

4.1 Protection against viruses in a tube (Seroneutralization)

4.1 Protección frente a los virus en un tubo (Seroneutralización)

Bienvenidos a un nuevo bloque de videos de este curso, en el que hablaremos del diagnóstico de la infección vírica a través de la respuesta inmunitaria que los virus provocan en el hospedador. Empezamos viendo cómo se evalúa el papel protector de los anticuerpos, lo que se realiza mediante ensayos de seroneutralización o neutralización vírica.

Como bien sabes, para que un virus infecte a una célula se debe producir un reconocimiento entre el receptor celular y ciertas moléculas o epitopos de la superficie del virus. Pues bien, determinados anticuerpos pueden rodear a esas moléculas víricas e impedir que sean reconocidas por el receptor. Estos anticuerpos se denominan neutralizantes y son muy importantes porque realmente van a bloquear el progreso de la infección, así que son protectores. Como todos los anticuerpos, son muy específicos, y si las moléculas víricas varían, no se unirían a ellas y dejarían de ser protectores.

La seroneutralización se considera la técnica que mejor refleja la correlación virus-anticuerpos *in vivo* e *in vitro*. Se trata de una técnica cuantitativa, por lo que realizaremos diluciones del suero problema y añadiremos una cantidad constante de virus. Tras incubar para que haya reacción antígeno-anticuerpos, se añaden las mezclas a un sistema susceptible para ver la infectividad residual del virus. Los sistemas susceptibles pueden ser animales de experimentación, huevos embrionados o cultivos celulares, donde el virus no neutralizado pueda producir un efecto reconocible, como pueden ser muerte, lesiones específicas, efecto citopático, hemaglutinación, formación de sincitios, etc.

Hay distintas formas para preparar las diluciones del suero, pero se diferencian sólo en las proporciones. Aquí vamos a hacer diluciones dobles seriadas, para lo que prepararemos una batería de 10 tubos, a los que añadimos 250 µl de medio de cultivo. A continuación agregamos 250 µl del suero al primer tubo, mezclamos bien y pasamos 250 µl de la mezcla al siguiente tubo, y así sucesivamente. Cada vez que pasamos de un tubo a otro diluimos la cantidad de anticuerpos presentes en el suero a la mitad. Es decir, en el primer tubo la dilución será 1:2, en el siguiente 1:4, en el siguiente 1:8, y así hasta el tubo 10 donde será 1:1024. Debemos seguir el mismo procedimiento con unos controles positivo y negativo de suero. A continuación añadimos a los 10 tubos 250 µl de la concentración adecuada de virus (con lo que volvemos a diluir a la mitad), agitamos e incubamos 60 minutos a 37°C para que los posibles anticuerpos neutralizantes del suero reaccionen con los epitopos del virus de unión al receptor celular.

Como he dicho antes, la neutralización se puede observar en animales de experimentación, huevos, o cultivo tisular. Aquí vamos a hacerlo en cultivo tisular. Trasladamos 100 µl de cada mezcla suero-virus por cuádruplicado a pocillos de una placa de 96 pocillos en los que hemos cultivado células susceptibles al virus e incubamos las placas 2 o 3 días o el tiempo necesario para observar el efecto citopático con el microscopio. Si en el suero hay anticuerpos neutralizantes, no se producirá ningún efecto. Por supuesto, hay que comparar los resultados del suero problema con los controles positivos y negativos.

Este método cuantitativo nos permite conocer el llamado **título de anticuerpos**, en este caso neutralizantes, que se define como el denominador de la dilución más alta en la que se observa neutralización completa del efecto citopático en el 50% de los pocillos. Para esto se aplica una fórmula estadística. Así, tras introducir los datos en la fórmula el resultado indica a cuánto

debemos diluir el suero para obtener protección en el 50% de los pocillos, de los animales, o de los huevos, dependiendo del sistema que hayamos usado.

Esta fórmula es muy útil, y se emplea mucho para hallar la concentración de virus que produce muerte o infección en el 50% de los animales (dosis letal 50, o dosis infectiva 50, respectivamente), en el 50% de los pocillos (que es el TCID 50), etc.

Como ves, la seroneutralización o neutralización vírica es una técnica algo laboriosa y más lenta que las técnicas que veremos en el siguiente video, pero es muy específica y sensible y se considera prueba de referencia para cualquier valoración serológica.

Muchas gracias por tu atención.