

CUANTIFICACIÓN DE VIRUS

Ref.PCR9

10 grupos de estudiantes

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en la cuantificación de virus mediante la técnica de cultivo en placa.

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre la biología y el uso del cultivo en placas para determinar la carga viral y cómo método de detección y seguimiento de un paciente.

2. COMPONENTES para 10 grupos de estudiantes

¡ATENCIÓN! IMPORTANTE

Revisar cuidadosamente las condiciones de almacenamiento después de recibir el kit.

BactoBeads™ <i>E. coli</i>	Conservar a 4°C
ViroBeads™ <i>Bacteriophage T4</i>	Conservar a 4°C
Agar LB ReadyPour™	Temperatura ambiente
Agar ColorTop™	Temperatura ambiente
Buffer fosfato salino (PBS) 1x	Temperatura ambiente
Caldo Luria (LB)	Temperatura ambiente

NOTA: Este práctica simula una prueba de carga viral para VIH en células *HeLa humanas* usando los sustitutos benignos y optimizados para el aula de *ViroBeads™ Bacteriophage T4* y una cepa no patógena de *BactoBeads™ E. coli*.

2.1 Material suministrado

Almacenar todos los componentes detallados a continuación a temperatura ambiente:

- Tubos cónicos 50 ml
- Tubos cónicos 15 ml
- Tubos microcentrifuga 1,5 ml
- Puntas pipetas estériles 10 ml
- Placas de Petri estériles
- Asas del cultivo estériles

NOTA: Tras la recepción, almacenar los componentes percederos a las temperaturas indicadas.

NOTA: Todos los componentes de este kit están destinados a la investigación educativa. No pueden ser utilizados con fines de diagnóstico o médicos, ni pueden ser administrados o consumidos por seres humanos o animales.

2.2 Material requerido y no suministrado

- Incubador de 37°C
- Baño de agua
- Micropipetas automáticas y puntas
- Pera de succión para pipetas
- Papel de aluminio

NOTA: Asegúrense que el material de vidrio utilizado durante la práctica esté limpio, seco y libre de residuos de jabón.

Manual de preparación de los reactivos y muestras en el anexo 1.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 ¿Qué es un virus?

En el siglo XIX, los científicos estaban trabajando en la caracterización de los microbios causantes de enfermedades. Algunas de estas enfermedades como pueden ser la cólera, la tuberculosis y el ántrax pueden ser explicados por la presencia de una bacteria específica, pero otras enfermedades como la rabia no es así. Estas enfermedades a las cuales no encontraban un organismo dijeron que eran causadas por químicos biológicos. Posteriormente, fueron llamados **virus**.

Martinus Beijerinck, científico holandés, en 1899 propuso que el virus que causa la enfermedad del mosaico del tabaco era un agente que se replicaba dentro de las células de la planta del tabaco y que era mucho más pequeño que una bacteria.

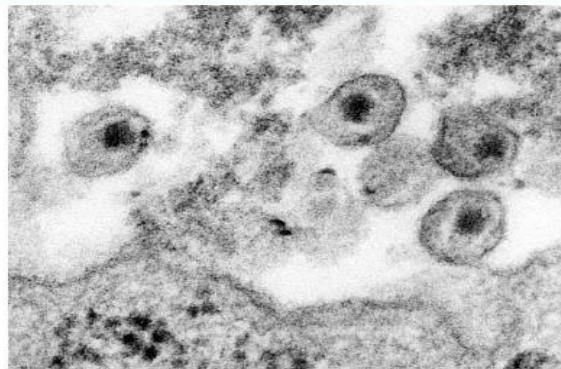
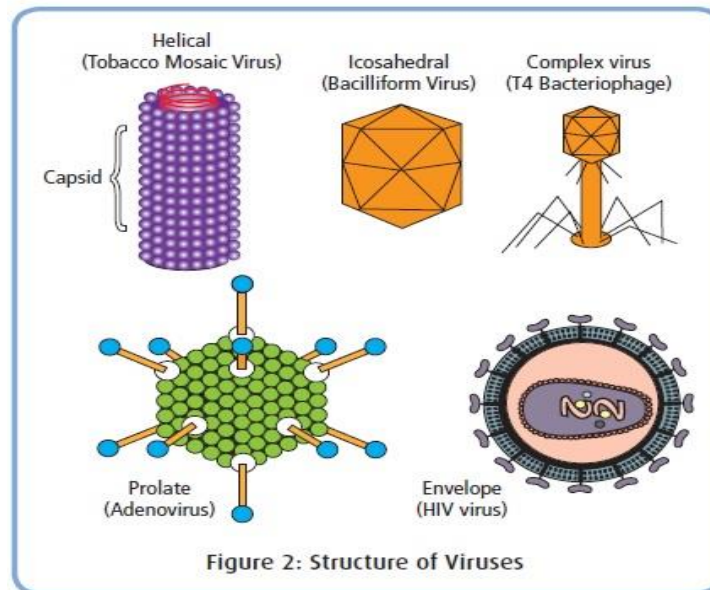
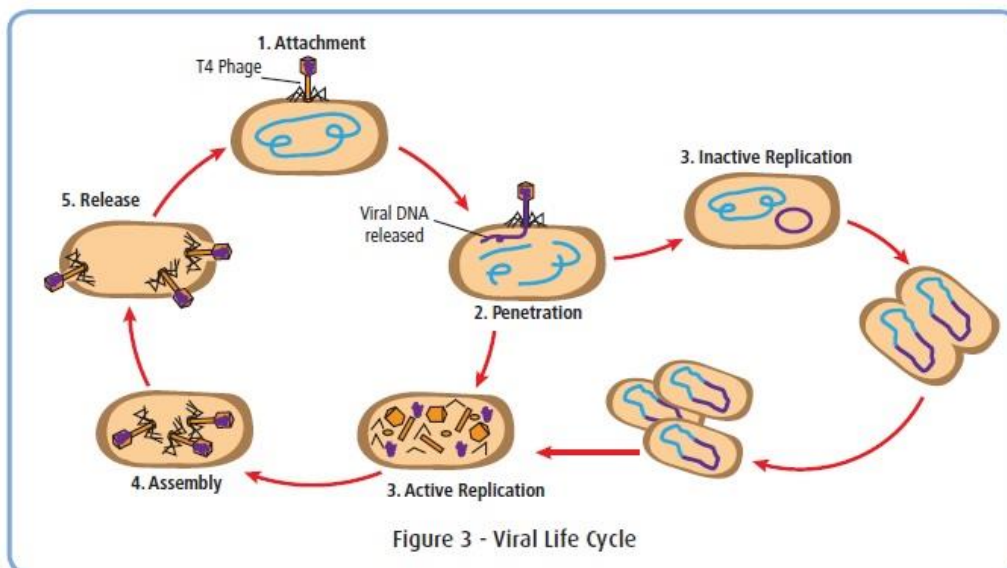


Figure 1: An electron microscope image of the Human Immunodeficiency Virus.

Hoy en día, los virus se consideran partículas infecciosas, las cuáles podemos llegar a observar gracias a los microscopios electrónicos (Figura 1). Lo que se observa a través del microscopio recibe el nombre de **virión**. Los viriones están formados por un genoma de ADN o de ARN, una cápside proteica protectora y en alguno de los casos también tienen una membrana lipídica externa (Figura 2).



Para realizar la replicación y poder dar a más viriones necesitan la maquinaria de una célula, ya que ellos no tienen los mecanismos para poderlo realizar. Ésta es la razón por la cual no se considera un ser vivo. El proceso a través del cual el virión es capaz de infectar una célula se llama **proceso patológico** y está formada por varias etapas (Figura 3):



1. Ataque: los virus se unen a la célula huésped mediante mecanismo de reconocimiento específico, ya sea gracias a receptores de membrana como a lípidos.

2. Penetración: el virus puede entrar en la célula y liberar su material genético o inyectar su material genético al interior de la célula.

3. Replicación: el virus usa la maquinaria de la célula para llevar a cabo la replicación del material genético y las proteínas que forman parte de su cápside. En alguno de los casos el material genético del virus es incorporado dentro del material genético de la célula y se convierte en un **provirus**.

4. Ensamblaje: las nuevas proteínas de la cápside sintetizadas se ensamblan para dar lugar a los nuevos viriones con el material genético en el interior de ellos.

5. Salida: los nuevos viriones pueden salir de la célula mediante la lisis celular o bien por vesículas.

Un gran número de virus viven en nuestro interior. La gran mayoría de ellos son benignos y son beneficiosos para nosotros. Sin embargo, hay otros que son virulentos y que causan enfermedad. Estos virus están en el punto de mira de científicos y médicos.

3.2 Virus y humanos

Los virus tal y como hemos comentado anteriormente usan la maquinaria de las células del huésped, en nuestro caso los humanos, para poder reproducirse. En alguno de los casos este proceso no implica ningún cambio en la salud del humano, en algunos casos podemos tener ciertas molestias, como pueden ser los rinovirus que causan faringitis y secreción nasal, y en otros pueden llevarnos a la muerte, como el virus del ébola.

Entre los problemas que presentan los virus y que hace que sea complicado su control y erradicación están, por un lado, la alta tasa de mutación que presentan, como es el caso del virus VIH, y, por otro lado, el hecho que algunos virus tienen una fase latente donde el virus está en forma de provirus dentro de la célula. Durante esta fase latente nuestro sistema inmune no puede luchar contra él y esto hace que puedan estar años en esta fase hasta que se vuelve a activar el ciclo.

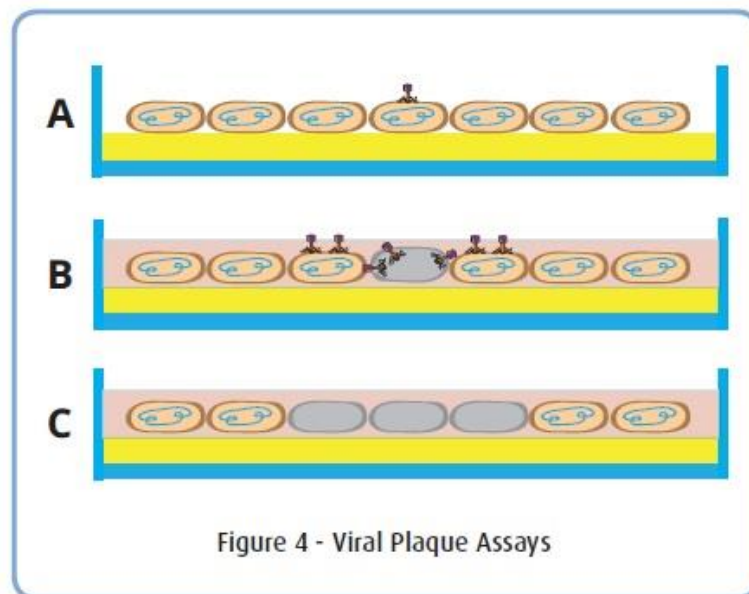
Otro de los problemas con los que nos encontramos en el caso de los virus es que no hay tratamientos específicos para todos ellos y en muchos de ellos directamente no existe tratamiento. Es por esto que la primera línea de tratamiento es la **prevención**. Eso empieza limitando la expansión de los virus, con medidas como el lavado de manos, el control de los alimentos, realizando prácticas sexuales seguras, entre otras. Otra de las defensas con las que contamos son las **vacunas**. Las vacunas virales normalmente están formadas por parte de los virus o con una imitación de forma sintética del virus para poder crear una reacción del sistema inmune. Esto provoca que cuando entremos en contacto con el virus después de la vacunación nuestro sistema inmune lo reconozca rápidamente y lo elimine.

Otra opción son los **medicamentos antivirales**. Sin embargo, como los virus usan la maquinaria de la célula para replicarse es complicado encontrar antivirales que maten de forma específica al virus sin verse afectadas las células del organismo. Además, al tener una alta tasa de mutación estos se adaptan muy bien y se convierten en resistentes con facilidad. Por esto, normalmente, los tratamientos antivirales se basan en el uso de varios medicamentos para poder combatir la infección. La función de estos en muchos casos es impedir la reproducción o la penetración de este en las células de forma que la **carga viral** (cantidad de virus) sea indetectable, pero sin eliminarlo completamente del cuerpo.

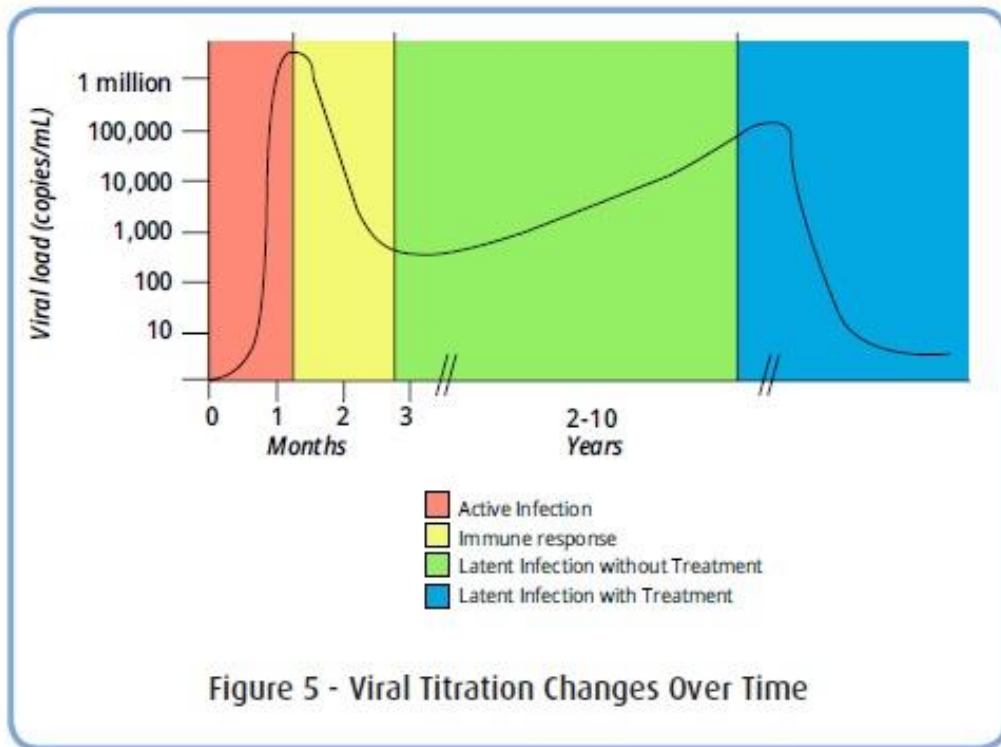
3.3 Cuantificación viral mediante un ensayo de placa

Los médicos que recetan antivirales para infecciones crónicas deben controlar continuamente la gravedad de la infección. Lo hacen determinando la concentración de partículas virales en una muestra dada. Este valor a menudo se **denomina carga viral, carga viral o título viral**. Por ejemplo, la carga viral de una persona con SIDA que se somete a una terapia antiviral contra el VIH se determinará antes del tratamiento, de 2 a 8 semanas después del inicio del tratamiento, y luego cada 3-6 meses, siempre que el tratamiento continúe. Tal monitoreo ayuda al médico a evaluar el éxito de la terapia y a detectar rápidamente la resistencia antiviral. Conocer su carga viral también ayuda a los pacientes a controlar mejor su condición y a tomar decisiones sobre actividades que podrían propagar un virus activo.

Existen muchos métodos para medir la carga viral. Un método altamente preciso es medir el número de secuencias de ADN o ARN virales específicas en una muestra utilizando **PCR cuantitativa** o **PCR de transcriptasa inversa**. Este método requiere acceso tanto a equipos avanzados como a técnicos altamente capacitados. Otra herramienta popular son los **ensayos de inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA)**, que utilizan la unión antígeno-anticuerpo para detectar proteínas antivirales específicas en la muestra de un paciente. Los ELISA son rápidos y sensibles, pero son solo medidas indirectas de la carga viral. Finalmente, se puede usar un ensayo de placa para determinar la carga viral en función del número de células infectadas por virus activos en la muestra de un paciente.



Durante un ensayo de placa, la muestra potencialmente infectada se diluye en serie y se inocula en un cultivo de células huésped. Esto es seguido por un período de incubación que permite que cualquier virión presente se una a estas nuevas células (Figura 4a). A continuación, se vierte una capa de agar sobre las células potencialmente infectadas. Debido a que el cultivo de células huésped es una sola capa de células y al agar que bloquea el virus para que no se mueva verticalmente, la única forma de propagación de un virus es infectando una célula vecina (Figura 4b). En consecuencia, durante el próximo período de incubación, se formará una zona circular de infección alrededor de cualquier célula infectada (Figura 4c). Esta zona circular se conoce como **placa** o calva y, de hecho, se puede visualizar a simple vista, especialmente cuando se usan tintes adicionales que enfatizan la diferencia entre las células vivas no infectadas y las células muertas infectadas.



Después de un ensayo de placa, la carga viral se calcula como una medida de la **unidad de formación de placa (UFP)** por mililitro. Para tener en cuenta la variación y los errores en el recuento, solo las placas de Petri que contienen entre 10 y 100 placas/calvas se utilizan para calcular las mediciones de UFP. Además, se preparan múltiples placas de Petri por muestra porque la concentración viral en un paciente puede variar enormemente con el tiempo (Figura 5). Por ejemplo, alguien que se ha infectado recientemente con el VIH puede tener más de 40 millones de copias virales por ml de sangre, mientras que alguien en tratamiento con una carga viral indetectable puede tener menos de 50 copias virales por ml. Para tener en cuenta este rango, los científicos prepararán una dilución en serie de la muestra inicial, crearán una placa de Petri para cada dilución y luego incorporarán la concentración de la dilución en sus cálculos de UFP.

En esta práctica, la clase evaluará a dos personas que toman una nueva combinación de medicamentos contra el VIH. Se tomaron muestras de sangre antes y durante el tratamiento. Cada grupo preparará cuatro placas de Petri de ensayo de placa para determinar la carga viral para un paciente en un punto de tiempo. Después, todos los grupos compartirán sus resultados y evaluarán el éxito del tratamiento para ambos pacientes.

4. DESCRIPCIÓN DEL EXPERIMENTO

ANTES DE COMENZAR EL EXPERIMENTO

1. Lea todas las instrucciones antes de comenzar el experimento.
2. Escriba una hipótesis que refleje el experimento y prediga los resultados experimentales.

OBJETIVO DEL EXPERIMENTO:

En este experimento se testarán dos pacientes que están tomando una nueva combinación de medicamentos antivirales para VIH. Cada grupo preparará cuatro placas de Petri para poder determinar la carga viral. Después se compartirán los resultados y se evaluará si el tratamiento es efectivo.

4.1 Precauciones

1. Llevar gafas y guantes de laboratorio mientras se trabaja.
2. El agar se debe calentar y fundir lo cual puede ser peligroso si se realiza incorrectamente.
3. **NO PIPETEAR CON LA BOCA**, utilizar los dispositivos adecuados.
4. Lavarse las manos con jabón y agua después de haber trabajado en el laboratorio.
5. Tapar los tubos y cubrir las placas de forma rápida siempre que sea posible.
6. Usar puntas de pipeta estériles, especialmente al preparar las placas de agar LB y alicuotar el agar COLORTOP™.
7. Limpiar las superficies de trabajo con un desinfectante de laboratorio o una solución de lejía al 10% o de etanol al 70% antes de iniciar la práctica para evitar una posible contaminación.
8. Las bacterias *E.coli* y el *Bacteriophage T4* utilizados en este experimento no son patógenos para el ser humano. A pesar de ello, es una buena práctica seguir los siguientes consejos para el manejo y desecho de los materiales contaminados con bacterias:
 - a) Limpiar las superficies de trabajo con un desinfectante de laboratorio o una solución lejía al 10% o de etanol al 70%.
 - b) Todos los materiales que entran en contacto con los microorganismos deberían ser desinfectados antes de tirar a la basura. Desinfectar los materiales lo antes posibles después de su uso, bien utilizando un autoclave a 121°C durante 20 minutos, o bien, por inmersión de los materiales durante una noche en una solución al 10 % de lejía.

4.2 Cronología de la práctica

Módulo I: Ensayo de placa

Esta sección describe los preparativos recomendados previos a la práctica y los requisitos de tiempo aproximado para completar cada actividad.

Qué Hacer	Cuando	Tiempo requerido
Verter LB en la base de las placas de Petri	2-7 días antes del Módulo I	45 min
Preparar PBS	Antes del Módulo I	5 min
Preparar cultivo de células huésped	1 día antes del Módulo I	10 min antes de la incubación durante la noche
Preparar muestras de pacientes	1 día antes del Módulo I	30 min
Equilibrar temperatura del baño a 60°C e incubador a 37°C. Precalentar placas de Petri con LB	Día del Módulo I	10 min
Preparar agar COLORTOP™ y placas de Petri control	Día del Módulo I	50 min

Módulo II: Resultados y análisis

Qué Hacer	Cuando	Tiempo requerido
Obtener acceso a software de gráficos (opcional)	Durante Módulo II	Varios min

Resultados y limpieza

Qué Hacer	Cuando	Tiempo requerido
Los estudiantes observan los resultados de sus experimentos y realizan los cálculos necesarios	La clase siguiente al experimento	50 min
Descartar los materiales contaminados	Después que los estudiantes analicen sus resultados	40 min - overnight

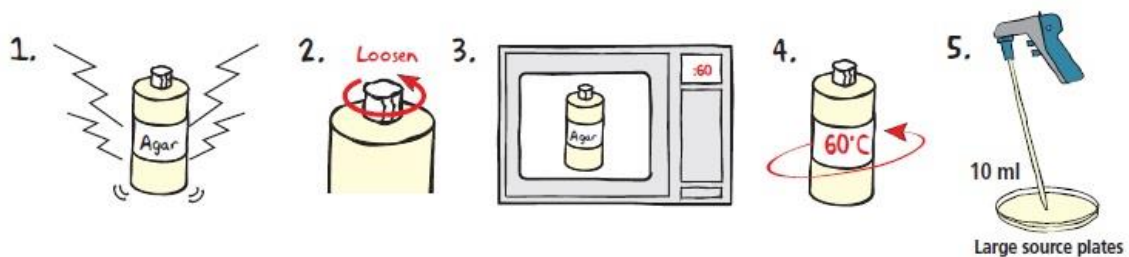
5. PRÁCTICA

Se realizarán 10 grupos de trabajo.

NOTA: Es importante que tanto el profesor como los alumnos estén familiarizados y practiquen la técnica aséptica básica antes de iniciar la fase de preparaciones previas y el **Módulo I**, ya que tanto el agar LB como el agar COLORTOP™ pueden contaminarse. La contaminación no afecta la formación de placas/calvas, pero puede dificultar el conteo. Seguir las indicaciones incluidas en el punto **4.1 Precauciones** (especialmente puntos 1, 3, 5, 6 y 7) para minimizar el riesgo de contaminación.

5.1 Preparaciones previas al día de la práctica

Preparación de las placas de Petri con agar (2-7 días antes de la práctica)



1. Romper el ReadyPour LB Agar sólido en pequeños trozos mediante movimientos y apretando la botella de plástico.
2. Aflojar el tapón de la botella, pero no retirarlo, para permitir que el vapor salga durante el calentamiento.

PRECAUCIÓN: Si no se afloja el tapón de la botella antes de calentar puede romperse o explotar.

3. Calentar el ReadyPour LB Agar en el microondas durante 60 segundos. Remover la botella y mezclar haciendo movimientos circulares, nunca agitar arriba y abajo.

PRECAUCIÓN: Utilizar guantes protectores para el calor y gafas de seguridad durante todos los pasos que impliquen la utilización de calor.

PRECAUCIÓN: Manipular la botella con precaución, ya que el tapón está aflojado y el recipiente y su contenido está caliente.

PRECAUCIÓN: Tener mucho cuidado y asegurarse que el agar no hierva dentro de la botella. Prestar mucha atención y parar el calentamiento si el agar comienza a burbujear.

Continuar calentando a intervalos de 30 segundos al microondas y volver a remover. Repetir este paso tantas veces como haga falta hasta que el agar se disuelva totalmente (la solución de color ámbar debe quedar transparente y libre de partículas pequeñas).

4. Una vez disuelto el agar ReadyPour™ enfriarlo a 60°C mediante movimientos circulares de la botella para facilitar una disipación uniforme del calor.
5. Verter 10 ml del agar ReadyPour™ enfriado en cada una de las cuarenta y dos placas de Petri grandes con una pipeta de 10 ml y una bomba de succión para pipetas.

6. Cubrir y esperar al menos 20 minutos para que las placas de agar LB se solidifiquen. Para obtener resultados óptimos, dejar las placas a temperatura ambiente durante la noche.
7. Las placas deben invertirse y colocarse en una bolsa de plástico con cierre hermético para garantizar que no se sequen.

Las placas de Petri se pueden almacenar a temperatura ambiente como máximo dos días. En el caso de no utilizar de forma inmediata las placas de Petri preparadas, se deberán almacenar a 4°C hasta el día de su uso.

NOTA: Si las placas de Petri se preparan más de dos días antes de su uso, deben almacenarse invertidas en una bolsa de plástico en el refrigerador (4 ° C). Retirar las placas de Petri del refrigerador y calentarlas en una incubadora a 37°C antes de usarlas.

NOTA: Consejos al verter agar LB en las placas de Petri.

- Utilizar una pipeta estéril de 10 ml con una bomba de succión para pipetas para transferir el volumen indicado de medio a cada placa de Petri. Pipetear con cuidado para evitar formar burbujas.
- Mover suavemente la placa de Petri hacia atrás y adelante para conseguir que el medio cubra toda la superficie de la placa de Petri.
- Si el medio fundido vertido en la placa de Petri contiene burbujas, se pueden eliminar pasando una llama cerca de la superficie del medio.
- Cubrir la placa de Petri y permitir que el medio se solidifique.

Preparación del PBS (antes que MÓDULO I)

1. Rotular 10 microtubos como PBS 1x.
2. Alicuotar 1ml de PBS 1x en cada uno de ellos.
3. Guardar el PBS sobrante para las muestras de los pacientes y las placas control (opcional).

Preparación del cultivo celular (día anterior a la práctica)

1. Utilizando un asa de cultivo estéril, añadir 2 BactoBeads™ a 10ml de LB en un tubo cónico de 50ml.
2. Incubar durante 16-20h a 37°C en un incubador.
3. Alicuotar 500 µl de medio de cultivo celular a 10 tubos.
4. Guardar el cultivo celular sobrante para las placas de control (opcional).

Preparación de las muestras de los pacientes (el día anterior o el mismo día de la práctica)

Las instrucciones a continuación son para crear cuatro concentraciones que simulan que un paciente responde bien a un tratamiento antiviral y un paciente que muestra signos de resistencia antiviral. También pueden crear su propio escenario y diluciones.

1. Abrir el vial de ViroBeads™.
2. Con una punta de pipeta estéril, añadir 1,25 ml de PBS 1x estéril al vial. Mezclar pipeteando arriba y abajo varias veces. Esta será la solución de stock viral.
3. En un tubo de microcentrifuga, mezclar 50 µL de solución de stock viral y 450 µL de PBS estéril para crear una dilución 1:10. Mezclar bien.

4. En un tubo de microcentrifuga, mezclar 10 μ L de solución de stock viral y 490 μ L de PBS estéril para crear una dilución 1:50. Mezclar bien.
5. En un tubo de 15 ml, mezclar 10 μ L de solución de stock viral y 5 ml de PBS estéril para preparar una dilución 1:500. Mezclar bien.
6. Usar las referencias de la **Tabla I** para rotular diez tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y alicuotar 130 μ L de la dilución apropiada para cada tubo.

TABLA I
(Diluciones de las 10 muestras de pacientes)

Muestra	Tratamiento	Dilución
P1, T0	Antes del tratamiento	Stock (vial de ViroBeads™)
P1, T1	1 mes después del tratamiento	1:50
P1, T2	3 meses después del tratamiento	1:500
P1, T3	6 meses después del tratamiento	1:500
P1, T4	9 meses después del tratamiento	1:500
P2, T0	Antes del tratamiento	Stock (vial de ViroBeads™)
P2, T1	1 mes después del tratamiento	1:50
P2, T2	3 meses después del tratamiento	1:10
P2, T3	6 meses después del tratamiento	1:10
P2, T4	9 meses después del tratamiento	01:10:00

7. Si las muestras se preparan antes de la práctica, mantenerlas a 4°C hasta el momento que se realiza la práctica o hasta que se necesiten estas muestras.

5.2 Preparaciones previas, el mismo día de la práctica antes de realizar el experimento

Preparación placas de Petri con base de agar LB (día de la práctica)

1. Incubar las placas de Petri con base de agar, previamente preparadas, a 37°C durante 15-30 minutos antes de realizar el experimento. Las placas de Petri con agar deben estar calientes para que el experimento funcione correctamente.
2. Cada grupo de estudiantes debe recoger cuatro placas de Petri con base de agar justo antes del **Módulo I: paso 7**.

Preparación del COLORTOP™ Agar (día de la práctica)

1. Preparar los baños de agua. Para este experimento, deberá sumergir cuarenta y dos tubos cónicos con tapa de rosca de 15 ml en agua a 60°C. Una forma de lograr esto es cubrir la parte superior de los baños de agua con papel de aluminio y hacer agujeros para cada tubo de 15 ml. Preparación del baño de agua o incubador a 60°C.
2. Aflojar, pero **NO RETIRAR**, la tapa de la botella de agar COLORTOP™. Esto permite que el vapor salga durante el calentamiento.
3. Calentar en el microondas el agar COLORTOP™ a temperatura alta durante 30 segundos para derretir el agar. Retirar cuidadosamente la botella del microondas y mezclar mediante movimientos circulares de la botella. Continuar calentando la solución en intervalos de 15 segundos hasta que el agar se disuelva completamente (la solución de color rojo debe ser transparente y libre de partículas pequeñas).

4. Una vez fundido el agar COLORTOP™, dispensar 5 ml de agar en cada tubo cónico con tapa de rosca de 15 ml (4 tubos por grupo x 10 grupos + 2 controles opcionales = 42 tubos).
5. Colocar todos los tubos de 15 ml en el baño de agua a 60°C para evitar que el agar se solidifique. El agar debe mantenerse caliente en todo momento.
6. Colocar los tubos de 15 ml en el baño hasta su uso. Los grupos de estudiantes deben recoger los tubos de uno en uno durante los pasos **9 a 14 del Módulo**

Preparación de las placas control (día de la práctica) (OPCIONAL)

Se han proporcionado material adicional de ReadyPour, Agar COLORTOP™ y placas de Petri para que se puedan preparar dos controles negativos de cultivos celulares no infectados. Dichos controles se utilizan en un entorno clínico para verificar la viabilidad celular y ayudar en la identificación de la placa. También son una oportunidad para que los alumnos se familiaricen con la técnica de análisis de placa antes de la clase.

1. Coger un tubo de agar COLORTOP™ del baño de agua y una placa de agar LB de la incubadora.
2. Añadir 100 µl de cultivo celular en el tubo.
3. Añadir 100 µl de PBS 1x en el tubo
4. Voltar con las manos durante 2-3 segundos para mezclar el contenido.
5. Verter el contenido en la placa de Petri con agar precalentada.
6. Tapar la placa de Petri.
7. Mover la placa de Petri hacia los lados y realizando movimientos circulares hasta que el contenido quede repartido uniformemente por toda la superficie de la placa de Petri.
8. Repetir los pasos del 1 al 7 para realizar un segundo control.
9. Dejar las placas de Petri durante 10 minutos en la poyata para permitir que el agar blando se endurezca.
10. Incubar a 37°C con las placas de Petri invertidas (con el agar en la parte superior) durante toda la noche junto con las placas de Petri preparadas por los alumnos en el **Módulo I**.

Experimento

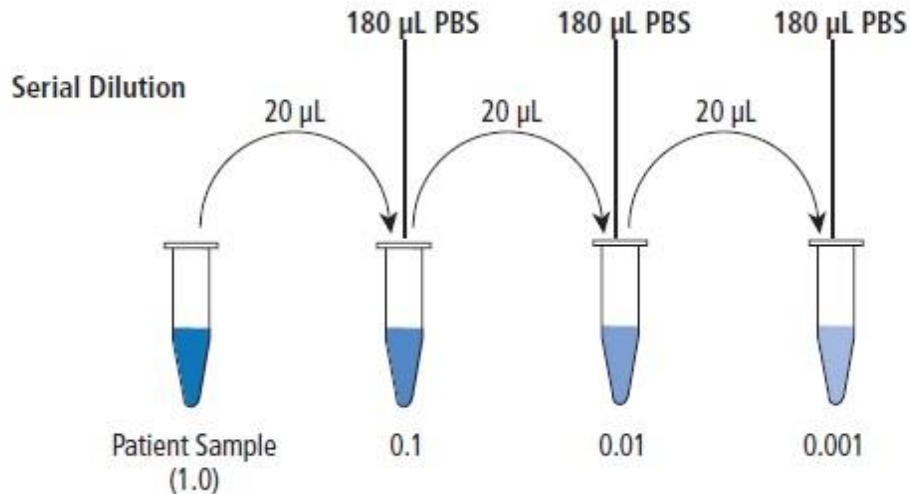
Módulo I: Ensayo de placa

En este módulo, se preparará una dilución en serie de la muestra de un paciente. Luego se realizará un ensayo de placa de cada dilución utilizando un método de doble capa de agar. Se prepara una mezcla de virus, bacterias y agar suave COLORTOP™ y luego se vierte sobre una base de agar duro. Finalmente, se incubará las placas de Petri durante 24 horas para permitir que el virus se propague y las células infectadas se rompan.

Cada grupo requiere:

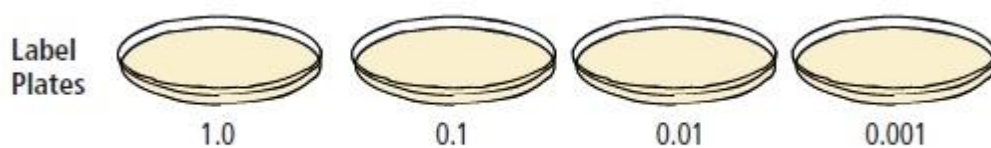
- 1 microtubo con 1 ml de PBS 1x.
- 1 microtubo con 500 µl de cultivo celular.
- 1 microtubo con 130 µl de la muestra de paciente.
- 3 microtubos.
- 4 placas de Petri con lavase de agar, incubadas a 37°C.
- 4 tubos cónicos con 5 ml de agar COLORTOP™, incubados a 60°C.
- Papel de aluminio (para aislar las placas de Petri con la base de agar).

5.3 Preparación de las diluciones de las muestras del paciente



1. Marcar 3 tubos de microcentrifugación como 0.1, 0.01 y 0.001 (los diferentes factores de dilución). Marcar también la identificación de cada grupo en los tubos.
2. Añadir 180 µl de PBS 1x en los tres tubos
3. Coger la muestra que ha de facilitar el profesor e identificarla como muestra 1.0.
4. Añadir 20 µl de la muestra del paciente (muestra 1.0) en el tubo 0.1 y mezclar con la pipeta o golpeando suavemente el tubo.
5. Añadir 20 µl de la muestra 0.1 al tubo 0.01 y mezclar con la pipeta o golpeando suavemente el tubo.
6. Añadir 20 µl de la muestra 0.01 al tubo 0.001 y mezclar con la pipeta o golpeando suavemente el tubo.

5.4 Marcar las placas de Petri con agar



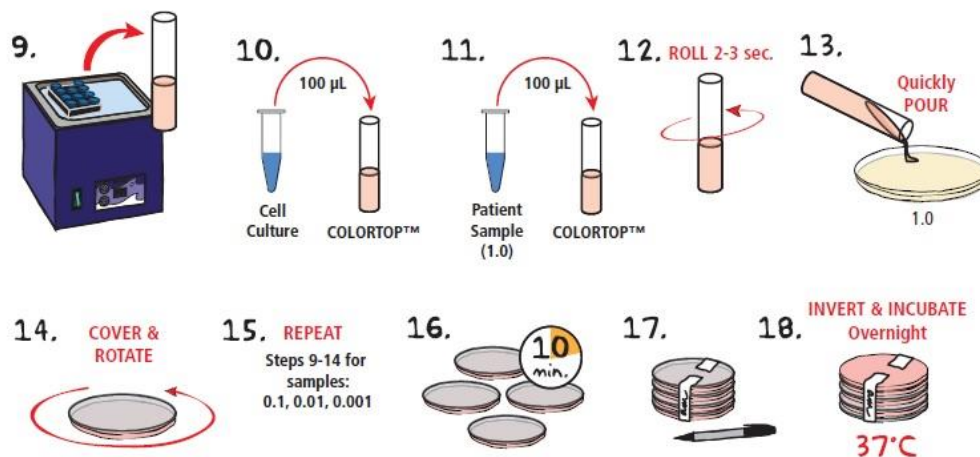
7. Revisar que las placas de Petri con agar estén a 37°C, ya que es importante realizar el experimento con las placas de Petri calientes.
8. Marcar las placas de Petri como 1, 0.1, 0.01 y 0.001. También se puede indicar el nombre del grupo, la identificación del paciente y la fecha de realización del experimento. Todas las indicaciones escritas en las placas de Petri deben ser pequeñas y en el borde de las placas para facilitar la observación posterior de las mismas.

NOTA: Mantener calientes las placas de Petri etiquetadas devolviéndolos a la incubadora lo antes posible y retirando solo una cada vez.

5.5 Ensayo de placa

Las siguientes instrucciones son para la muestra original del paciente (factor de dilución de 1.0) pero deben repetirse para las otras tres diluciones (0.1; 0.01; y 0.001). Debido a que la capa superior del agar se enfría muy rápidamente, preparar solo una placa de Petri cada vez. También se deben realizar los pasos 9-14 lo más rápido posible.

NOTA: El cultivo celular y las muestras de los pacientes se deben añadir, mezclar y verter rápidamente para evitar el endurecimiento del agar COLORTOP™.



9. Recoger el tubo de agar COLORTOP del baño o del incubador.

10. Añadir 100 µL de medio de cultivo de bacterias en el tubo

11. Añadir 100 µL de la muestra del paciente (muestra 1.0) en el tubo.

12. Rodar el tubo de agar entre las palmas de las manos durante 2-3 segundos para mezclar el cultivo celular y el virus con el agar.

13. Decantar la muestra sobre la placa de Petri con agar marcada como 1.0.

14. Tapar la placa de Petri y dejarla sobre la poyata. Sujetando la placa de Petri con las manos, extender la muestra mediante pequeños movimientos circulares. Esto dispersa el agar COLOR-TOP™ uniformemente por la superficie del agar LB.

NOTA: El cultivo celular y las muestras de los pacientes se deben añadir, mezclar y verter rápidamente para evitar el endurecimiento del agar COLOR-TOP™.

15. Repetir los pasos del 9 al 14 de este apartado para las muestras 0.1, 0.01 y 0.001.

16. Dejar las placas de Petri en reposo 10 min para que el agar solidifique.

17. Colocar las placas de Petri juntas una encima de las otras por grupos (identificar claramente que placas pertenecen a cada grupo).

18. Guardar las placas de Petri en posición invertida e incubarlas a 37°C toda la noche.

PUNTO DE PARADA OPCIONAL:

Después de la incubación, las placas de Petri pueden colocarse en una bolsa con cierre hermético y guardarse durante 1-2 semanas a 4 ° C.

Módulo II: Resultados y análisis

En este módulo observará las cuatro placas de Petri que preparó en el Módulo I, contará el número de placas/calvas en cada placa de Petri y lo usará para determinar la carga viral de la muestra original del paciente. A continuación, utilizará los datos de la clase para trazar los cambios en la carga viral con el tiempo en dos pacientes y recomendará cualquier cambio en el tratamiento.

5.6 Calcular la carga viral de las muestras

1. Observar las placas de Petri. Las placas de Petri deben estar turbias con el crecimiento celular. Las placas/calvas aparecerán como pequeñas manchas claras.
2. Cuando sea posible, contar el número de placas/calvas en cada placa de Petri. Debido a la amplia gama de diluciones, algunas placas de Petri pueden no tener placas/calvas y otras pueden tener demasiadas placas/calvas para poder contarlas. Anotar los resultados obtenidos en la **Tabla II**.

TABLA II

PACIENTE:

TIEMPO:

Placa	Observaciones	Nº placas/calvas
1.0		
0.1		
0.01		
0.001		

3. Calcular el número de unidades formadoras de placa por mililitro (PFU/mL).
 - a. Seleccionar una placa de Petri que tenga más de 10 pero menos de 100 placas/calvas. (Si hay dos placas de Petri que se ajustan a este rango, calcule la carga viral para ambas y promedie los resultados).
 - b. Multiplicar el factor de dilución de la placa de Petri por el volumen de virus agregado a la placa de Petri en el Módulo I, paso II (100 µl=0.1 ml).
 - c. Dividir el número de placas/calvas en la placa de Petri por el número calculado en el paso anterior (apartado 3.b).

$$\text{CARGA VIRAL} = \text{PFU/ml} = \frac{\text{(Nº placas/calvas)}}{\text{(Factor dilución x Volumen del virus diluido añadido)}}$$

5.7 Determinar un plan de tratamiento (opcional)

4. COMPARTA sus datos como una clase para determinar la carga viral de ambos pacientes en los 5 puntos de tiempo. Con los datos obtenidos completar la **Tabla III**.

TABLA III

Tiempo	Carga viral paciente1 (UFP/ml)	Carga viral paciente2 (UFP/ml)
Antes tratamiento (T0)		
1 mes después tratamiento (T1)		
3 mes después tratamiento (T2)		
6 mes después tratamiento (T3)		
9 mes después tratamiento (T4)		

5. GRÁFICO los resultados con el tiempo después del tratamiento en el eje X y PFU/mL en el eje Y.
6. RESPONDA lo siguiente: ¿Parece que el virus está suprimido en ambos pacientes? ¿Recomendaría un tratamiento continuo o un enfoque de tratamiento revisado para el paciente 1? ¿Qué le recomendarías al paciente 2?

6. RESULTADOS Y PREGUNTAS

6.1 Resultados

A continuación, se muestran imágenes de placas de Petri a concentraciones distintas como ejemplo de lo que se observa durante la realización del experimento.

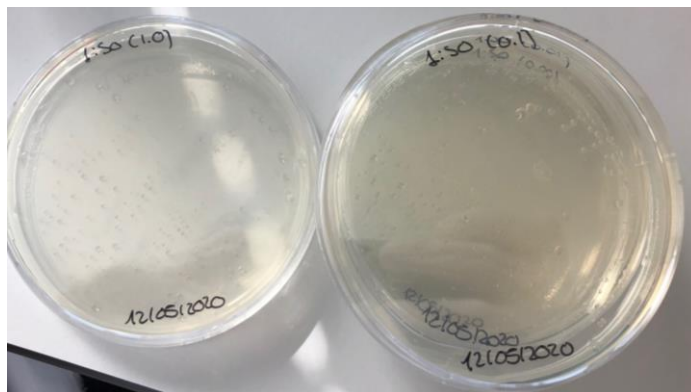


Imagen 1

En la **Imagen 1** se observan placas de Petri con agar sin cultivo. Aún no se ha añadido el cultivo y se observan de color transparente amarillento.

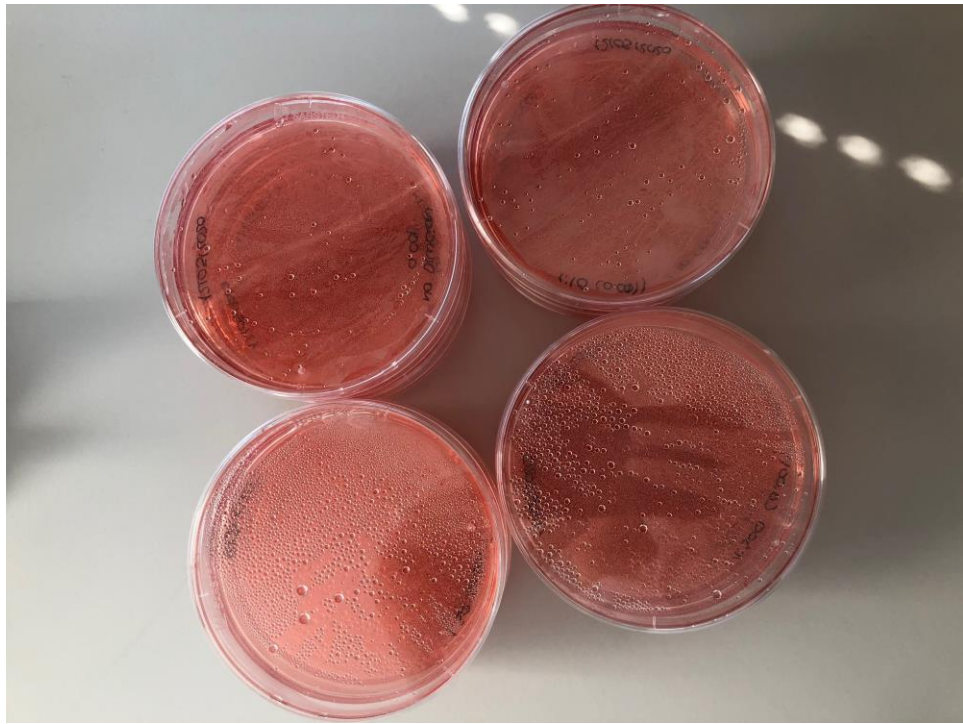


Imagen 2

En la **Imagen 2** se observan las placas de Petri con medio de cultivo y el virus a cultivar. En esta imagen se ve que las placas de Petri tienen un color rosado-rojizo debido a que se ha añadido los virus a cultivar. Esta imagen se obtiene antes de colocar las placas de Petri al incubador de 37°C.



Imagen 3

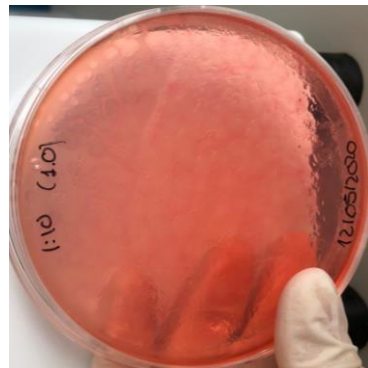


Imagen 4

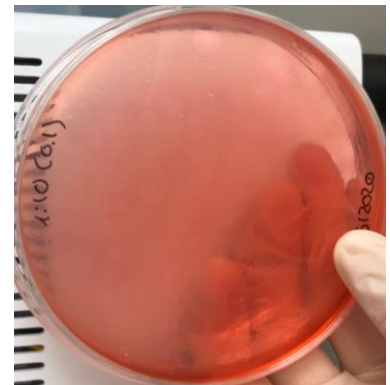


Imagen 5

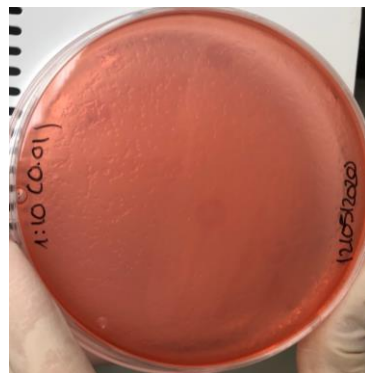


Imagen 6



Imagen 7

Las **Imágenes 4, 5, 6 y 7** son de las distintas concentraciones realizadas para un mismo paciente, la **Imagen 3** es de un paciente diferente.

Tanto en la **Imagen 3** como en la **Imagen 4**, se observa que en las placas de Petri hay placas/calvas pequeñas más transparente que el medio que los rodea, que es más turbio.

En la **Imagen 5** también se observan estas placas/calvas más transparentes, pero en menor número. La **Imagen 6** presenta menos placas/calvas que la **Imagen 5**. Y, finalmente, en la **Imagen 7** no se observa ninguna placa/calva y se ve del mismo color y turbidez toda la placa de Petri.

Cada una de las distintas placas/calvas que se observan es debida al crecimiento del virus y es lo que se tiene que contabilizar.

A continuación se presenta un ejemplo de los posibles datos que pueden encontrar los alumnos al realizar la práctica.

Calculando la carga viral



Placa	Observaciones	Nº placas/calvas
1.0	Muchas placas/calvas en la placa Petri, la mayoría se han fusionado.	Demasiadas para contarlas
0.1	Muchas placas/calvas en la placa Petri, algunas se han fusionado.	39
0.01	Algunas placas/calvas aisladas.	6
0.001	Sin placas/calvas. Capa continua de células fácilmente identificables.	0

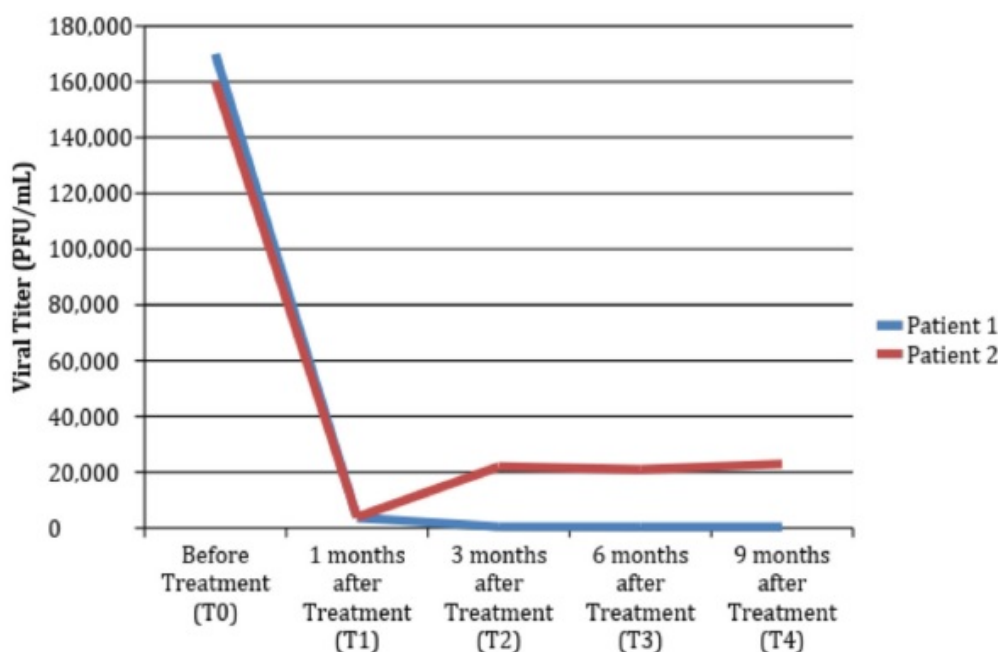
En este ejemplo, solo la placa de dilución 0.1 tenía un recuento entre 10 y 100. La carga viral en esta placa era de 39 placas. Esto se divide por el factor de dilución de la muestra original del paciente (0.1) y la cantidad agregada a la placa (100 µL) en ml (0.1 ml).

$$\text{Carga viral} = 39 \text{ PFU} / (0.1 * 0.1 \text{ ml}) = 3900 \text{ PFU/ml.}$$

Determinar un plan de tratamiento para los pacientes (opcional)

Tiempo	Carga viral paciente1 (UFP/ml)	Carga viral paciente2 (UFP/ml)
Antes tratamiento (T0)	170000	160000
1 mes después tratamiento (T1)	3700	3900
3 mes después tratamiento (T2)	480	22000
6 mes después tratamiento (T3)	440	21000
9 mes después tratamiento (T4)	450	23000

**Effects of 9 Months of Antiviral Treatment
On the Viral Load of Two HIV Positive Patients**



Para el **paciente 1**, la carga viral disminuyó y desde entonces se ha mantenido en un nivel bajo durante muchos meses. Esto indica un tratamiento estable y exitoso que mantiene el virus suprimido y ha detenido la progresión de la enfermedad del VIH. En este caso, los médicos recomendarían continuar el tratamiento antiviral y el monitoreo cada 3 meses.

Después de 2 años, la frecuencia de este monitoreo puede disminuir a cada 6 meses.

Para el **paciente 2**, la carga viral disminuyó inicialmente, pero después parece estar aumentando. Esto indica que el tratamiento actual no puede controlar la infección por VIH. Las razones del rebote viral pueden ser una mala adherencia al tratamiento, baja absorción de los medicamentos, interacciones inesperadas de medicamentos o la evolución de virus resistentes a los medicamentos. En este caso, un médico haría una prueba para determinar la causa subyacente al ver si/qué virus resistentes a los medicamentos están presentes y discutir cualquier cambio de tratamiento al paciente. Afortunadamente, se han desarrollado varios antivirales contra el VIH y un segundo tratamiento alternativo puede ser exitoso.

6.2 Preguntas previas

1. **Elegir un virus que haya sido noticia recientemente, ya sea por su impacto en la salud humana o por su coste económico. Investigar y descubrir la forma y el tamaño de los virus. Realizar un dibujo sencillo del virión y señalar su material genético, capa proteica y cubierta lipídica (si está presente).**

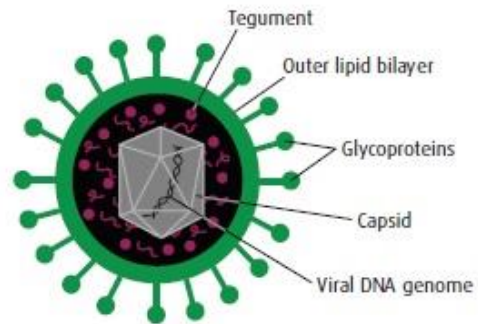
Las respuestas pueden ser muy variadas, aquí proponemos 2 ejemplos:

A. Virus de Epstein-Barr

Responsable de la mayoría de casos de mononucleosis.

Tamaño: 120-220 nm

Forma: esférica

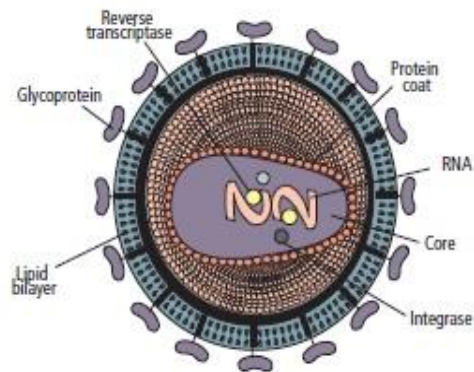


B. Virus de inmunodeficiencia humana (HIV)

Virus responsable del SIDA

Tamaño: 120 nm

Forma: esférica



2. **Debatir con los alumnos si los virus son organismos vivos o no. Completar la siguiente tabla con al menos 4 puntos (dividir a los alumnos para defender una posición u otra de la tabla, o hacer que den argumentos para ambas posiciones).**

Virus son organismos vivos

- Se reproducen
- Contienen ADN o ARN
- Con capacidad de mutación
- Con capacidad de autoensamblarse
- Necesitan energía
- Son estructuras complejas y organizadas
- A veces, responden a señales ambientales

Virus NO son organismos vivos

- Solo se pueden replicar utilizando el metabolismo de una célula huésped
- No crecen
- No producen su propia energía
- Son acelulares (no presentan orgánulos ni citoplasma)

3. **Cada año, la gripe cuesta miles de millones a la economía mundial en días de baja por enfermedad y pérdida de productividad o poner en peligro a muchos de los ciudadanos más vulnerables. Resumir tres enfoques de tratamiento que podrían ayudar a reducir la cantidad de casos de gripe o la gravedad de las infecciones.**

Las estrategias para reducir la gripe incluyen: las **vacunas** contra la gripe que se actualiza anualmente, una línea cada vez mayor de **tratamientos antivirales** que pueden acortar la duración de una infección y la **prevención**, como puede ser el simple acto de lavarse las manos con frecuencia para evitar la propagación del virus.

4. **¿Por qué es importante crear diluciones seriadas de la muestra del paciente antes de realizar la prueba?**

Las concentraciones virales pueden variar enormemente en pacientes infectados, pero el recuento preciso de las unidades formadoras de placas requiere que el número de placas/calvas que aparecen en una placa de Petri sea lo suficientemente grande como para evitar el sesgo de muestreo y lo suficientemente pequeño como para contarse fácilmente (y con precisión).

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros info@bioted.es