Biogénesis
FONDO EDITORIAL

Capítulo 5

CUANTIFICACIÓN VIRAL

Juan Carlos Zapata J.

Se entiende por cuantificación viral la medición de la actividad biológica de una suspensión de virus. Para el efecto se ha 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 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 (esto sería el máximo de precisión posible). Podríamos decir 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. (Sin embargo debemos reconocer que estos principios generales clásicos han venido siendo objeto de críticas crecientes a través de discursos contra el método y de los nuevos paradigmas antimecaniscistas).

Los grandes avances en el conocimiento de los virus que afectan plantas, bacterias y animales han sido fundamentales para el desarrollo de métodos confiables para la cuantificación viral. La respuesta en estos hospederos puede ser medida en términos cuantitativos (ensayos en placa, focos fluorescentes, centros infecciosos y transformación) o de todo o nada, en la cual se mide la presencia o ausencia de infección.

Cuando se piensa en cuantificación viral lo primero que se nos viene a la mente es el microscopio electrónico. Este instrumento ha sido fundamental en la dilucidación de la estructura de los virus, sin embargo en la cuantificación viral no es útil debido a que no todas las partículas virales son infecciosas (del virus de la influenza sólo una de cada 15 partículas es infecciosa) y, además, lo dispendioso y el alto costo del proceso hace que el uso de la microscopía electrónica se restrinja a la investigación.

Biogénesis FONDO EDITORIAL

El primer sistema en el que se identificó a los virus, como agentes filtrables, fue en la planta del tabaco (nicotiana tabacum, var. Xanthi nc). En esta se desarrolló el primer método para cuantificar virus que se conoce como "ensayo de lesiones locales". El método consiste en aplicar un detergente abrasivo en las hojas para romper la pared celular; posteriormente se aplica el Virus del Mosaico del Tabaco (VMT), en este caso. El número de lesiones observadas será proporcional a la concentración de partículas virales infecciosas en la muestra; por ejemplo, si se aplica 0.1ml de una suspensión de VMT se podrían producir en la hoja, en promedio, 50 lesiones necróticas (figura 1); mientras que una décima parte de esta suspensión (0.01 ml) producirán, en promedio, 5 lesiones. Para evitar la variabilidad entre ensayos, usualmente se usa virus puro, en este caso VMT, de concentración conocida, como control; la mitad de la hoja se infecta con el virus desconocido y la otra mitad con el virus estándar (esto es posible porque este virus no se disemina en forma sistémica).

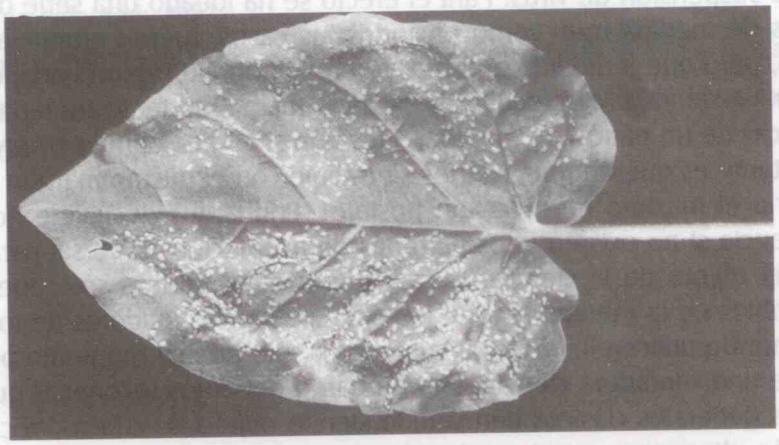

Figura 1. Lesiones inducidas por el VMT sobre hoja de nicotiana tabacum. (Tomado de Primrose S.B. and Dimmock N.J Introduction to modern virology. Second edition. Ed. Blackwell. 1980.)

La infectividad relativa de la suspensión viral desconocida se calcula con base en el análisis de 6 plantas (30 hojas, cada una infectada con virus estándar y virus desconocido), lo que da una seguridad del 15%. Debido al nivel de incertidumbre que se presenta por el poco número de lesiones detectadas, el cálculo de la concentración de unidades infecciosas (UI) se expresa como el promedio de las UI detectadas +/- un porcentaje que resulta del número de repeticiones (en el ejemplo anterior seria +/-15%).

En los primeros intentos de aislar y cuantificar agentes virales de mamíferos, se utilizaba el hospedero natural. Estos intentos se tropezaban con la complejidad propia del microorganismo, y las grandes diferencias en la sensibilidad de un animal a otro, incluso dentro de la misma especie. Este método fue mejora-

Biogénesis
FONDO EDITORIAL

do cuando se adaptaron animales al laboratorio, donde se podían controlar muchas de las variables que afectaban el sistema. En estos hospederos se desarrolló el método llamado dosis letal 50, que se analizará más adelante. Sin embargo, con el desarrollo del cultivo de células *in vitro*, el uso de modelos animales se hizo menos frecuente.

El desarrollo de la técnica de huevos embrionados para la propagación de virus, por Rous y Murphy en 1911, permitió que, a partir de la década de 1930, se identificaran un buen número de agentes virales. Algunos virus forman lesiones localizadas (llamadas pústulas) sobre la membrana corioalantoidea del huevo embrionado, mientras que otros producen hemorragias o muerte embrionaria (figura 2). Si se inoculan diluciones del virus, por ejemplo 4 huevos por dilución, se puede determinar el título en la suspensión viral. Este ensayo fue bastante utilizado antes del desarrollo del sistema de placas, pero en la actualidad es poco utilizado, pues es más engorroso y más variable. Sin embargo, los huevos embrionados siguen siendo muy útiles para la producción de algunas vacunas.

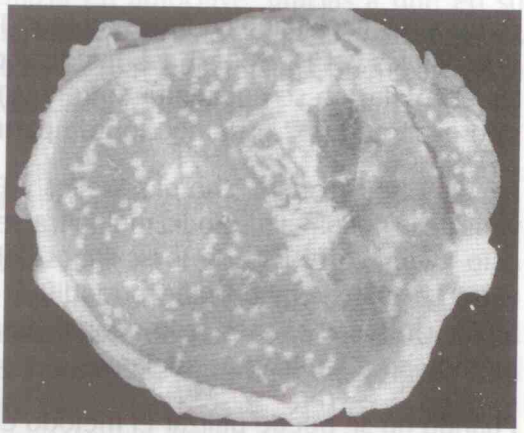

Figura 2. Fotografía de las pústulas que produce el virus Herpes Simplex sobre la membrana corioalantoidea de embrión de pollo. Tomado de Preier J.E. Basic medical virology. Williams and wilkins. 1966.

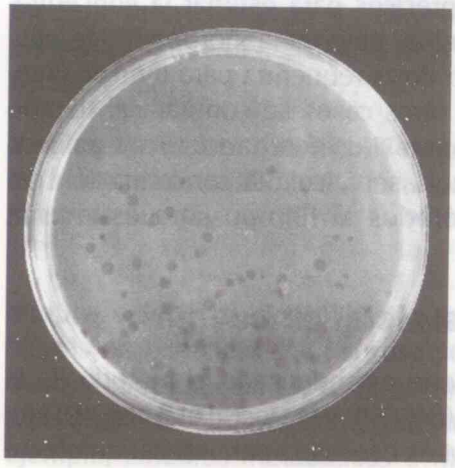

Figura 3. Ensayo en placa para determinar el número de partículas infecciosas en una suspensión viral.

En teoría cada placa es producida por la replicación de un solo virión.

En esta figura se muestra la acción del bacteriófago lamda sobre una capa de E. Coli. (Tomado de Primrose S.B. and Dimmock N.J Introduction to modern virology. Second edition. Ed. Blackwell. 1980.)

Biogenesis FONDO EDITORIAL

Posteriormente, con la identificación de los fagos, se desarrolló un sistema para cuantificar agentes filtrables que infectaban células procariotas. En este caso, se toma la suspensión que contiene los bacteriófagos y se mezcla con un exceso de bacterias susceptibles; se extiende la mezcla sobre un agar y se incuba. Las bacterias no infectadas crecen, mientras que las infectadas replican el virus y lo diseminan a las bacterias vecinas, de tal manera que muere un grupo de bacterias alrededor de la bacteria infectada originalmente, dejando una área o foco libre de células, que se denomina placa.

La concentración de partículas virales es directamente proporcional al número de placas detectadas. Teóricamente cada partícula infecciosa produce una placa por lo que el método se conoce como Unidades Formadoras de Placas (UFP). Puesto que este método detecta solamente las partículas infecciosas dejando a un lado otras partículas que podrían ser detectadas por otros métodos (detección de antígenos o de ácidos nucleicos), algunos autores proponen que este procedimiento debería llamarse evaluación viral y no titulación viral.

En los virus bacterianos o fagos, el fago T, por ejemplo, la relación entre partículas virales y UFP es de 1 a 2, mientras que para los virus de plantas y animales esta relación se encuentra entre 4 y 10.000 o más. Este hecho siempre ha sido explicado por la producción de partículas defectuosas o no infecciosas.

En 1949 John Enders, Thomas Weller y Frederick Robins demostraron que el virus de la poliomielitis podía multiplicarse en cultivos de células no neuronales; esto incentivó el uso de los cultivos celulares para la propagación de otros virus. En 1959, Renato Dulbeco modificó el ensayo en placa, desarrollado para titular virus bacterianos, y lo adaptó para el uso en la virología animal; este método se discutirá más adelante.

Cuando no se puede utilizar el método en placa para algunos virus animales o de plantas, se recurre a métodos menos precisos para estimar la concentración de virus infecciosos. Una de estas técnicas determina, por medio de diluciones seriadas, la mínima concentración o dosis requerida para inducir síntomas típicos de enfermedad sistémica. En otros casos se compara el tiempo necesario para producir cierta respuesta por un virus desconocido con un virus de concentración conocida y de esta manera se calcula la concentración del primero. También se utilizan ambos métodos al tiempo para estimar la infectividad viral.

Dosis infecciosa cincuenta y dosis letal cincuenta

Para medir el efecto de la infección, se tiene estandarizado el método de la Dosis Infecciosa 50%, en Cultivos Celulares (DICC50) y la Dosis Letal 50% (DL50). La Primera se define como la cantidad de virus necesaria para causar un efecto

Biogénesis

en el 50% de las células infectadas; la segunda se refiere al mismo concepto, pero el sistema indicador son animales vivos (ratones o embriones) y el efecto a medir es muerte del animal; se define, entonces, como la cantidad de virus necesaria para matar el 50% de los animales inoculados

Haciendo analogía con un veneno, la dosis letal 50, ha sido una de las formas más utilizadas de medir la actividad viral. En esta se busca la máxima dilución viral (o la mínima concentración) que es capaz de producir el 50% de mortalidad en los animales inoculados. Los ratones lactantes son los animales de laboratorio más utilizados en estos ensayos debido a que permiten la replicación de una gran cantidad de agentes virales, a la eficiencia reproductiva de esta especie, a la facilidad de manipulación y a la posibilidad de controlar su variación genética.

A manera de ejemplo, para calcular la DL50, se hacen diluciones decimales de la suspensión viral de concentración desconocida (ej 1/10, 1/100.....10^{-8}). De cada una de estas diluciones se inocula 0.03 ml a 10 ratones entre 1 y 3 días de edad. La ruta de inoculación varía dependiendo del tipo de virus, sin embargo la ruta más utilizada es la vía intracerebral (figura 4).

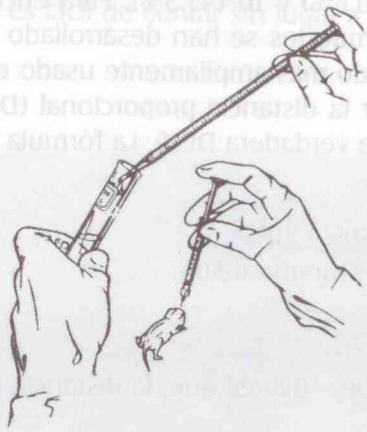

Figura 4. Inoculación de una suspensión viral en un ratón lactante por vía intracerebral. (Tomado de Ballew H.C, Lyerla H.C, Forrester F.T. Laboratory methods for diagnosing herpesvirus infections. C.D.C, Atlanta, 1979.)

Si preparamos 8 diluciones e inoculamos 10 ratones con cada dilución tendremos un total de 80 ratones, sin embargo debemos tener ratones control (inoculados con el diluyente) que nos permitan asegurar que el efecto sea debido al virus. Se hace seguimiento durante varios días (dependiendo del virus), observando los ratones 2 veces diarias y anotando la mortalidad. Entre 48 y 72 horas, después de que haya cesado la mortalidad, se tabulan los datos para calcular el punto final. Veamos:

Biogenesis FONDO EDITORIAL

Dilución	Muertos	Sobrevivientes	Mortalidad acumulada	Sobrevivencia acumulada	Tasa de mortalidad	% 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	95.3
10^{-4}	8	2	25	4	25/29	86.2
10^{-5}	7	3	17	7	7/24	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	6.96

Como podemos observar la dilución que produce el 50% de mortalidad en los ratones está entre 10^{-5} (70.8%) y 10^{-6}(45.5%). Para encontrar la dilución exacta que produce el 50% de muertes se han desarrollado diferentes procedimientos matemáticos. El método más ampliamente usado es el de Reed y Muench, el cual permite encontrar la distancia proporcional (DP) entre las dos diluciones, que corresponde a la verdadera DL50. La fórmula de Reed y Muench es la siguiente:

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

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

DP = 0.8 Así que, la distancia entre 10^{-5} y 10^{-6} es 0.8

Entonces la dilución que mata el 50% de los ratones es $10^{-5.8}$; pero por convención, el título viral se da como el recíproco de la dilución respectiva, esto es $10^{5.8}$. Decimos que 1 DL50 equivale a la cantidad de virus presente en 0.03 cc de la dilución $10^{-5.8}$. (que equivale a diluir 1 volumen de la suspensión viral original, en 630957.34 volúmenes del diluyente. Este número es el antilogaritmo de 5.8)

La DITC 50 se calcula haciendo diluciones seriadas (Dobles, cuádruples o decimales) de la suspensión viral, luego se inocula cada una de las diluciones, haciendo repeticiones de cada una, en un sistema de células que sea susceptible a la infección por el agente que se está evaluando (células de riñón de mono verde, por ejemplo, en el caso del Virus del herpes simplex). Posterior-

Biogénesis

mente, se mide el porcentaje de células muertas por medio de un colorante vital (rojo neutro) o no vital (cristal violeta) y se determina la dilución en la que se murió el 50% de las células. Esta dilución corresponde a 1 DITC50. La determinación del título en un plato coloreado se hace a simple vista (aunque el método se puede mejorar haciendo la medición por métodos colorimétricos).

Unidades formadoras de placa

Otro método para la cuantificación es el de Unidades Formadoras de Placa UFP. Para el efecto se hacen diluciones decimales de la muestra; se inoculan en pozos con monocapas de células y luego se cubren con un medio semisólido que reduce el movimiento browniano y limita la dispersión de las partículas virales, nacientes de la célula inicialmente infectada, a las células en la vecindad inmediata. De esta manera, el efecto citopático se localiza y se forma la placa. Veamos el ejemplo de la figura 4 que corresponde a una titulación del virus de la estomatitis vesicular, en células Vero. En las células donde se inocularon las primeras diluciones (10^{-1} y 10^{-2}), la monocapa está completamente destruida, pero en la dilución siguiente (10^{-3}), podemos observar el patrón de placas, si bien todavía no es posible el conteo de las mismas. En la dilución 10^{-4} el número de placas es fácil de contar sin lugar a ambigüedades: tenemos

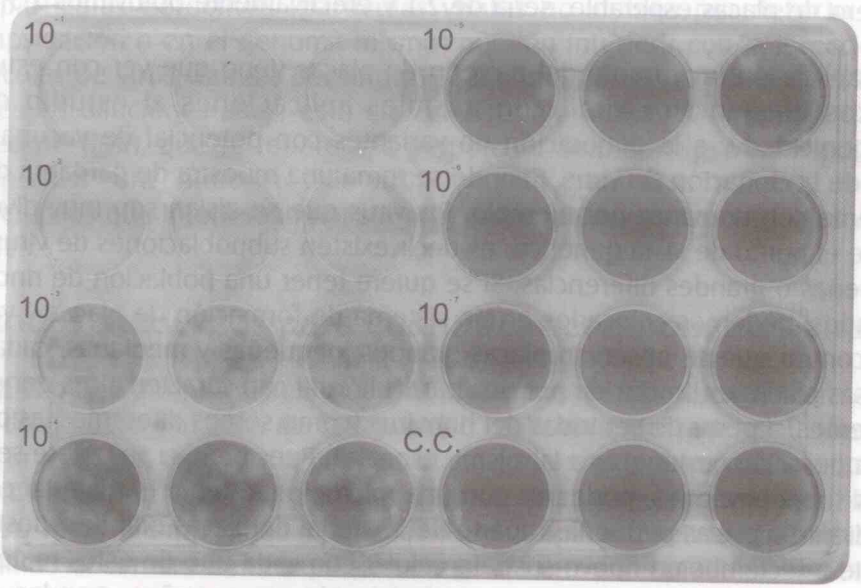

Figura 5. Titulación del virus de estomatitis vesicular en células Vero (riñon de mono) por el método de UFP. (Cortesía del médico veterinario Albeiro López. Laboratorio de virología universidad de antioquia).

Biogenesis FONDO EDITORIAL

entonces 16, 22 y 14 placas, que en promedio nos da 21 placas y con este dato procedemos al cálculo de la cantidad de Unidades Formadoras de Placa que contiene la suspensión de virus en la muestra. Para el efecto decimos que en la dilución 10^{-4} existen 21 x 10^4 placas, lo que equivale a 210.000 y puesto que el inóculo fue de 200 ul, multiplicamos por 5 para dar el título final en cantidad de placas por ml, que en este caso corresponde a 1.050.000 UFP/ml. Para obtener datos más confiables se recomienda que, en la medida de lo posible (que no fue el caso en nuestro ejemplo), el número de placas en la dilución donde se realice el recuento, sea aproximadamente de 30 en promedio.

En resumen, hemos hecho el siguiente cálculo:

$$UFP = \frac{\text{promedio de placas x recíproco de la dilución}}{\text{cantidad inoculada}}$$

$$UFP = \frac{21 \times 10^4}{0{,}2 \text{ ml}} = 1.05 \times 10^6 \text{ UFP/ml}$$

Para facilitar el entendimiento del asunto, digamos que el número de placas presentes en la dilución 10^{-3} sería de 210 en promedio, en 10^{-2} sería de 2100 y en 10^{-1} sería de 21.000; por esta razón las placas se superpusieron de tal manera que cubrieron la totalidad de la monocapa. Al contario en la dilución 10^{-5}, el número de placas esperable, sería de 2.1 y efectivamente obtuvimos 2.3.

Otra aplicación importante del método de placas tiene que ver con estudios básicos de genética viral, con posibles aplicaciones al estudio de la patogenicidad y a la generación de variantes con potencial de vacunas. 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 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 esas 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 grandes; posteriormente infectamos un nuevo sustrato celular con cada uno de estos materiales y encontramos que solamente se producirán placas pequeñas, grandes o medianas; y en caso de que todavía persista alguna contaminación podemos repetir el proceso hasta tener subpoblaciones completamente puras (virus clonados).

Biogenesis FONDO EDITORIAL

entonces 16, 22 y 14 placas, que en promedio nos da 21 placas y con este dato procedemos al cálculo de la cantidad de Unidades Formadoras de Placa que contiene la suspensión de virus en la muestra. Para el efecto decimos que en la dilución 10^{-4} existen 21 x 10^4 placas, lo que equivale a 210.000 y puesto que el inóculo fue de 200 ul, multiplicamos por 5 para dar el título final en cantidad de placas por ml, que en este caso corresponde a 1.050.000 UFP/ml. Para obtener datos más confiables se recomienda que, en la medida de lo posible (que no fue el caso en nuestro ejemplo), el número de placas en la dilución donde se realice el recuento, sea aproximadamente de 30 en promedio.

En resumen, hemos hecho el siguiente cálculo:

$$\text{UFP} = \frac{\text{promedio de placas x recíproco de la dilución}}{\text{cantidad inoculada}}$$

$$\text{UFP} = \frac{21 \times 10^4}{0{,}2 \text{ ml}} = 1.05 \times 10^6 \text{ UFP/ml}$$

Para facilitar el entendimiento del asunto, digamos que el número de placas presentes en la dilución 10^{-3} sería de 210 en promedio, en 10^{-2} sería de 2100 y en 10^{-1} sería de 21.000; por esta razón las placas se superpusieron de tal manera que cubrieron la totalidad de la monocapa. Al contario en la dilución 10^{-5}, el número de placas esperable, sería de 2.1 y efectivamente obtuvimos 2.3.

Otra aplicación importante del método de placas tiene que ver con estudios básicos de genética viral, con posibles aplicaciones al estudio de la patogenicidad y a la generación de variantes con potencial de vacunas. 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 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 esas 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 grandes; posteriormente infectamos un nuevo sustrato celular con cada uno de estos materiales y encontramos que solamente se producirán placas pequeñas, grandes o medianas; y en caso de que todavía persista alguna contaminación podemos repetir el proceso hasta tener subpoblaciones completamente puras (virus clonados).

Biogénesis
FONDO EDITORIAL

Los métodos descritos anteriormente miden la actividad biológica de los virus en términos de capacidad de multiplicarse en un sistema determinado. Sin embargo, existen otros métodos que permiten medir la concentración de partículas, o de algunos de sus componentes, independiente de su capacidad replicativa. Entre estas tenemos:

La microscopía electrónica

Como se mencionó en un principio, el microscopio electrónico puede ser utilizado para contar las partículas virales en una suspensión muy concentrada. Para medir la cantidad de virus por este método, las partículas virales se mezclan con una concentración conocida de perlas de látex, luego se hace el conteo del número de partículas virales y de perlas, esto permite determinar, por comparación, la concentración de virus en la muestra, sin embargo, como se dijo antes, el sistema es costoso y poco sensible.

La hemaglutinación

Esta técnica se basa en la propiedad de algunos virus de unirse a los glóbulos rojos, lo que permite calcular el número de partículas virales independiente de si son viables o no. Sin embargo, esta prueba se limita solo a aquellos virus que presentan una proteína llamada hemaglutinina (Influenza, Adenovirus, Sarampión, virus de la encefalitis equina venezolana, entre otros). Las partículas defectivas (partículas virales no viables por defecto en la encapsidación o en el genoma mismo) pueden interferir con la infección de partículas de virus viables, por lo que se recomienda el uso de suspensiones virales en diluciones altas, esto es, con un bajo índice de multiplicidad de infección (IMI), que se refiere a la proporción de partículas virales por célula. En altas concentraciones de virus existirán grandes cantidades de virus defectuosos que interferirán por simple competición, con las partículas virales viables.

Métodos modernos para cuantificar componentes virales

Hasta el momento no existen métodos modernos de cuantificación viral, en el sentido de determinación de la capacidad replicativa, del potencial infeccioso o de la letalidad. Pero, en la última década se han propuesto métodos para la cuantificación de ácidos nucleicos y de proteínas virales en muestras biológicas; su relativa simplicidad y adaptabilidad a aplicaciones diagnósticas han permitido el estudio de la expresión de genes en varios modelos virales tales como el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Papilomavirus Humano (PVH), Virus de la Hepatitis C (VHC), entre otros, permitiendo resolver preguntas fundamentales con respecto a la patogénesis de la infección y al manejo clínico de las personas infectadas.

Biogenesis FONDO EDITORIAL

Los virus mencionados anteriormente tienen en común que establecen infecciones crónicas o latentes, por lo tanto era necesario el desarrollo de técnicas que nos ayudaran al estudio de la relación entre la actividad viral y el desarrollo y evolución de la enfermedad a lo largo de extensos períodos de tiempo. En este sentido, durante los últimos años, se han desarrollado técnicas que pueden ser utilizadas para cuantificar DNA o RNA virales específicos, con una alta sensibilidad, a partir de muestras biológicas. La más utilizada ha sido la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ha contribuido al entendimiento de los procesos que ocurren en el organismo después de una infección aguda, y el mantenimiento de una infección crónica. De esta técnica se han hecho variaciones que permiten obtener una idea aproximada de la cantidad de partículas producidas, sin tomar en cuenta su infecciosidad; tal es el caso del PCR competitivo (cPCR), el PCR con transcriptasa reversa (RT - PCR), el PCR con transcriptasa reversa y cuantitativo (cRT-PCR), y la amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico (NASBA).

Otro de los métodos desarrollados es la hibridación de ácidos nucleicos; que recibe un nombre diferente dependiendo del tipo de ácido nucleico al que se dirige la sonda; cuando se trata de DNA se denomina Southern Blot, en el caso de RNA se denomina Northern Blot. Estas técnicas permiten la localización de los ácido nucleicos dentro de la célula y son semicuantitavas. Recientemente se desarrolló otro procedimiento de hibridación llamado bDNA o DNA ramificado (branched) que amplifica la señal inicial en forma proporcional a la cantidad de material genético que esté presente en la reacción.

También podemos cuantificar partículas virales por medio de los componentes más abundantes de la partícula viral, esto es, las proteínas. Durante la replicación viral se producen una gran cantidad de proteínas que pueden ser detectadas por métodos bioquímicos, inmunológicos o moleculares. Así la detección y evaluación de las características o la actividad de una enzima puede identificar la presencia y determinar la cantidad de un agente viral específico.

Estas técnicas modernas, como hemos dicho, tienen más aplicabilidad para el diagnóstico y por lo tanto se tratarán, en extenso, en el capítulo correspondiente. A continuación veremos cómo con el desarrollo de la ingeniería genética y el DNA recombinante se sigue avanzando en las técnicas de cuantificación viral; el modelo específico ha sido desarrollado durante el estudio de los retrovirus como vectores de información:

Cuando se usa un retrovirus recombinante para la traducción de genes, se hace necesario tener un sistema de medición de la concentración de los viriones activos (título viral). En el caso de los virus que codifican marcadores seleccionables, estos pueden ser determinados por la infección de una línea celular susceptible (usualmente 3T3), cultivándolas en medio selectivo, y ha-

Biogénesis

ciendo recuento de las colonias de células resistentes, lo cual da una concentración de partículas virales en la preparación, algo así como el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml). En los casos en que el gen de interés no es seleccionable, la cuantificación puede ser realizada por el uso de virus recombinantes que, adicionalmente, codifiquen un marcador selectivo bajo el control de un promotor independiente. En este caso la cantidad puede ser determinada por medio de Southern blot que nos puede indicar el número relativo de copias del gen en el DNA extraído de una población de células infectadas. Conociendo el número de células blanco y teniendo el DNA control, que representa el número de copias del gen equivalente, se puede calcular el número de células que han recibido el constructo.

Frecuentemente los genes a ser transducidos codifican antígenos de superficie; estos pueden ser utilizados como marcadores de infección para calcular el título por medio de coloración de la población de células infectadas con un anticuerpo conjugado con fluoresceína. El análisis de las células que producen virus ha mostrado que su nivel de expresión de antígenos de superficie se correlaciona con la producción de nuevas partículas.

Para estimar el título en un gran número de clones productores, se utiliza la hibridación con sondas radiomarcadas para la detección de RNA genómico viral, preparado desde un medio condicionado por esas células. La intensidad de la señal, después de la autoradiografía, es una indicación de la concentración de partícula virales en el medio. El principal valor de esta técnica es para la determinación cualitativa de los clones que producen altos títulos virales, antes de su cuantificación por southern blot. Sin embargo, esta técnica puede ser utilizada cualitativamente si la preparación de virus de título conocido está disponible para uso como estándar de hibridación.

Bibliografía

- Clementi M, Menzo E, Bagnarelli, et al. Clinical use of quantitative molecular methods in studying human immunodeficiency virus Type 1 Infection. Clin Microbiol Rev, Apr: 135-147. 1996.
- Murray PR, Rosenthal KS, et al. Medical microbiology. 3 rd ed. Mosby. 1998.
- Mary KL. Collins. Practical molecular virology. Methods in molecular biology. 8: 45-48. 1991.
- Prier JE. Basic medical virology. Williams and Wilkins. 1966.