O ENZIMÁTICA).

- SU CONCENTRACIÓN DEBE SER FÁCIL DE MEDIAR (ÍNDICE DE REFRACCIÓN).
- ELIMINARSE FACILMENTE DE LAS FRACCIONES QUE CONTENGAN VIRUS (DIÁLISIS, ULTRAFILTRACIÓN, CENTRIFUGACIÓN).
- NO INTERFERIR CON EL ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DE LAS FRACCIONES VIRALES (ABSORBANCIA, U.V. O VISIBLE, - CONTEO DE RADIOACTIVIDAD, DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS).
- DEBEN SER DE USO SEGURO (NO FLAMABLES, NO TÓXICO, - NI CORROSIVO).

1.7.4 MEDIO DE CENTRIFUGACIÓN: ESENCIALMENTE HAY CUATRO - TIPOS DE MATERIALES PARA GRADIENTES:

- A) SALES INORGANICAS (CLORURO DE CESIO)
  - B) MOLECULAS ORGANICAS (SACAROSA)
  - C) COMPUESTOS AROMATICOS YODADOS (METRIZAMIDA)
  - D) SILICA COLOIDAL (PERCOLL)
- A) SALES INORGANICAS: EL CLORURO DE CESIO ES UNA SAL MUY SOLUBLE QUE PERMITE LA PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON DENSIDADES HASTA DE 1.91 G/ML DE TAL FORMA QUE CUALQUIER PARTÍCULA VIRAL PUEDE SER SEPARADA - EN ESTE MEDIO. EL GRADO ÓPTICO DEL CLORURO DE CESIO NO ABSORBE LA LUZ ULTRAVIOLETA, LO QUE PERMITE LA MEDICIÓN DE LAS FRACCIONES DEL GRADIENTE POR -- ESPECTROFOTOMETRÍA DIRECTA. SUS DESVENTAJAS SON - SU ALTA FUERZA IÓNICA Y SU ELEVADA OSMOLALIDAD QUE LO HACEN INCOMPATIBLE PARA LA PURIFICACIÓN DE VIRUS LÁBILES.

EL TRIFLUOROACETATO DE CESIO (CSTFA) HA SIDO RE --  
CIENTEMENTE INTRODUCIDO PARA LA PREPARACIÓN DE GRA  
DIENTES.

- B) MOLECULAS ORGANICAS: LA SACAROSA ES EL COMPUESTO -  
MÁS AMPLIAMENTE UTILIZADO EN LA CENTRIFUGACIÓN POR  
GRADIENTES DE DENSIDAD PARA VIRUS. PUEDE FORMAR -  
GRADIENTES ESTABLES A DENSIDADES HASTA DE 1.3 G/ML  
QUE SON SUFICIENTES PARA LOGRAR QUE EL VIRUS QUE-  
DE EN UNA SOLA BANDA.

LA DENSIDAD DE LA SACAROSA SE MIDE POR REFRACTOME-  
TRÍA (DENSIDAD A 20°C= 2.732 N - 2.6425) (35). SE  
DIALISA FÁCILMENTE PARA RECUPERAR EL VIRUS LIBRE -  
DE SACAROSA. DEBIDO A SU ALTA OSMOLALIDAD Y VISCO  
CIDAD, LA SACAROSA PUEDE DAÑAR A LOS VIRUS LÁBILES.  
ADEMÁS INTERFIERE CON ALGUNAS PRUEBAS PARA MEDIR -  
RNA, DNA Y PROTEÍNAS, PERO NO INTERFIERE PARA DE -  
TERMINAR SU INFECTIVIDAD, HEMAGLUTINACIÓN O ENSA -  
YOS DE RADIOACTIVIDAD (4).

EL FICOLL UN POLÍMERO DE LA GLUCOSA DE ALTO PESO -  
MOLECULAR (400,000), HA REEMPLAZADO VENTAJOSAMENTE  
A LA SACAROSA DEBIDO A SU BAJA OSMOLALIDAD (38).--  
SIN EMBARGO LA PRESIÓN OSMÓTICA AÚN ES DE MÁS DE -  
2,000 M<sub>OSM</sub> A UNA DENSIDAD DE 1.2 G/ML Y SU VISCOCI  
DAD ES MUY ALTA. LA DENSIDAD ES MEDIDA POR REFRA  
C TOMETRÍA. TIENE COMO DESVENTAJ. SU GRAN PM QUE --  
EVITA SU SEPARACIÓN DE LAS FRACCIONES VIRALES POR-  
DIÁLISIS O ULTRAFILTRACIÓN, SIN EMBARGO LA CROMATO  
GRAFÍA EN SEFAROSA O SEFACRIL PUEDE SER UTILIZADA-  
VENTAJOSAMENTE. EL FICOLL TAMBIÉN SUFRE EL MISMO-  
PROBLEMA QUE LA SACAROSA EN DIFERENTES ENSAYOS Y -  
SU USO POR LO CONSIGUIENTE ES MUY LIMITADO.

- c) COMPUESTOS AROMATICOS YODADOS : Los derivados hidrofílicos de ácido triyodobenzóico se han utilizado ventajosamente en la ultracentrifugación de virus. En forma de sal, como el metrizoato de sodio (renografin) o como compuestos no iónicos - por ejemplo metrizamida (nicodenz) (35), estos -- productos forman soluciones estables a densidades hasta de 1.45 g/ml suficientes para separar virus envueltos y desnudos. Estas soluciones son menos viscosas que las soluciones equivalentes de sacarina o ficoll.
- d) SILICA COLOIDAL: Este es un nuevo medio para gradientes de densidad, llamado comercialmente percoll (33). El percoll consiste de partículas de sílica coloidal de 17 a 30 nm de diámetro, cubiertas con polivinilpirrolidona y mezcladas con solución salina amortiguada. Con el percoll es posible preparar soluciones con una densidad máxima de 1.2 g/ml a un pH fisiológico de 7, una osmolaridad de 280 mOsm y con una carga de superficie - muy baja.

EL PERCOLL TIENE MUCHAS VENTAJAS ENTRE LAS QUE SE PUEDEN MENCIONAR (32):

- 1) SU BAJA VISCOSIDAD FACILITA EL RÁPIDO BANDEO - ISOPÍCNICO DE LOS VIRUS, O PARTÍCULAS CON UN COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN MAYOR QUE 60 S EN UN GRADIENTE SIGMOIDEO.

- 2) ES ISOOSMÓTICO
- 3) TIENE LA PROPIEDAD DE AUTOGENERAR GRADIENTES EN UN TIEMPO MUY CORTO (10 A 30 MINUTOS).

EL GRADIENTE SIGMOIDEO PUEDE UTILIZARSE PARA SEPARAR PARTÍCULAS CON DENSIDADES CERCANAS. SIN EMBARGO LOS GRADIENTES AUTOGENERADOS SON METAESTABLES DEBIDO A LA CONTÍNUA SEDIMENTACIÓN DE LAS PARTÍCULAS DE SÍLICA. PARA LOS GRADIENTES DE PERCOLL GENERALMENTE SE UTILIZAN ROTORES DE CABEZA ANGULAR AUNQUE TAMBIÉN -- PUEDEN UTILIZARSE LOS ROTORES VERTICALES.

EL PERCOLL SE HA UTILIZADO CON ÉXITO PARA LA PURIFICACIÓN DE VIRUS Y SU ISOOSMOLARIDAD Y CARENCIA DE TOXICIDAD LO HACEN SER UN MEDIO DE ELECCIÓN PARA LA -- PURIFICACIÓN DE VIRUS ENVUELTOS LÁBILES (33) (37) -- (43) (50).

LA MAYORÍA DE LOS VIRUS TIENEN DENSIDAD MENOR EN -- PERCOLL QUE EN OTRO MEDIO; LOS VIRUS ENVUELTOS SEDI-MENTAN A UNA DENSIDAD DE 1.05 A 1.1 G/ML MIENTRAS -- QUE LOS VIRUS DESNUDOS SE LOCALIZAN A UNA  $\rho = 1.1$ . -- LAS DENSIDADES PUEDEN MEDIRSE UTILIZANDO ESFERAS MAR-CADORAS PARA CALIBRAR EL GRADIENTE.

LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PUEDE REALIZARSE EN -- FRACCIONES DE GRADIENTE DE PERCOLL UTILIZANDO EL --- REACTIVO DE FOLIN CIOCALTAU (20 EL MÉTODO DE AZUL DE COOMASSIE (1). LA MAYOR PARTE DE LA ACTIVIDAD BIOLÓ-GICA COMO LA HEMAGLUTINACIÓN, INFECTIVIDAD O ACTIVI-DAD ENZIMÁTICA PUEDE EVALUARSE SIN LA INTERFERENCIA-DEL PERCOLL.

1.7.5 TECNICAS DE SEPARACION EN LA ULTRACENTRIFUGACION PREPARATIVA: LAS PARTICULAS DE VIRUS SON SEPARADAS EN GRADIENTES DE DENSIDAD DE ACUERDO A DOS CARACTERISTICAS FÍSICAS (50).

- SU ÍNDICE DE SEDIMENTACIÓN (UNIDAD SVEDBERG) Y
- SU NIVEL DE DENSIDAD.

UNA SEPARACIÓN BASADA EN LA VELOCIDAD DE SEDIMENTACIÓN ES UNA CENTRIFUGACIÓN ZONAL, MIENTRAS QUE EN UNA SEPARACIÓN BASADA EN LA DENSIDAD DE FLOTACIÓN ES DENOMINADA CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA. COMBINADAS EN FORMA SECUENCIADA, ESTOS METODOS PERMITEN UNA PURIFICACIÓN SATISFACTORIA DE LA MAYORÍA DE LOS VIRUS.

- A) ÍNDICE ZONAL: AL CENTRIFUGAR EN UN GRADIENTE LAS PARTÍCULAS VIRALES SE MUEVEN DE ACUERDO A SU ÍNDICE DE SEDIMENTACIÓN EN UNA ZONA DE DISTINTAS BANDAS. PARA OBTENER UNA BUENA SEPARACIÓN POR ÍNDICE DE CENTRIFUGACIÓN ZONAL SE REQUIEREN DOS CONDICIONES: LA DENSIDAD DE LAS PARTÍCULAS POR SEPARAR DEBE SER MAYOR QUE LA DENSIDAD MÁXIMA DEL GRADIENTE Y LA CENTRIFUGACIÓN DEBE DETENERSE ANTES DE QUE EL VIRUS ALCANCE EL FONDO DEL TUBO. PARA ESTE TIPO DE CENTRIFUGACIÓN, SE PREFIEREN LOS ROTORES HORIZONTALES.
- B) ISOPÍCNICA: EN LA CENTRIFUGACIÓN ISOPÍCNICA, LA DENSIDAD MÁXIMA DEL GRADIENTE ES MAYOR QUE LA DE LA PARTICULA VIRAL QUE SE VA A SEPARAR, PERMITIENDO EL BANDEO DE LA PARTÍCULA. LA MUESTRA PUEDE SER APLICADA TANTO EN LA SUPERFICIE DEL GRADIENTE

PREFORMADO O MEZCLADA CON ALGÚN MATERIAL DEL GRADIENTE CUANDO ES AUTOGENERADO. LOS ROTORES DE ÁNGULO FIJO Y LOS HORIZONTALES SON APROPIADOS PARA ÉSTE TIPO DE GRADIENTE.

1.7.6 TIPOS DE GRADIENTES: PARA LA SEPARACIÓN VIRAL, SON UTILIZADOS DOS TIPOS DE GRADIENTES; CONTINUOS Y DISCONTINUOS (GRADIENTES EN PARTES). EL GRADIENTE CONTINUO SE PREPARA UTILIZANDO UN APARATO FORMADOR DE GRADIENTE O COLOCANDO MANUALMENTE CONCENTRACIONES DIFERENTES DEL MEDIO DE CENTRIFUGACIÓN EN UN TUBO, PERMITIENDO QUE SE DIFUNDAN HASTA ALCANZAR LA LINEARIDAD. SOLUCIONES DE CLORURO DE CESIO, NYCODENZ Y PERCOLL AL CENTRIFUGARSE AUTOGENERAN UN GRADIENTE. LOS GRADIENTES CONTINUOS SON MÁS UTILIZADOS Y PERMITEN UNA MAYOR SEPARACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES.

LOS GRADIENTES DISCONTINUOS O EN PARTES SE PREPARAN MANUALMENTE FORMANDO BANDAS EN UN TUBO, CON LA CONCENTRACIÓN DESEADA DEL MATERIAL DEL GRADIENTE. ESTOS GRADIENTES SE UTILIZAN PARA LA SEPARACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE PARTÍCULAS VIRALES.

CUANDO SE REALIZA UN GRADIENTE DISCONTINUO 50% Y 30% DE SACAROSA LA CAPA DE SACAROSA AL 30% SIRVE COMO UNA BARRERA SELECTIVA PERMITIENDO SOLAMENTE EL PASO DE PARTICULAS CON UN ALTO ÍNDICE DE SEDIMENTACIÓN, MIENTRAS QUE LAS OTRAS SON DETENIDAS POR LA VISCOSIDAD Y LA DENSIDAD. LA SACAROSA AL 50% SIRVE COMO UN COLCHÓN PARA EVITAR QUE EL VIRUS SE PRECIPITE HASTA EL FONDO. EN LA INTERFASE ENTRE LAS DOS SOLUCIONES DE SACAROSA SE CREA UN GRADIENTE INTERMEDIO DURANTE LA CENTRIFUGACIÓN, AL MISMO TIEMPO EN ESTE SITIO EL VIRUS ALCANZA SU DENSIDAD ISOPÍCNICA (42 A 45%).

1.7.7 TIPOS DE ROTORES DISPONIBLES: EXISTEN BÁSICAMENTE - TRES TIPOS DE ROTORES:

- DE ÁNGULO FIJO Y VERTICALES
- ROTORES HORIZONTALES (DE CAMISA PENDIENTE)
- ROTORES ZONALES.

1.7.8 PARAMETROS UTILES PARA ULTRACENTRIFUGACION:

COEFICIENTE DE SEDIMENTACION: EL ÍNDICE DE SEDIMENTACIÓN DE PARTÍCULAS EN ULTRACENTRIFUGACIÓN SE EXPRESA EN UNIDADES SVEDBERG QUE AL MEDIRSE EN AGUA A 20°C SE ABRE VIA COMO  $S_{20w}$ . COMO SU VALOR EN SEGUNDOS ES DEMASIADO PEQUEÑO PARA PARTÍCULAS VIRALES, POR CONVENSIÓN SE MULTIPLICA POR 1,000. EI COEFICIENTE DE SEDIMENTACIÓN DE UNA PARTÍCULA ES PROPORCIONAL A SU MASA, ESTE VALOR ES ÚTIL PARA LA PREDICCIÓN DEL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN -- Y PARA LA SELECCIÓN DEL ROTOR.

DENSIDAD: LA DENSIDAD DE UNA PARTÍCULA VIRAL SE REFIERE A LA RELACIÓN ENTRE LA MASA DE SU VOLUMEN Y LA MASA DEL MISMO VOLUMEN DE AGUA A 4°C Y SE EXPRESA EN GRAMOS-POR MILILITRO (G/ML). PARA EL CASO DE LOS VIRUS ESTE VALOR ES IMPORTANTE EN LA SELECCIÓN DEL MEDIO PARA EL GRADIENTE.

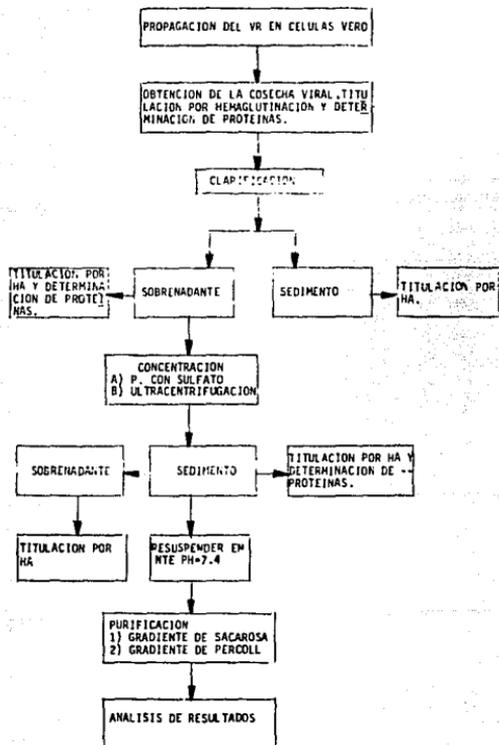
1.7.9 FRACCIONAMIENTO DE GRADIENTES

LA RECUPERACIÓN DE VIRUS DE GRADIENTES DESPUÉS DE LA CENTRIFUGACIÓN SE REALIZA MANUAL O AUTOMÁTICAMENTE. -- PARA COLECTAR LAS FRACCIONES DE FORMA MANUAL EL TUBO SE PUNCIONA CON UNA AGUJA EN EL FONDO Y LAS FRACCIONES SE COLECTAN GOTA A GOTA. ESTE FRACCIONAMIENTO DE LOS-

21.

GRADIENTES ES SATISFACTORIO PARA LA MAYOR PARTE DEL -  
TRABAJO PREPARATIVO. SI SE REQUIERE UNA MAYOR PRECI-  
SIÓN PARA EL TRABAJO ANALÍTICO, HAY DISPONIBLE UN MONI-  
TOREO VOLUMETRICO O RECOLECTOR DE FLUJO PARA LA COLEC-  
CIÓN AUTOMÁTICA.

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## MATERIAL Y METODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

VIRUS DE RUBEOLA: CEPA THERIEN (VRT), DONADA POR EL M.D. OLLI MEURMAN DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE - TURKU, FINLANDIA. ESTA CEPA FUE RECIBIDA EN DOS BOTELLAS FALCON DE 60 ML CON CÉLULAS VERO (FIBROBLASTOS DE MONO VERDE - AFRICANO), INFECTADAS. EL MEDIO DE MANTENIMIENTO FUE MEDIO-BASAL (BME), 0.2% DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (ASB) Y 5% DE -- FOSFATO DE TRIPTÓNA.

EL VRT SE CULTIVÓ EN CÉLULAS VERO, EN MEDIO ESENCIAL MÍNIMO-(MEM), ADICIONADO DE 10% DE SUERO DE TERNERA, 100 UI/ML DE ESTREPTOMICINA, 100 µg/ML DE PENICILINA Y 50 µg/ML DE NISTATINA. LAS CAJAS DE CULTIVO SE INCUBARON A 35°C EN ATMÓSFERA HÚMEDA Y 5% DE CO<sub>2</sub>. POSTERIORMENTE SE CONSECHÓ EL SOBRENADANTE CADA TERCER DÍA, HASTA QUE LAS CÉLULAS SE FUERON DESPRENDIENDO EN SU TOTALIDAD (APROXIMADAMENTE 5 - 7 DÍAS POST-INFECCIÓN).

EL MEDIO COSECHADO SE CLARIFICÓ POR CENTRIFUGACIÓN A 300 XG DURANTE 15 MINUTOS A 4°C, EL SOBRENADANTE SE CONCENTRÓ DE -- ACUERDO A LOS DIFERENTES MÉTODOS QUE SE DESCRIBEN.

3.1.1 OBTENCIÓN DE ERITROCITOS DE POLLO Y PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN UTILIZADA EN LA TITULACIÓN POR HEMAGLUTINACIÓN DEL ANTIGENO DE RUBEOLA.

SE TRABAJÓ CON POLLOS DE UN DÍA DE NACIDOS, EN AYUNAS, DE LA RAZA RHODE ISLAND RED OBTENIDOS DE LA CASA ARMOUR HATCHERY - DE MÉXICO, S.A. LA SANGRE SE OBTUVO POR PUNCIÓN CARDIACA --

DIRECTA Y SE COLECTÓ EN SOLUCIÓN DE ALSEVER EN PROPORCIÓN -- 1:1 MEZCLÁNDOLA CUIDADOSAMENTE PARA EVITAR LA HEMÓLISIS. DES PUÉS SE PASÓ POR UNA GASA, CON EL OBJETO DE RETENER LOS COÁGULOS QUE PUEDEN HABERSE FORMADO.

LA SANGRE SE COLECTÓ EN UN TUBO DE CENTRÍFUGA GRADUADO Y SE - CENTRIFUGÓ A TEMPERATURA AMBIENTE A 1500 XG DURANTE 10 MINU - TOS. LOS ERITROCITOS OBTENIDOS SE CONSERVARON EN ESTA SOLU - CIÓN A 4°C POR UN TIEMPO MÁXIMO DE 4 DÍAS.

PARA LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACIÓN LOS ERITROCITOS SE LAVARON CON SOLUCIÓN DE ALSEVER HASTA RETIRAR COMPLETAMENTE LA HEMOGLOBINA, GENERALMENTE SE REQUIRIERON DE 3 A 4 LAVADOS Y SE - RESUSPENDIERON AL 0,25% EN AULETTA CON ASB.

## M E T O D O S

### 3.2 TITULACION DEL ANTIGENO POR HEMAGLUTINACION.

EL ANTÍGENO SE TITULÓ POR HEMAGLUTINACIÓN DE ACUERDO AL MÉTODO DE MICROTITULACIÓN DE LA CDC ATLANTA GEORGIA. SE UTILIZARON ERITROCITOS DE POLLO. LA TITULACIÓN SE REALIZÓ EN PLACAS DE 96 POZOS EN FONDO DE "V", A TODOS LOS POZOS SE LES PUSO -- 0.025 ML DE AULETTA CON ASB AL 0.4%. DOS DE ESTAS LÍNEAS DE 9 POZOS SE UTILIZARON PARA EL CONTROL DE AGLUTINACIÓN A ESTOS SE LES AÑADIERON 0.025 ML DE LA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS. -- LOS CONTROLES DE ERITROCITOS MOSTRARON EL BOTÓN EN EL FONDO - DEL POZO POR LA SEDIMENTACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS.

PARA CADA ANTÍGENO POR TITULAR SE UTILIZÓ UNA LÍNEA DE LA -- PLACA CON 8 POZOS. AL PRIMER POZO SE LE ADICIONA 0.025 ML - DEL ANTÍGENO PROBLEMA A PARTIR DE ESTE POZO SE HICIERON DILU CIONES SERIADAS HASTA 1:256 A TODOS LOS POZOS SE LES AGREGA- 0.025 ML. DE LA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS AL 0.25%. SE AGI- TA CUIDADOSAMENTE. DESPUÉS DE ESE TIEMPO SE OBSERVA EL PA - TRÓN DE SEDIMENTACIÓN DE LOS ERITROCITOS. LA RECÍPROCA DE - LA ÚLTIMA DILUCIÓN QUE AGLUTINA LOS ERITROCITOS SE CONSIDERA COMO EL TÍTULO DEL ANTÍGENO.

### 3.3 CUANTIFICACION DE PROTEINAS

LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS DEL ANTÍGENO UTILIZADO EN EL - PRESENTE TRABAJO SE DETERMINÓ POR EL MÉTODO DE LOWRY (27).

PARA CADA DETERMINACIÓN SE PREPARÓ UNA SOLUCIÓN DE REFEREN - CIA DE ASB 1 MG/ML EN SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFA TO (PBS).

SE HIZO UNA CURVA ESTANDAR DE ASB UTILIZANDO UN RANGO DE CON - CENTRACIÓN DE 0.025 A 0.500 MG/ML, LAS LECTURAS SE HICIERON POR DUPLICADO Y EN UN VOLUMEN FINAL DE 0.2 ML.

LA MUESTRA PROBLEMA SE DILUYE 1:10; 1:50 Y 1:60 EN PBS.

SE ADICIONA A CADA UNO DE LOS TUBOS, 1 ML DEL REACTIVO A (VER APÉNDICE). SE MEZCLAN Y SE DEJAN REPOSAR 10 MIN A TEMPERATU - RA AMBIENTE.

SE AGREGA 0.1 ML DEL REACTIVO B (VER APÉNDICE) A CADA UNO DE LOS TUBOS.

SE MEZCLAN INMEDIATAMENTE Y SE DEJAN REPOSAR 30 MIN. EN UN LAPSO DE 30 MIN A 4 HORAS, SE DETERMINÓ LA DENSIDAD ÓPTICA-(D.O.) A 680 NM.

### 3.4 CLARIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA

LOS RESTOS CELULARES DE LA COSECHA VIRAL SE ELIMINARON POR-CENTRIFUGACIÓN, BAJO DIFERENTES CONDICIONES (TABLA 4.1), AL CENTRIFUGAR A 300 RPM SE UTILIZARON TUBOS CÓNICOS DE 13 ML- APROXIMADAMENTE, EN UNA CENTRÍFUGA CLÍNICA. MIENTRAS QUE - CLARIFICANDO CON VELOCIDADES MAYORES SE UTILIZÓ UNA CENTRI-FUGA BECKMAN Y TEMPERATURA DE 4°C. EN UN ROTOR 45 TI Y TUBOS DE POLIALÓMERO DE 80 ML. EN AMBOS CASOS SE OBTUVO UN SOBRENADANTE Y SEDIMENTO, LOS CUALES SE TITULARON POR HEMAGLUTINA CIÓN.

### 3.5 CONCENTRACION DEL VIRUS

#### 3.5.1 CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

LA PRECIPITACIÓN DEL VIRUS CON SULFATO DE AMONIO, SE REALIZÓ DE ACUERDO A TRUDEL Y COLABORADORES (47),

SE MEZCLARON VOLUMENES IGUALES DEL SOBRENADANTE Y SULFATO DE AMONIO SATURADO A PH:7.4 (VER APÉNDICE). ES IMPORTANTE QUE-LA ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO SE REALICE LENTAMENTE Y CON-AGITACIÓN CONSTANTE.

DESPUÉS DE 2 HORAS A 4°C, LA MEZCLA SE CENTRIFUGÓ A 26 000 - XG. EN LA ULTRACENTRÍFUGA BECKMAN, MODELO L8-60 M EN UN RO-TOR 45TI A UNA TEMPERATURA DE 40°C Y DURANTE 1 HORA.

SE DECANTÓ EL SOBRENADANTE Y EL PRECIPITADO SE RESUSPENDIÓ - EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE NTE (NACL 0.15 M. TRIS HCL 0.05 M Y EDTA 0.001 M. PH: 7.4) EN UN VOLUMEN 15 VECES MENOR AL - VOLUMEN ORIGINAL DE LA MUESTRA.

SE DETERMINÓ EL CONTENIDO PROTEÍCO TANTO AL ANTÍGENO SIN CON - CENTRAR COMO AL CONCENTRADO.

LA TITULACIÓN DEL ANTÍGENO SE DETERMINÓ POR HEMAGLUTINACIÓN.

### 3.5.2 CONCENTRACION DE VIRUS POR ULTRACENTRIFUGACION

LA SUSPENSIÓN VIRAL SE CONCENTRÓ POR ULTRACENTRIFUGACIÓN, POR EL MÉTODO DE PAYMENT Y TRUDEL (32)

SE DETERMINÓ EL CONTENIDO DE PROTEÍNAS A LA COSECHA VIRAL Y - SE TITULÓ. EL TÍTULO VARIÓ ENTRE 2 Y 4 UNIDADES HEMAGLUTI -- NANTES. 65 ML DE ESTA SOLUCIÓN SE COLOCARON EN UN TUBO DE -- 70 ML DE POLICARBONATO (BECKMAN 343281) Y EN EL ROTOR TIPO 45 T1. SE CENTRIFUGÓ EN LA ULTRACENTRÍFUGA BECKMAN, MODELO L8-60 M A 151 000 XG A 4°C DE 2 A 4 HORAS.

EL SOBRENADANTE SE TITULÓ Y SE DESCARTÓ CUANDO EL TÍTULO FUE MENOR A 2 UNIDADES HEMAGLUTINANTES.

EL PRECIPITADO SE LAVÓ CON 1 ML DE NTE, DEJÁNDOLO ESCURRIR - POR LAS PAREDES, SE RESUSPENDIÓ CON UNA PIPETA PASTEUR, LA - SUSPENSIÓN SE PASÓ A UN TUBO DE 13 X 100 MM. ESTE PROCEDI - MIENTO SE REPITIÓ 3 VECES UTILIZANDO EN CADA OCASIÓN 1 ML DE NTE, LAS SUSPENSIONES SE MEZCLARON EN UN TUBO DE 13 X 100 MM. SE TITULARON Y SE LES DETERMINÓ CONTENIDO PROTÉICO.

### 3.6 PURIFICACION DEL VIRUS

#### 3.6.1 POR GRADIENTE DE SACAROSA

SE REALIZÓ UN GRADIENTE DISCONTÍNUO DE SACAROSA 50/30% (32).

EN TUBOS DE 13.5 ML DE POLIALÓMERO (BECKMAN 342413) SE COLOCARON 1.7 ML DE SOLUCIÓN DE SACAROSA AL 50% Y 1.7 ML DE SOLUCIÓN DE SACAROSA AL 30%.

POSTERIORMENTE AL GRADIENTE SE LE ADICIONARON 9.0 ML DE ANTÍGENO VIRAL CONCENTRADO. SE CERRÓ PERFECTAMENTE EL TUBO Y SE CENTRIFUGÓ A DIFERENTES VELOCIDADES Y TIEMPOS EN LA CENTRIFUGA ANTES MENCIONADAS A 4°C Y EN UN ROTOR BECKMAN TIPO 50 TI.

SE COLECTARON POR PUNCIÓN DEL TUBO FRACCIONES DE 0.5 ML EN TUBOS DE 13 x 100 MM.

TODAS LAS FRACCIONES OBTENIDAS SE TITULARON POR HEMAGLUTINACIÓN Y EL CONTENIDO DE SACAROSA SE DETERMINÓ POR REFRACTOMETRÍA (REFRACTÓMETRO BAUSCH AND LOMB, MODELO ABBE 32).

#### 3.6.2 PURIFICACION DEL VIRUS POR GRADIENTE DE PERCOLL

SE REALIZÓ UN GRADIENTE DE PERCOLL SEGÚN LA TÉCNICA DE HAKAN Y PERTOFT (34).

EN TUBOS DE POLIALÓMERO DE 13.5 ML (BECKMAN 342413) SE COLOCARON 4.5 ML DE PERCOLL + 0.5 ML DE SOLUCIÓN A (SACAROSA 2.5 M DISUELTA EN ASB 1% Y TRIS 0.05 M, PH: 7.4) + 5 ML DE SOLUCIÓN B (SACAROSA 0.25 M EN ASB 0.1% Y TRIS 0.0005 M PH 7.4).

AL GRADIENTE SE ADICIONARON LENTAMENTE 2.5 ML DE ANTÍGENO -  
CONCENTRADO, SE CERRÓ PERFECTAMENTE EL TUBO Y SE CENTRIFUGÓ  
UTILIZANDO UN ROTOR TIPO 50 TI Y LA CENTRÍFUGA BECKMAN, MODE  
LO L8-60 M A 4°C T A DIFERENTES VELOCIDADES Y TIEMPOS.

SE COLECTARON POR PUNCIÓN DEL TUBO, FRACCIONES DE 0.5 ML Y/O  
0.5 CM Y SE TITULARON POR HEMAGLUTINACIÓN.

PARA CONOCER LA DENSIDAD DE FLOTACIÓN DEL VIRUS SE UTILIZA -  
RON ESFERAS MARCADORAS DE DENSIDAD (PHARMACIA CAT. No. 17---  
0459-01). EL VIRUS Y LOS MARCADORES DE DENSIDAD SE CENTRIFU  
GARON EN TUBOS POR SEPARADO BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.

LA DENSIDAD SE CALCULÓ AL MEDIR LA DISTANCIA (CM) DEL FONDO-  
DEL TUBO HASTA DONDE APARECIERON LAS ESFERAS.

## R E S U L T A D O S

4.1 CLARIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA

PARA ELIMINAR RESTOS CELULARES DE LA COSECHA VIRAL SE LLEVÓ A CABO UNA CLARIFICACIÓN. ESTA SE REALIZÓ, BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE CENTRIFUGACIÓN (TABLA No.4.1).

TABLA: 4.1

CLARIFICACION DE LA COSECHA VIRAL<sup>1</sup>

CONDICIONES		(TITULO DE UHA) <sup>2</sup>	
TIEMPO (MIN).	VELOCIDAD (xg)	SOBRENADANTE	SEDIMENTO
45	7500	0	4
30	3500	4	4
15	300	4	0

<sup>1</sup>TODAS LAS CENTRIFUGACIONES SE REALIZARON A 4°C

<sup>2</sup>PROMEDIO DE 15 EXPERIMENTOS PARA CADA UNO.

COMO SE PUEDE OBSERVAR EN LA TABLA 4.1 LOS MEJORES RESULTADOS SE OBTUVIERON AL CENTRIFUGAR A 300 X G DURANTE 15 MINUTOS; BAJO ESTAS CONDICIONES NO SE PIERDE ANTIGENO - EN EL SEDIMENTO, SOLO SE ELIMINAN RESTOS CELULARES. LO ANTERIOR SE COMPROBÓ AL TITULAR POR HEMAGLUTINACIÓN, TANTO EL SOBRENADANTE COMO EL SEDIMENTO OBTENIDO DESPUÉS DE LA CENTRIFUGACIÓN.

EL TÍTULO DEL SOBRENADANTE AL CENTRIFUGAR A 300 XG FUE DE 4 UHA (UNIDADES HEMAGLUTINANTES), MIENTRAS QUE EL SEDIMENTO QUE PREVIAMENTE SE RESUSPENDIÓ EN AMORTIGUADOR NTE - NO PRESENTÓ TÍTULO. A MAYOR VELOCIDAD HUBO UNA PÉRDIDA DEL VIRUS, DEBIDO A QUE ÉSTE SE SEDIMENTÓ JUNTO CON LOS RESTOS - CELULARES.

#### 4.2 CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA

##### 4.2.1 CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO

LA CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE -- AMONIO, SE REALIZÓ CON UNA SOLUCIÓN SOBRESATURADA AL 50% EN PROPORCIÓN: 1:1 Y 2:1 DE SULFATO DE AMONIO Y LA COSECHA VIRAL CLARIFICADA. SE PROBARON VARIAS CONDICIONES DE CENTRIFUGACIÓN A FIN DE OBTENER LA MÁS EFICIENTE, LAS CONDICIONES -- UTILIZADAS FUERON: 3360 XG/30 MIN, 3360 XG/60 MIN, 26000 XG/60 MIN.

CUANDO SE UTILIZÓ SULFATO DE AMONIO EN PROPORCIÓN -- 1:1 Y CENTRIFUGANDO A 3360 XG/30 MIN SE OBTUVIERON LOS RESULTADOS DE LA TABLA 4.2.

AL CONCENTRAR EL VIRUS POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO, EN LAS CONDICIONES DE 3360 XG/30 MIN, Y CENTRIFUGANDO INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA PRECIPITACIÓN SE OBSERVA QUE EL FACTOR PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN ES DE 9 VECES. SIN EMBARGO TODOS LOS SOBRENADANTES PRESENTARON TÍTULO DE 16 UHA, LO CUAL SIGNIFICA QUE NO SE CONCENTRÓ TODO EL -- VIRUS, ÉSTO POSIBLEMENTE SE DEBIÓ A QUE LA VELOCIDAD NO FUE SUFICIENTE, O BIEN A QUE ERA NECESARIO AUMENTAR EL TIEMPO -- DE CENTRIFUGACIÓN O A QUE EL TIEMPO DE PRECIPITACIÓN NO FUE SUFICIENTE.

TABLA: 4.2

CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO SATURADO.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TITULO (UHA)		TITULO DEL SOBRENADANTE	FACTOR DE CONCENTRACION <sup>2</sup>
	INICIAL	DEL PRECIPITADO		
1	16	256	16	16
2	16	256	16	16
3	16	64	16	4
4	16	64	16	4
5	16	64	16	4
6	16	128	16	8
$\bar{x}$	= 16	$\bar{x}$ = 139	$\bar{x}$ = 16	$\bar{x}$ = 9

<sup>1</sup>LA CENTRIFUGACIÓN SE REALIZÓ INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE PRECIPITAR CON SULFATO DE AMONIO AL 50%; PH=7.4 ; T=4°C.

<sup>2</sup>SE OBTIENE AL DIVIDIR: TÍTULO DEL PRECIPITADO/TÍTULO INICIAL.

AUMENTANDO EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN Y MANTENIENDO LA VELOCIDAD A 3360 XG SE OBSERVA EN LA TABLA 4.3, UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE 5 VECES CON RESPECTO AL INICIAL. AL IGUAL QUE EN LA TABLA 4.2, TODOS LOS SOBRENADANTES PRESENTARON TÍTULO DE 16 UHA POR LO QUE NUEVAMENTE NO TODO EL VIRUS PRESENTE LLEGÓ A PRECIPITARSE, AÚN CUANDO SE AUMENTÓ - EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN.

TABLA: 4.3

CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR PRECIPITACION:  
3360 XG/60 MIN.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TÍTULO (UHA)		TÍTULO DEL SOBRENADANTE	FACTOR DE CONCENTRACION <sup>2</sup>
	INICIAL	DEL PRECIPITADO		
1	16	128	16	8
2	16	64	16	4
3	16	64	16	4
4	16	64	16	4
5	16	128	16	8
6	16	64	16	4
7	16	32	16	2
8	16	64	16	4
	$\bar{X} = 16$	$\bar{X} = 76$	$\bar{X} = 16$	$\bar{X} = 5$

<sup>1</sup>LA CENTRIFUGACIÓN SE REALIZÓ INMEDIATAMENTE, DESPUÉS DE PRECIPITAR CON SULFATO DE AMONIO SATURADO AL 50%; PH=7.4 ; T=4°C.

<sup>2</sup>SE CALCULA DIVIDIENDO TÍTULO DEL PRECIPITADO/TÍTULO INICIAL.

CON LA FINALIDAD DE OBTENER MEJORES RESULTADOS PARA LA CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO, SE PROCEDIÓ A PRECIPITAR EL VIRUS EN PROPORCIÓN 1:1 INCUBÁNDOLO DURANTE UNA HORA, EN SEGUIDA SE CENTRIFUGÓ A -- 3360 XG/30 MIN OBTENIÉNDOSE LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN LA-TABLA 4,4.

TABLA 4.4

CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR PRECIPITACION;  
3360 XG/30 MIN.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TITULO (UNA)		TITULO DEL SOBRENADANTE	FACTOR DE CONCENTRACION <sup>2</sup>
	INICIAL	DEL PRECIPITADO		
1	16	128	16	8
2	16	64	16	4
3	16	64	16	4
4	16	64	16	4
5	16	64	16	4
6	16	64	16	4
	$\bar{X} = 16$	$\bar{X} = 75$	$\bar{X} = 16$	$\bar{X} = 5$

<sup>1</sup>CENTRIFUGACIÓN DESPUÉS DE UNA HORA DE INCUBACIÓN; T= 4°C.

<sup>2</sup>SE CALCULA DIVIDIENDO: TÍTULO DEL PRECIPITADO/TÍTULO INICIAL.

DESPUÉS DE INCUBAR EL VIRUS PRECIPITADO DURANTE UNA HORA Y CENTRIFUGAR A 3360 XG/30 MIN., SE OBTUVO UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE 5 VECES CON RESPECTO AL INICIAL. - POR LO QUE PUEDE DECIRSE QUE UNA INCUBACIÓN PARA PRECIPITAR-AL VIRUS NO FAVORECIÓ A LA CONCENTRACIÓN DEL MISMO.

LO ANTERIOR SE CONCLUYE COMPARANDO LOS RESULTADOS DE LA TABLA 4.2 Y 4.4. EN LA PRIMERA SE TIENE UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE 9, MIENTRAS QUE EN LA SEGUNDA ES DE 5. POR LO TANTO EL FACTOR DE CONCENTRACIÓN DISMINUYE 4 VECES.

DESPUÉS DE COMPROBAR QUE UTILIZANDO EL SULFATO DE -- AMONIO SATURADO EN PROPORCIÓN 1:1 TODOS LOS SOBRENADANTES -- PRESENTARON UN TÍTULO DE 16 UHA, LO QUE INDICA QUE NO TODO -- EL VIRUS PRESENTE SE PRECIPITÓ, LA PROPORCIÓN DE SULFATO DE-- AMONIO SE AUMENTÓ 2:1 Y SE CENTRIFUGÓ INMEDIATAMENTE, OBTI -- NIÉNDOSE LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA 4.5

TABLA: 4.5

CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR PRECIPITACION;  
3360 XG/30 MIN.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TITULO (UHA)		TITULO DEL SOBRENADANTE	FACTOR DE CONCENTRACION <sup>2</sup>
	INICIAL	DEL PRECIPITADO		
1	16	128	8	8
2	16	128	8	8
3	16	64	8	4
4	16	64	8	4
5	16	64	8	4
6	16	64	16	4
7	16	32	8	2
8	16	64	16	4
	$\bar{X} = 16$	$\bar{X} = 76$	$\bar{X} = 10$	$\bar{X} = 5$

<sup>1</sup>LA CONCENTRACIÓN SE REALIZÓ CON SULFATO DE AMONIO PROPORCIÓN 2: 1.

<sup>2</sup>SE CALCULA DIVIDIENDO TÍTULO DEL PRECIPITADO/TÍTULO INICIAL.

TOMANDO EN CUENTA LOS RESULTADOS DE LA TABLA ANTE --  
 RIOR SE OBSERVA QUE EL FACTOR PROMEDIO DE CONCENTRACIÓN ES DE  
 5 VECES Y QUE AL IGUAL QUE EN LAS CONDICIONES ANTERIORES TO--  
 DOS LOS SOBRENADANTES PRESENTARON TÍTULO, POR LO QUE NO TODO  
 EL VIRUS PRESENTE SE PRECIPITÓ AL AUMENTAR LA PROPORCIÓN DE --  
 SULFATO DE AMONIO 2:1

AL AUMENTAR LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN A 26000 XG/  
 60 MIN. SE OBTUVIERON LOS SIGUIENTES RESULTADOS DE LA TABLA  
 4.6.

TABLA: 4.6

CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR PRECIPITACION;  
 26000 XG/60 MIN.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TÍTULO (UHA)		TÍTULO DEL SOBRENADANTE	FACTOR DE CONCENTRACION <sup>2</sup>
	INICIAL	DEL PRECIPITADO		
1	8	64	4	8
2	8	64	4	8
3	8	64	4	8
4	8	64	4	8
5	8	64	4	8
6	8	32	4	4
$\bar{X} = 8$	$\bar{X} = 59$	$\bar{X} = 4$	$\bar{X} = 7$	

<sup>1</sup>LA CONCENTRACIÓN SE REALIZÓ 60 MIN. DESPUÉS DE AGREGAR SUL-  
 FATO DE AMONIO SATURADO AL 50% PH=7.4 ; T=4°C.; PROPORCIÓN  
 1:1

<sup>2</sup>SE CALCULA DIVIDIENDO TÍTULO DEL PRECIPITADO/TÍTULO INICIAL.

AL CONCENTRAR EL VIRUS POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO EN LAS CONDICIONES DE 26000 XG/60 MIN. SE OBTIENE UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN DE 7 VECES CON RESPECTO AL INICIAL. AL IGUAL QUE EN LAS CONDICIONES ANTERIORES TODOS LOS SOBRENADANTES PRESENTARON TÍTULO, NO OBSTANTE QUE LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN Y EL TIEMPO FUERON AUMENTADOS.

PARA CONFIRMAR SI EL VIRUS FUE O NO CONCENTRADO SE DETERMINÓ LA CANTIDAD DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY, PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA. ESTO SE REALIZÓ ÚNICAMENTE PARA EL ÚLTIMO EXPERIMENTO DEBIDO A QUE PRESENTÓ MENOR VALOR DE UHA EN EL SOBRENADANTE. LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE MUESTRAN EN LA TABLA 4.7.

TABLA: 4.7

ACTIVIDAD ESPECIFICA DEL VIRUS DE RUBEOLA CONCENTRADO POR -  
PRECIPITACION CON SULFATO DE AMONIO.<sup>1</sup>

No. DE TUBO.	(UHA / M L)		PROTEINAS / MG		ACT. ESP. ( $\frac{UHA}{MG} / \frac{M L}{PROT.}$ )	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
1	320	2560	0.0925	.0065	$3.4 \times 10^3$	$3.9 \times 10^5$
2	320	1280	0.0925	.0125	$3.4 \times 10^3$	$1.0 \times 10^5$
3	320	2560	0.0925	.0125	$3.4 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
4	320	2560	0.0925	.0125	$3.4 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
5	320	2560	0.0925	.0125	$3.4 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
6	320	2560	0.0925	.0125	$3.4 \times 10^3$	$2.0 \times 10^5$
$\bar{x} =$	320	2347	0.0925	.0115	$3.4 \times 10^3$	$2.15 \times 10^5$

<sup>1</sup>EL VIRUS DE RUBEOLA CON SULFATO DE AMONIO AL 50%, INCUBADO 2 HORAS; 4°C CENTRIFUGADO A 26000XG/60 MIN.

OBSERVANDO LOS RESULTADOS DE LA TABLA 4.7 SE CONFIRMA QUE EFECTIVAMENTE EL VIRUS HA SIDO CONCENTRADO, AUNQUE NO EN SU TOTALIDAD PUESTO QUE APARECE TÍTULO EN EL SOBRENADANTE. SIN EMBARGO SE OBSERVA QUE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA AUMENTÓ CON RESPECTO A LA INICIAL EN UN PROMEDIO DE 63 VECES.

#### 4.2.2 CONCENTRACION DEL VIRUS DE RUBEOLA MEDIANTE ULTRA - CENTRIFUGACION.

ESTE MÉTODO SE EMPLEÓ BAJO DIFERENTES CONDICIONES, PARA OBTENER EL MEJOR RENDIMIENTO. LAS CONDICIONES UTILIZADAS FUERON: 117000 XG/2 HORAS 117000 XG/4 HORAS.

CUANDO SE CONCENTRÓ A 117000 XG/2 HORAS SE OBTUVIERON LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA 4.8. EN LA CUAL SE OBSERVA QUE EL CONCENTRAR EL VIRUS DE RUBEOLA EN LAS CONDICIONES ANTES MENCIONADAS SE OBTIENE UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE 13 VECES CON RESPECTO AL INICIAL, TOMANDO EN CUENTA QUE LA MAYORÍA DE LOS SOBRENADANTES PRESENTÓ UN TÍTULO DE 2 UHA, PUEDE DECIRSE QUE NO TODO EL VIRUS PRESENTE HA SIDO CONCENTRADO Y QUE EL TIEMPO UTILIZADO NO ES SUFICIENTE O BIEN ES NECESARIO AUMENTAR LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN.

AL AUMENTAR EL TIEMPO A 4 HORAS, MANTENIENDO LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN A 17000 XG SE OBTUVIERON LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA 4.9

TABLA : 4.8

VALORES OBTENIDOS EN LA CONCENTRACION DE VR POR ULTRACENTRIFUGACION A 117000 Xg/2 HORAS.<sup>1</sup>

No. DE TUBO	TITULO (UHA)		FACTOR DE CONCENTRACION <sup>3</sup>
	INICIAL	FINAL <sup>2</sup>	
1	64	256	4
2	64	256	4
3	64	128	2
4	64	128	2
5	64	128	2
6	64	128	2
7	4	128	32
8	4	256	64
9	4	64	16
10	4	64	16
11	4	32	8
12	4	32	8
13	4	32	8
14	4	32	8

<sup>1</sup> LAS CENTRIFUGACIONES SE REALIZARON A 4°C

<sup>2</sup> LA MAYOR PARTE DE LOS SOBRENADANTES DA TÍTULO DE 2 UHA

<sup>3</sup> SE CALCULA DIVIDIENDO TÍTULO FINAL / TÍTULO INICIAL.

TABLA :4.9

VALORES OBTENIDOS EN LA CONCENTRACION DE VR POR ULTRACENTRIFUGACION A 117000 Xg/4 HORAS.

No.DE	TITULO (UHA)		FACTOR DE
TUBO	INICIAL	FINAL <sup>2</sup>	CONCENTRACION <sup>3</sup>
1	4	512	128
2	2	32	16
3	4	256	64
4	4	256	64
5	4	256	64
6	4	256	64
7	4	256	64
8	2	32	16
9	2	64	32
10	2	64	32
11	4	128	32
12	4	128	32
13	4	128	32
14	4	128	32
15	2	64	32
16	2	64	32
17	2	64	32
18	2	128	64
19	2	128	64
20	2	16	8

<sup>1</sup> LAS CENTRIFUGACIONES SE REALIZARON A 4°C.

<sup>2</sup> NINGÚN SOBRENADANTE DIÓ TÍTULO.

<sup>3</sup> SE CALCULA DIVIDIENDO TÍTULO FINAL / TÍTULO INICIAL.

TABLA : 4.10

ACTIVIDAD ESPECIFICA DE VR CONCENTRADO POR ULTRACENTRIFUGACION; 117000 Xg/4 HORAS.

No.DE	(UHA / M L)		PROTEINAS /MG		ACT.ESP. ( $\frac{UHA}{MG} / \frac{M.L.}{PROT.}$ )	
	TUBO.	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL	INICIAL
1	160	20480	0,0425	.0300	$3,7 \times 10^3$	$6,8 \times 10^5$
2	80	1280	0.0525	.0250	$1,5 \times 10^3$	$5,1 \times 10^4$
3	160	10240	0.285	.230	$5,6 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
4	160	10240	0.335	.125	$4,7 \times 10^2$	$8,1 \times 10^4$
5	160	10240	0.335	.125	$4,7 \times 10^2$	$8,1 \times 10^4$
6	160	10240	0.335	.125	$4,7 \times 10^2$	$8,1 \times 10^4$
7	160	10240	0.335	.090	$4,7 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$
8	80	1280	0.175	.040	$4,5 \times 10^2$	$3,2 \times 10^4$
9	80	2560	0.210	.065	$3,8 \times 10^2$	$3,9 \times 10^4$
10	80	2560	0.210	.055	$3,8 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$
11	160	5120	0.300	.115	$5,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
12	160	5120	0.300	.115	$5,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
13	160	5120	0.300	.115	$5,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
14	160	5120	0.300	.115	$5,3 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
15	80	2560	0.210	.065	$3,8 \times 10^2$	$3,9 \times 10^4$
16	80	2560	0.210	.065	$3,8 \times 10^2$	$3,9 \times 10^4$
17	80	2560	0.210	.055	$3,8 \times 10^2$	$4,6 \times 10^4$
18	80	5120	0.300	.115	$2,6 \times 10^2$	$4,4 \times 10^4$
19	80	5120	0.280	.105	$2,8 \times 10^2$	$4,8 \times 10^4$
20	80	640	0.275	.025	$4,5 \times 10^2$	$2,5 \times 10^4$
$\bar{x}$ =			0.245	.09	$6,55 \times 10^2$	$8,31 \times 10^4$

COMO SE PUEDE OBSERVAR EN LA TABLA 4.9 CONCENTRANDO EL VIRUS DE RUBÉOLA A 117000 XG/4 HORAS, SE OBTUVO UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN PROMEDIO DE 45 VECES CON RESPECTO AL INICIAL, ADEMÁS DE QUE NINGÚN SOBRENADANTE PRESENTÓ TÍTULO A DIFERENCIA DE LOS EXPERIMENTOS ANTERIORES, ESTO INDICA QUE SE RECUPERÓ TODO EL VIRUS PRESENTE.

CON BASE EN LO ANTERIOR SE CONSIDERÓ INNecesario REALIZAR LA CONCENTRACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA POR ULTRACENTRIFUGACIÓN EN OTRAS CONDICIONES, PUESTO QUE A 117000 XG/4 HORAS FUE SUFICIENTE PARA CONCENTRAR TODO EL VIRUS PRESENTE.

PARA COMPROBAR QUE EFECTIVAMENTE EL VIRUS DE RUBÉOLA FUE CONCENTRADO, SE REALIZÓ LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS PARA CONOCER LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA, OBTENIÉNDOSE LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA 4.10, EN LA CUAL SE OBSERVA QUE ESTA AUMENTÓ EN UN PROMEDIO DE 127 VECES.

CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE PUEDE OBSERVAR QUE ES MÁS EFICIENTE LA CONCENTRACIÓN POR ULTRACENTRIFUGACIÓN QUE LA CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO.

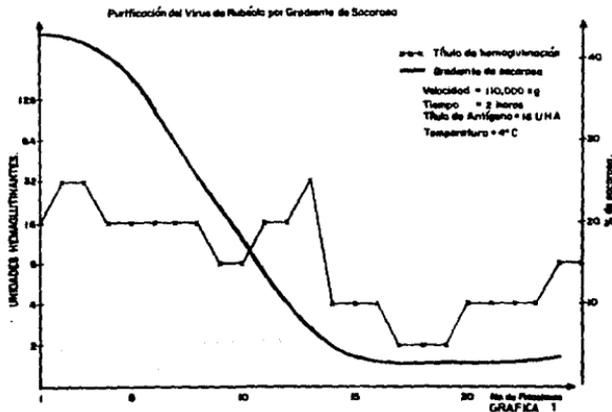
#### 4.3 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA

UNA VEZ QUE EL VIRUS DE RUBÉOLA SE CONCENTRÓ POR ULTRACENTRIFUGACIÓN, EL SIGUIENTE PASO FUE PURIFICARLO, PARA ESTO SE UTILIZÓ EL MÉTODO DE GRADIENTES DE DENSIDAD, UTILIZANDO DOS VARIANTES: LA PRIMERA CON SACAROSA Y LA SEGUNDA CON PERCOLL.

#### 4.3.1 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR GRADIENTE DE SACAROSA.

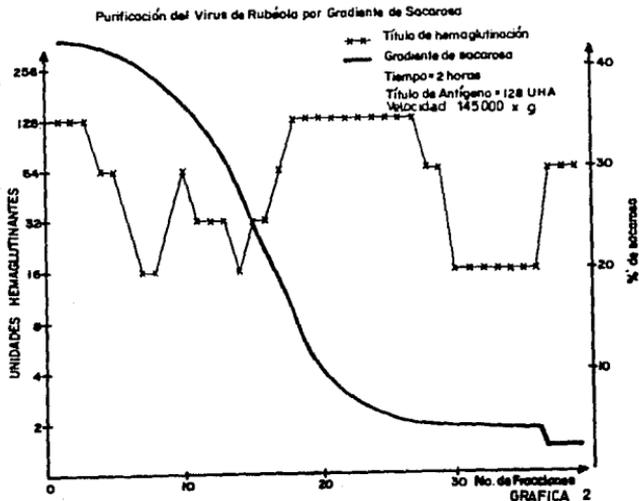
SE REALIZÓ UN GRADIENTE DISCONTINUO DE SACAROSA BAJO DIFERENTES CONDICIONES DE VELOCIDAD Y TIEMPO, ESTAS CONDICIONES FUERON: 110 000 XG/2 HORAS; 145 000 XG/2 HORAS; - - - 145 000 XG/3 HORAS; 145 000 XG/4 HORAS Y 145 000 XG/ 8 HORAS.

LOS RESULTADOS OBTENIDOS AL CENTRIFUGAR A 110 000 XG DURANTE 2 HORAS SE MUESTRAN EN LA GRÁFICA 1 .



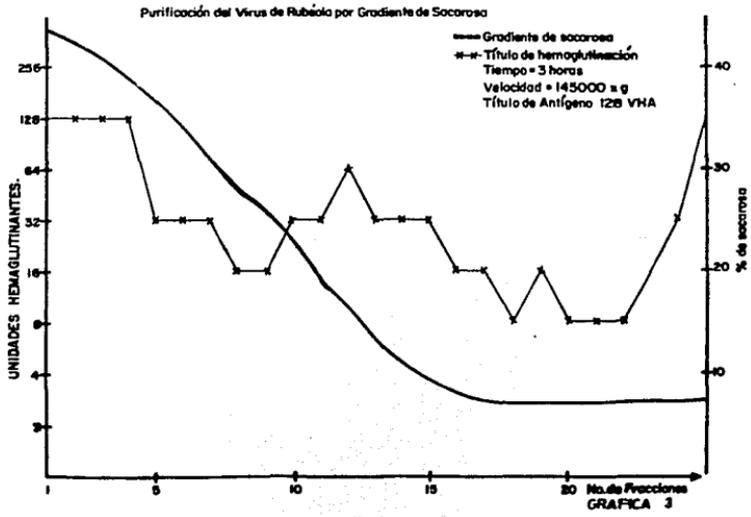
EN LAS CONDICIONES ANTES MENCIONADAS NO FUE POSIBLE OBTENER UNA BUENA PURIFICACIÓN DEL VIRUS, YA QUE COMO SE OBSERVA EN LA GRÁFICA 1 HAY VARIAS FRACCIONES CON TÍTULO DE -- UHA, ESTO INDICA QUE EL VIRUS NO SE CONCENTRÓ EN UNA SOLA -- FRACCIÓN, YA QUE APARECE EN VARIAS DE ELLAS. SIN EMBARGO SE -- OBSERVA UN LIGERO AUMENTO DEL TÍTULO ENTRE LAS FRACCIONES 11 A 14 QUE CORRESPONDEN A LOS POR CIENTO DE SACAROSA DE 14.5 A 5.1 RESPECTIVAMENTE. EN ESTAS CONDICIONES NO SE OBTUVO UNA-- SÓLA FRACCIÓN CON TÍTULO ELEVADO QUE ERA LO DESEADO, PERO -- PUEDE NOTARSE QUE SE FORMÓ UN BUEN GRADIENTE DE SACAROSA.

TOMANDO EN CUENTA LOS RESULTADOS DE LA GRÁFICA 1 SE-- CONSIDERÓ NECESARIO, AUMENTAR LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN A 145 000 XG/ MANTENIENDO EL TIEMPO CONSTANTE (2 HORAS). GRÁ-- FICA 2.



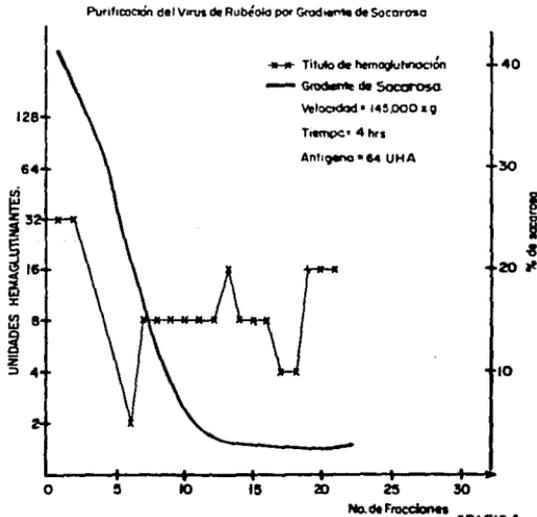
AL AUMENTAR LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN A 145 000 XG/2 HORAS, SE OBSERVARON MEJORES RESULTADOS, YA QUE LA MAYOR PARTE DEL VIRUS SE CONCENTRÓ EN LAS FRACCIONES 16 A 29 QUE CORRESPONDEN DEL 22 AL 3% DE SACAROSA, NO OBSTANTE AÚN SE OBSERVARON VARIAS FRACCIONES CON AUMENTO DEL TÍTULO, ADEMÁS SE ENCONTRÓ TÍTULO DE HA TANTO AL INICIO COMO AL FINAL DEL GRADIENTE. AL AUMENTAR LA VELOCIDAD SE OBSERVARON MEJORES RESULTADOS, POR LO CUAL SE INCREMENTÓ EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN, MANTENIENDO LA VELOCIDAD CONSTANTE.

AUMENTANDO EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN A 3 HORAS Y MANTENIENDO LA VELOCIDAD A 145 000 XG SE OBSERVA (GRAFICA 3) QUE EL NÚMERO DE FRACCIONES CON TÍTULO ELEVADO ES MENOR Y QUE EL VIRUS SE CONCENTRÓ EN LAS FRACCIONES 10 A 16 QUE CORRESPONDEN A UN POR CIENTO DE SACAROSA DE 22.5 A 7.8. OBTENIENDO UN BUEN GRADIENTE DE SACAROSA.

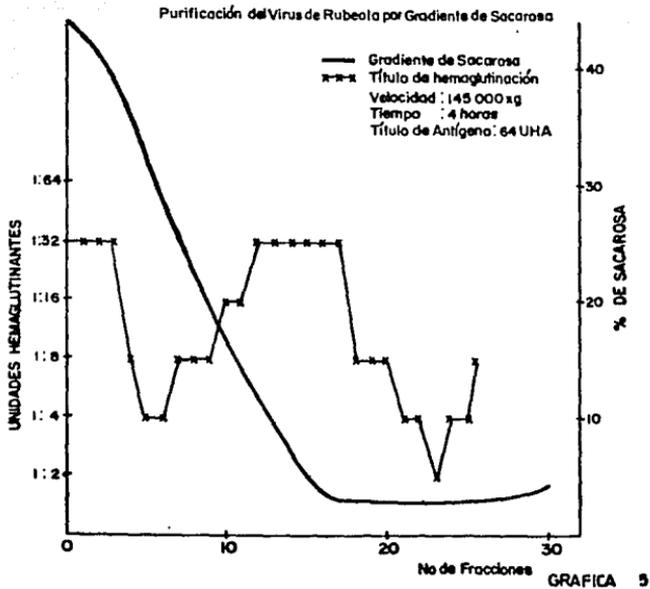


TOMANDO EN CUENTA QUE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA GRÁFICA 3, MEJORARON CON RESPECTO A LAS ANTERIORES, SE AUMENTÓ EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN A 4 HORAS MANTENIENDO LA VELOCIDAD A 145 000 XG. BAJO ESTAS CONDICIONES SE OBTUVIERON MEJORES RESULTADOS (GRÁFICA 4) YA QUE EL VIRUS PREDOMINA EN POCAS FRACCIONES, DE LA 7 A LA 16 QUE CORRESPONDEN DEL 20 AL 2,8 POR CIENTO DE SACAROSA.

PARA COMPROBAR LOS RESULTADOS ANTERIORES SE REALIZÓ NUEVAMENTE LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA EN LAS CONDICIONES UTILIZADAS EN LA GRÁFICA 4. LOS RESULTADOS OBTENIDOS MUESTRAN QUE EFECTIVAMENTE EL VIRUS SE SEPARÓ EN UNA SÓLA SERIE DE FRACCIONES CON TÍTULO DE HÁ ELEVADO (GRÁFICA 5) LOGRÁNDOSE CON ESTO UNA BUENA PURIFICACIÓN DEL VIRUS.

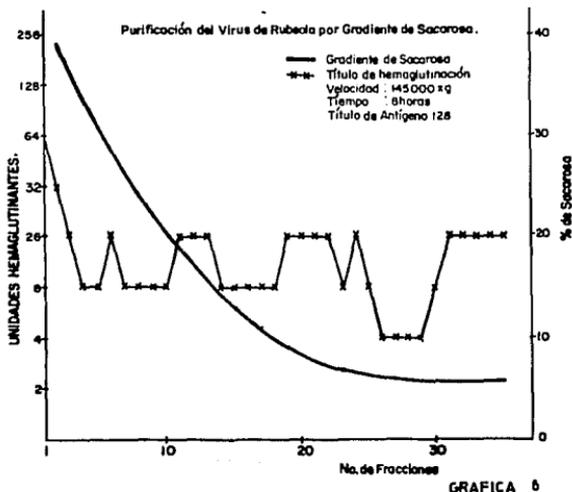


GRÁFICA 4



CON LA FINALIDAD DE CONOCER SI EL TIEMPO ES UN FACTOR DETERMINANTE EN LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA ESTE SE AUMENTÓ A 8 HORAS, OBTENIÉNDOSE LOS RESULTADOS MOSTRADOS EN LA GRÁFICA 6 EN LA CUAL SE OBSERVA QUE EL VIRUS ESTA EN UN GRAN NÚMERO DE FRACCIONES, ADEMÁS DE QUE EL TÍTULO DEL VIRUS DISMINUYE HASTA EN 8 VECES CON RESPECTO AL TÍTULO INICIAL. -- POR LO TANTO UN TIEMPO EXCESIVO DE CENTRIFUGACIÓN NO ES ADECUADO PARA LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS.

CON BASE A LOS RESULTADOS ANTERIORES PUEDE CONSIDERARSE QUE LAS MEJORES CONDICIONES DE PURIFICACIÓN POR GRADIENTE DE SACAROSA SE LOGRARON AL CENTRIFUGAR A 145 000 XG/ 4 HORAS.

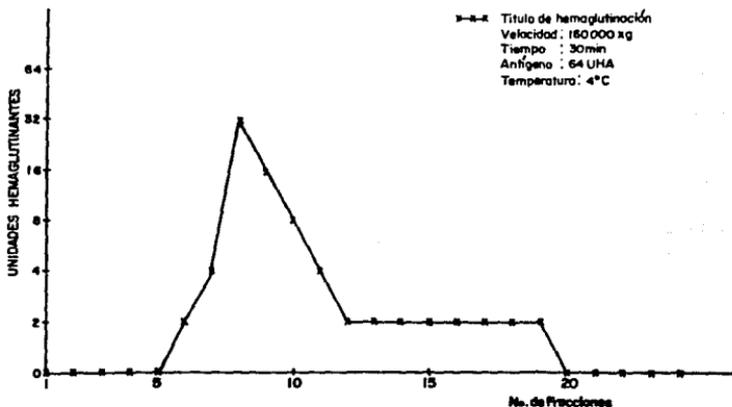


#### 4.3.2 PURIFICACION DEL VIRUS DE RUBEOLA POR GRADIENTE DE PERCOLL.

EL OTRO MÉTODO UTILIZADO PARA LA PURIFICACIÓN DEL -- VIRUS DE RUBÉOLA FUE EL GRADIENTE DE PERCOLL, QUE A DIFERENCIA DEL GRADIENTE DE SACAROSA ES UN GRADIENTE CONTINUO. AL IGUAL QUE EN EL GRADIENTE DE SACAROSA TAMBIÉN SE PROBARON DIFERENTES CONDICIONES: 160 000 XG/30 MIN.; 160 000 XG/45 MIN. Y 160 000 XG/ 20 MIN.

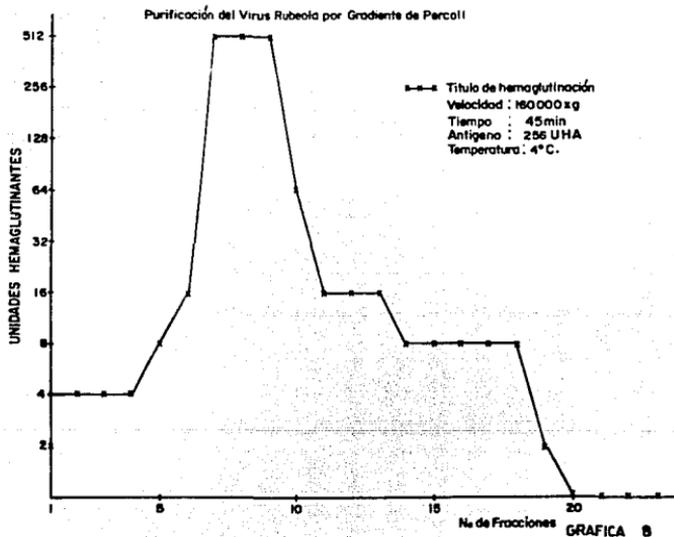
CUANDO EL GRADIENTE SE REALIZÓ A 160 000 XG/30 MIN.- LA MAYOR PARTE DEL VIRUS SE CONCENTRÓ EN POCAS FRACCIONES, LO QUE DA ORIGEN A UN SOLO PICO (GRÁFICA 7). NO SE OBTUVO TÍTULO DE HÁ EN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES AL INICIO Y AL FINAL DEL GRADIENTE, ÉSTO INDICA QUE TODO EL VIRUS PRESENTE QUEDÓ EN LA PARTE INTERMEDIA DEL GRADIENTE.

Purificación del Virus de Rubéola por Gradiente de Percoll.

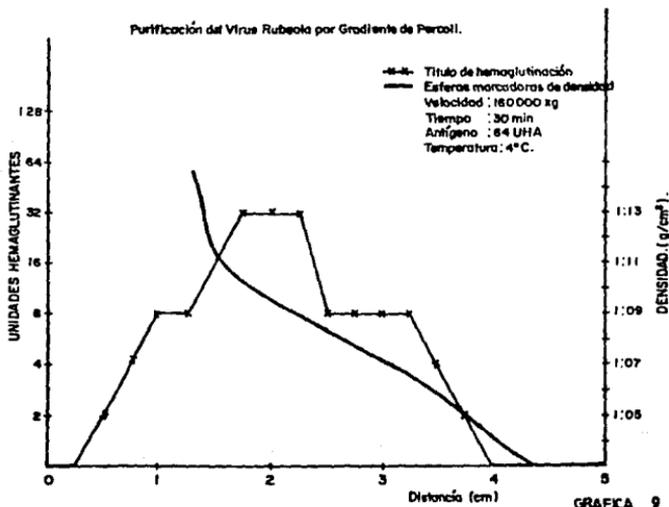


GRAFICA 7

AUMENTANDO EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN A 45 MINUTOS Y MANTENIENDO LA VELOCIDAD A 160 000 XG LA MAYOR PARTE DEL VIRUS SE CONCENTRÓ EN UN NÚMERO MÍNIMO DE FRACCIONES (GRÁFICA 8).

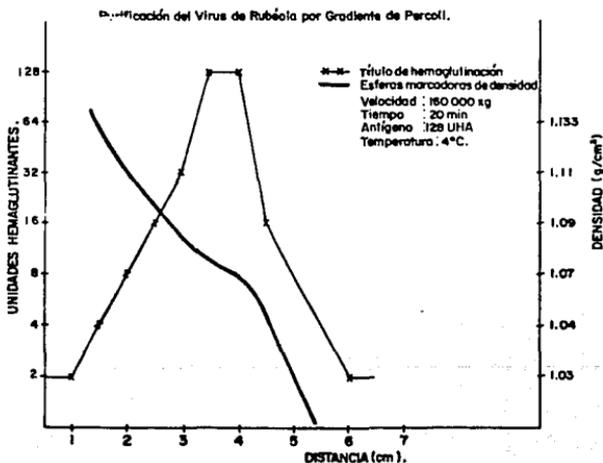


CUANDO EL GRADIENTE SE REALIZÓ A 160 000 XG/30 MIN.- (GRÁFICA 9) LAS FRACCIONES CON TÍTULOS MAYORES SE OBTUVIERON A UNA DISTANCIA DE 1.7 A 2.5 CM., LO CUAL CORRESPONDE A UNA DENSIDAD DE 1.11 A 1.09 G/CM<sup>3</sup>. SIN EMBARGO SE OBTUVO TÍTULO DE HEMAGLUTINACIÓN EN OTRAS FRACCIONES. EL GRADIENTE DE --- PERCOLL TIENE LA FORMA SIGMOIDEA CARACTERÍSTICA DE ESTOS GRADIENTES.



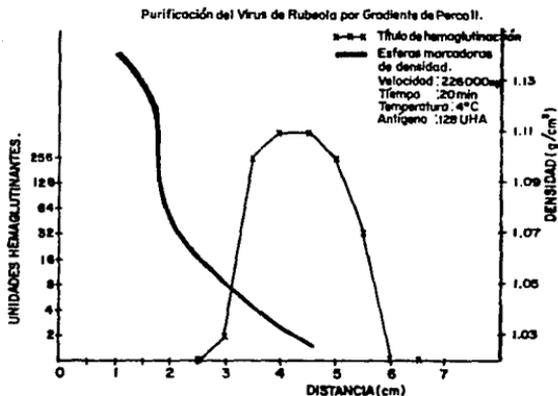
CON LA FINALIDAD DE OBSERVAR COMO INFLUYE EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN, ESTE SE DISMINUYÓ DE 30 A 20 MINUTOS, -- PERO MANTENIENDO LA VELOCIDAD CONSTANTE A 160 000 XG.

EN ESTAS CONDICIONES SE LOGRÓ UNA BUENA PURIFICACIÓN, YA QUE EL MENOR TÍTULO DE HA SE OBTUVO EN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A UNA DISTANCIA DE 2,5 A 4,5 (DENSIDAD DE 1.10 A 1.05 G/CM<sup>3</sup>), MIENTRAS QUE EN LAS PRIMERAS FRACCIONES EL TÍTULO DE HA AUMENTÓ LENTAMENTE Y EN LAS ÚLTIMAS --- FRACCIONES ESTAS TAMBIÉN DECRECEN LENTAMENTE (GRAFICA 10).



GRAFICA 10

A CONTINUACIÓN SE AUMENTÓ LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN A 226 000 XG/20 MIN. Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN A UNA BUENA PURIFICACIÓN DEL VIRUS, DEBIDO A QUE ÚNICAMENTE SE OBTUVO TÍTULO HA EN LAS FRACCIONES CORRESPONDIENTES A UNA DISTANCIA DE 3 A 6 CM (DENSIDAD MENOR A  $1.05 \text{ g/cm}^3$ ) OBTENIÉNDOSE EN ESTAS FRACCIONES UN TÍTULO MÁXIMO DE 512 UHA (GRÁFICA 11).

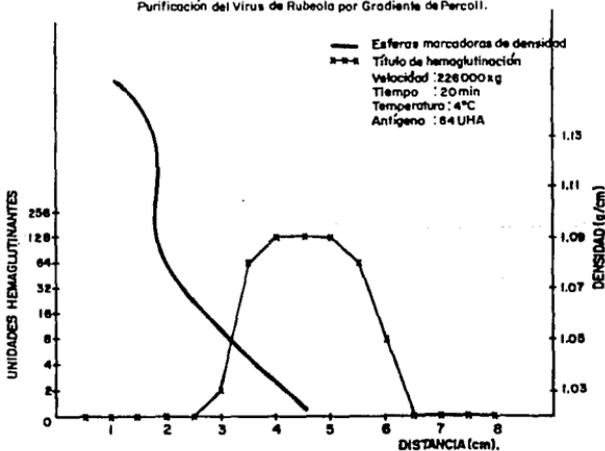


GRAFICA 11

AL EFECTUAR LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS EN LAS MISMAS CONDICIONES QUE LAS UTILIZADAS EN LA GRÁFICA 11 SE OBTUVIERON RESULTADOS SIMILARES ÉSTO ES; UN SÓLO INCREMENTO DEL TÍTULO DE HA EN LAS FRACCIONES QUE CORRESPONDEN A UNA DISTANCIA DE 3 A 6 CM (DENSIDAD MENOR A  $1.05 \text{ g/cm}^3$ ) LO ANTERIOR - SE MUESTRA EN LA GRÁFICA 12.

DE ACUERDO CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS LAS MEJORES-CONDICIONES PARA PURIFICAR AL VIRUS DE RUBÉOLA POR GRADIENTE DE PERCOLL SE OBTUVIERON CENTRIFUGANDO A  $160\ 000 \text{ XG}/20 \text{ MIN.}$ , EN DONDE EL VIRUS SE ENCUENTRA A UNA DENSIDAD PROMEDIO DE  $1.075 \text{ g/cm}^3$ . TAMBIÉN ES POSIBLE PURIFICAR AL VIRUS CENTRIFUGANDO A  $226\ 000 \text{ XG}/20 \text{ MIN.}$  Y BAJO ESTAS CONDICIONES SE TIENE UNA DENSIDAD PROMEDIO DE  $1.03 \text{ g/cm}^3$ .

Purificación del Virus de Rubéola por Gradiente de Percoll.



GRAFICA 12

DESPUÉS DE REALIZAR VARIOS EXPERIMENTOS Y PARA OBTENER LA DENSIDAD DE FLOTACIÓN DEL VIRUS, SE UTILIZARON ESFERAS MARCADORAS DE DENSIDAD, LAS CUALES TAMBIÉN SIRVEN PARA COMPROBAR LA FORMACIÓN DE UN BUEN GRADIENTE. ESTO SE OBSERVA EN LA FIGURA 4.2.

LA CURVA DE DENSIDAD SE CALCULÓ AL MEDIR LA DISTANCIA (CM) A LA QUE APARECEN LAS ESFERAS, COMENZANDO A PARTIR DEL FONDO DEL TUBO. LA DENSIDAD DEL VIRUS SE CALCULÓ EXTRAPOLANDO EL TÍTULO DE H<sub>A</sub> EN LAS FRACCIONES CON LA CURVA DE DENSIDAD.



FIG.4.2 FORMACION DE UN GRADIENTE DE PERCOLL - - -  
UTILIZANDO ESFERAS MARCADORAS DE DENSIDAD.

V

## DISCUSION

LA CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA ES DE GRAN IMPORTANCIA CUANDO VA A SER UTILIZADO EN LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO QUE REQUIEREN DE UN ANTÍGENO PURO, TAL ES EL CASO DE ELISA Y AGLUTINACIÓN CON LATEX, YA QUE SI NO SE CUENTA CON EL ANTÍGENO PURO PUEDEN OBTENERSE RESULTADOS FALSOS,

LA CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA SE INICIÓ CON UNA CLARIFICACIÓN DE LA COSECHA VIRAL QUE SE OBTUVO A PARTIR DE CULTIVOS CELULARES, ESTE PASO ES NECESARIO PARA ELIMINAR LOS RESTOS CELULARES QUE PODRÍAN INTERFERIR EN LA CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL VIRUS.

CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS BAJO LAS DIFERENTES CONDICIONES DE CLARIFICACIÓN SE DEMOSTRÓ QUE ESTE PASO DEBE REALIZARSE A BAJAS VELOCIDADES DE CENTRIFUGACIÓN, PARA EVITAR LA PÉRDIDA DEL VIRUS, YA QUE SI SE CENTRIFUGA A VELOCIDADES ALTAS EL VIRUS SE SEDIMENTA JUNTO CON LOS RESTOS CELULARES, OCASIONANDO UN BAJO RENDIMIENTO.

EN LA ETAPA DE CONCENTRACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO SE NOTÓ QUE LA INCUBACIÓN DEL VIRUS DESPUÉS DE SER PRECIPITADO NO ES RECOMENDABLE YA QUE EL FACTOR DE CONCENTRACIÓN ES MUY BAJO, ÉSTO NO SUCEDE CUANDO EL VIRUS SE CENTRIFUGA INMEDIATAMENTE DESPUÉS DE LA PRECIPITACIÓN, LO ANTERIOR PROBABLEMENTE SE DEBA A QUE BAJO ESAS CONDICIONES LA HEMAGLUTININA DEL VIRUS NO SEA ESTABLE. ÉSTO TAMBIÉN SE OBSERVÓ CUANDO EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN FUE PROLONGADO, LO ANTERIOR PODRÍA SER OCASIONADO POR -

LA MISMA CAUSA (TABLA: 4.2 Y 4.3).

CON LAS DIFERENTES CONDICIONES UTILIZADAS PARA CONCENTRAR AL VIRUS DE RUBÉOLA POR SULFATO DE AMONIO SE OBSERVÓ QUE TODOS LOS SOBRENADANTES PRESENTARON TÍTULO DE HÁ, ESTO SE DEBE POSIBLEMENTE A QUE EL SULFATO DE AMONIO NO LOGRA PRECIPITAR -- TODO EL VIRUS PRESENTE, NO OBSTANTE QUE LA PROPORCIÓN DE SULFATO DE AMONIO SE AUMENTÓ.

CON RESPECTO A LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN SE OBTUVO UN FACTOR DE CONCENTRACIÓN MAYOR CUANDO SE CENTRIFUGÓ A ALTAS VELOCIDADES (TABLA: 4.3 Y 4.6).

A PESAR DE QUE LA CONCENTRACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO NO LOGRÓ PRECIPITAR TODO EL VIRUS, SE OBTUVO UN AUMENTO CONSIDERABLE EN LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA (TABLA:4.7).

CUANDO EL VIRUS DE RUBÉOLA SE CONCENTRÓ POR ULTRACENTRIFUGACIÓN SE OBTUVIERON MEJORES RESULTADOS AL AUMENTAR EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN, ÉSTO SE DEDUCE YA QUE LOS SOBRENADANTES NO PRESENTARON TÍTULO DE HÁ (TABLA: 4.8 Y 4.9). ADEMÁS DE QUE LA ACTIVIDAD ESPECÍFICA ES MUCHO MAYOR A LA OBTENIDA AL PRECIPITAR CON SULFATO DE AMONIO (TABLA: 4.10).

CON RESPECTO A LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA CUANDO ÉSTA SE LLEVÓ A CABO POR GRADIENTE DE SACAROSA, LA PRINCIPAL DIFICULTAD OBSERVADA FUE QUE EL VIRUS NO SE OBTENÍA EN UNA SOLA FRACCIÓN, SINO QUE APARECÍA DE MANERA DISPERSA, ESTE -- PROBLEMA SE FUÉ SOLUCIONANDO AL AUMENTAR EL TIEMPO Y LA VELOCIDAD DE CENTRIFUGACIÓN, LO CUAL NOS PUEDE INDICAR QUE POSIBLEMENTE CUANDO EL VIRUS SE CENTRIFUGA A BAJAS VELOCIDADES Y POCO TIEMPO, ÉSTE ENTRE PARCIALMENTE AL GRADIENTE DE SACARO-

SA Y NO DE UNA MANERA UNIFORME, ASÍMISMO EL AUMENTO DEL TÍTULO DE HEMAGLUTINACIÓN AL INICIO Y AL FINAL DEL GRADIENTE, SE PUEDE DEBER A QUE SE TENGAN FRAGMENTOS DE VIRUS, PARTÍCULAS-DEFECTIVAS O AGREGADOS DEL VIRUS. NO OBSTANTE SI SE AUMENTA MUCHO EL TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN, EL ANTÍGENO PIERDE ACTIVIDAD (GRÁFICA: 6), POR ESTO LO MÁS RECOMENDABLE ES UN TIEMPO-DE CENTRIFUGACIÓN DE 4 HORAS (GRÁFICA: 5).

AL REALIZAR LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBÉOLA POR GRADIENTES DE PERCOLL, EL VIRUS APARECIÓ EN UN NÚMERO REDUCIDO DE FRACCIONES DE LA PARTE INTERMEDIA DEL GRADIENTE, LO QUE INDICA UNA PURIFICACIÓN MÁS EFICIENTE CON RESPECTO AL GRADIENTE-DE SACAROSA, LA DENSIDAD A LA QUE APARECE EL VIRUS DE RUBÉOLA DEPENDE DE LA VELOCIDAD Y TIEMPO DE CENTRIFUGACIÓN. POR-LO TANTO, PARA PURIFICAR EL VIRUS A UNA DENSIDAD QUE PUEDA SER CALCULADA CON LOS MARCADORES DE DENSIDAD ES PREFERIBLE UTILIZAR UNA VELOCIDAD DE 160 000 XG/20 MIN. (GRÁFICA:10).

## CONCLUSIONES

- LAS MEJORES CONDICIONES PARA LA CLARIFICACIÓN DE LA COSECHA VIRAL DEL VIRUS DE RUBEÓLA FUERON 300 XG/15 MIN.
- POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO EL VIRUS DE RUBEÓLA SE CONCENTRÓ 9 VECES, POR ULTRACENTRIFUGACIÓN 45 VECES. LA ULTRACENTRIFUGACIÓN A 117,000 XG/4 HORAS FUE LA MÁS EFICIENTE.
- LAS CONDICIONES MÁS ADECUADAS PARA LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBEÓLA POR CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTE DE SACAROSA DESCONTINUO FUERON 145,000 XG DURANTE 4 HORAS.
- LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBEÓLA POR CENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES CONTINUO DE PERCOLL FUE MÁS EFICIENTE A 160,000 XG DURANTE 20 MINUTOS.
- LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS DE RUBEÓLA CON GRADIENTES DE PERCOLL FUE LA MÁS ADECUADA PORQUE EL VIRUS SE OBTIENE EN UN MENOR NÚMERO DE FRACCIONES EN LA PARTE INTERMEDIA DEL GRADIENTE, EN COMPARACIÓN CON EL GRADIENTE DE SACAROSA.

## VII

## RESUMEN

LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS ANTIRUBÉOLA POR ELISA Y AGLUTINACIÓN CON LATEX REQUIEREN DE ANTÍGENO VIRAL CONCENTRADO Y PURO. EL OBJETIVO DE ESTE TRABAJO FUE ESTABLECER LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA OBTENER EL ANTÍGENO CON LAS CARACTERÍSTICAS REQUERIDAS EN DICHAS TÉCNICAS.

EL VIRUS DE RUBÉOLA CON EL QUE SE TRABAJÓ FUE LA CEPA THEREIN-PROPAGADA EN CÉLULAS VERO, EL PARÁMETRO QUE SE UTILIZÓ EN EL SEGUIMIENTO DE LA CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ANTÍGENO VIRAL FUE LA RELACIÓN DE UNIDADES HEMAGLUTINANTES CON RESPECTO AL CONTENIDO PROTÉICO.

LA CONCENTRACIÓN DEL VIRUS SE PROBÓ POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y ULTRACENTRIFUGACIÓN, CON ÉSTA ÚLTIMA SE OBTUVO EL MEJOR RENDIMIENTO REPRODUCIBLE.

LA PURIFICACIÓN DEL VIRUS SE HIZO POR ULTRACENTRIFUGACIÓN EN GRADIENTES DE SACAROSA Y DE PERCOLL; EL MEJOR RESULTADO PARA PURIFICAR EL VIRUS DE RUBÉOLA POR GRADIENTE DE SACAROSA DISCONTINUO 50/30% SE OBTUVO, AL CENTRIFUGAR 4 HORAS A 145 000 XG.

MIENTRAS QUE AL PURIFICAR EL VIRUS DE RUBÉOLA POR GRADIENTE DE PERCOLL LOS MEJORES RESULTADOS SE OBTUVIERON AL CENTRIFUGAR A 160 000 XG/20 MIN. LA PURIFICACIÓN CON GRADIENTE DE PERCOLL ES MEJOR.

## A P E N D I C E

A) SOLUCION DE ALSEVER PH: 6,2

CLORURO DE SODIO (NACL).....	4.2	G
GLUCOSA.....	22.55	
ACIDO CITRICO (C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> .1 H <sub>2</sub> O).....	0.27	
CITRATO TRISÓDICO (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NA <sub>3</sub> O <sub>7</sub> .2 H <sub>2</sub> O).....	8.0	
AGUA DESTILADA C.B.P.....	1000.0	ML

ESTERILIZAR POR FILTRACIÓN A TRAVÉS DE MEMBRANA MILLIPORE DE 0,22 MICRAS. CONSERVAR A 4°C DURANTE UN MÁXIMO DE 2 MESES.

B) SOLUCION DE AULETTA PH: 6.4

NACL.....	9.0	G
CACL <sub>2</sub> ANHIDRO..1 G. ó CACL <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O.....	1.32	
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O.....	1.0	
AGUA DESTILADA C.B.P.....	1000.0	ML

ESTERILIZAR A 121°C/ 15 LB PRESIÓN POR 30 MIN.

C) SOLUCION AMORTIGUADORA NTE PH: 7.4

SOLUCIÓN DE NACL.....	0.15	M
SOLUCIÓN DE TRIS-HCL.....	0.05	M
SOLUCIÓN DE EDTA.....	0.001	M
AGUA DESTILADA C.B.P.....	1000.0	ML

ESTERILIZAR A 121°C/ 15 LB DE PRESIÓN POR 30 MIN.

D) SOLUCION DE AULETTA CON ALBUMINA SERICA BOVINA (ASB)

SOLUCIÓN DE AULETTA.....	100.0	ML
ALBUMINA SÉRICA BOVINA (FRACCIÓN V).....	0.4	G

ESTERILIZAR CON FILTRO MILLIPORE DE 0,45 MM. Y GUARDAR EN CONGELADOR.

E) REACTIVO A: PARA DETERMINACION DE PROTEINAS (LOWRY)

A <sub>1</sub> ) TARTRATO DE SODIO Y POTASIO (C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> KN <sub>2</sub> O <sub>6</sub> · 4 H <sub>2</sub> O).....	2.0	G
AGUA DESTILADA C.B.P. ....	100.0	ML
A <sub>2</sub> ) SULFATO DE COBRE (CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O).....	1.0	G
AGUA DESTILADA C.B.P.....	100.0	ML
A <sub>3</sub> ) CARBONATO DE SODIO (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ).....	20.0	G
HIDRÓXIDO DE SODIO (NaOH).....	4.0	G
AGUA DESTILADA C.B.P.....	100.0	ML

• EL REACTIVO A ES UNA MEZCLA DE:

- 0.5 ML DE A<sub>1</sub>
- 0.5 ML DE A<sub>2</sub>
- 50 ML DE A<sub>3</sub>

F) REACTIVO B: PARA DETERMINACION DE PROTEINAS (LOWRY)

FOLIN- CIICALTEAU.....	1.0	ML
AGUA DESTILADA .....	1.0	ML

G) SOLUCION SALINA AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (SSAF) PH:7.8

DISOLVER EN 700 ML DE AGUA DESTILADA Y DESIONIZADA

CLORURO DE SODIO (NaCl).....	8.0	G
CLORURO DE POTASIO (KCl).....	0.2	G
FOSFATO DE SODIO DIBÁSICO ANHIDRO		
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.96	
FOSFATO DE POTASIO MONOBÁSICO		
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O.....	0.2	

AFORAR CON AGUA DESTILADA A 1000 ML Y AJUSTAR PH A 7.8. ESTERILIZAR POR CALOR HÚMEDO A 121° C DURANTE 15 MIN.

H) SOLUCION PATRON DE PROTEINA 1 MG/ ML.

ALBÚMINA SÉRICA BOVINA.....	1.0	MG
SOLUCIÓN SALINA DE FOSFATOS (SSAF).....	1.0	ML

I) SOLUCION AMORTIGUADORA TRIS-HCL 0.1 M PH:7.6\*

A) TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO.....	0.2	ML
(24.2g DE C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> EN 1000 ML DE AGUA DESTILADA).		

B) ACIDO CLORHIDRICO 0.2 M

\* MEZCLAR 50 ML DE LA SOLUCIÓN A Y 38.4 ML DE LA SOLUCIÓN B DILUIDOS EN UN TOTAL DE 200 ML DE AGUA DESTILADA Y AJUSTAR EL PH.

J) SOLUCION DE SACAROSA AL 50%

SACAROSA.....	50,0	G
AGUA DESTILADA C.B.P.....	100	ML

K) SOLUCION DE SACAROSA AL 30%

SACAROSA.....	30	G
AGUA DESTILADA C.B.P.....	100	ML

L) SOLUCION SATURADA DE SULFATO DE AMONIO PH: 7,4

ADICIONAR A 1 LITRO DE AGUA DESTILADA 316 G DE SULFATO DE AMONIO PARA TENER UNA SOLUCIÓN DE 40% DE -- SATURACIÓN A 20°C AJUSTANDO PH A 7.4 USANDO HCL. -- CONCENTRADO O NAOH 0.4 N.

M) GRADIENTE DE PERCOLL

SOLUCIÓN A: PH: 7,4

SACAROSA.....	21.40	G
ASB (FRACCIÓN V).....	0.25	
TRIS-BASE .....	0.151	

SOLUCIÓN B: PH: 7,4

SACAROSA.....	2.14	
ASB (FRACCIÓN V).....	0.025	
TRIS-BASE.....	0.015	

## R E A C T I V O S

PROCEDENTE DE J.T. BAKER, S.A. DE C.V., XALOSTOC, MEXICO.

ACIDO CITRICO, CAT. 0110, LOT M-36641  
CITRATO DE SODIO, CAT 3646, LOT M-29760  
FOSFATO DE SODIO, CAT 3818, LOT 30193  
ETILENDINITRILOTETRACETO DISODICO (EDTA) 8993 LOT 26799

PROCEDENTE DE MERK, S.A., ESTADO DE MEXICO, MEXICO.

ACIDO CLORHIDRICO, CAT. 317, LOT 209296 R  
CARBONATO DE SODIO, CAT 106391, LOT 206154 R  
CITRATO TRISODICO DIHIDRATADO, CAT 106448, LOT 21131  
CLORURO DE CALCIO, CAT. 2382, LOT 903385  
CLORURO DE SODIO, CAT. 204936, LOT 106570 N  
ETANOL ABSOLUTO, CAT. 15853, LOT 211430 N.  
FOSFATO DE POTASIO MONOBASICO, CAT. 104873, LOT 901618  
FOSFATO DE SODIO DIBASICO ANHIDRO, CAT. 206586  
HIDROXIDO DE SODIO, CAT. 6598, LOT 214102 R  
SACAROSA, CAT. 7651, LOT 3985251 R  
SULFATO DE AMONIO, CAT 1217, LOT. 40514  
SULFATO DE COBRE, CAT. 2790, LOT 6535 N  
TARTRATO DE SODIC Y POTASIO, CAT. 108087, LOT 103480 R  
TRIS (HIDROXIMETIL) AMINOMETANO, CAT. 8382, LOT 96602 B

PROCEDENTE DE SIGMA CHEMICAL CO., ST., LOUIS Mo., E.U.A.

ALBUMINA SERICA BOVINA, FRACCION V, CAT. A-9647, LOT.71F-0356

PROCEDENTE DE SIGMA DE MEXICO, S.A. MEXICO, D.F.

PERCOLL, LOT. 56-F- 02951

## IX

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Bradford, M. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilising the Principle of Protein-Dye Binding", Anal. Biochem., 72:248-254 ---- (1976).
- 2.- Brakke M.K. "Density Gradient Centrifugation; A New Separation Technique", J. Amer. Chem. Soc. 73: 1847-1848 (1951).
- 3.- Brakke M.K. "Zonal Separation by Density Gradient Centrifugation", Arch. Biochem. Biophys., 45:275-290 (1953)
- 4.- Brakke M.K. "Density Gradient Centrifugation". IN METHODS - IN VIROLOGY, 1, p.93. K. Maramorosch and H. Koprowky. eds. -- Ed. Academic Press, New York. (1967).
- 5.- Cooper, L.Z., Frugman, S. "Clinical Manifestations of Post natal an Congenital Rubella. Arch. Opht. 77: 434 (1967).
- 6.- Cooper, T.G. "THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY". Ed. John Wiley -- and Sons. New York (1977).
- 7.- Cooper, L. Krugman, S. Rubella In: Virology Fields. eds. -- Ed. Raven Press. New York. (1985).
- 8.- Davis, B.D., Dulbecco, R. Tratado de Microbiología 2a. ed. Ed. Salvat Editores, S.A. Barcelona. pp.1354-1381.(1983).
- 9.- Fenner F., White D.O. VIROLOGIA MEDICA. 2a. Edición. Ed. -- la. Prensa Médica, S.A. México. (1979).
- 10.- Fields B.N. VIROLOGY Ed. Raven Press. New York. pp.1005-1020 (1985).
- 11.- Fudenberg, MICROBIOLOGIA MEDICA, 11a. edición Ed. El Manual-Moderno. México, D.F. (1985).
- 12.- Gaidamovich, S.Y., Klisienco, G.A., Shangan, M.K. "New ---- Aspects of Laboratory Techniques for Studies of Colorado --- Tick Fever". Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:526-529 (1974).
- 13.- Griffith, O.M. "Technique of Preparative Zonal and Continuous Flow Ultracentrifugation". Technical Booklet, Bechman, Palo Alto, Ca. 50pp. (1979).

- 14.- Habel, K. **FUNDAMENTAL TECHNIQUES IN VIROLOGY**. Ed. Academic Press. New York. (1969).
- 15.- Hinton, J. and Dobrota, M. "Density Gradient Centrifugation". **IN LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR --- BIOLOGY**. Ed. T.S. Work and E. Work., Northe-Holland., ---- Amsterdam, 290 pp. (1976).
- 16.- Ho. L. and Cohem, A. "Rubella Virus Haemagglutinin Association With a Single Virion Glicoprotein". Archives of Viro-  
logy. 84: 207-215 (1985).
- 17.- Ho. L. and Cohem, A. "Degradation of Rubella Virus Envelope Components". Archives of Virology 65: 1-13 (1980)
- 18.- Hortsman, D.M. Rewiew Rubella: "The Challenge of its Control" J.Infec. Dis. 23: (6): 640-654.(1974)
- 19.- Jawetz, E. 1985 **MICROBIOLOGIA MEDICA**. 11a edición. El Manual Moderno. México,D.F. (1985).
- 20.- Khan, M., Khan R.J. and Posner, B. "A Method for Quantitation of Protein in the Presence of Percoll: Analytical Biochemis - try. 117:108-112. (1981).
- 21.- Kumate, J. **INMUNIDAD, INMUNIZACION Y VACUNAS**, 2a. edición. - Editoriales Médicas del Hospital Infantil de México, ----- México,D.F. (1979).
- 22.- Kumate, J. **MANUAL DE INFECTOLOGIA**. 10a. edición Ed. Francis- co Méndez. México,D.F. (1984).
- 23.- Kurstak, E. and Kurstak, C. "COMPARATIVE DIAGNOSIS OF VIRAL- DISEASES". Vol.I. In: Human and Related Viruses. Part. A. -- Ed. Academic Press. New York. (1977).
- 24.- Laguna Mejía J., Martín Sosa S. y Magaña, M.C. "Investiga -- ción de Anticuerpos Antivirus del Sarampión y Antivirus de - la Rubéola en Pacientes de la Población Universitaria". Memo  
rias, IV Jornadas Internas de Trabajo y 1er. Congreso Nacio-  
nal de Salud Escolar y Universitaria. Dir. Gral. de Servicios Médicos de la UNAM. México,D.F. (1979).
- 25.- Lennette, E.H. **MANUAL DE MICROBIOLOGIA CLINICA**. 3a. edición Ed. Panamericana. México,D.F. (1982).

- 26.- Liebhaber, H., "Measurement of Rubella Antibody by Hemagglutination Inhibition". J. Immunol. 104: 818-825. (1970).
- 27.- Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951).
- 28.- Miller, E. Cradeck-Watson J.E.P. "Consequences of Confirmed Maternal Rubella at Successive Stages of Pregnancy". Lancet. 9:781-784 (1982).
- 29.- Oker-Blom, C. Kalkkinen, M., Kääñänen, L. and Petterson, -- R.F. "Rubella Virus Contains One Capsid protein and Three-- Envelope Glycoproteins, E<sub>1</sub>E<sub>2</sub> and E<sub>2</sub> b". J. Virol 46:964-973. (1983).
- 30.- Parkam, H. Rubiviridae: Rubella Virus. In: HANDBOOK SERIES IN CLINICAL LABORATORY SCIENCE. D. Seligson, eds. Ed. C.R.C. Press. New York. pp (1978).
- 31.- Payment "Le virus de la Rubéole I. Morphologie et Proteines Structurales". Can. J. Microbiol. 21: pp (1975)
- 32.- Payment, P. and trudel. M. "Concentration and Purification of Viruses by Molecular Filtration and Ultracentrifugation- Methods". Centre de Recherche en Virologie, Institut Armand Frappier, CP. 100 Laval, Quebec, Canada. H 7 N 4z3.pp.436 - 450. (1983).
- 33.- Pertoft, H., Laurent, T. Laas, and Kagedal, "Density Gra -- dient Prepared From Colloidal Particles Coated by Polivinyl pyrrolidone (Percoll)". Anal. Biochem. 38:271-283 (1978)
- 34.- Pertoft, H., "Herpes Simplex Virus a Simple Purification -- Procedure". Biomedial Centre Uppsala University.
- 35.- Richwood, D. "Isopycnic Centrifugation in Non Ionic Media", In: CENTRIFUGAL SEPARATION IN MOLECULAR CELL BIOLOGY. C.D. -- Bernie and D. Rickwood, eds., Ed. Butterworths, London. ---- (1978).
- 36.- Rhodes, A.J., Paul, Rubella Virus Infection Diagnosis of --- Viral Diseases. Vol. I. In: HUMAN AND RELATED VIRUSES PART - A. Ed. Academic Press. New York. (1977).
- 37.- Robin, J. and Dery, C. "The Genome of Bluegill Virus". Can. J. Microbiol. 28: 58-64 (1982).

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

69.

- 38.- Scholzer, G. and Breese, S. "Purification of African Malignant Catarrhal Fever. Virus Using a two Phase Aqueous Polymer -- System". J.Gen Virol. 59:101-110 (1982) .
- 39.- Schmidt, N.J. Lennette E. "Physical and Immunologic Properties of Rubella Antigens". J. of Immunol. 100: 851-857 ---- (1968).
- 40.- Sedwick, D. and Franstser, S. "Nucleic acid of Rubella Virus and its Replication in Hamster Kidney Cells" Journal of Virology 5: 478-489 (1970).
- 41.- Sever, J. Rubella Diagnostic Test: What is a Significant Result. Post. Graduate Medicine 71: 71-77 (1982).
- 42.- Svennerholm, B.A., Vahlme, S. Jeansson, R. Lunden, S.Olofsson "Simplex Virus Virions and Nucleocapsids on Percoll Gradients" J. Virol. Methods. 1. 363-309 (1980).
- 43.- Stewart, G.L. and Parkaman P. "Rubella Virus, Hemagglutination Inhibitions Test. The England Journal of Medicine. 10:554-557 (1969).
- 44.- Traavik, T. and Spanne C. "Rubella Serology: A Comparison of four Methods for Exclusion of Non- Specific Serum Inhibitor" J. Hyg Camb. 86:315-317 (1980).
- 45.- Trudel, M. "Identification of Rubella Virus Structural Proteins by immunoprecipitation". J.of Virol Methods.5:191-197 (1982).
- 46.- Tamura, T.A. and Takano, T. "A New Rapid Procedure for the -- Concentration of C-type Viruses From Large Quantities of -- Culture Media: Ultrafiltration by Diaflo Membrane and Purification by Ficoll Gradien Centrifugation". J. Gen. Virol. 41: 135-141 (1978).
- 47.- Trudel, M. Marchessault, F. and Payment, P. "Purification of Infectious Rubella Virus by Gel Filtration on Sepharosa 2 B Compared to Gradien Centrifugation in Sucrosae Sodium Metrizoate and Metrizamide". J. of Virol. Methods. 2: 141-148. -- (1981).
- 48.- Trudel, M. Nadon, R. Contains, M. and Payment. "Antibody -- Response to Rubella Virus Proteins in Diferent Physical Forms". Antiviral Research. 2: 347-354 (1982).

- 49.- Vahro, M. and Slenczka W. "Rapid Purification of Lymphocytic Choriomeningitis Virus by Density Gradient. Centrifugation in Colloidal Silica". J. Gen Virol. 42: 215-218 (1978).
- 50.- Van, Alstyne, Krystal, G. and Kettys, G. "The Purification of Rubella Virus and Determination of Polipeptide Composition" -- Virology . 108: 491-498. (1981).
- 51.- Waxham, M.N. and Wolinsky, J.S. "Immunochemical Identification of Rubella Virus Hemagglutinin". Virology.126: 194-203.(1985).
- 52.- Weir.D.M. HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. Vol. 1., 3a. edición, Ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford. (1978).
- 53.- Yolken, R.H. "Enzyme Immunoassays for the Detection of ---- Infectious Antigens in Body Fluids: Current Limitations and Future Prospects". Review of Infectious Diseases 4: 35-63 (1982)
- 54.- Zinsser, H. MICROBIOLOGIA 17a. edición Ed. Panamericana, México, D.F. (1983).