



CENUR
Litoral Norte
Salto



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Aislamiento y Titulación Viral

UDELAR, CENUR Litoral Norte

Curso Microbiología

CBB

2025

Docente: **Fernando Lopez Tort**

Laboratorio de Virología Molecular

Dpto de Ciencias Biológicas

CENUR LN, Salto, UDELAR

fernandolopeztort@gmail.com

Primera parte

Aislamiento Viral

Segunda parte

Titulación Viral

Primera parte

Aislamiento Viral

Los virus pueden ser detectados **directamente a partir de una muestra biológica**

Detección del virus o de alguno de sus componentes:

- Antígenos - Ag (péptidos y proteínas virales)
- Parte de su genoma viral (Ej. PCR)

Diagnóstico Viral & Investigación

■ Detección Directa

- Microscopia
- Aislamiento Viral
- Detección de antígenos virales
- Detección del material genómico (ADN o ARN)

AISLAMIENTO VIRAL

- El virus como agente infeccioso
- Todos los virus son parásitos intracelulares obligatorios

Inoculación experimental de virus en sistemas
hospederos

SISTEMAS UTILIZADOS:

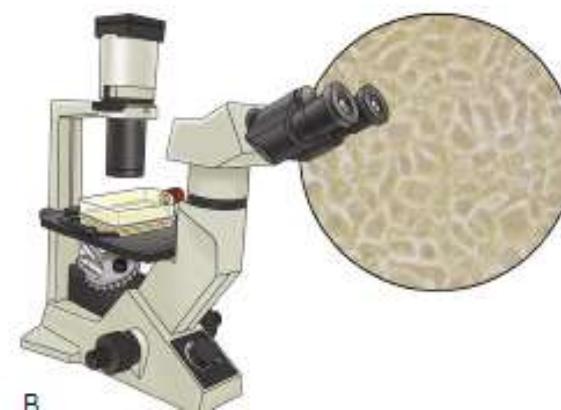
- **Animales de experimentación**



- **Huevos embrionados**



- **Cultivos celulares**



ANIMALES de EXPERIMENTACIÓN

- **Grandes animales**

- **Animales de laboratorio:**
 - Ratones
 - Cobayos
 - Conejos
 - Hamster
 - Monos



INOCULACIÓN en ANIMALES de EXPERIMENTACIÓN

VENTAJAS

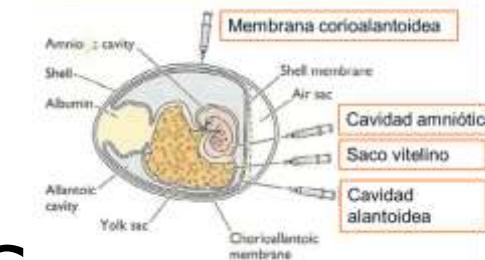
- Reproducir la enfermedad.
- Obtención de anticuerpos.
- Observación de síntomas clínicos.

DESVENTAJAS

- Riesgo operador.
 - Medidas de bioseguridad.
 - Costo de manutención.
 - Necesidad de animales libres de patógenos (*SPF*).
-

HUEVOS EMBRIONADOS

- Sistema utilizado para diagnóstico, investigación e innovación (Ej: vacunas de la gripe y fiebre amarilla)
- Se utilizan diferentes vías de inoculación dependiendo del virus
- Se deben utilizar huevos *SPF*



CULTIVOS CELULARES

¿QUÉ SON LOS CULTIVOS CELULARES?

El cultivo celular es el proceso mediante el cual células, ya sean células procariotas, eucariotas o vegetales, pueden **cultivarse** en condiciones controladas.

Cultivo celular = conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células *in vitro*, conservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas.

En la práctica el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares superiores, especialmente **células animales**.

EQUIPOS NECESARIOS

- Cabina de flujo laminar.
- Estufas e Incubadora CO₂.
- Baño María.
- Autoclave.
- Microscopio invertido.
- Microcentrífuga.
- Tanques de Nitrógeno líquido.



4 REQUERIMIENTOS

- Sustrato
 - Medios de Cultivo
 - Factor de crecimiento
 - Parámetros fisiológicos
-

SUSTRATO

□_Sustratos para el crecimiento de las células
= **lugar donde las células van a pegarse y multiplicarse.**

- Botellas de plástico
- Botellas de vidrio
- Tipo "Roller"
- Placas de cultivo (6 - 96 pocillos)
- Placas de petri
- Tubos



SUSTRATO: Botellas de cultivo



MEDIOS DE CULTIVO + «suplementos»*

Solución con nutrientes esenciales, aminoácidos, vitaminas, minerales, iones inorgánicos y azúcares

+

*Antibióticos y antimicóticos

MEM, Earle, Eagle, Hank's



Suplementos medios de cultivo: SUERO FETAL

Fuente principal de nutrientes. Aportan proteínas, hidratos de carbono, aminoácidos, y *factores del crecimiento*.

Especies comúnmente utilizadas: **Bovino**, equino, conejo, Ovino.

Tipos: **Suero Fetal**

Suero animal adulto

Tratamiento: Inactivado

Irradiado (UV)

Filtrado



Medio de Crecimiento: 10%
Medio de Mantenimiento: 2 a 5 %

Suplementos medios de cultivo: TRIPSINA



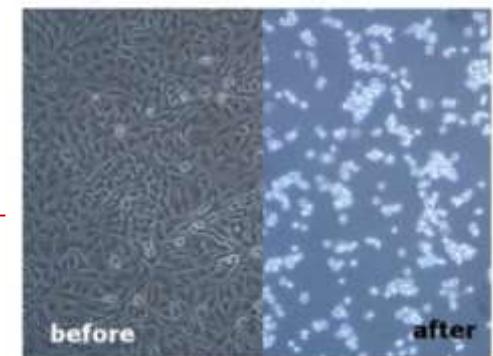
Enzima => peptidasa: rompe los enlaces peptídicos (producida en el páncreas).

Compuesto químico esencial para la disgregación celular.

Disgregación de las células en cultivos en monocapa.



Tripsinización

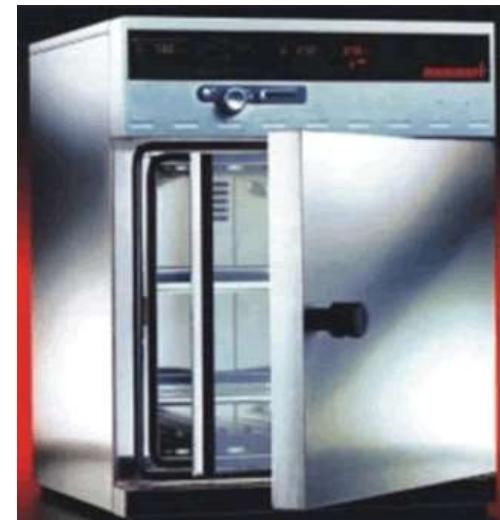


before

after

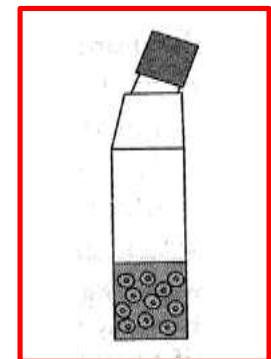
PARÁMETROS FISIOLÓGICOS

- Temperatura: 37°C**
- Tensión de CO₂: 5%**
- Humedad**



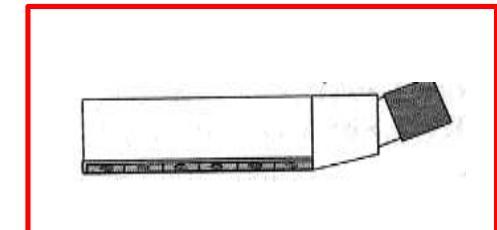
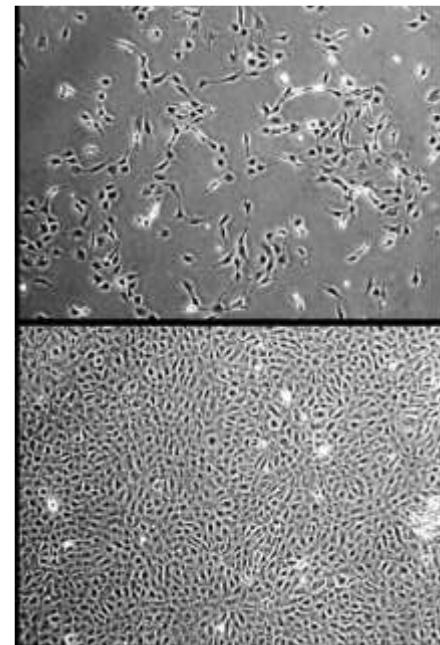
FORMAS DE CRECIMIENTO CELULAR

- En suspensión



FORMAS DE CRECIMIENTO CELULAR

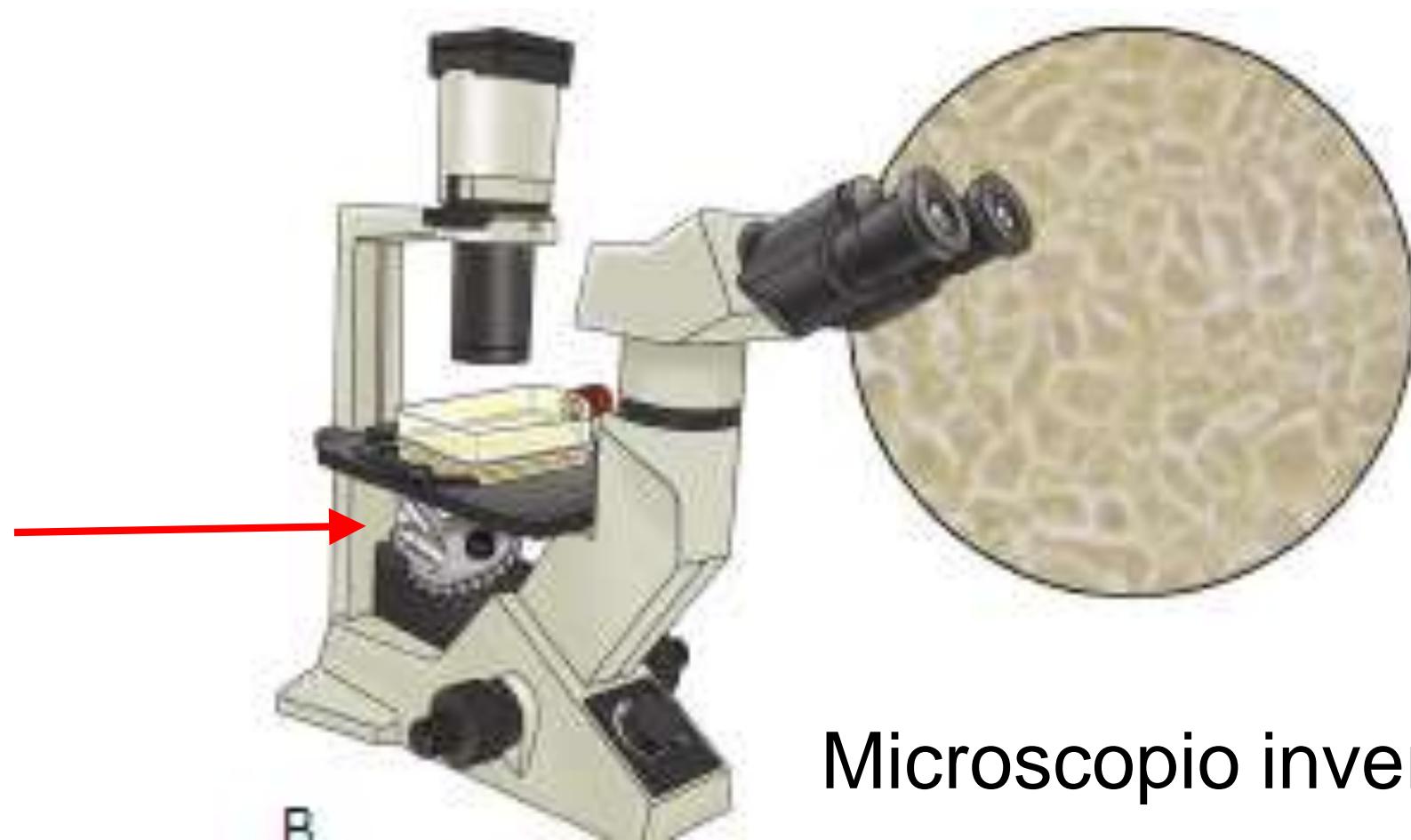
En monocapa



Cultivo en monocapa: SOPORTES



OBSERVACIÓN de los CULTIVOS:



Microscopio invertido

TIPOS DE CULTIVOS CELULARES:

- 1) Cultivo primario
 - 2) Línea celular
 - 2.1) Finita (Línea celular)
 - 2.2) Infinita (Línea celular continua)
-

TIPOS DE CULTIVOS CELULARES:

1) Cultivo primario

2) Línea celular

2.1) Finita (Línea celular)

2.2) Infinita (Línea celular continua)

LÍNEA CELULAR INFINITA o CONTÍNUA:

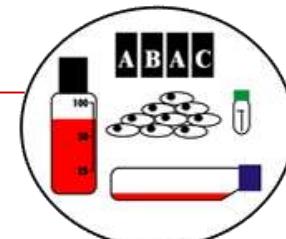
Derivan de:

- Cultivos primarios mutados
- **Células tumorales**

Se propagan *in vitro* **indefinidamente**. Pero no son sensibles para propagar TODOS los virus.

Líneas celulares establecidas – Puede decirse que una línea celular se ha “establecido” cuando demuestra posibilidades de ser subcultivada indefinidamente.

Existen empresas que las venden: Colección Americana de Cultivos (ATCC), Banco de células Argentino (ABAC), etc.



LÍNEAS CELULARES ESTABLECIDAS

VENTAJAS:

- Homogeneidad celular
- Conocimiento del tipo celular
- Economía
- Practicidad

DESVENTAJAS:

- Falta de diferenciación celular
- Menor sensibilidad
- Inestabilidad de la línea (mutaciones ADN)

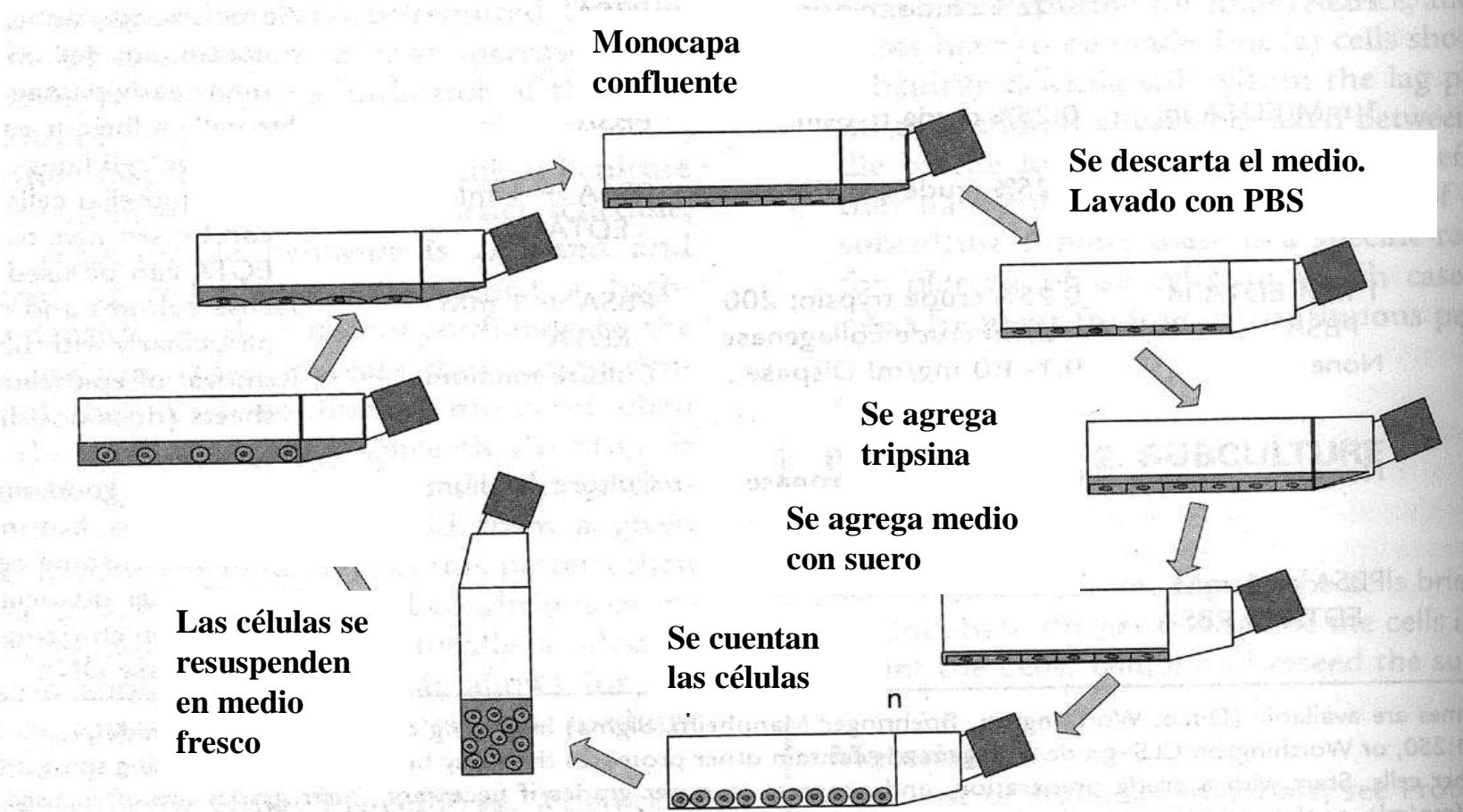
SUBCULTIVOS: ¿Qué son y cómo se realizan?



- MDBK
- CRFK
- BHK-21
- VERO



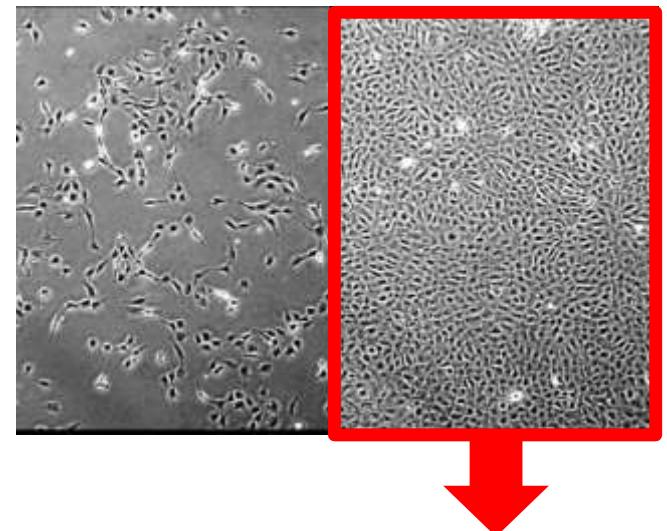
PROCEDIMIENTO:



FINALIDAD:

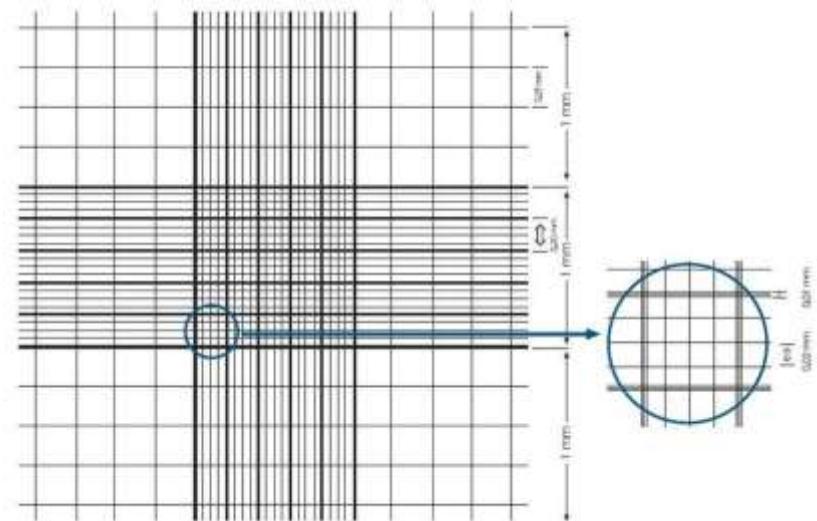
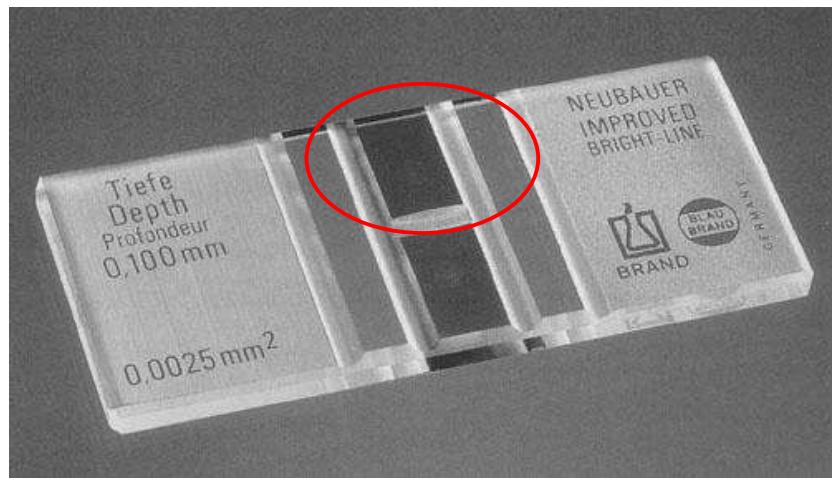
- Propagación de la línea celular.
- Producción de *stocks* celulares.

**Usualmente se realizan al
llegar a confluencia.**



**Confluencia
Monocapa de células**

¿CÓMO SE CUENTAN LAS CÉLULAS?



Cámara de Neubauer.

¿CÓMO SE CONSERVAN LOS CC?

- Nitrógeno líquido (-196°C)
- Medio de congelamiento
(crioprotector:DMSO o glicerol)



Infección de CC con virus

VENTAJAS

- Condiciones de laboratorio.
- No interfieren Ac
- Amplio espectro
- Poco riesgo al operador
- Observación de ECP

DESVENTAJAS

- Estrictas condiciones de esterilidad.
- Toxicidad de la muestra
- Instalaciones especiales
- Personal entrenado

COMO EVIDENCIAMOS LA PRESENCIA DE VIRUS EN UN CULTIVO CELULAR????

EFFECTOS CITOPÁTICOS:

Se denomina **Efecto Citopático (ECP)** a los cambios bioquímicos, moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles al microscopio óptico invertido, causados durante el ciclo de replicación viral.

ALGUNOS TIPOS DE ECP:

- Lisis celular
 - Sincitios (fusión celular)
 - Cuerpos de inclusión
 - Vacuolización intracitoplasmática
-

LISIS CELULAR:

INICIALMENTE:

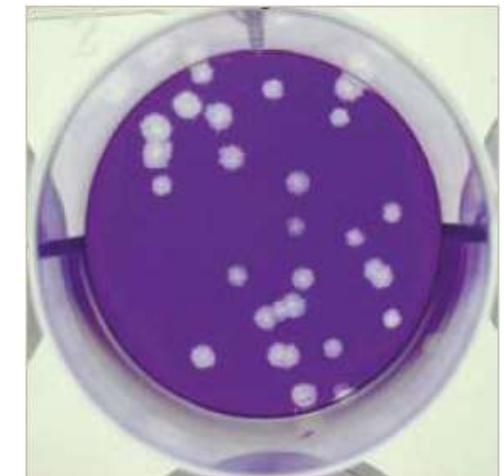
Alteración de la membrana plasmática, nucleo, citoesqueleto, etc.



Pérdida de la fijación al soporte



Redondeamiento celular



FINALMENTE: muerte de las células por lisis.

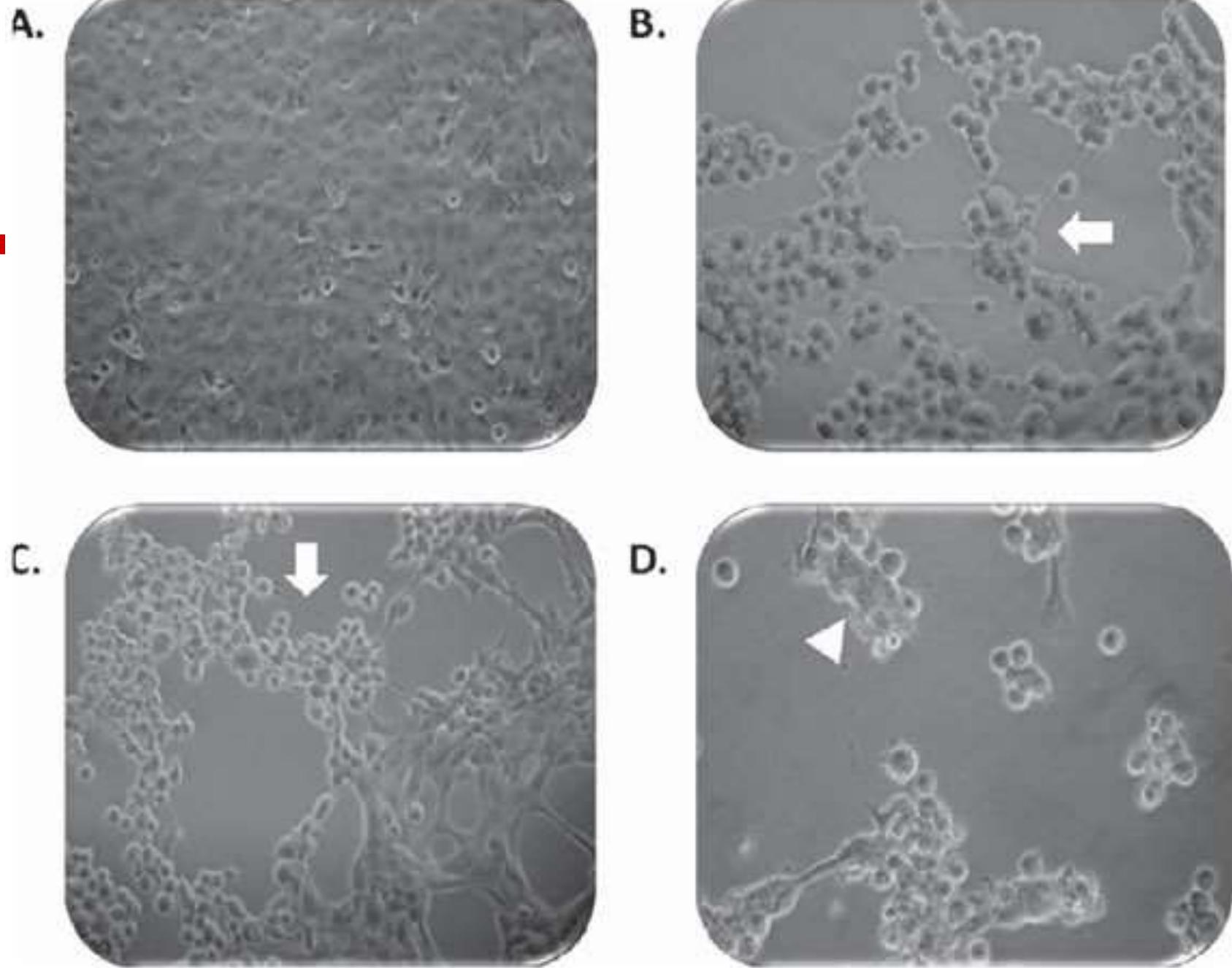


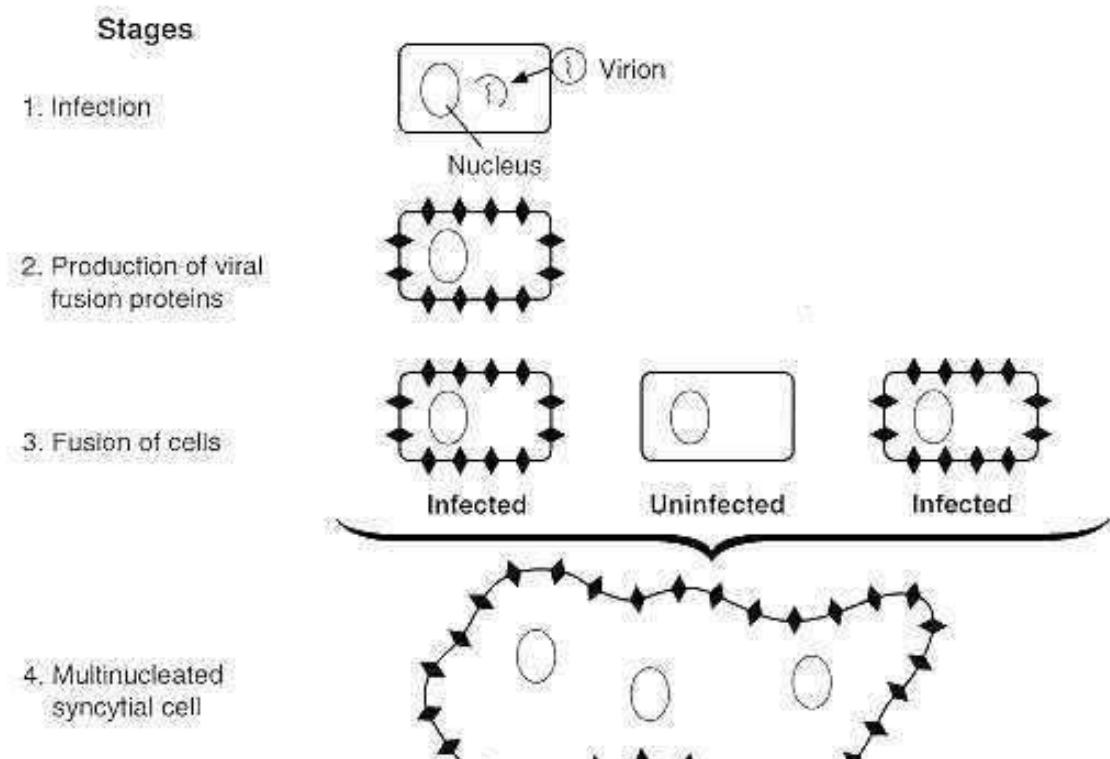
Figura 2. Aislamiento de BHV-1 en cultivos de células MDBK.

A. Control negativo; B. Control positivo – cepa Iowa 48 horas post-infección (h.p.i.); C. Muestra de campo 48 h.p.i.; D. Muestra de campo 72 h.p.i. Nótese la presencia del efecto citopático característico conocido como formación de racimos de células (flechas) y formación de sincitios (cabeza de flecha), con posterior desprendimiento de la monocapa celular (B-D).

SINCITIOS:

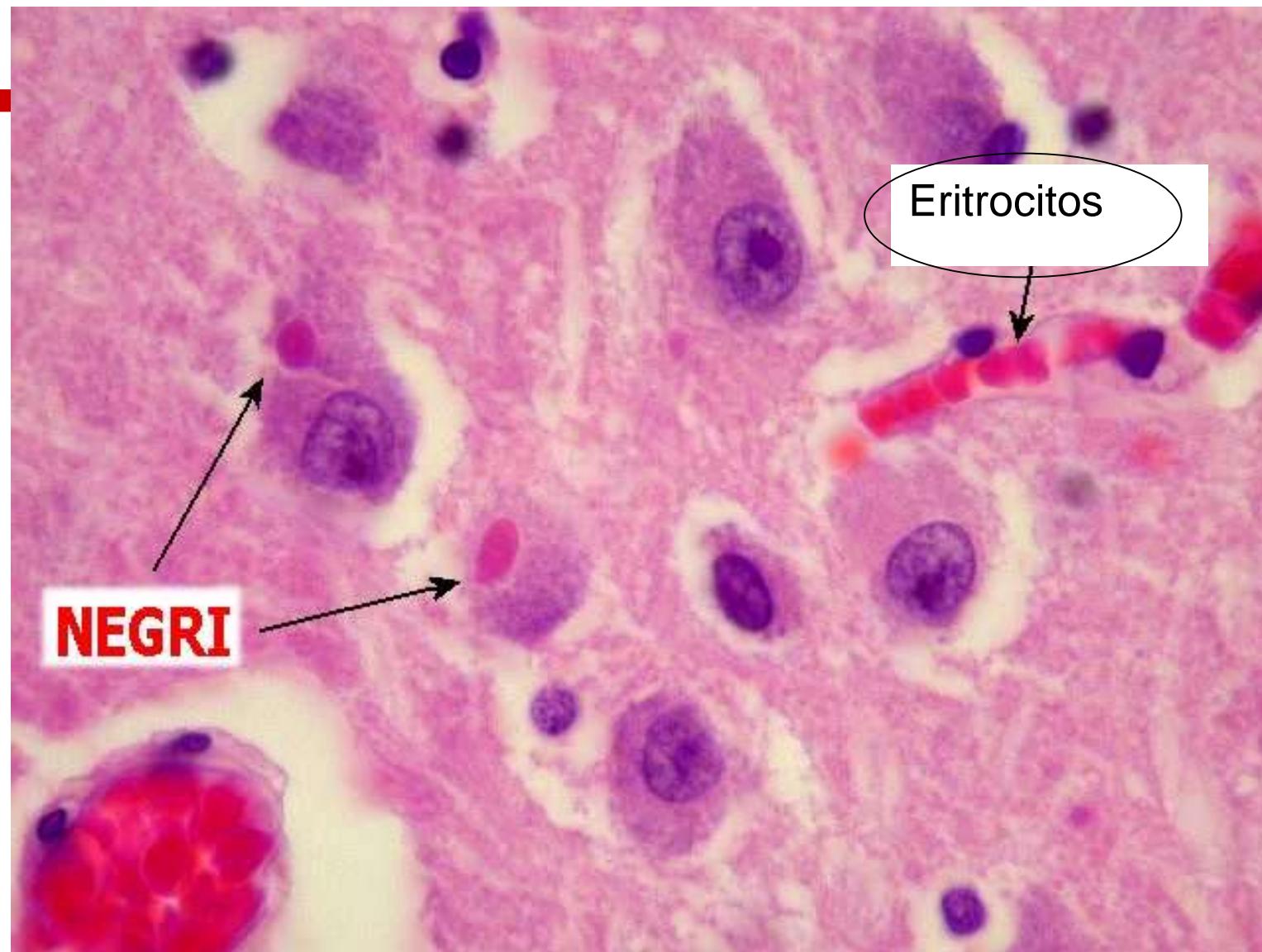
Los sincitios son células fusionadas apreciables como una masa celular multinucleada.

Ej.: Virus sincitial respiratorio.



CUERPOS DE INCLUSIÓN:

- Los cuerpos de inclusión son parte del ciclo de replicación del virus. Son las «fabricas virales», (ej. Rotavirus: Viroplasma)
 - Acúmulos de estructuras virales inmaduras.
 - Intranucleares /Intracitoplasmáticos
 - Basófilos / Eosinófilos
 - Simples/ Múltiples
 - Redondeados/ Irregulares
-



Cuerpos de inclusión eosinófilos, intracitoplasmáticos
(`Cuerpos de Negri': Virus de la Rabia)

EFEKTOS CITOPÁTICOS

La detección del efecto citopático y el estudio de sus características, tienen **cierto** valor diagnóstico, especialmente en la identificación **presuntiva** del agente viral.

EFECTOS CITOPÁTICOS: problemas

- No todos los virus producen ECP en cultivos celulares.
- Virus diferentes producen ECP similares.

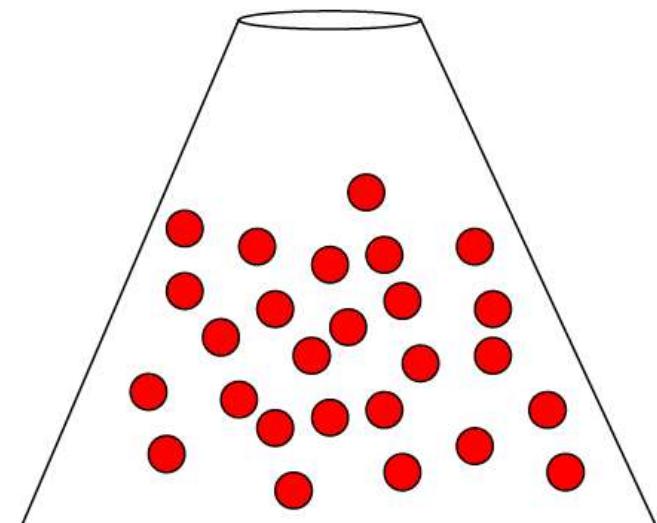
Es necesaria la identificación viral por técnicas específicas.

Segunda parte

Titulación Viral

Titulación viral

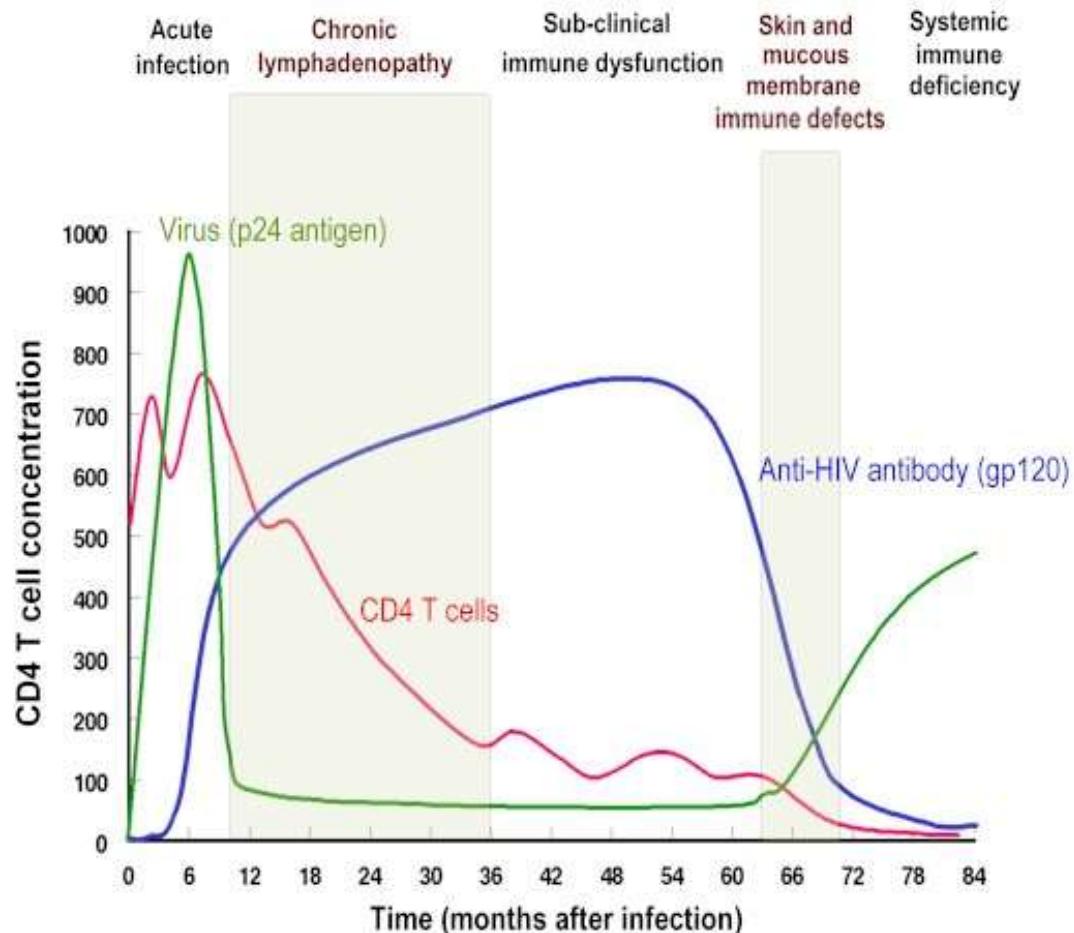
"Titular" significa determinar la cantidad del elemento en cuestión que esa preparación contiene



26 elementos

Para que queremos titular un virus?

Diagnóstico virológico – Permite conocer el curso de una enfermedad viral.

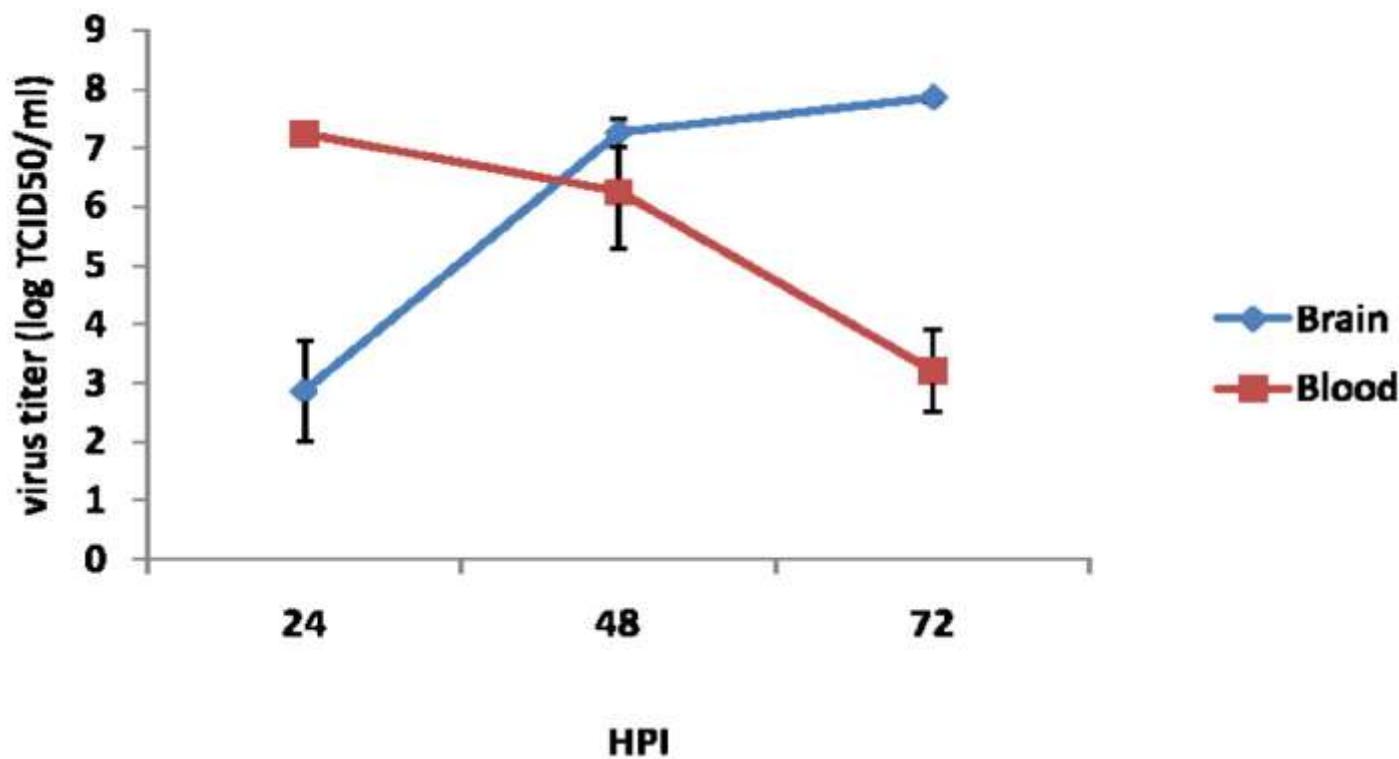


Título viral, numero de células CD4 y anticuerpos anti-gp120 durante el curso de una infección con HIV.

Para que queremos titular un virus?

Investigaciones – Si deseamos conocer la dinámica de infección de virus en diferentes tejidos, podemos estudiarlo en un periodo de tiempo determinado, tomando muestras luego de la infección.

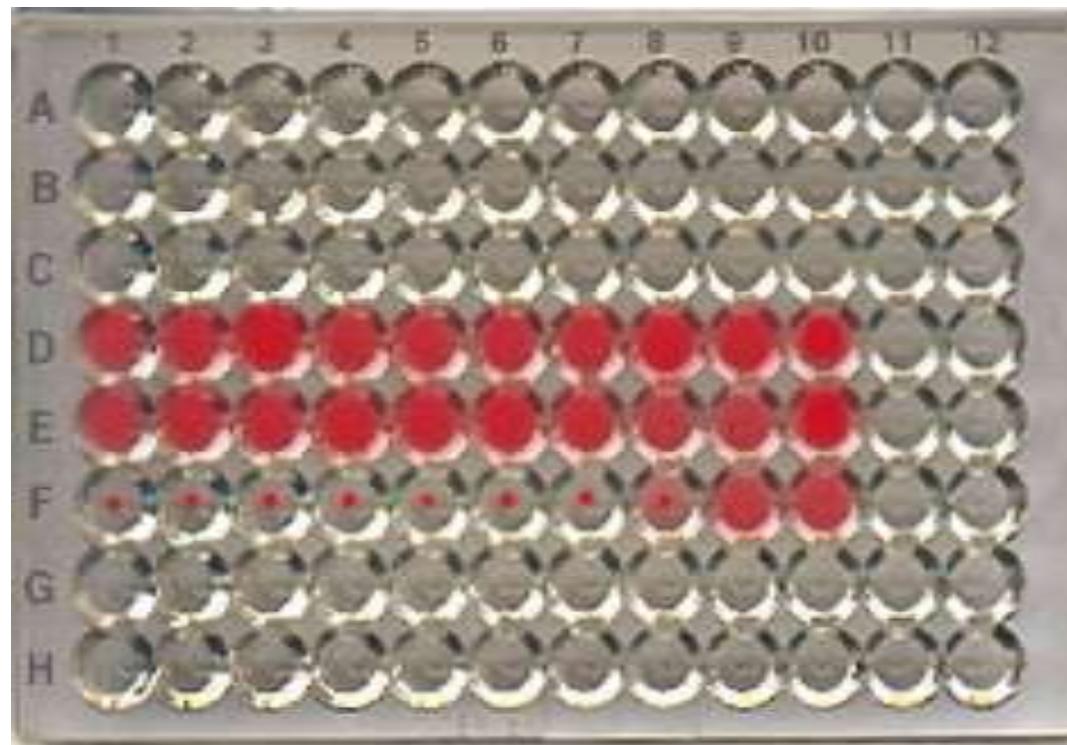
Inyección intravenosa en ratones del Virus Chandipura (Familia *Rhabdoviridae*) y estudio de la presencia del mismo en sangre y cerebro.



Para que queremos titular un virus?

Técnicas serológicas – Para determinadas técnicas inmunodiagnósticas como la Seroneutralización *in vitro*, Seroprotección, Inhibición de la Hemaglutinación, es necesario saber el título viral con que estamos trabajando.

Estas técnicas pueden ser aplicadas tanto para Diagnóstico como para Investigaciones.



Como podemos titular un virus?

Las partículas virales pueden ser cuantificadas desde dos puntos de vista:

- a) **Por constitución físico-química - donde **NO** se mide la capacidad infecciosa de las partículas virales**
- b) **Por actividad biológica - donde **SÍ** se mide la capacidad infecciosa de las partículas virales.**

a) Por constitución físico-química podríamos utilizar por ej:

- *Microscopia electrónica* – partícula viral entera
- *Detección de Ag-virales* – proteínas de la partícula viral
- *PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR)* – genoma viral

b) Por actividad biológica – se utilizan ensayos cuantitativos de las infecciones producidas por las partículas virales. En dichos ensayos, se realizan diluciones sucesivas de la suspensión viral y se contabiliza el número de respuestas positivas sobre el número total de respuestas posibles producidas en un sistema hospedador determinado.

Como podemos titular un virus?

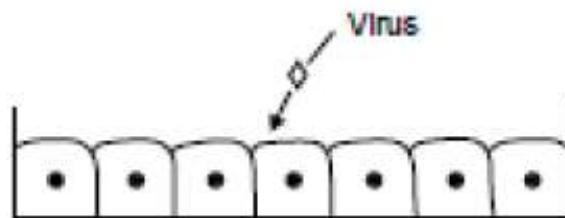
b) Por actividad biológica:

1. **Método de Placa** – se basa fundamentalmente en que una **ÚNICA** partícula viral es capaz de producir una «*placa de lisis*»: que es un efecto observable a simple vista. Por lo tanto: “Una placa de lisis = una partícula viral”.
2. **Método del punto final 50%** – se basa en la estimación de la dosis de la suspensión viral que mata o genera ECP en el 50% de los animales o de los cultivos de células.

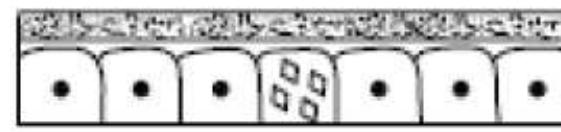
Como podemos titular un virus?

b) Por actividad biológica:

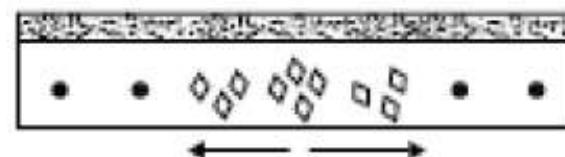
1. Método de Placa



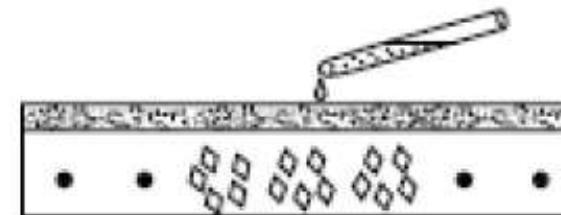
1) Infección de monocapa celular



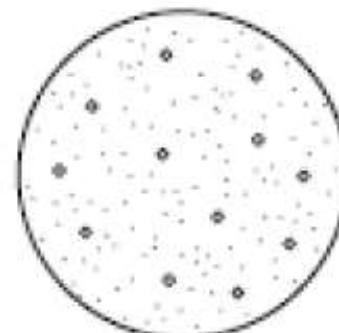
2) Cubrir con agarosa y nutrientes



3) Replicación en células adyacentes



4) Tinción con colorante vital (rojo neutro)



5) Recuento de las placas obtenidas. El recuento es visual.

Como podemos titular un virus?

b) Por actividad biológica:

1. **Método de Placa** – “Una placa de lisis = una partícula viral”. Los partículas virales se contabilizan como **Unidades Formadoras de Placas = UFP**

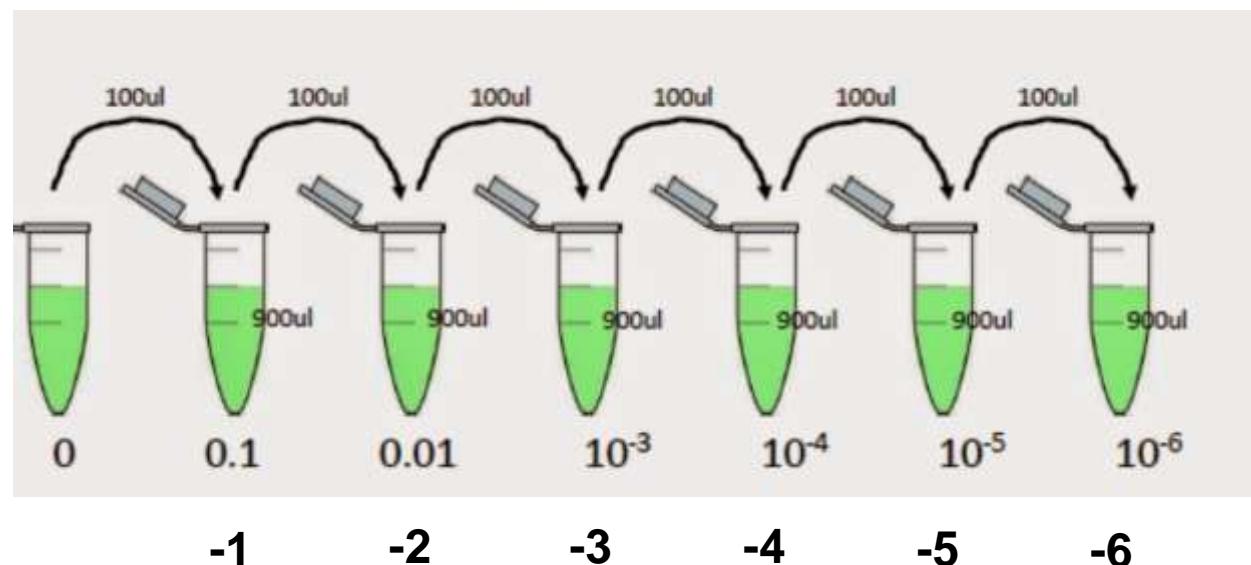
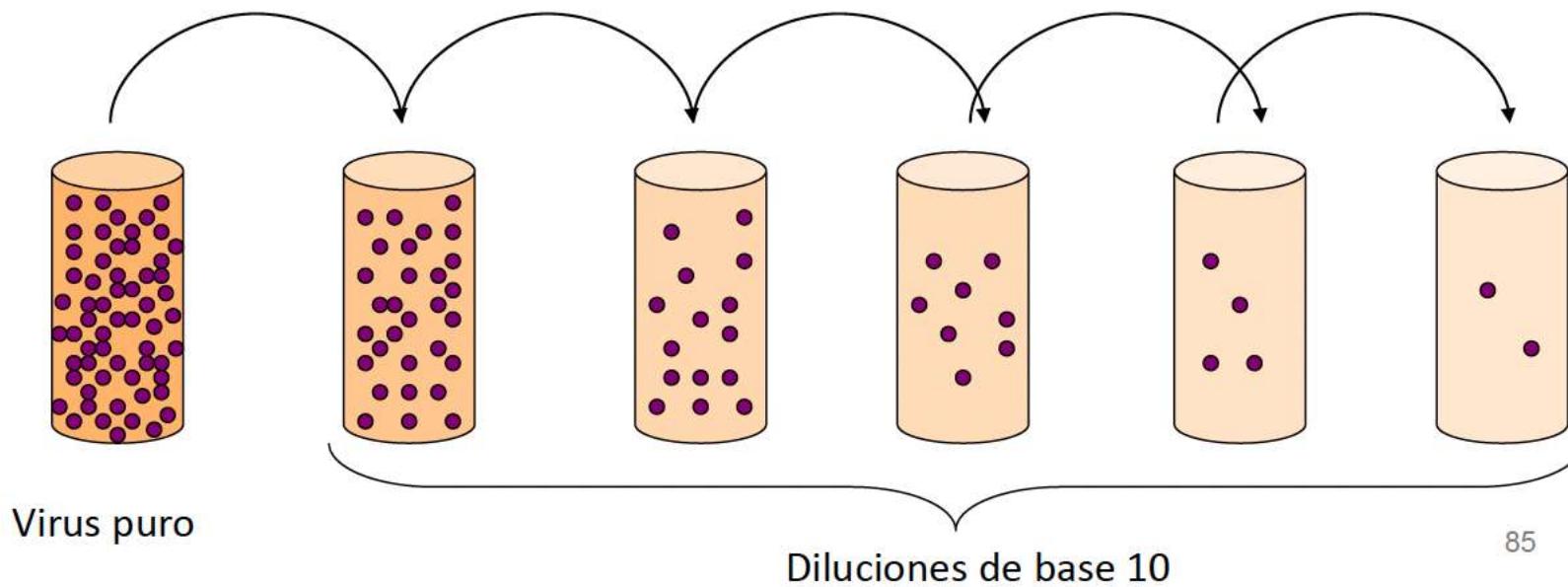
FUNDAMENTO: Se utiliza monocapas celulares mantenidas bajo una capa de medio semisólido para impedir el pasaje de la progenie viral al sobrenadante.



b) Por actividad biológica:

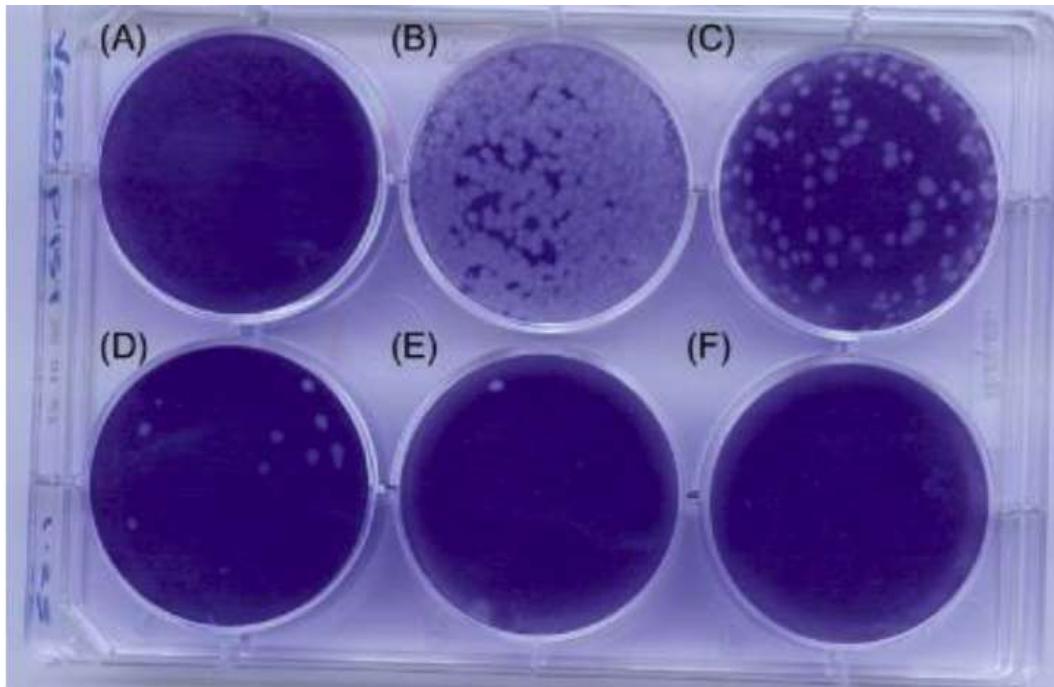
1. Método de Placa

Se hacen diluciones seriadas de la muestra que queremos estudiar el título viral y se siembran en placas de cultivo



b) Por actividad biológica:

1. Método de Placa



(A) = Control negativo

(B) inoculo viral dilución -1 (1:10)

(C) inoculo viral dilución -2 (1:100)

(D) inoculo viral dilución -3 (1:1000)

(E) inoculo viral dilución -4 (1:10.000)

(F) inoculo viral dilución -5 (1:100.000)

Interpretación de resultados

La infectividad se puede expresar como unidades formadoras de placas (UFP) por ml. El título se calcula directamente a partir de la dilución de la muestra (**d**), el número de placas contadas (**n**) y el volumen del inóculo (**v**).

$$\text{Título (UFP/ml)} = n / v \times d$$

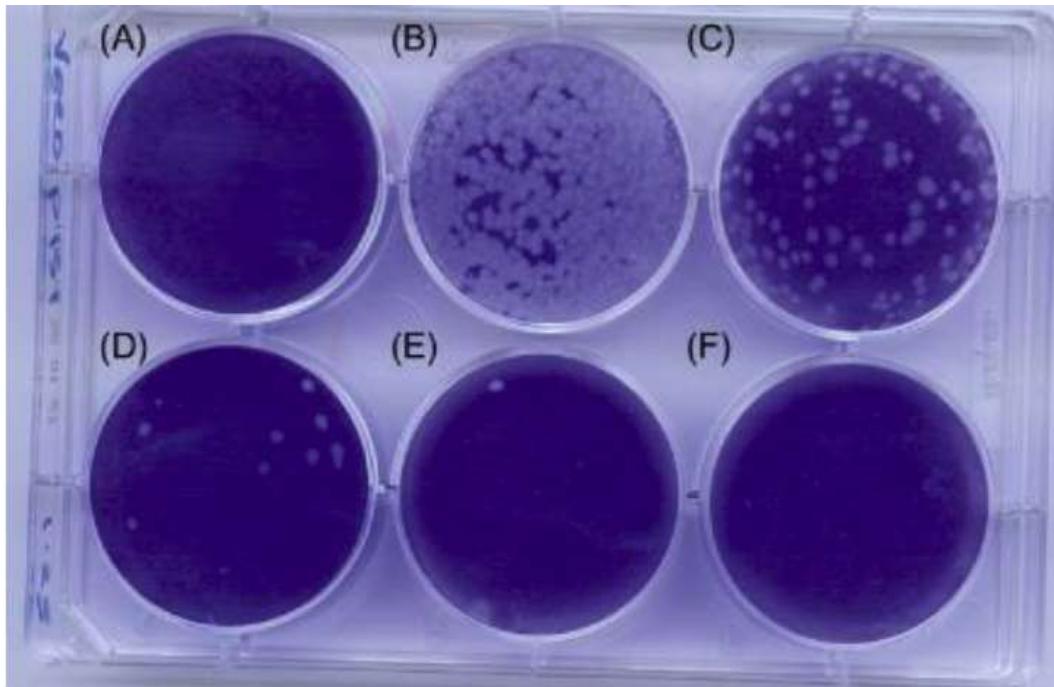
$$n (D) = 10 \text{ UFP}$$

$$v = 0,1 \text{ mL de inoculo viral}$$

$$d = 0,001 - (D) = -3$$

b) Por actividad biológica:

1. Método de Placa



(A) = Control negativo

(B) inoculo viral dilución -1 (1:10)

(C) inoculo viral dilución -2 (1:100)

(D) inoculo viral dilución -3 (1:1000)

(E) inoculo viral dilución -4 (1:10.000)

(F) inoculo viral dilución -5 (1:100.000)

Interpretación de resultados

La infectividad se puede expresar como unidades formadoras de placas (UFP) por ml. El título se calcula directamente a partir de la dilución de la muestra (**d**), el número de placas contadas (**n**) y el volumen del inóculo (**v**).

$$10 / 0,1 \times 0,001 = 100.000 = 10^5$$

$$1 \times 10^5 \text{ UFP/mL}$$

$$\text{Título (UFP/ml)} = n / v \times d$$

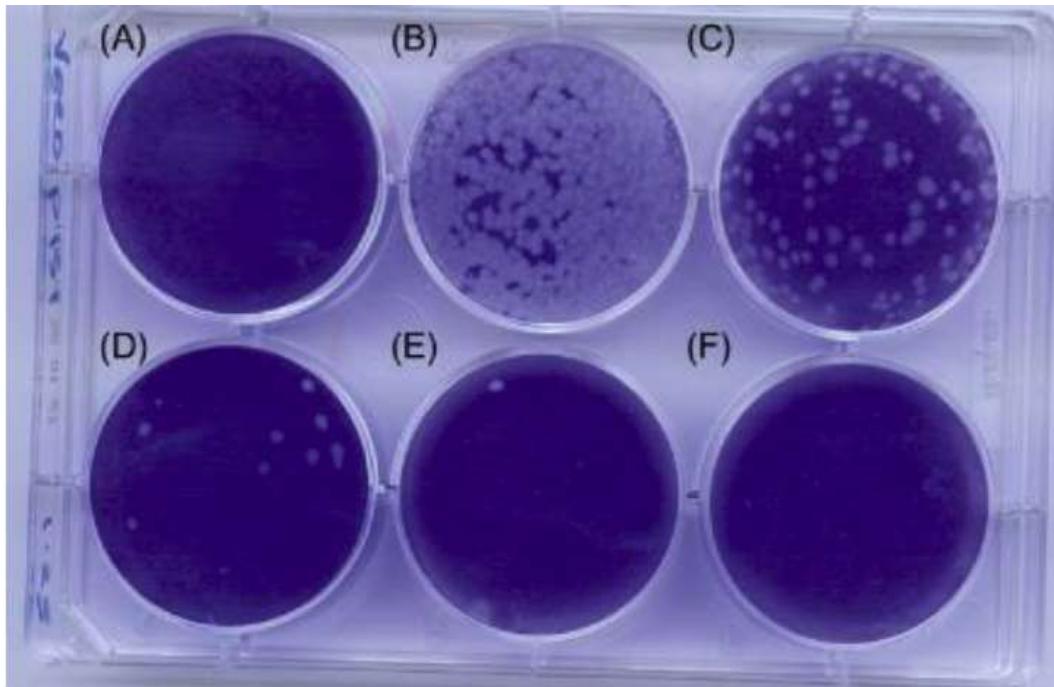
$$n (D) = 10 \text{ UFP}$$

$$v = 0,1 \text{ mL de inoculo viral}$$

$$d = 0,001 - (D) = -3$$

b) Por actividad biológica:

1. Método de Placa



(A) = Control negativo

(B) inoculo viral dilución -1 (1:10)

(C) inoculo viral dilución -2 (1:100)

(D) inoculo viral dilución -3 (1:1000)

(E) inoculo viral dilución -4 (1:10.000)

(F) inoculo viral dilución -5 (1:100.000)

Interpretación de resultados

La infectividad se puede expresar como unidades formadoras de placas (UFP) por ml. El título se calcula directamente a partir de la dilución de la muestra (**d**), el número de placas contadas (**n**) y el volumen del inóculo (**v**).

$$1 / 0,1 \times 0,0001 = 100.000 = 10^5$$

$$1 \times 10^5 \text{ UFP/mL}$$

$$\text{Título (UFP/ml)} = n / v \times d$$

$$n (E) = 1 \text{ UFP}$$

$$v = 0,1 \text{ mL de inoculo viral}$$

$$d = 0,0001 - (D) = -4$$

Como podemos titular un virus?

b) Por actividad biológica:

1. **Método de Placa** – se basa fundamentalmente en que una UNICA partícula viral es capaz de producir una «placa de lisis»: que es un efecto observable al microscopio óptico. Por lo tanto: “Una placa de lisis = una partícula viral”.

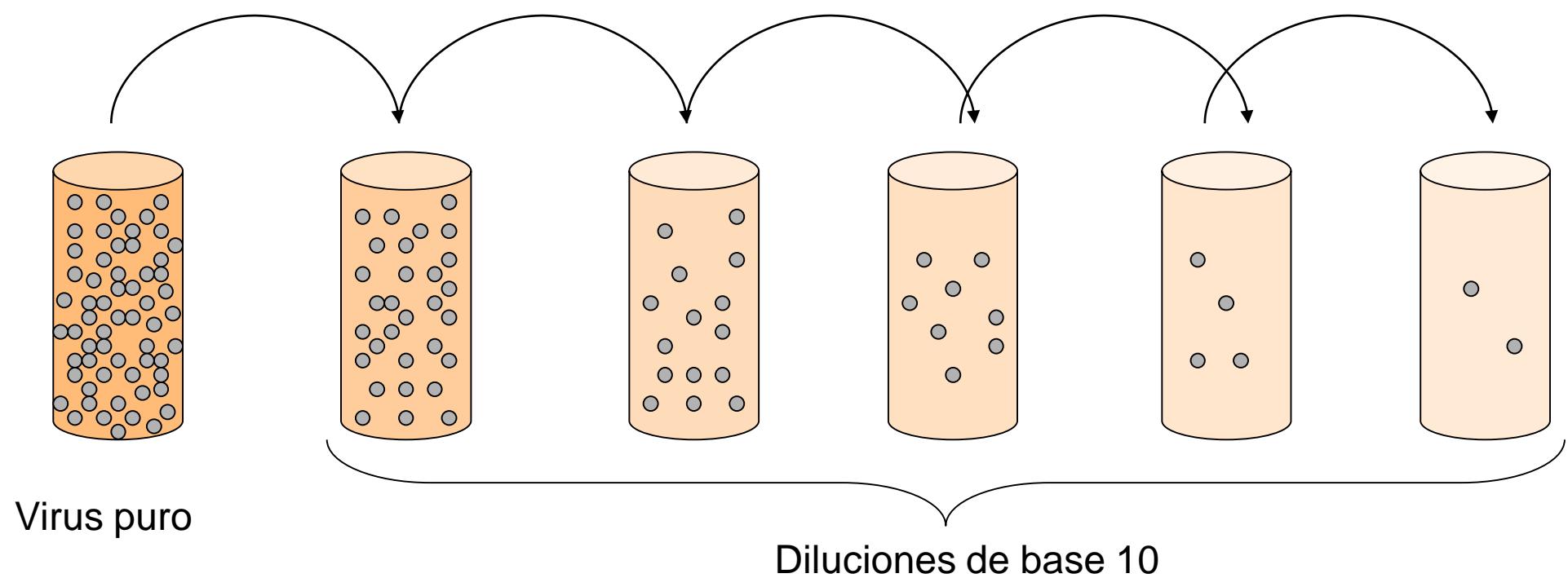
2. **Método del punto final 50%** – Se basa en la estimación de la dosis de la suspensión viral que mata el 50% de los animales o de los cultivos de células.

b) Por actividad biológica:

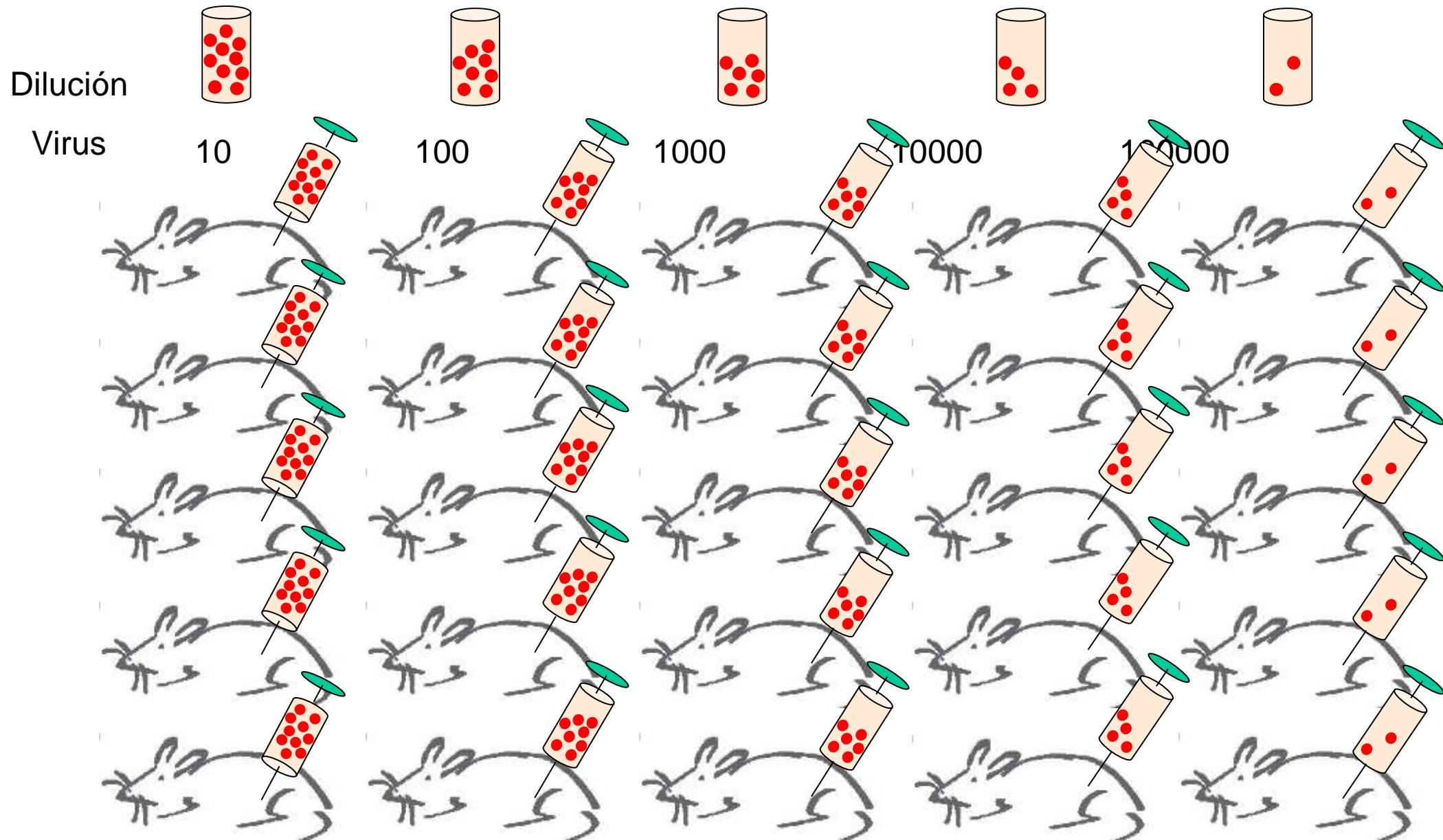
2. Método del punto final 50%

El punto final 50% en la titulación de una suspensión viral, es la dilución de virus que produce el 50% de efectos positivos.

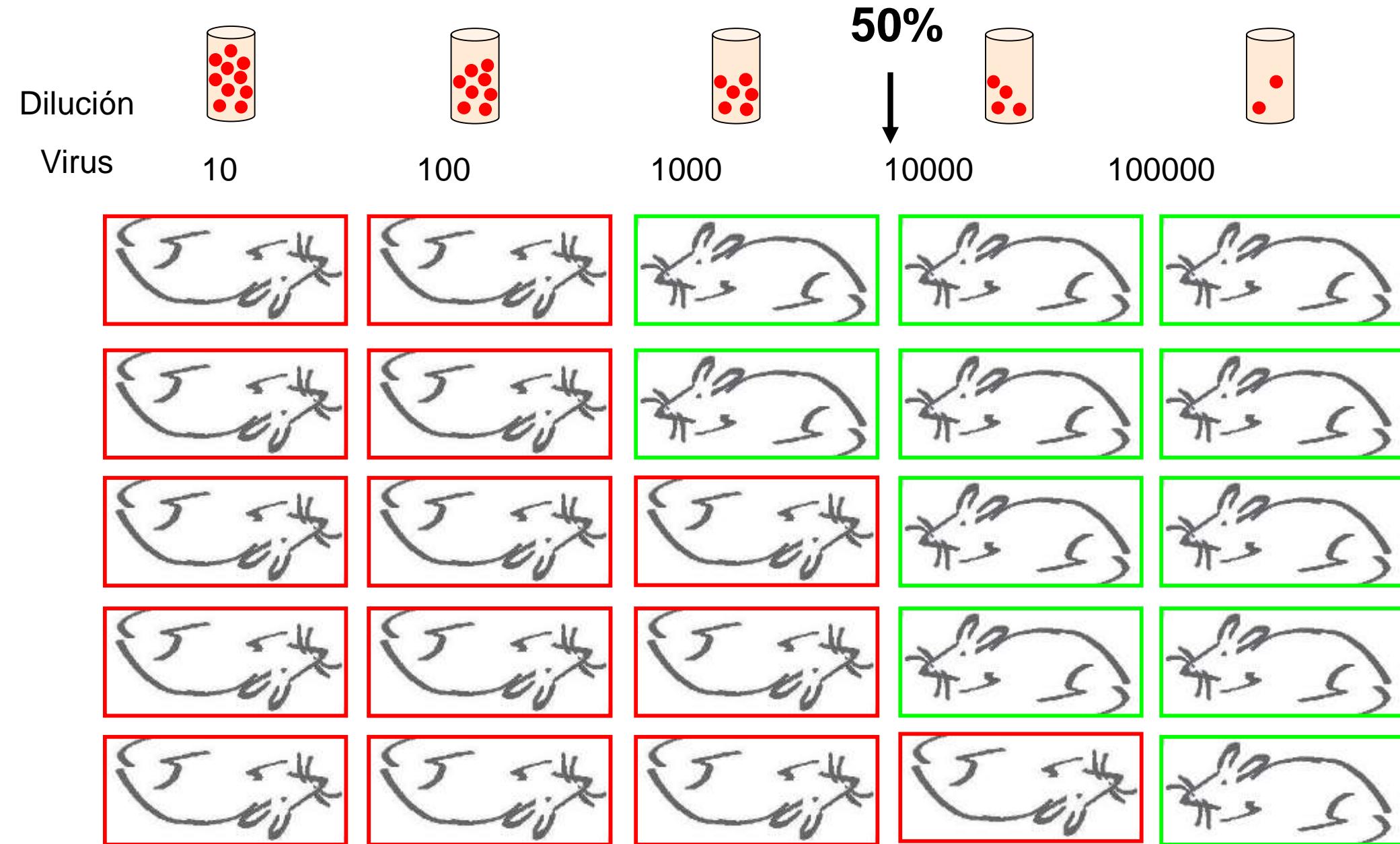
Se hacen diluciones seriadas de la muestra que queremos estudiar el título viral y se siembran en placas de cultivo celular o se inoculan en animales de laboratorio.



Método del punto final 50% – Se basa en las respuestas “**todo o nada**” es decir “positivas o negativas”. Luego se calcula la dosis de la suspensión vírica que mata el 50% de los animales o de los cultivos celulares.



Método del punto final 50% – en animales de experimentación.



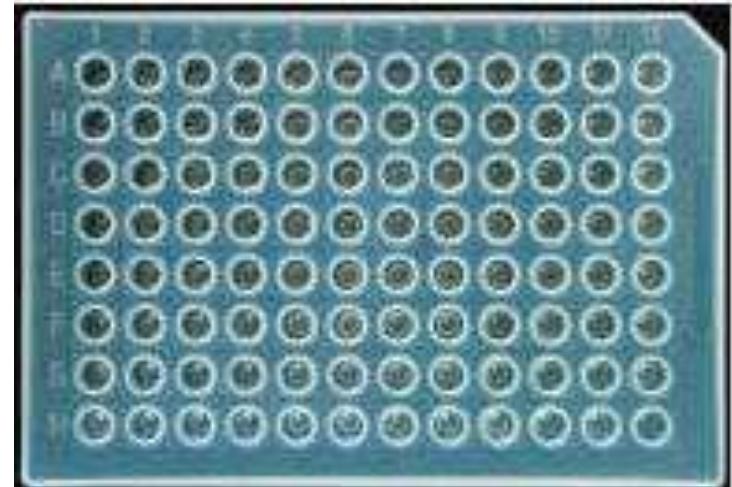
b) Por actividad biológica:

2. **Método del punto final 50% – *en cultivo de células*.**

También se hacen en placas de 96 pocillos con monocapas de células sensibles al virus que queremos titular. Se siembra el virus en cada pocillo por quintuplicado para cada dilución. Luego se incuba en la estufa de cultivo el tiempo suficiente (generalmente 3 días) para que aparezca el efecto citopático en la monocapa

Ejemplo:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8				
B	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8				
C	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8				
D	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8				
E	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8				
F												
G												
H												



+

-

b) Por actividad biológica:

2. **Método del punto final 50% - *en cultivo de células.***



	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
A								
B								
C								
D								
E								
F								
G								
H								
Nº Pos	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5	1/5	0/5	0/5
Nº Neg	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	4/5	5/5	5/5

b) Por actividad biológica:

2. **Método del punto final 50%**

Cálculo del título viral – El cálculo del título final de la suspensión vírica se puede hacer por dos métodos fundamentalmente.

- **Método de Reed y Muench**

- **Método de Spearman-kärber**