

2.2 Can we count the number of viruses?

2.2 ¿Podemos contar cuántos virus hay?

Hoy vamos a ver algunos de los procedimientos que se emplean para determinar el número de virus en un volumen determinado y así establecer su concentración. Esto se denomina “cuantificación”. La cuantificación vírica es esencial en investigación y desarrollo, para preparar vacunas, o para saber la cantidad de virus que se añaden a los cultivos tisulares. Pero también en diagnóstico, para evaluar la respuesta del paciente a la terapia antiviral.

Se han descrito diversos métodos para cuantificar los virus, valorando la infectividad de los mismos, o su ácido nucleico o sus proteínas, o incluso contando directamente el número de partículas. En este video vamos a hablar de algunos de ellos.

Ensayos en placa

Uno de los métodos más habituales para cuantificar virus es el ensayo de placas, sobre todo en virus que lisan las células que infectan. Consiste en infectar cultivos tisulares dispuestos en placas o en pocillos, con diluciones del virus problema. Un primer paso es retirar el medio de cultivo para que el contacto entre los virus y las células sea óptimo. Tras una breve incubación, se cubren los cultivos con agar semisólido. De esta forma se evita que el virus se disperse libremente y tan sólo infectará a células contiguas a las ya infectadas. Transcurridos unos días se puede ver el desarrollo de zonas circulares transparentes, señal de que el virus ha lisado las células. Estas son las denominadas “placas”. El número de placas depende del número de viriones en el inóculo, y se asume que cada placa se formó a partir de una partícula vírica en la muestra. Se cuentan manualmente, generalmente a simple vista, siendo más fácil verlas tras retirar el agar semisólido y teñir las células, por ejemplo, con cristal violeta. El resultado se expresa como unidades formadoras de placa o PFU por mililitro. Para calcular este valor lo más correcto es añadir la suspensión vírica por triplicado y hacer la media de los tres valores. Finalmente, sólo queda dividir este valor por la dilución empleada y por el volumen añadido a la placa, como puedes ver en el ejemplo de la imagen.

Unidades formadoras de focos

Te estarás preguntando cómo hacer este ensayo si los virus no producen lisis ¿verdad? El truco consiste en emplear anticuerpos específicos frente a las proteínas víricas, marcados con un reactivo fluorescente. Este tipo de ensayos con reactivos marcados lo veremos en el video 4.2. Es un método más rápido que el ensayo en placa, puesto que los resultados se observan entre 24 y 72 horas tras la infección. Pero es más caro, ya que se necesitan más reactivos.

Determinación de TCID50

La TCID50 cuantifica la cantidad de virus necesaria para destruir o producir cualquier otro tipo de efecto citopático en el 50% de las células o cultivos infectados. Se considera más precisa que los métodos anteriores porque las concentraciones que producen el 100% de efecto pueden variar ampliamente, siendo el valor del 50% el más preciso. Se aplica una fórmula matemática, de la que hablaremos en el video 4.1, que se emplea para otras muchas mediciones, como la dosis infectiva 50, etc. El valor TCID50 es diferente del valor por ensayo de placas, y estadísticamente, una unidad TCID50 equivale a 0,69 PFU.

Ensayos de proteínas

También se puede cuantificar la concentración vírica determinando la cantidad de proteínas, tanto totales como específicas de un virus. Esto se puede hacer mediante técnicas como la hemaglutinación, el Western Blot, los inmunoensayos o el ELISA. De la mayoría de estas técnicas hablaremos en otros videos.

Algunos laboratorios recurren a otras técnicas, como son las siguientes.

Para cuantificar virus mediante citometría de flujo (de la que hablaremos en el video 4.4) se emplean dos fluorocromos diferentes: uno para marcar las proteínas víricas y otro para marcar el ácido nucleico vírico. La PCR cuantitativa, que veremos en el video 3.3, mide el ARN tanto asociado a los viriones como libre. Finalmente, también se puede cuantificar la cantidad de virus utilizando el microscopio electrónico de transmisión que acabamos de ver en el video anterior.

Por cualquiera de los sistemas anteriores se puede llegar a saber aproximadamente el número de viriones por mililitro. Otro concepto interesante es el MOI que significa multiplicity of infection, que es el número de viriones que se añaden por célula durante la infección. Así, si se añade un millón de virus a un millón de células, la MOI es uno.

Como ves, se pueden seguir diferentes estrategias para cuantificar virus. Aquí te hemos hablado de unas pocas, pero hay muchas más. Muchas gracias por tu atención.