

CUANTIFICACION DE LOS VIRUS

“La reproducibilidad es el requerimiento fundamental de toda ciencia”

(Robert M. Friedman).

Se entiende por cuantificación viral la medición de la actividad biológica de una suspensión de virus. Para el efecto se han ideado una serie de unidades de medida, que como en todos los casos, fueron arbitrarias en un principio, pero que a medida que mostraron su bondad fueron ganando una aceptación universal. La universalidad es quizá la más importante de todas las características de un patrón de medida, pues aún si la medida no es muy precisa lo importante es que en todas partes se trabaje con el mismo margen de error. Podríamos decir, parafraseando a Friedman, que no puede haber ciencia si no existen unos patrones de aceptación universal para la medición del objeto de la ciencia. Las experiencias científicas sólo pueden ser reproducibles en la medida en que los diferentes investigadores de todas partes del mundo utilicen los mismos métodos y sólo en ese momento podemos hablar de una verdadera ciencia.

Lo primero en que podríamos pensar en el momento de hablar de cuantificación de virus, es el microscopio electrónico. Desafortunadamente, a pesar de que este instrumento ha sido sumamente valioso para acercarnos al entendimiento de la estructura de los virus, no tiene mayor valor para efecto de medir la actividad biológica, ya que no todas las partículas observables al microscopio son infecciosas (en el caso de la influenza que es muy infecciosa, sólo una de cada 15 partículas virales producidas por una célula infectada es contagiosa; en el caso de los papilomavirus, la proporción de partículas infecciosas puede disminuir hasta 1 por 100.000).

Compatible con la idea de un veneno, una de las unidades de medida de la actividad viral, de más frecuente uso, es la **dosis letal 50% (DL50)**. Con esta unidad buscamos la dilu-

ción mínima de una suspensión viral que es capaz de matar el 50% de los huéspedes indicadores. En un principio, los virus se probaban en los mismos huéspedes naturales, inclusive se utilizó el mismo hombre para los estudios iniciales de la Fiebre Amarilla. Posteriormente, los modelos de laboratorios fueron reemplazando al huésped natural: los huevos embrionados, los ratones lactantes y posteriormente los cultivos celulares, entre los más importantes. Entre estos huéspedes de laboratorio, los ratones merecen especial mención, pues ellos representan el modelo de laboratorio de más amplio uso, debido al amplio espectro de agentes virales a que son susceptibles, y debido también a la facilidad para la manipulación, a la prolificidad y sobre todo a la posibilidad de unificar su genotipo para disminuir la variación individual y hacer los resultados mucho más reproducibles.

Para hacer una titulación de una muestra de virus utilizando la DL50, se procede de la siguiente forma:

1. Se hacen diluciones decimales de la muestra (por ejemplo de 10^{-1} a 10^{-8});
2. Se inocula una cantidad constante de cada dilución en una camada de 10 ratones lactantes entre 1 - 3 días de edad (la inoculación se puede hacer por varias vías pero generalmente en ratones de esta edad se usa la vía intracerebral, inoculando 0.03 cc.);
3. Inoculadas así 8 camadas de ratones cada una con una dilución diferente, se procede a observarlos dos veces diarias y a anotar la mortalidad.
4. Al cabo de varios días (dependiendo del virus), unas 48 a 72 horas después de que haya cesado la mortalidad, se procede a tabular los datos para calcular el punto final. Los datos se tabulan en la siguiente forma:

Dilución	Muertos	Sobrevivientes	Mortalidad acumulada	Sobrevivencia acumulada	Rata de Mortalidad	% de Mortalidad
10^{-1}	10	0	53	0	53/53	100
10^{-2}	10	0	43	0	43/43	100
10^{-3}	8	2	33	2	33/35	94.3
10^{-4}	8	2	25	4	25/29	86.2
10^{-5}	7	3	17	7	17/24	70.8
10^{-6}	5	5	10	12	10/22	45.5
10^{-7}	3	7	5	19	5/24	20.8
10^{-8}	2	8	2	27	2/29	6.9

Así encontramos que el 50% de mortalidad se da en algún lugar entre las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , que tienen un porcentaje de mortalidad de 70.8% y 45.5% respectivamente. Para encontrar la dilución exacta que nos mataría 50% de los ratones, tenemos que aplicar una de varias fórmulas existentes para encontrar la distancia proporcional entre estas dos diluciones. La más común es la fórmula o método de Reed y Muench.

$$DP = \frac{\text{o/o mayor al } 50\% - 50\%}{\text{o/o mayor al } 50\% - \text{o/o menor al } 50\%}$$

Para nuestro caso:

$$DP = \frac{70.8 - 50}{70.8 - 45.5}$$

$$DP = 0.8$$

Lo cual quiere decir que la distancia proporcional entre 10^{-5} y 10^{-6} es 0.8 o sea que la dilución que mata el 50% de los ratones es $10^{-5.8}$ o sea que el título del virus es $10^{5.8}$, pues el título se da como el recíproco de la dilución respecti-

va. En otros términos, esto quiere decir que en la dilución $10^{-5.8}$ tenemos una dosis letal 50.

Cada que se repita la experiencia, utilizando ratones de la misma cepa, de la misma edad; y utilizando la misma vía y la misma dosis, debemos encontrar el mismo resultado.

Otra unidad de medida de la actividad viral muy utilizada es la **dosis infecciosa 50^o/o (DI 50)**. Esta se utiliza cuando se está trabajando con células y consiste en calcular la menor dilución del virus que es capaz de producir un efecto citopático en el 50^o/o de las células inoculadas. Para el efecto se hacen diluciones en la misma forma como se hizo para calcular la DL50; luego se inocula una cantidad estándar de cada dilución en cada uno de 4 pozos de células (se utilizan platos de 96 pozos para este trabajo).

El cálculo del título se hace a simple vista, determinando la dilución que mata aproximadamente el 50^o/o de las células y el título será el recíproco de esa dilución. Este sistema de medida es de uso muy común, pero no es tan exacto como el cálculo de la DL50.

Otro sistema que utiliza células y que sí mide precisamente la actividad viral es el de la formación de placa (**Unidades formadoras de Placa, UFP**). Para ello se inoculan diluciones decimales de la muestra en pozos con células, las cuales se cubren con un medio semisólido a fin de limitar el movimiento de las partículas virales. En esta forma, el efecto citopatogénico originado en la infección de una célula, se limita a las células inmediatamente vecinas, formándose una placa que es fácilmente detectable a simple vista después de hacer una tinción con cristal violeta. Se encontrará que en las diluciones más bajas, o sea donde el virus está más concentrado, se producen tantas placas que prácticamente todo el cultivo celular desaparece; mientras que en las diluciones mayores se produce un menor número de placas hasta que finalmente ese número de placas se puede contar sin que haya interferencia con placas vecinas. El promedio de placas en una de estas diluciones de fácil recuen-

to, se multiplica por la dilución y por la cantidad de inóculo y se obtiene entonces el número de UFP/ml de la muestra de virus problema, así:

Si en la dilución 10^{-4} se obtienen en promedio 30 placas, el título del virus será de $30 \times 10.000 \times$ cantidad inoculada, generalmente $0.1 \text{ cc} = 30.000 \text{ UFP/ml}$.

Finalmente, otra unidad útil en la cuantificación de algunos virus es la **hemaglutinación (HA)**. Sólo los virus que tienen capacidad de aglutinar glóbulos rojos pueden cuantificarse por este método. Los principales virus en este grupo son los de las familias Ortomixoviridae y los Paramixoviridae. Estos virus tienen una aglutinina en su superficie a través de la cual pueden interactuar con glóbulos rojos de algunas especies, bajo determinadas condiciones de concentración iónica y pH. La prueba se hace de la siguiente forma:

En primer lugar se debe disponer de glóbulos rojos de la especie apropiada; por ejemplo glóbulos rojos de gallina si vamos a trabajar con el virus de la influenza (en su defecto, podríamos utilizar glóbulos rojos humanos tipo O). Luego hacemos diluciones de la muestra problema, en este caso utilizamos diluciones dobles y mezclamos cantidades iguales de virus y de glóbulos rojos diluidos al 10%, en tubos o en platos de fondo en U.

La unidad hemaglutinante será la dilución mayor que es capaz de aglutinar los glóbulos rojos en forma completa. Así podemos encontrar que en las diluciones de 1:2 hasta 1:64 hay aglutinación, pero no hay aglutinación completa en 1:128. Se dice entonces que el título del virus es 1:64 o sea que en esta dilución tenemos 1 UHA.

El sistema de la hemaglutinación es muy práctico y de fácil visualización, pero como ya mencionamos sólo los virus que tienen una hemaglutinina pueden hemaglutinar y en este caso sólo algunos tipos de glóbulos rojos.

La HA si bien se la puede considerar una actividad biológica de los virus, no se puede comparar con las unidades mencionadas inicialmente, pues no todas las partículas que causan HA son necesariamente infecciosas, ya que la HA es una propiedad de las superficies más externas del virus y no nos dice nada de la integridad de la información genética de la partícula viral.

Para finalizar debemos aprovechar la oportunidad para mencionar otra aplicación de la formación de placas en estudios básicos de los virus. Se trata de la clonación de virus. Cuando se toma una muestra de garganta de un paciente con rinovirus, por ejemplo, los virus que se aíslan son muy diversos desde el punto de vista genético; es decir que existen subpoblaciones de virus con pequeñas o grandes diferencias. Si se quiere tener una población de rinovirus clonados, podemos colocarlos en un sistema de formación de placas y vamos a encontrar que se observan placas grandes, pequeñas y medianas; cada una de estas placas es producida por una partícula viral con características genéticas diferentes, a pesar de ser todas del rinovirus (como somos diferentes las personas a pesar de pertenecer a la misma especie). Pues bien, si se quiere separar estas subpoblaciones, podemos con una micropipeta tomar el material correspondiente a placas pequeñas, aparte del material de placas medianas y aparte del material de placas grandes; posteriormente infectamos un nuevo substrato celular con cada uno de estos materiales y encontramos que solamente se producirán placas pequeñas o grandes o medianas y en caso de que todavía persista alguna contaminación podemos repetir el proceso hasta tener subpoblaciones completamente puras (virus clonados).

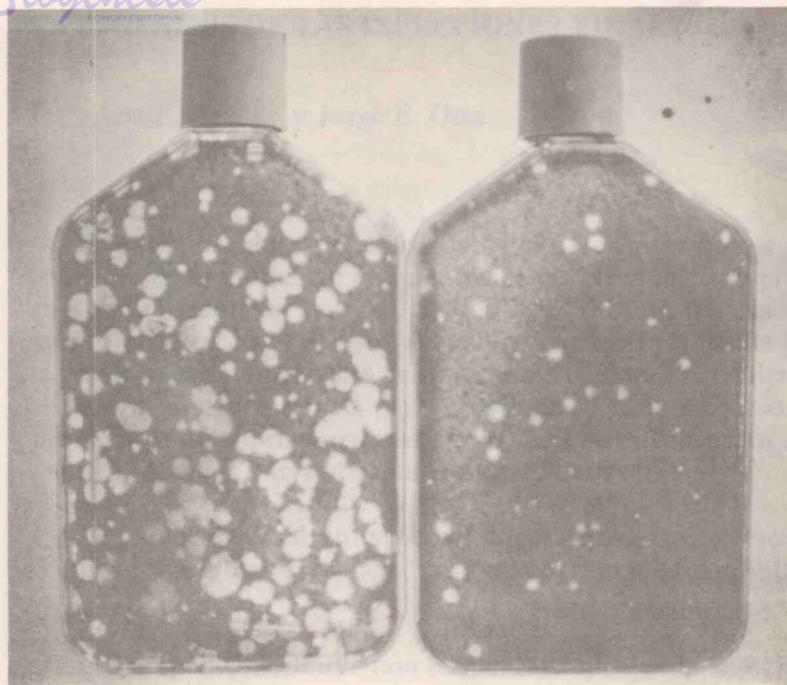


Fig.1 Técnica de formación de las placas. Los frascos con células fueron inoculados con dos diluciones del virus Herpes Simplex. Véase la diversidad en el tamaño de las placas.

El número de unidades infecciosas (U.I.) que se forman en un momento dado

