



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



**Reestructuración de las Prácticas de Virología del
Manual del Laboratorio de Microbiología General II**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIOLÓGICA**

PRESENTA

BEATRIZ MARTÍNEZ MORA

DIRECTOR

QFB JOSÉ OSCAR GONZÁLEZ MORENO

ASESOR

Dr. JOSÉ LUIS ALFREDO MORA GUEVARA

APOYO A LA DOCENCIA

AGRADECIMIENTOS

Mis Padres

Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constante deseo que sepan que este logro, es el logro de ustedes, que me formaron con buenos sentimientos, hábitos y valores, que gracias a estos hoy puedo ver alcanzada mi meta ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles de mi carrera.

Gracias a su confianza y apoyo me forme como una mujer segura y fuerte, que en los momentos más difíciles nunca desvanecí y gracias a eso hoy estoy concluyendo uno de los logros más importantes en mi vida. “Los amo con todo mi corazón”

Mi familia

Gracias por ser mis amigos y aliados; por su comprensión pero sobre todo el apoyo que me brindaron cuando se presentaron las situaciones más difíciles; esas palabras de consuelo, de ánimo, de cariño, esos abrazos, esas tardes de estudio para que lograra acreditar mis materias. Creo que es una lista enorme de buenas cosas que nunca terminaría de redactar, los quiero muchísimo y gracias por compartir este día tan especial conmigo.

Mi esposo y mi Santiago

Amor mío gracias por siempre estar a mi lado; desde que nos conocimos me has apoyado, impulsado y motivado de principio a fin. Compartimos momentos difíciles, pero sobre todo hermosos y muy felices, recibimos la mejor bendición, a nuestro Santiago que ha sido el motor y mayor motivación para seguir, y de aquí en adelante no pararemos, los amo muchísimo, son los amores de mi vida.

ÍNDICE.

RESUMEN.	4
INTRODUCCIÓN	5
1.- MARCO TEORICO	7
1.1 Antecedentes	8
1.2 Definición	10
1.3 Características de los virus	11
1.4 Clasificación	13
1.5 Replicación	14
2.- JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA	18
3.- OBJETIVOS	18
4.- MATERIAL	19
5.- METODOLOGÍA	19
6.- DIAGRAMA DE FLUJO	20
7.- RESULTADOS	21
8.- ANALISIS DE RESULTADOS	23
9.- CONCLUSIÓN	24
10.- REFERENCIAS	25

RESUMEN.

En el presente trabajo se llevó a cabo la reestructuración de las prácticas de Virología del Manual de Laboratorio de Microbiología General II editado en 1997, en el que se realizó lo siguiente: se redactaron los objetivos de manera que los verbos empleados quedaran en infinitivo, se actualizó la introducción de cada práctica y para esto se realizó una revisión documental (electrónica, libros, artículos, revistas y manuales) para posteriormente seleccionar la información más relevante. Se homogenizaron los cuestionarios de cada práctica a 10 preguntas quitando aquellas que resultan irrelevantes o no adecuadas; se modificaron los métodos utilizando diagramas de flujo y esquemas; se propuso una guía de estudio, donde se encontrarán los puntos más importantes a estudiar por el alumno para la preparación previa a cada práctica, un formato de resultados a todas las prácticas; además un anexo donde se encontrara información adicional de las prácticas.

Se propusieron dos nuevas prácticas: Efecto Citopático que ayuda a determinar el agente viral que invade al hospedero y Titulación del Bacteriófago T7 donde cuantificaremos las partículas infecciosas, que sería de gran utilidad en la aplicación en un tratamiento clínico.

Es indudable que el desarrollo en investigación inmunológica de la biología celular y molecular han aportado un gran número de técnicas sofisticadas para detección viral, pero es importante tener en cuenta que estas prácticas ayudaran al alumno a tener fundamentos claros, además que han sido de gran utilidad por la sencillez de las técnicas, la economía y la certeza.

El presente trabajo es una propuesta actualizada del modulo de Virología del Laboratorio de Microbiología General II, y se espera que una vez revisado y aprobado por el Comité Académico de la Carrera de QFB sirva de apoyo académico para dicho modulo.

INTRODUCCIÓN.

La Microbiología cobra gran relevancia debido al estudio de los microorganismos patógenos, bacterias, virus, hongos y parásitos; los microorganismos que tienen aplicación industrial ya que se utilizan en las síntesis de productos químicos (acetonas, ácidos grasos, enzimas, alcohol y medicamentos entre otros); los microorganismos en la industria de los alimentos (producción de vinagre, bebidas alcohólicas, mantequilla, queso, yogurt, pan, etc). La microbiología se puede definir sobre la base de su etimología, como la ciencia que trata de los seres vivos muy pequeños. Esto hace que el objetivo de esta disciplina venga determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia, y poder estudiar a los microorganismos.

La evolución de esta ciencia, dependió del desarrollo de estrategias experimentales fiables, la búsqueda de agentes infecciosos, parasitismo y aprovechamiento de los mecanismos de defensa del hospedador, condujeron a la acentuada autonomía de ciencias auxiliares como Virología, Inmunología, Micología, Parasitología y Bacteriología.¹

Gran parte de los avances en Microbiología se deben a la necesidad de resolver problemas prácticos. El objetivo material para la microbiología viene delimitado por el tamaño de los seres que investiga, lo que supone que abarca en enorme heterogeneidad de tipos estructurales, funcionales y taxonómicos: desde partículas no celulares como los virus, viroides y priones, hasta organismos celulares tan diferentes como las bacterias, los protozoos y parte de las algas y de los hongos.

Mientras que el objeto formal de la Microbiología lo constituye el conjunto de aspectos y enfoques desde los que se pueden estudiar los microorganismos tales como las características estructurales, fisiológicas, bioquímicas, genéticas, taxonómicas y ecológicas, por citar algunas.

La microbiología ha de ocuparse de todas las técnicas y metodologías destinadas al estudio experimental, manejo y control de los microorganismos, es decir de

todos los aspectos relacionados con el modo de trabajo de una ciencia empírica. En la actualidad los conocimientos microbiológicos de que se dispone son amplios y aún quedan por conocer y constantemente se efectúan nuevos descubrimientos de este campo.

Conociendo los precedentes de la Microbiología, es de resaltar el área de virología, porque ha resultado ser un grupo de partículas muy amplias; de interés actual para el sector salud, para el avance científico y descubrimiento de nuevas enfermedades y antídotos.²

Se realizará la actualización, reestructuración y propuesta de nuevas prácticas del manual de laboratorio de Microbiología General II, en el apartado de virología, para obtener de un material didáctico con mayor calidad de información para el alumno.

MARCO TEORICO.

La palabra virus es de origen latino y generalmente se designaban a cualquier microorganismo infectante, sin importar su naturaleza. Sin embargo, sin virus la tierra sería un lugar diferente, quizás incluso ¡un planeta sin vida!. En una cucharadita de agua hay más de un millón de virus que a la mayoría se les conoce como bacteriófagos (virus que infectan a bacterias), por cada bacteria en el agua hay 15 a 25 partículas virales. El descubrimiento de la abundancia de virus en el agua natural condujo a la conclusión de que los virus son importantes agentes biológicos que están involucrados tanto en la mortalidad de microorganismos acuáticos como en la constitución de las comunidades acuáticas. Gunnar Bratbak, En 1990 realizó experimentos sorprendentes de los cuales, selectivamente, se eliminaban bacteriófagos del agua del mar y se medían las tasas de crecimiento de las bacterias y el plancton. Era esperable que las poblaciones bacterianas y el plancton crecieran drásticamente debido a que eran liberadas de una infección viral. Para la sorpresa de los investigadores, las poblaciones bacterianas detuvieron completamente su crecimiento ya que dependían de los nutrientes que se liberaban a medida que los virus destruían a las bacterias. Sin la muerte de estos microorganismos por los virus, no había combustible para mantener en funcionamiento a las comunidades acuáticas.³

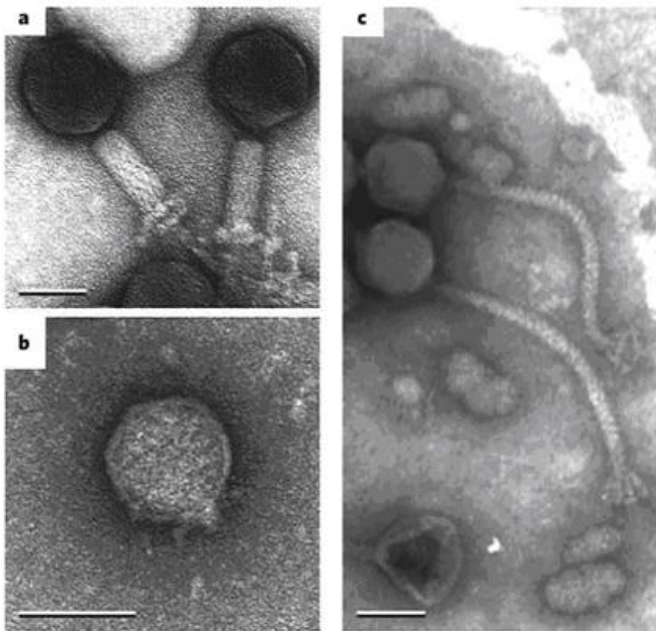


Figura 1.- Bacteriófagos con cola en el agua de mar.⁴

a) *Myxovirus*

b) *Podovirus*.

c) *Siphovirus*

ANTECEDENTES

Antes de la investigación del microscopio electrónico en 1931, los virus no se podían ver o cultivar en el laboratorio. Más importante aun los virus sólo se definían como agentes tan pequeños que podían pasar a través de los filtros que atrapaban a la mayoría de las bacterias conocidas. Los científicos tuvieron que desarrollar otros medios para observar y conservar otros agentes en el laboratorio. Las observaciones y métodos iniciales desarrollados para el estudio de los virus implicaban sistemas con plantas y bacterias. En realidad el primer virus descubierto fue uno de las plantas, conocido como virus del mosaico del tabaco (TMV), una enfermedad que destruye los cultivos de tabaco. En 1892, el botánico ruso Dimitri Iwanowski demostró que extractos de plantas de tabaco enfermas podrían transmitir la enfermedad a plantas de tabaco sanas, luego de pasajes a través de filtros de cerámica que atrapaban la mayoría de las bacterias.³

TOBACCO MOSAIC VIRUS

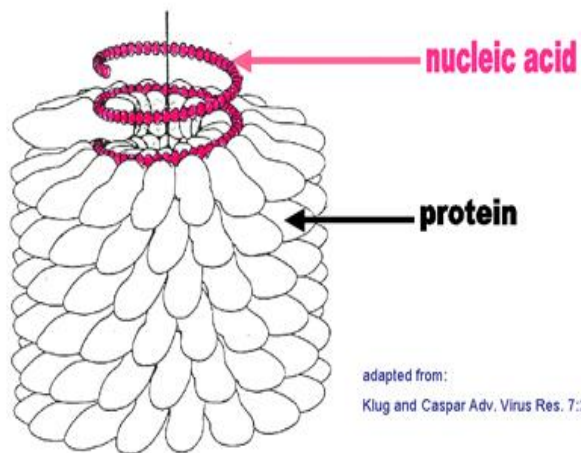


Figura 2.- Estructura del virus del mosaico del tabaco, denota una estructura helicoidal.⁵

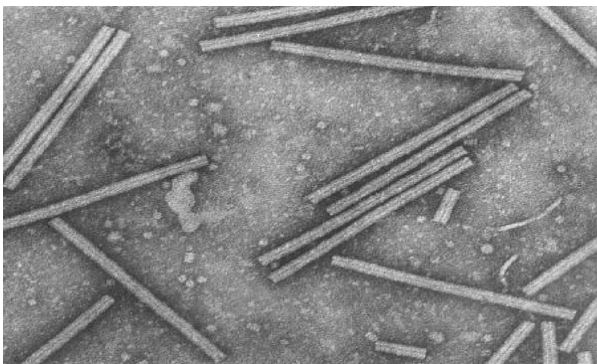


Figura 3.- Vista cercana de los bastoncillos del virus del mosaico del tabaco 1994.⁶

Cuadro 1. Acontecimientos destacados en el desarrollo de la virología médica.⁷

Fecha aproximada	Principales autores	Descubrimiento
1892	Iwanowski	Señaló que la enfermedad del mosaico, en las plantas de tabaco, se debía a un “agente filtrable”
1898	Löffler y Frosch	Descubrieron el virus de la glosopeda, que fue el primer virus de animales que se describió
1898	Beijerinck	Llamó al virus del mosaico <i>contagium vivum fluidum</i>
1902	Reed	Descubrió la causa de la fiebre amarilla
1907	Von Prowazek	Descubrió el primer virus de insecto
1908	Ellerman y Bang	Demostraron que la leucemia de pollo podría ser transmitida utilizando extractos sin células.
1911	Rous	Descubrió la transmisión en el pollo del virus del sarcoma que lleva su nombre
1915	Twort	Descubrió los bacteriofagos
1917	D’Herelle	Creó un ensayo en placa para la cuantificación de los virus infectantes; y acuñó el termino “bacteriófago”
1931	Woodruff y Goodpasture	Crearon el cultivo de los virus en embriones de pollo
1933	Shope	Descubrió el virus del papiloma del conejo
1935	Stanley	Logró cristalizar el virus del mosaico del tabaco
1936	Bittner	Descubrió el virus del tumor mamario del ratón y su transmisión por medio de la leche
1939	Delbruck	Inició el estudio sistemático de los bacteriófagos
1941	Hirst	Demostró que el virus de la influenza podía aglutinar los glóbulos rojos(hemaglutinación)
1940		Se desarrolló el microscopio electrónico y en la misma década las centrifugas de alta velocidad que permiten concentrar y purificar los virus.
1952	Dulbecco	Creó la teoría de la placa para el ensayo de virus de animales
	Hershey y Chase	Demostraron que bastaba con el DNA del bacteriófago para la duplicación de éste.
1953	Salk	Creó la vacuna con virus de la poliomielitis inactivado
1955	Sabin	Creó la vacuna con virus de la poliomielitis atenuado, pero activo

1957	Colter	Extrajo de virus de animales ácido nucleico dotado de poder infectante
	Stewart, Eddy, Gochenour, Borgese y Grubbs	Aislaron el virus del polio en cultivos de tejidos
1960	Enders	Creó la vacuna con virus activos atenuado del sarampión
1962	Rauscher	Descubrió en el ratón una leucemia linfocítica producida por virus
1962	Tretin, Yabe y Taylor	Señalaron que los adenovirus de origen humano podían producir tumores en el criceto recién nacido
1964	Temin	Emitió la hipótesis de que el RNA podría dirigir la síntesis de provirus de DNA
	Epstein y Barr	Señalaron la intervención de un virus de tipo herpes en el linfoma de Burkitt
1970	Baltimore, Temin	Obtuvieron independientemente pruebas de la existencia de la polimerasa de DNA regida por RNA (transcriptasa invertida) en viriones de virus de tumores de RNA.
	Spiegelman	Demostró que, en los virus oncogenos de RNA, la polimerasa de DNA regida por RNA cataliza la síntesis de un híbrido RNA:DNA
1971	Kufe, Hehlmann y Spiegelman	Encontraron que los sarcomas del hombre contienen cadenas de RNA homólogas de las que existen en un virus del cual se sabe que causa sarcoma en el ratón.
1972		Demostraron que en las células de los enfermos leucémicos (pero no en las células de individuos normales), existen series de RNA homólogas de las que presentan el virus de la leucemia de Rauscher.

DEFINICIÓN.

En vista del gran número de relaciones especializadas entre virus y células huésped que se descubrieron sucesivamente, no hay una definición satisfactoria, la siguiente es un intento de distinguir los virus de las rickettsias, clamidias y organelos celulares que poseen ácidos nucleicos: “Los virus son parásitos intracelulares obligados que contienen DNA o RNA; utilizan los sistemas de síntesis de la célula para la duplicación de la partícula infectante, llamada virión.”⁸

CARACTERISTICAS DE LOS VIRUS.

Tamaño:

Son 100 veces más pequeños que las bacterias, suelen medir 0,03 a 0,1 micrómetros (30 a 100 nanómetros).

Composición:

- Ácido nucleico que lleva la información genética y que constituye el genoma viral puede tener varias formas. Una partícula viral tiene en su estructura un solo tipo de ácido nucleico ADN o ARN, pero la forma de estos puede ser de doble o simple cadena, segmentado o no, circular, lineal, recubierto de una capa de proteína llamada cápside.

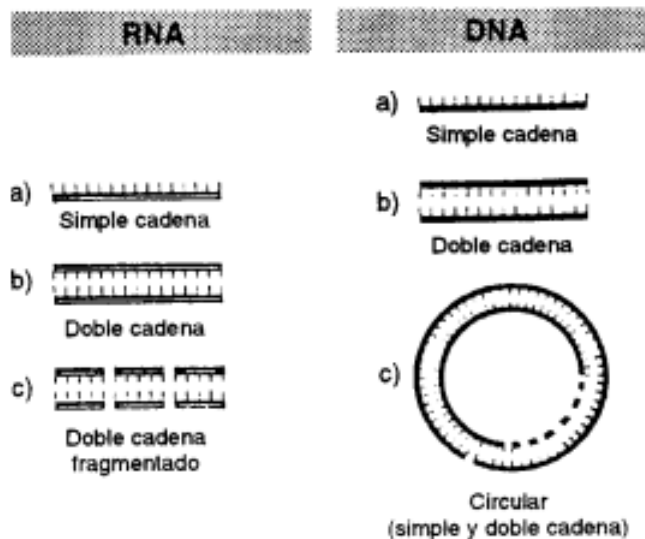


Figura 4.- Tipos de estructura de los ácidos nucleicos.

- Las cápsides están compuestas por muchas subunidades individuales denominadas **capsómeros**.
- Los capsómeros se unen entre sí para formar una cápside icosaédrica o irregular; por lo general adoptan una forma helicoidal (espiral), son cúbicas, con 20 caras planas.⁹

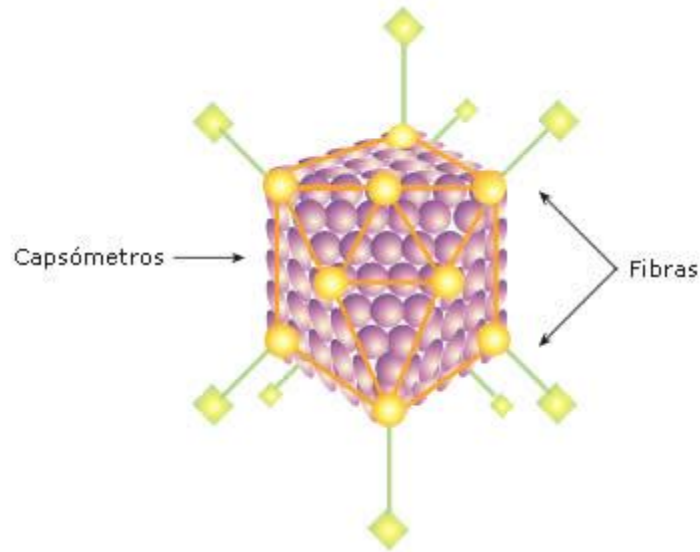


Figura 5.- virión icosaédrico. ¹⁰

La estructura completa, o sea, el ácido nucleico cubierto por la cápside, constituye la nucleocápside. Algunos virus constan únicamente de nucleocápsides **desnudas**, en tanto que otros poseen una envoltura o peplos aparentemente formado por membrana celular, hablándose entonces de virus **envueltos**. Algunas envolturas están cubiertas por espículas lipoproteicas, que son proyecciones superficiales de distintas longitudes, que actúan como factores de adherencia o como enzimas. Los virus envueltos pueden tener proteínas de matriz dentro de la envoltura que agregan rigidez a la partícula viral y se cree que actúan como un puente entre la nucleocápside y las proteínas virales sepultadas en la envoltura. Aseguran de tal modo la nucleocápside interna a la envoltura, lo cual puede ser importante para el brote y la liberación del virus de la célula huésped. El virus completo, incluido el ácido nucleico, la cápside, la envoltura y las espículas glicoproteínas, se denomina **virión** o partícula viral.

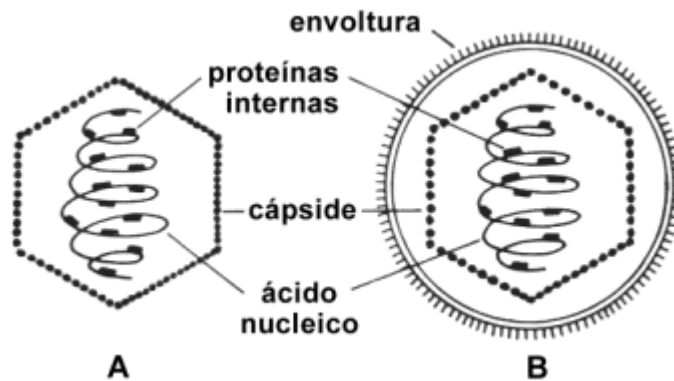


Figura 6.- Virus desnudo (A), Virus envuelto (B). ¹¹

CLASIFICACIÓN.

Los criterios sobre los cuales basar tal sistema han cambiado con los avances en nuestros conocimientos sobre su naturaleza y propiedades. Por ejemplo, el espectro de huéspedes no puede ser un criterio, no solo cada especie animal está sujeta a infección por una amplia variedad de agentes virales si no que numerosos virus infectan diferentes especies animales. En forma similar el patrón de patogenia de la enfermedad causada no es una base confiable para un sistema de clasificación. Se ha hecho cada vez más evidente que el sistema de clasificación debe basarse sobre las propiedades físicas y químicas de las propias partículas virales.

Criterios de clasificación:

- **Morfología:**

Es el criterio primario, es fácil de aplicarse porque no requiere de virus purificados. Las partículas virales pueden examinarse ya sea dentro de las células, es decir, en cortes delgados de tejido infectado, o bien en su estado extracelular. Habitualmente, los detalles morfológicos pueden ponerse de manifiesto por ensombrecimiento con delgadas partículas de algún metal pesado como uranio o tungsteno, por tinción con ácido ósmico o acetato de uranilo, o por tinción negativa con ácido fosfotúngstico.

- **Naturaleza física y química de los componentes virales:**

La similitud morfológica se correlaciona estrechamente con la similitud de los componentes de los viriones. Por ejemplo los virus con la morfología de adenovirus contienen genomas de ADN de doble cadena con un peso molecular de aproximadamente 23 millones; los papovavirus contienen genomas con ADN circular superenrollado con pesos moleculares de 3 a 5 millones; y los reovirus contienen genomas segmentados con ARN de doble cadena.

De hecho un sistema de clasificación de virus basado en las estructuras y tamaño de los genomas virales proporciona el mismo agrupamiento que uno basado sobre la morfología. En forma similar, los virus con similar morfología están compuestos por poblaciones similares de proteínas y un sistema de clasificación basado sobre patrones en el gel de poliacrilamida.

- Estrategias empleadas para la expresión genética y la replicación.

La clasificación se basa en la morfología y la naturaleza de los componentes del virión se correlaciona de manera exacta con una tercera característica viral: la estrategia que emplean los genomas virales para expresarse y replicarse. Por ejemplo, aunque los piconavirus, los togavirus y los coronavirus poseen genoma RNA, las estrategias usadas por cada uno para expresar la información que codifican, son muy diferentes. Por otra parte los reovirus y los rotavirus no están relacionados a juzgar por la secuencia de bases de sus ácidos nucleicos y por criterios inmunológicos pero ellos poseen una morfología similar y ácidos nucleicos y componentes proteicos parecidos a juzgar por su tamaño, su número de especies y su función y emplean las mismas estrategias para la expresión genética y la replicación por consiguiente, ambos son Reoviridae.¹¹

REPLICACIÓN.

- Los virus son parásitos intracelulares obligados por cuanto carecen de organelos que les permitan una vida autótrofa.
- La cinética de replicación viral varía dependiendo del tipo de genoma que posea el virión, esto permite inferir los mecanismos de interacción virus-célula de un virus desconocido a partir de hallazgos presentes en virus con características genéticas similares.
- La replicación viral requiere de una interacción entre los distintos compartimentos celulares y las macromoléculas virales.
- Las proteínas virales son sintetizadas en los ribosomas libres en el citosol o asociados al retículo endoplasmico rugoso (RER) y son transportadas por sistemas de vesículas hacia los distintos componentes del aparato de Golgi (cis, medium y trans Golgi) como se observa en el siguiente esquema.
- La localización celular de las proteínas virales está sujeta a información presente en las proteínas en la denominada péptida señal, que es el conjunto de los primeros aminoácidos sintetizados en el ribosoma, esta secuencia constituye el código postal para el direccionamiento de la proteína en un determinado espacio celular.
- Unos agentes virales tienen una replicación estrictamente citoplásmica, mientras que otros alcanzan el núcleo celular, todo dependiendo de la adaptación realizada entre los virus y las células que las hospedan.¹²

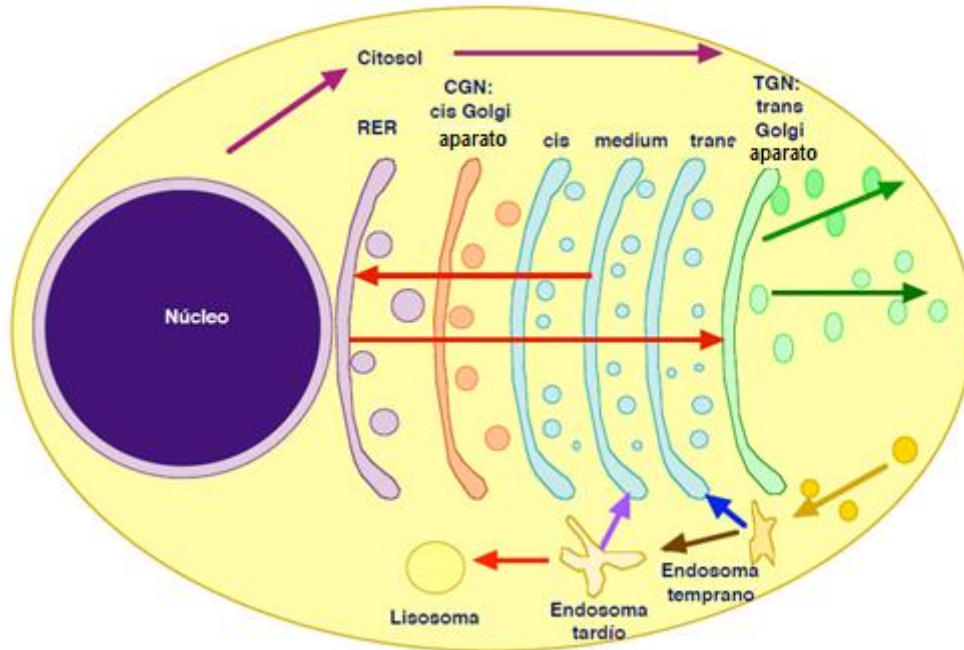


Figura 7.- Transporte de proteínas entre los distintos compartimentos celulares y en el citosol. ¹³

- Las proteínas que se dirigen al aparato de Golgi son modificadas mediante procesos de maduración postranslacional que requieren del sistema enzimático presente en los diferentes componentes del aparato de Golgi (cis, medium y trans Golgi) que garantizan el adecuado plegamiento molecular, los clivajes proteolíticos y da lugar en la fase final a la proteína madura funcional que poseerá las funciones de proteína estructural o no estructural.
- Las glicoproteínas virales requieren de este sistema de transporte para garantizar su localización en la membrana celular, mientras que otras proteínas que constituyen las cápsides virales pueden realizar su proceso de síntesis y transporte en el citosol y dirigidos sólo por el citoesqueleto celular. ¹²

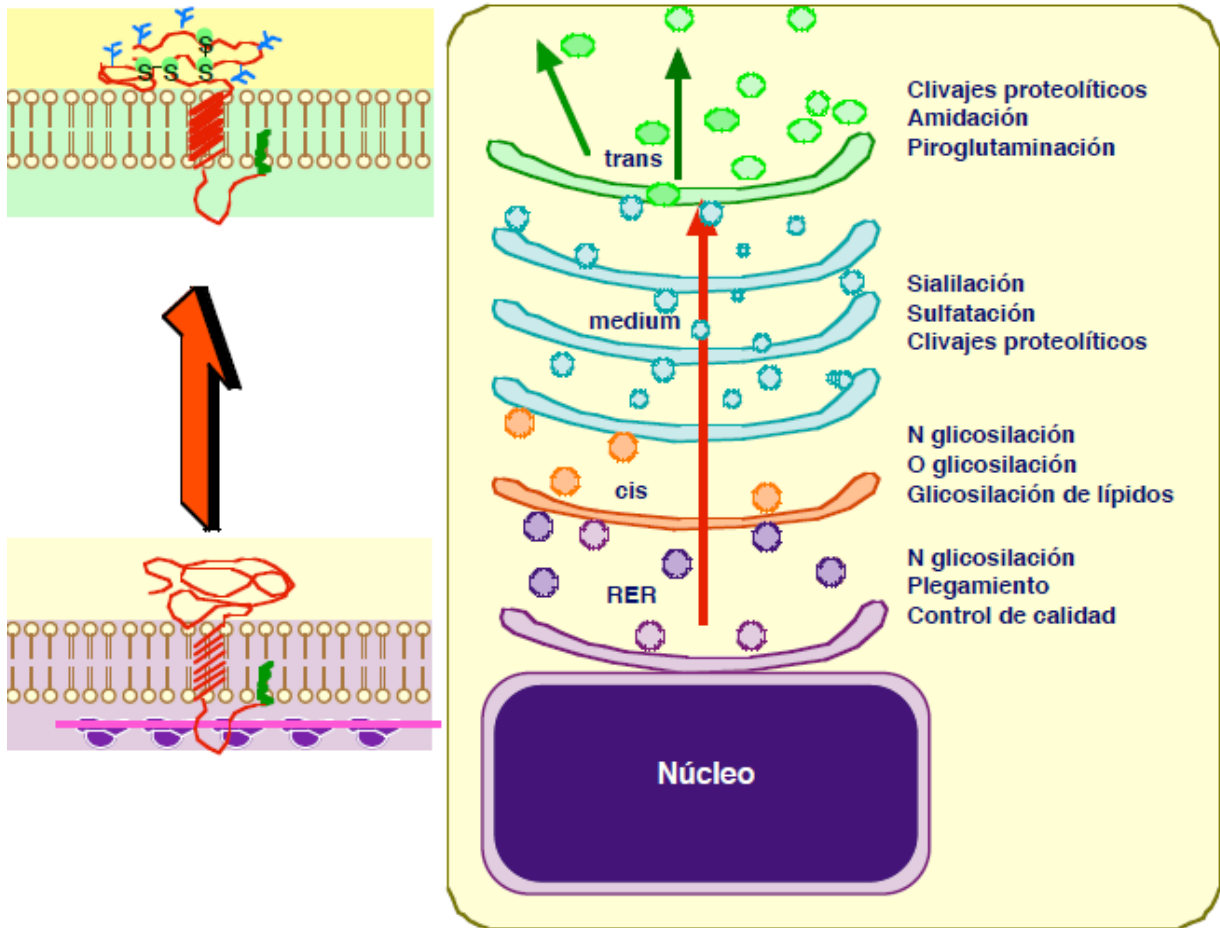


Figura 8.- Diferentes componentes del aparato de Golgi (cis, medium y trans Golgi) que garantizan el adecuado plegamiento molecular.¹³

La producción de partículas virales requiere que la célula sintetice ARN mensajero, el ARN de tipo mensajero utiliza la maquinaria biosintética celular para la síntesis de proteínas virales. La célula eucariota sólo posee a nivel nuclear las enzimas necesarias para la producción de ARN mensajero a partir de ADN de doble cadena, por esta razón en caso que el virus posea un genoma diferente al ADN de doble cadena debe aportar a la célula las enzimas necesarias para la síntesis de ARNm.¹²

Para la comprensión de la patogenia de la infección viral es importante conocer cuál es la secuencia de acontecimientos observados en el interior de la célula huésped. Si bien los pasos que se mencionan a continuación no son un esquema rígido y único, en el interior de la célula infectada; si sirven como organigrama mental para comprender cómo funcionan los virus y algunos mecanismos patogénicos. El ciclo replicativo en el cual hay producción de progenie viral y liberación de partículas usualmente por lisis de la célula hospedera se denomina

ciclo lítico. La sola destrucción de tejido por la replicación viral es un mecanismo que puede llevar al daño tisular y a la falla orgánica por lesión del tejido noble.

En la fase inicial ocurre lo que se conoce como **periodo de eclipse**, el cual estaría dado in vitro como el lapso transcurrido entre la desaparición de los viriones en el medio circundante, la denudación, la liberación del genoma viral a nivel intracelular y la aparición de nuevos viriones.¹⁴

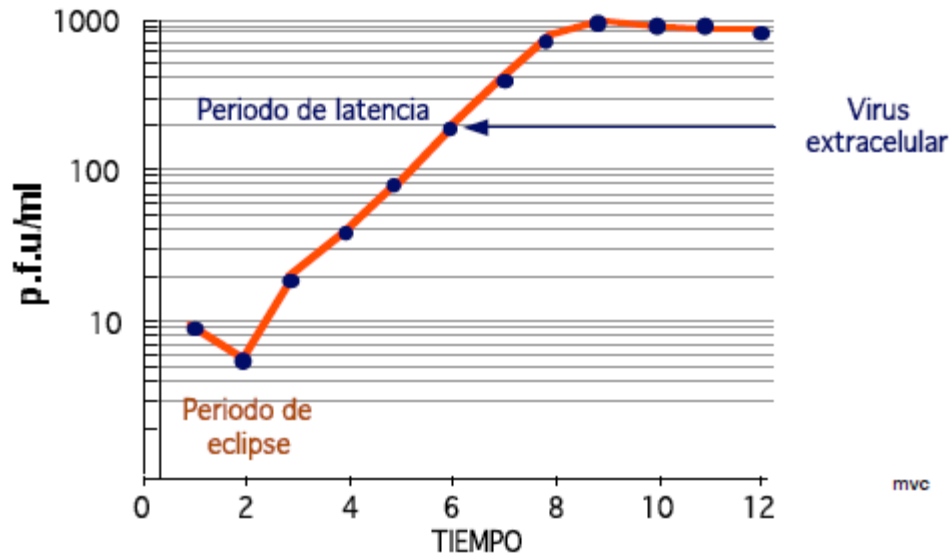


Figura 9.- Cinética de producción de partículas virales al interior de una célula infectada.¹⁵

Periodo de latencia el cual estaría comprendido entre la captación de viriones infectantes hasta la aparición del primer nuevo virión en el medio circundante.

Los periodos de eclipse y latencia pueden hacerse iguales en el caso de los virus cubiertos que maduran tomando parte de la membrana celular.⁹

JUSTIFICACIÓN ACADÉMICA.

El módulo de Microbiología General II, se imparte en el 7° semestre de la carrera de Química Farmacéutico Biológica, con un total de 12 créditos y 8 horas a la semana, distribuido en 4 horas para laboratorio. El laboratorio comprende tres áreas: Parasitología, Micología y Virología; para fines de esta tesis daremos énfasis y reestructuraremos cada una de las prácticas correspondientes a Virología. La importancia de este trabajo es la reestructuración de las prácticas de Virología y proponer procedimientos o practicas alternativas que son importantes en el desarrollo profesional de el alumno, ya sea en el área industrial, de la salud o en la investigación. Esto es debido a la evolución constante del conocimiento en el campo de la Virología que obliga a la búsqueda de textos cada vez más actuales y completos, pero a la vez prácticos y accesibles al entendimiento para quienes se aventuran por el vasto mundo de los virus. El actual manual de prácticas de microbiología general II se está utilizando desde octubre del año 1997, razón por la cual es importante la actualización, reestructuración y propuesta de nuevas prácticas del componente de virología.

OBJETIVOS.

General: Reestructurar, actualizar y proponer nuevas prácticas de Virología, del Manual de laboratorio de Microbiología General II.

Particulares:

- Modificar prácticas existentes en el manual de microbiología general II en el componente de virología incorporando nuevas introducciones, esquemas, cuestionarios, guías de estudio y formatos de reporte.
- Proponer dos nuevas prácticas en el modulo de virología y que sean factibles a realizar en un futuro.
- Buscar y seleccionar imágenes para todas y cada una de las prácticas en el módulo de Virología.
- Realizar un anexo general de las prácticas de Virología donde contendrá información más profunda y complementaria en caso de ser necesario.

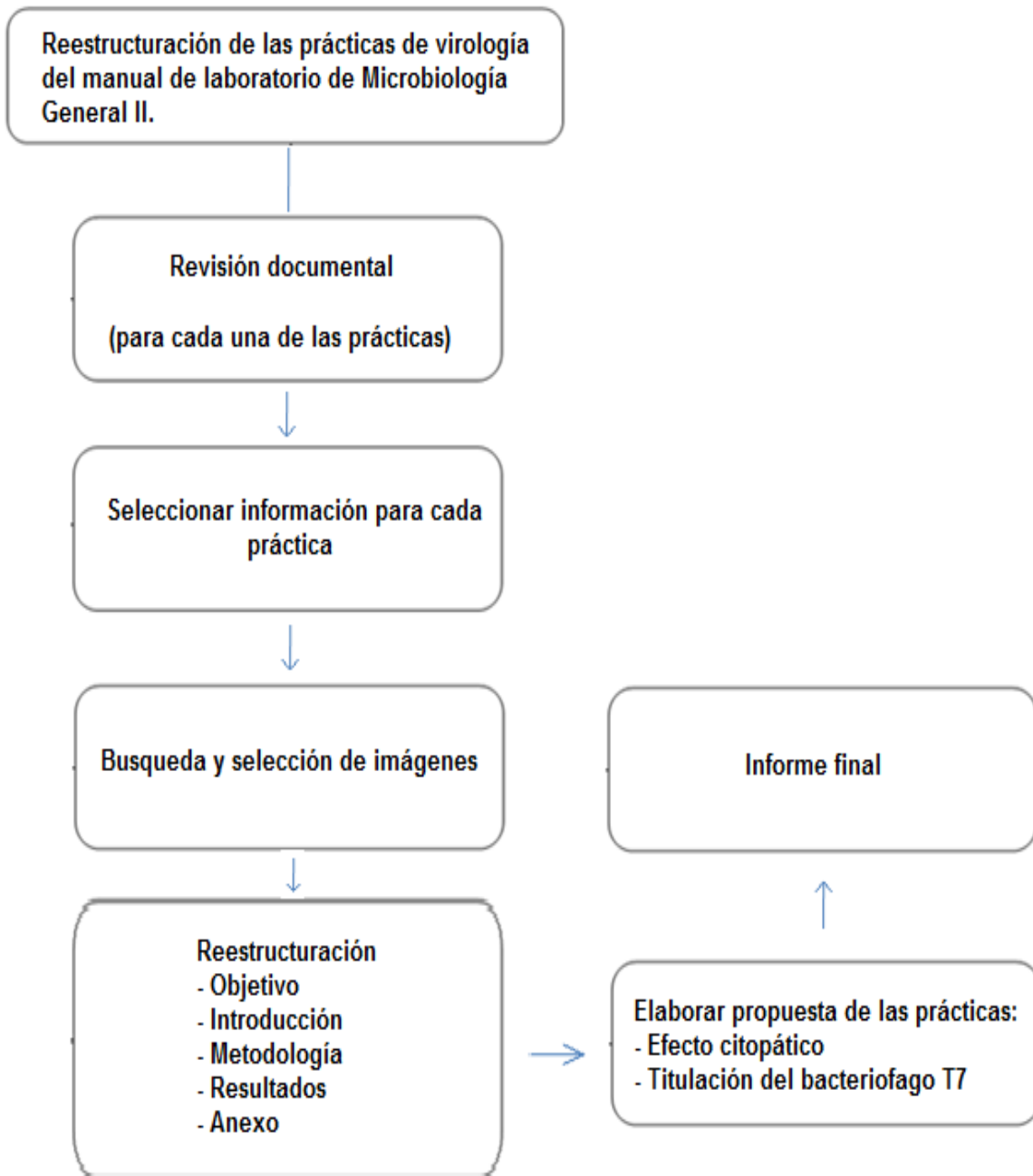
MATERIAL.

- Libros
- Información electrónica
- Manuales
- Revistas
- Tesis

METODOLOGIA.

1. Se realizó una revisión documental de la información requerida empleando: libros, artículos de revistas, manuales, tesis y páginas web.
2. Se eligió la información más apropiada para ser circunscrita en la actualización de cada práctica perteneciente al área de Virología.
3. Se modificó cada una de las prácticas en los siguientes aspectos:
 - Se modificaron los objetivos de tal manera que los verbos se redactaron en infinitivo.
 - Se actualizaron las introducciones y se incluyeron imágenes alusivas al tema.
 - La metodología de las prácticas se modificó haciendo uso de diagramas de flujo e imágenes que hicieran posible un mejor entendimiento del procedimiento a seguir en cada práctica, además del procedimiento descrito paso a paso.
 - Se elaboro una guía de estudios para que el alumno se apoye y amplie sus conocimientos acerca de la práctica que va a realizar.
 - Se homogenizaron los cuestionarios a 10 preguntas para cada práctica de Virología.
 - Se ideó un formato de resultados en tablas e imágenes para cada práctica.
 - Se creó un anexo con información complementaria a cada práctica
4. Se propusieron dos nuevas prácticas, para que sean factibles a emplear en un futuro.

DIAGRAMA DE FLUJO.



RESULTADOS.

En el presente trabajo se llevo a cabo la Reestructuración de las Prácticas del Módulo de Virología ya existentes en el manual de Laboratorio de Microbiología General II editado en 1997.

En cada una de las prácticas se modificó la redacción de los objetivos con los verbos en infinitivo y se agregaron objetivos que no estaban planteados. También se actualizó y amplió la introducción, se ilustró con imágenes representativas del tema, con la finalidad de darle al alumno los fundamentos necesarios para realizar la práctica.

Se modificaron los métodos que se encontraban de manera numerada a formatos con diagramas de flujo o imágenes que representen de manera más didáctica y entendible el procedimiento.

Se incluyo un formato en el cual los alumnos entregaran los resultados obtenidos.

Se implemento una guía de estudio que servirá como un precedente para que el alumno pueda buscar y consultar información adicional de la práctica que requiera.

El cuestionario se adapto a diez preguntas para cada práctica, las cuales pondrán a prueba los conocimientos adquiridos e investigados sobre el tema de estudio; para cubrir aspectos que permitan un claro conocimiento del contenido de las prácticas.

Finalmente se añadió información sobresaliente del tema que aunque esta no se

equiera para realizar la práctica, es importante para ampliar los conocimientos de nuevos métodos, procedimientos e información de las prácticas, el cual se encontrara al final de estas como un ANEXO.

Las prácticas de virología del manual de laboratorio de Microbiología General II quedo estructurado de la siguiente manera:

Práctica 1 Aislamiento de Bacteriófagos.

Práctica 2 Embrión de Pollo y sus vías de inoculación.

Práctica 3 Hemaglutinación viral e Inhibición de la hemaglutinación viral.

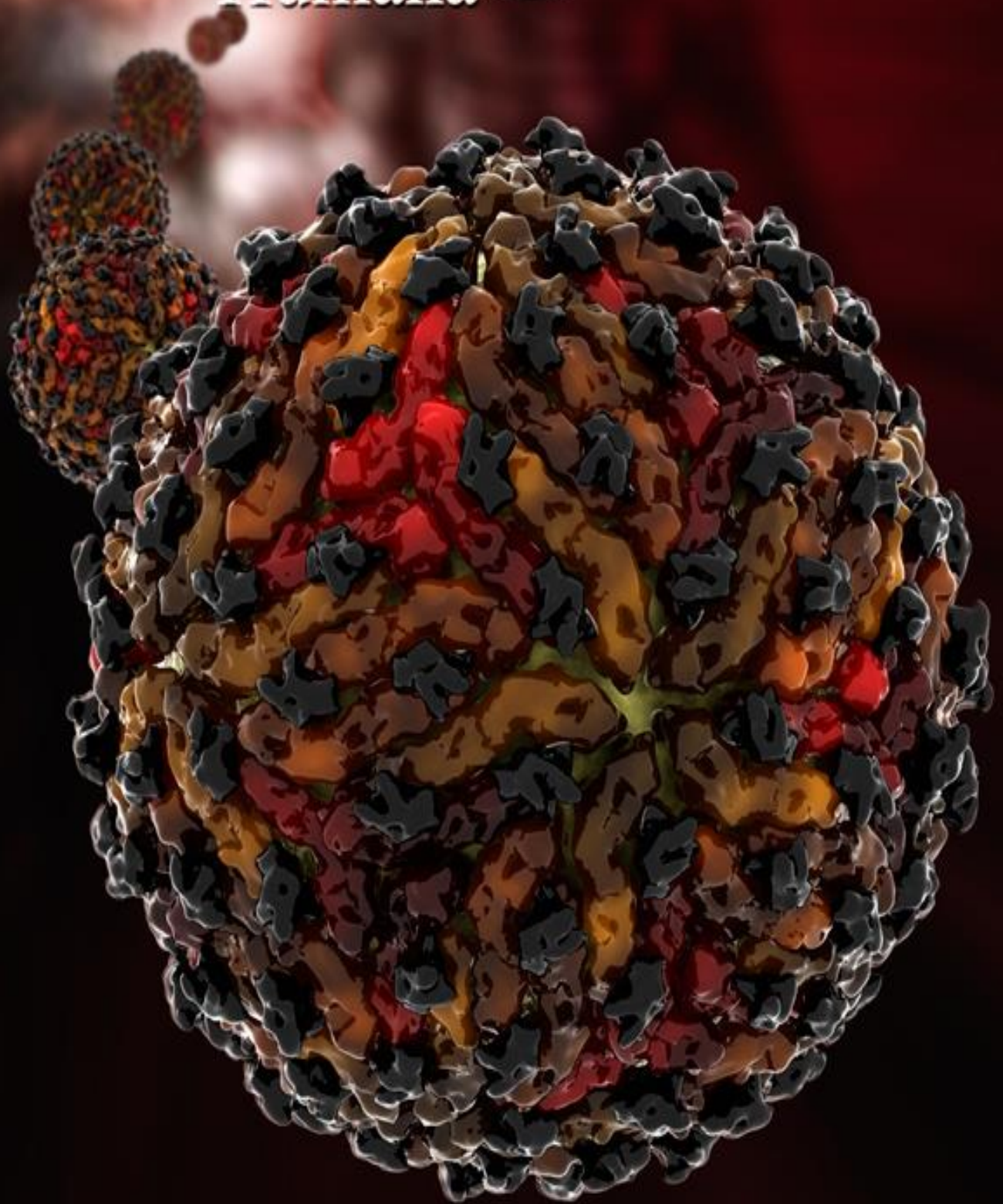
Práctica 4 Efecto Citopático.

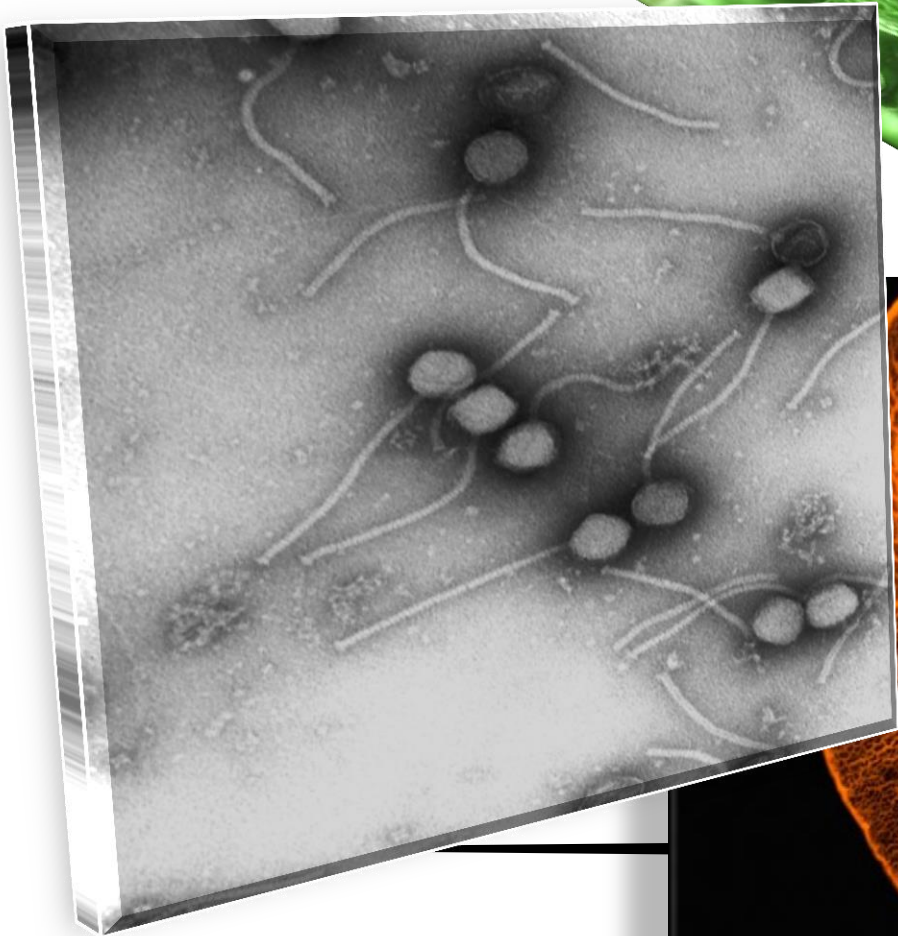
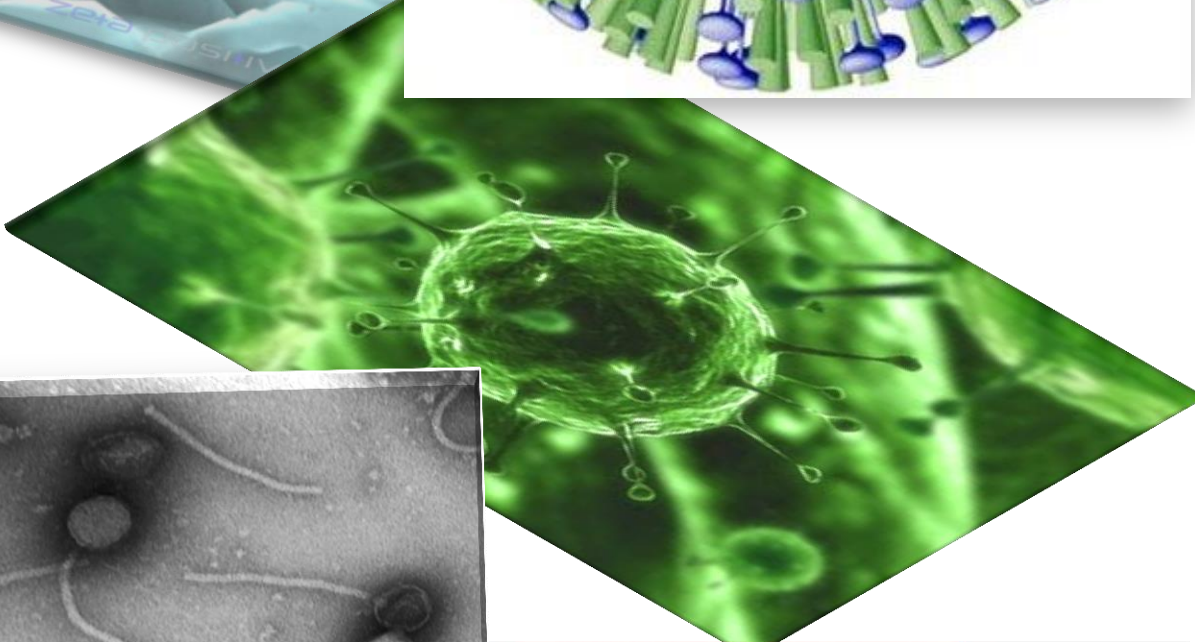
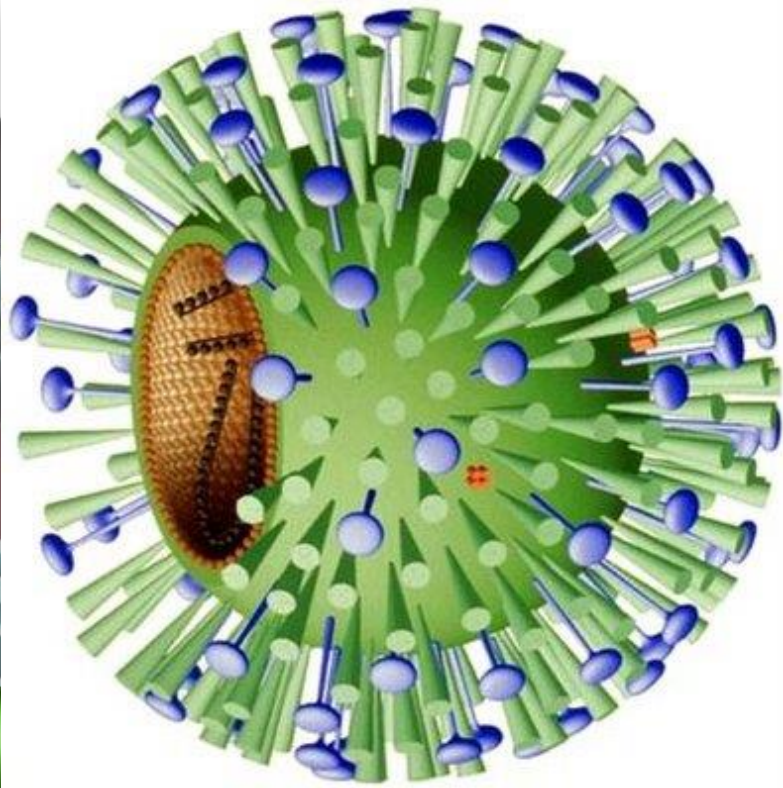
Práctica 5 Titulación del Bacteriófago T7.

A continuación se anexa el manual con las prácticas de virología.

Virología

Humana





CONTENIDO

PRACTICA 1

1. Aislamiento de Bacteriófagos	6
1.1 Objetivos	7
1.2 Introducción.	
1.2.1 Historia de la investigación de bacteriófagos	7
1.2.2 Experimento de la Licuadora de Harshel y Chase	9
1.2.3 Bacteriofagos y características	10
1.2.4 Multiplicación de los fagos	14
1.2.5 Infección lítica y lisogénica	15
1.2.6 Fagos como agentes de transducción	17
1.2.7 Curva de multiplicación en un solo paso	20
1.3 Material por equipo	23
1.4 Método	23
1.5 Resultados	26
1.6 Guía de estudio	27
1.7 Cuestionario	27
1.8 Anexo a la practica 1	28
1.9 Referencias	43

PRACTICA 2

2. Estructuras del embrión de pollo y sus vías de inoculación	44
2.1 Objetivos	45
2.2 Introducción	45
2.2.1 Animales y sus usos en el laboratorio	46
2.2.2 Embrión de pollo	47
2.2.3 Desarrollo de un huevo embrionado	49
2.2.4 Cuidados del huevo embrionado	50
2.2.5 Vías de inoculación de un huevo embrionado	51
2.3 Material por equipo	56
2.4 Método	56
2.5 Resultados	59
2.6 Guía de estudio	60
2.7 Cuestionario	60
2.8 Anexo a la practica 2	61
2.9 Referencias	70

PRACTICA 3

3. HEMAGLUTINACION VIRAL E INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION VIRAL	71
3.1 Objetivos	72
3.2 Introducción	72
3.2.1 Virus de la influenza	75
3.2.2 Virus del Newcastle	77
3.3 Material por equipo	79
3.4 Métodos	79
3.5 Resultados	83
3.6 Guía de estudio	84
3.7 Cuestionario	84
3.8 Anexo a la practica 3	85
3.9 Referencias	97

PRACTICA 4

4. EFECTO CITOPATICO	98
4.1 Objetivos	99
4.2 Introducción	99
4.2.1 Cambios morfológicos	99
4.2.2 Alteraciones bioquímicas	102
4.2.3 Identificación de células infectadas por virus	102
4.2.4 Virus de la rubeola y virus sincitial respiratorio	105
4.3 Material por equipo	107
4.4 Método	107
4.5 Resultados	110
4.6 Guía de estudio	110
4.7 Cuestionario	111
4.8 Anexo a la practica 4	112
4.9 Referencias	126

PRACTICA 5

5. TITULACION DEL BACTERIOFAGO T7	127
5.1 Objetivos	128

5.2	Introducción	128
5.2.1	Estructura de un bacteriófago T7	129
5.2.2	Titulación de virus por unidades infecciosas en cultivos celulares	130
5.3	Material por equipo	131
5.4	Método	131
5.5	Resultados	132
5.6	Guía de estudio	133
5.7	Cuestionario	133
5.8	Anexo a la practica 4	134
5.9	Referencias	136



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



PRÁCTICA 1
 AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS



PRÁCTICA 1

AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS.

OBJETIVOS.

- Conocer el manejo y aislamiento de bacteriófagos.
- Estudiar las etapas de la multiplicación de los bacteriófagos.

INTRODUCCIÓN.

HISTORIA DE LA INVESTIGACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS.

Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias. El término bacteriófago es una combinación de la palabra bacteria y la palabra griega *phagein*, que significa comer. Se les descubrió después del reconocimiento de los hospederos bacterianos en la década de 1880, época catalogada como la edad de oro de la microbiología. El bacteriólogo británico Frederick W. Twort es el autor del artículo publicado en 1915 que se considera el nacimiento de la investigación moderna acerca de los bacteriófagos. En el comunico una observación denominada transformación vidriosa.

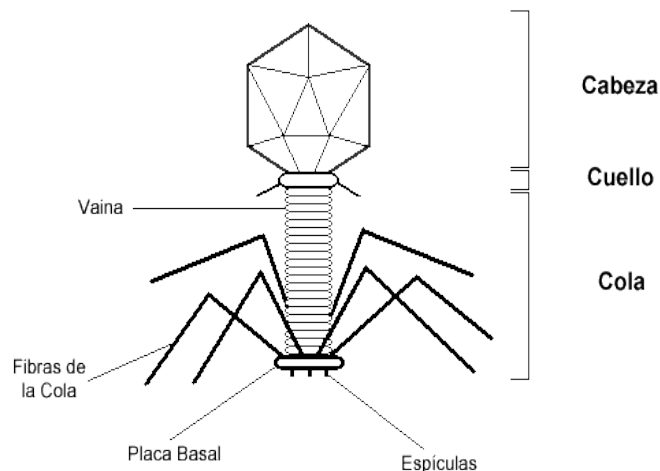


Figura1.- Estructura de un bacteriófago.

En esa época Twort estaba tratando de desarrollar los virus de la vacuna en medio de agar sin la presencia de células hospederas. Inoculo el medio sólido con líquido no filtrado de las partículas que se usaban en las vacunaciones contra la viruela. Sin embargo en lugar del virus de la vacuna, en el medio sólido se desarrollaron colonias de *micrococos*, las que en algunas áreas aparecían con un aspecto acuoso o vidrioso. Twort recogió las colonias acuosas, que no podían cultivarse en un medio nuevo, y las hizo pasar a través de un filtro de Chamberland.

El filtrado se agrego a cultivos de *micrococos* frescos y esto causaba su transformación vidriosa. Twort llegó a la conclusión de que un agente infeccioso filtrable mataba a las bacterias y que en el proceso el agente multiplicaba y producía la transformación vidriosa. Twort no estableció que era un virus bacteriano, a pesar de que sabía que los agentes filtrables infectaban a las plantas y a los animales.

El descubrimiento de los bacteriófagos se le atribuye a Felix d'Herelle debido a que en el artículo de 1917 describió la lisis de una bacteria causante de disentería desarrollada en un medio líquido. Formuló la hipótesis de que “un antagonista invisible”, un bacteriófago, de la bacteria de la disentería que podía pasar a través de los filtros de Chamberland causaba la lisis. d'Herelle no cito el estudio de Twort en su publicación y continuo la investigación en dos direcciones:

- Determinar la naturaleza biológica de los bacteriófagos
- Explorar su aplicación en el tratamiento de las infecciones bacterianas en una era preantibiótica

En 1919 intento usarlos en ensayos de campo para controlar una epidemia de tifus de las aves causada por la bacteria *Salmonella gallinarium*. Inoculo a los pollos con bacteriófagos por la vía oral o en forma inyectable y los resultados generales indicaron que otras poblaciones tratadas con bacteriófagos padecían menos muertes y epidemias más cortas no recurrentes.

Los informes de la década de 1920 y 1930 acerca de la administración oral de bacteriófagos específicos para el cólera en los pacientes fueron positivos. Este tratamiento redujo la gravedad de los síntomas en general y la mortalidad por la enfermedad. En la década de 1940 aislaron bacteriófagos para combatir la gangrena gaseosa causada por *Clostridium perfringes*.

En 1990 científicos comenzaron con éxito experimentos de laboratorio para solucionar estos obstáculos. Ahora se pueden obtener preparados puros que eliminan las toxinas y los desechos bacterianos de las reservas de los bacteriófagos. Se desarrollaron métodos para aislar mutantes de bacteriófagos que son más resistentes y tienen rangos de huéspedes más amplios. Las cepas resistentes presentan la capacidad de evitar la rápida eliminación por parte del sistema inmunitario del huésped¹

EXPERIMENTO DE LA LICUADORA DE HARSHEY Y CHASE.

Uno de los primeros bacteriófagos usados en el laboratorio, el T2, infecta a la bacteria *Escherichia coli*. El bacteriófago T2 consiste, casi completamente en un segmento de DNA estrechamente condensado que está rodeado o empaquetado por una cubierta proteica. El bacteriófago infecta a *E.coli* y la utiliza para reproducir más bacteriófagos T2. En 1952 los genetistas Alfred Hershey y Martha Chase proporcionaron evidencia de que el ADN era material hereditario.

- Hicieron dos cultivos de *Escherichia coli*
- Un frasco de *E.coli* fue infectado por bacteriófagos T2 cuyas cubiertas proteicas fueron marcadas con azufre radioactivo [³⁵S]
- El segundo frasco de *E.coli* fue infectado con bacteriófagos T2, en los cuales el material genético (DNA) del virus se había marcado con fósforo radioactivo [³²P]
- Permitieron que los bacteriófagos radioactivos se adhirieran e infectaran a *E.coli*.
- Vertieron en licuadoras separadas las mezclas de bacteriófagos T2 y *E.coli* radiactivamente marcados.
- Las licuadoras desprendieron las partículas de bacteriófagos de las células bacterianas en cada mezcla.
- Posteriormente las mezclas se centrifugaron. Esto separó las partículas de bacteriófagos, que quedaron en el sobrenadante líquido de las células bacterianas, que permanecieron en el precipitado²

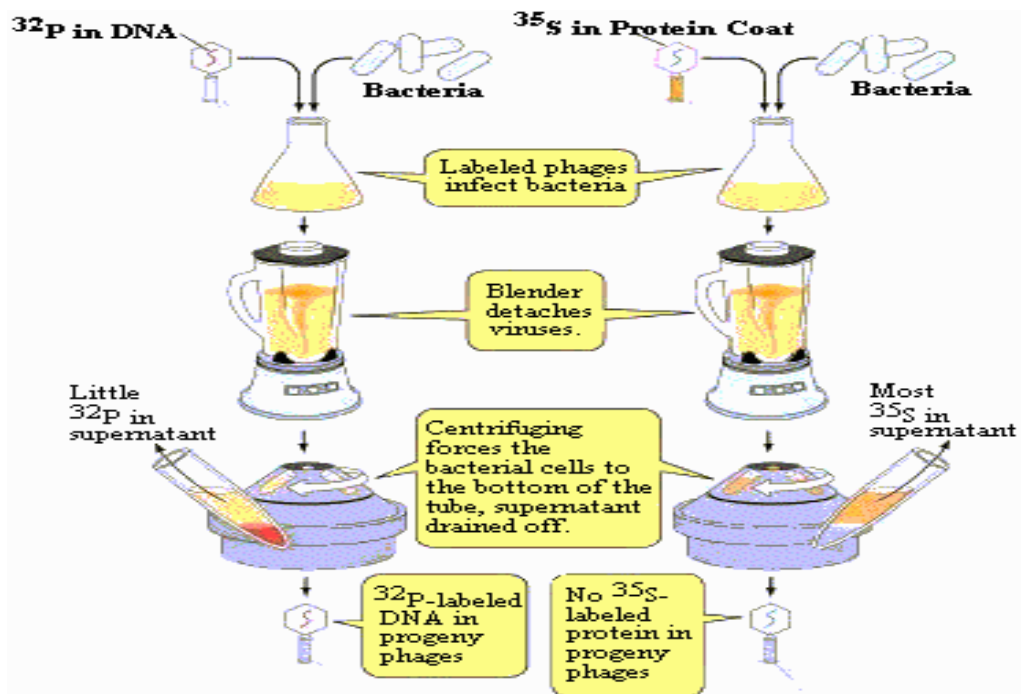


Figura 2.- Experimento de Hershey y Chase.

Hershey y Chase hallaron que el **sobrenadante (la proteína viral)** contenía $[^{35}\text{S}]$ y el **precipitado (porción celular)** contenía $[^{32}\text{P}]$ (el DNA viral) este experimento concluyo que el DNA marcado con $[^{32}\text{P}]$ transmitió el componente infeccioso del bacteriófago.

“El DNA era el material genético que especificaba toda la información necesaria para sintetizar nuevos bacteriófagos T2 “

BACTERIOFAGOS.

En la actualidad se examinan más de 5.100 bacteriófagos por microscopio electrónico. El comité internacional de taxonomía de los virus (ICTV) reconoce un orden de 13 familias y 31 géneros de bacteriófagos ¹

CARACTERISTICAS

- Hay 4 formas básicas o simétricas:
 - Binarias (fagos que tienen una estructura de cabeza de cola).
 - Icosaédricas (también conocidos como cúbicos).
 - Helicoidal (filamentosos).
 - Pleomórfica.
- Tienen una estructura de cabeza o cápside que varía en tamaño y forma.
- La mayoría tiene una estructura de cola de tamaño y longitud visible.
- La estructura de la cola es un tubo helicoidal hueco.
- Al comienzo de la infección, el genoma de los bacteriófagos pasa a través de la cola de la bacteria huésped.
- La longitud de los bacteriófagos binarios varía de 17 a 500kb y la longitud de sus colas oscila entre 10 y 800 nm.
- Solo tres familias contienen virus envueltos.
- En aproximadamente el 96% de los bacteriófagos hay un genoma de DNA (dsDNA)
- El 4% restante tienen genomas ssDNA, ssRNA, y dsRNA.
- El grupo más famoso es de tipo T que se enumeran de T1 a T7³

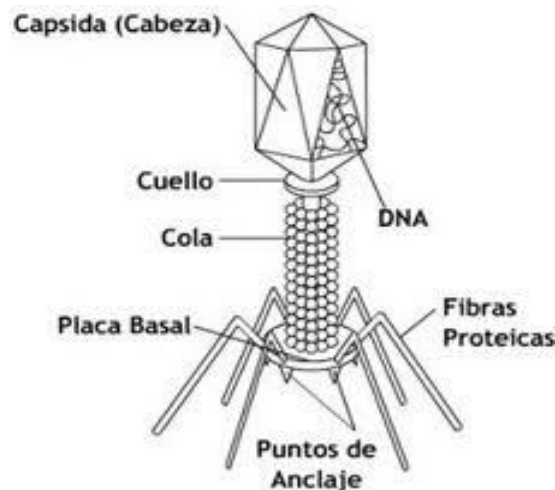


Figura 3.- Estructura de un bacteriófago T4⁴

Cuadro 1. Características generales de los fagos ⁵

FAGO	HOSPEDERO	CABEZA	COLA	ÁCIDO NUCLEICO	ESTRUCTURA	TIPO
T1	<i>E. coli</i>	Hexagonal	Simple	ADN +/-	Lineal	Virulento
T2,T4,T6	<i>E. coli</i>	Icosaédrico	Compleja	ADN +/-	Lineal y bases modificadas	Virulento
T3,T7	<i>E. coli</i>	Hexagonal	Corta	ADN +/-	Lineal	Virulento
T5	<i>E. coli</i>	Hexagonal	Simple	ADN +/-	Lineal y una cadena segmentada	Virulento
LAMBDA, fi-80, P2, Mu	<i>E. coli</i>	Hexagonal	Simple	ADN +/-	Lineal y extremos cohesivos	Atemperado
N4	<i>E. coli</i>	Hexagonal	Corta	ADN +/-	Lineal	Virulento
P22	<i>Salmonella</i>	Hexagonal	Compleja	ADN +/-	Lineal	Virulento
SP01	<i>Bacillus</i>	Hexagonal	Compleja	ADN +/-	Lineal	
SP82	<i>Bacillus</i>	Hexagonal	Compleja	ADN +/-	Lineal	
S13	<i>E. coli</i>	Icosaédrico	No	ADN +	Circular	Virulento
M12,G4	<i>E. coli</i>	Icosaédrico	No	ADN +	Circular	Virulento

Continuación

FAGO	HOSPEDERO	CABEZA	COLA	ÁCIDO NUCLEICO	ESTRUCTURA	TIPO
PM2	<i>Pseudomona</i>	Hexagonal, envoltura	No	ADN+/-	Circular	
M13	<i>E. coli</i>	Filamentoso	No	ADN +	Circular	Virulento
MS2, f2	<i>E. coli</i>	Icosaédrico	No	ARN +	Lineal	Virulento
fi-6	<i>Pseudomona</i>	Poliédrico y envoltura	No	ARN +	3 Segmentos	Virulento
f1, fd	<i>E. coli</i>	No	Filamentoso	ADN +/-		Virulento
P1	<i>Salmonella</i>	Icosaédrica	Compleja	ADN +/-		Atemperado

Cuadro 3. Ejemplos de los factores de virulencia que portan las bacterias ⁵

Bacteria	Bacteriófago	Toxina u otro producto génico	Fenotipo
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Beta	Toxina de la difteria	Difteria
<i>Streptococcus pyogenes</i>	T12	Toxina eritrogénica	Escarlatina
<i>Clostridium botulinum</i>	Fagos clostridiales (p ej. DE beta)	Toxina botulínica	Botulismo
<i>Vibrio cholerae</i>	CTX	Toxina del cólera	Cólera
<i>Escherichia coli</i>	H-19B	Toxinas similares a Shiga	Diarrea hemorrágica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Omega 315 Omega 13	Enterotoxinas P y A	Intoxicación alimentaria
<i>Micoplasma arthritidis</i>	MAV1	Proteína de la membrana externa	Artritis que compromete dos o más articulaciones

MULTIPLICACIÓN DE LOS FAGOS.

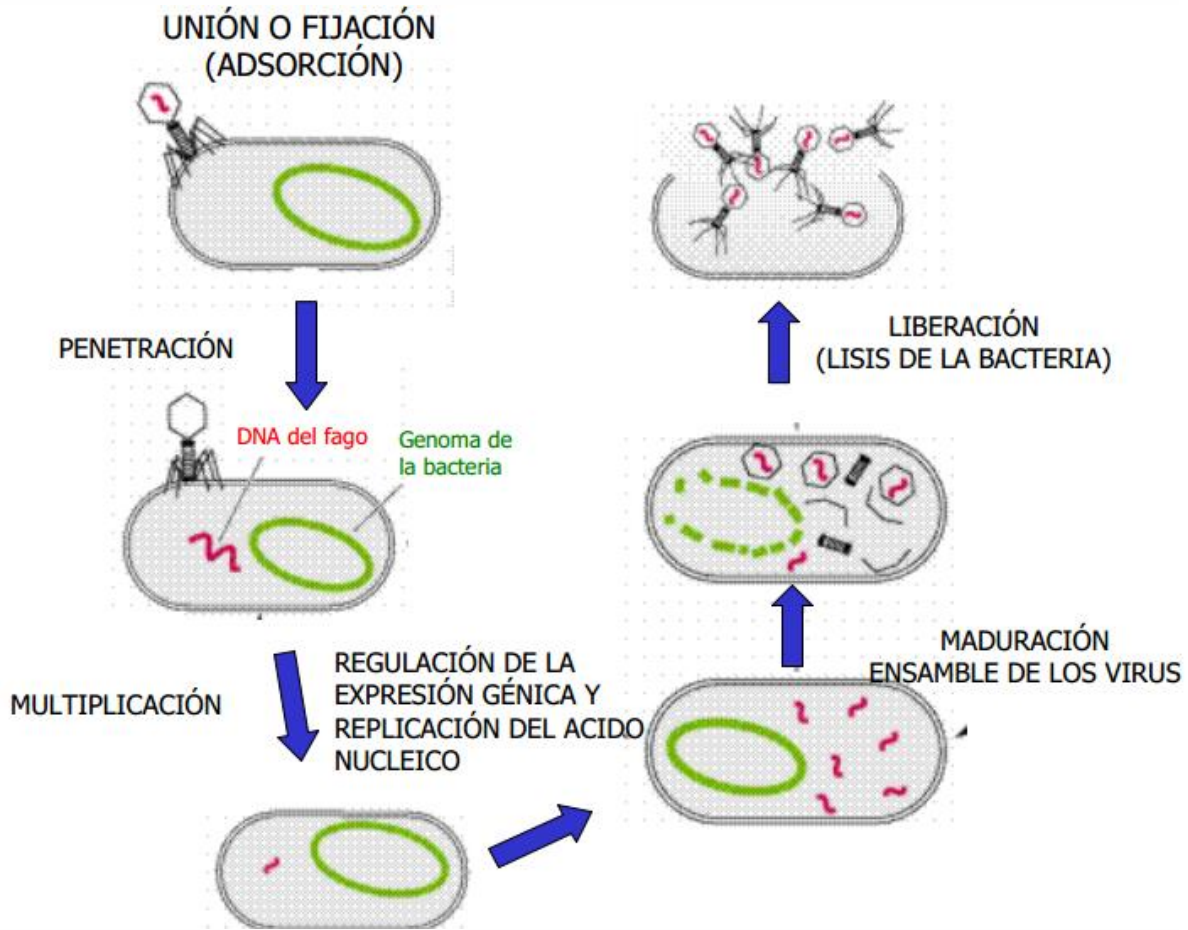


Figura 4.- Multiplicación de bacteriófagos⁶

Adsorción.

El primer paso en la infección es una interacción altamente específica de las organelas de adsorción de los fagos tales como la cola, con los receptores existentes en la superficie de la célula huésped, que conduce a la unión del fago de la célula.

Penetración.

- ✓ Al ácido nucleico generalmente asociado con algunas proteínas internas del virión, es liberado de la cápside.
- ✓ Penetran a las células, aparentemente por lugares en los que las membranas externas e internas están en contacto y permanecen asociadas con la membrana.
- ✓ El material nuclear liberado de los viriones está protegido de las nucleasas de membrana por las proteínas asociadas y por las modificaciones del ADN.
- ✓ Cuando el tubo alcanza la membrana plasmática, el ADN es expulsado. La concentración es el resultado de cambios de conformación de cadena iniciados por la adhesión de las fibras y las espículas a la célula.
- ✓ La placa basal hexagonal adquiere forma de estrella y se separa del tubo, después la vaina se acorta y condensa.

Multiplicación.

La fase de multiplicación consiste en la producción de nuevas partículas virales infectivas, siguiendo las instrucciones contenidas del ácido nucleico viral y utilizando para ello la maquinaria bioquímica y los nutrientes de la célula infectada. Consta de dos procesos diferenciados:

- La replicación del genoma viral, creando copias del mismo que serán incorporadas a las nuevas partículas virales.
- Expresión de la información contenida en dicho genoma, a través de los procesos de transcripción y traducción, para sintetizar las proteínas que a continuación se ensamblarán para formar las nuevas capsides virales. El proceso de ensamblaje es en algunos virus totalmente espontáneo y depende de las condiciones físico-químicas del medio; en otros intervienen determinados enzimas que también están codificados en el genoma del virus.

Ensamblaje y liberación.

Este proceso tiene dos vías:

1.- Infección lítica.

Una vez que todas las partes del bacteriófago han sido producidas, se ensamblan las nuevas partículas.

- Una copia del DNA del fago se empaqueta o se enrolla en una cabeza icosaédrica preensamblada.

- La cola y las estructuras accesorias se ensamblan y las pocas moléculas de lisozima o una enzima comparable son empaquetadas en la placa basal de la cola.
- La lisozima restante o la lisina del fago o las endolisinas, muramidasa o virolisinas en la célula permiten que el virus escape o se libere del hospedero.
- Otra enzima clave, la holina, es usada por los fagos para crear poros en la membrana interna de la célula huésped en el momento adecuado y permite que la lisina o enzimas semejantes alcancen el peptidoglucano, lo cual facilita la lisis del huésped y la liberación del bacteriófago.
- Finalmente la célula huésped es destruida por la lisis celular.

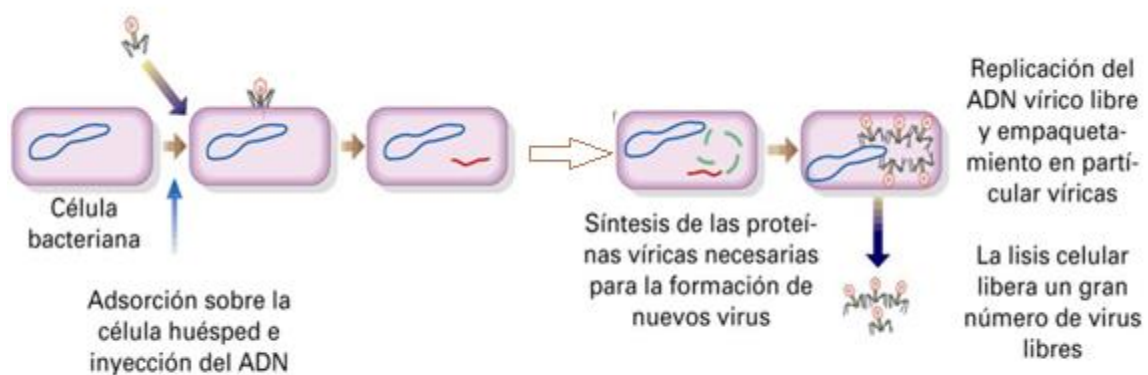


Figura 5 - Infección lítica.

2.- Infección lisogénica

Los bacteriófagos lisogénicos o atemperados infectan a sus hospederos aunque en lugar de matarlos durante una infección lítica, integran su genoma en una región específica de su cromosoma.

- Después de la penetración, el DNA viral se integra en el cromosoma y se replica cada vez que la célula copia su ADN cromosómico durante la división celular.
- Cuando el genoma del fago se integra en un sitio del cromosoma bacteriano se le denomina profago.
- Algunos bacteriófagos atemperados codifican transposasas, las cuales permiten que el fago se inserte aleatoriamente en el cromosoma.
- Durante el estado de profago todos los genes del bacteriófago están reprimidos, excepto el gen que codifica una proteína represora.

- La proteína represora impide la síntesis de enzimas y proteínas requeridas para el ciclo lítico.
- Si el receptor se torna inactivo (pierde su función), el DNA viral es eliminado del cromosoma bacteriano.
- El DNA separado (genoma del bacteriófago) actúa como un virus lítico capaz de producir nuevas partículas virales que se liberan durante la lisis celular.
- Esta inducción espontánea se reproduce una vez cada 10000 divisiones celulares aproximadamente.
- Los bacteriófagos atemperados pueden portar genes del huésped de una bacteria a otra en un proceso que se llama transducción ⁴

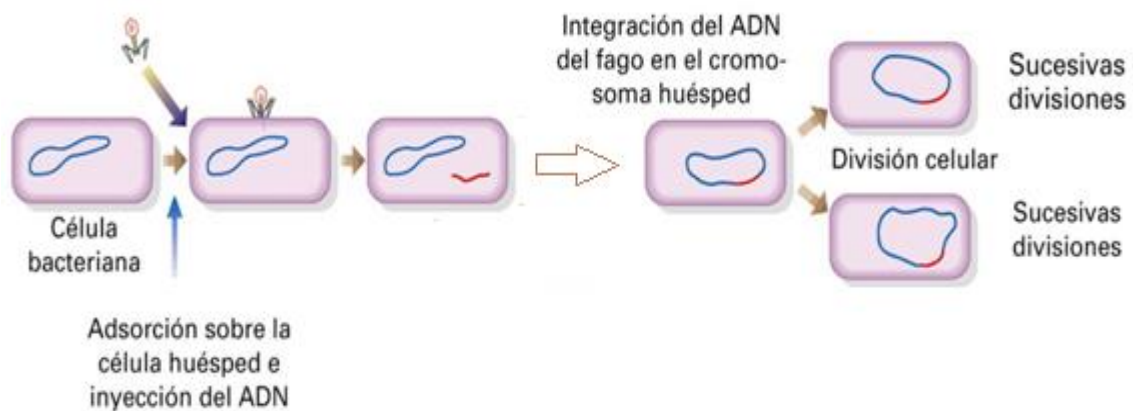


Figura 6.- Infección lisogénica.

FAGOS COMO AGENTES DE TRANSDUCCIÓN.

La transducción de genes bacterianos desde una célula a otra por fagos ha sido extensamente utilizada para establecer mapas del cromosoma bacteriano. Se puede distinguir dos tipos de transducción:

- Generalizada: puede transferir cualquier gene bacteriano.
- Restringida o Especializada: puede transferir genes desde solo una región muy pequeña del cromosoma huésped adyacente al punto del profago.

Transducción Generalizada.

- Este tipo de transducción es debido a la encapsidación del ADN celular en una cubierta del fago. La transducción puede producirse para cualquier marcador de la bacteria donante.
- Por lo general la transducción es llevada a cabo con una preparación del fago de título elevado obtenida de la cepa donante, ya sea por infección lítica ya sea por inducción de células lisógenas.

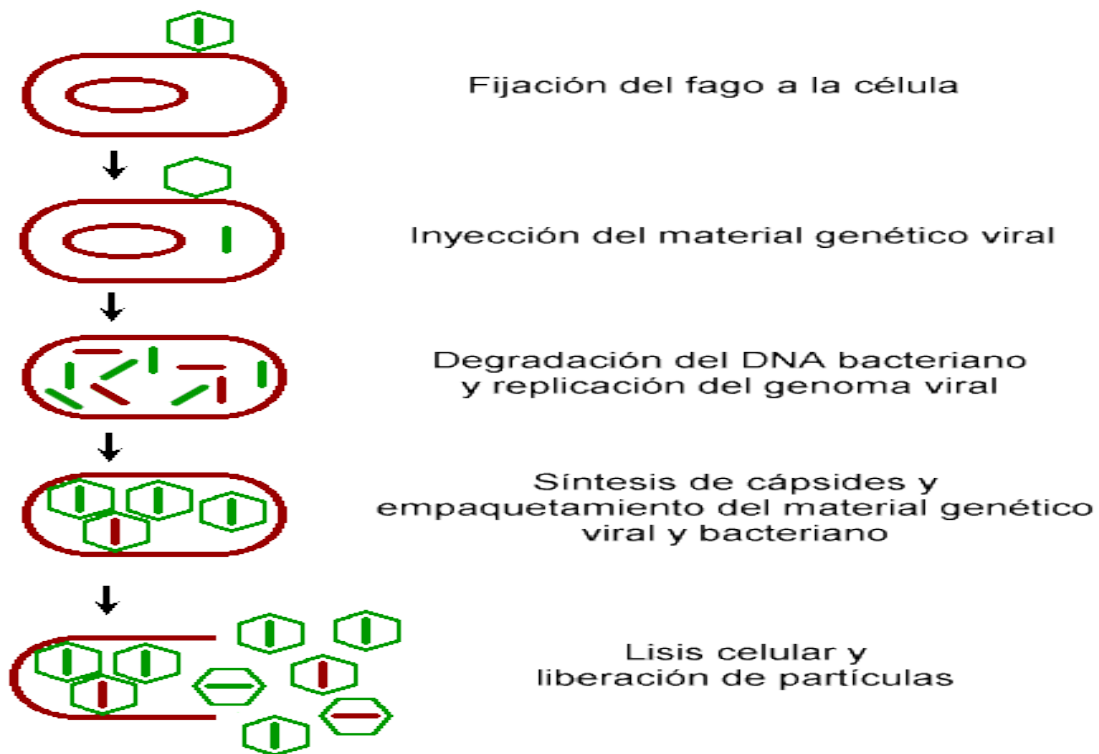


Figura 7.- Transducción Generalizada.

Transducción Especializada.

- Los Lederberg descubrieron que el fago λ puede determinar la transducción de una forma completamente distinta.
- Solo transfiere un grupo limitado de genes que se localizan cerca del profago y se produce solo en caso de inducción del profago y no (a diferencia de la transducción generalizada) en la infección lítica.
- Los genes transducidos, son incorporados en el genoma del fago por escisión anormal del profago.
- El ADN de partículas transductoras tiene deleciones que compensan la longitud para la inserción de genes de fago. Algunos tipos de partículas transductoras son infecciosas por que los genes del fago que faltan no son

esencialmente para la multiplicación vegetativa; en mayor frecuencia, las partículas transductoras son defectivas, es decir no pueden multiplicarse por si mismas.

- No obstante pueden duplicarse en infección mixta con λ como un auxiliador para completar las funciones que faltan.
- En los lisados de cultivos lisogénicos normales, solo una pequeña parte de los viriones son transductores, por lo que el lisado da lugar a una escasa frecuencia de transducción.
- Además los viriones transductores se diferencian entre si con respecto a sus sustituciones de ADN, ya que se producen a través de recombinación independiente.
- Los lisados de alta frecuencia de transducción (AFT) considerablemente enriquecidos en las partículas transductoras, pueden producirse a través del fago propagador recuperado por inducción de células transducidas.
- En el caso de partículas transductoras no defectivas el fago de una sola placa es suficiente, pero si se trata de fagos defectivos las células deben de ser coinfectadas con λ de tipo salvaje como auxiliadores; entonces estas células doblemente lisogénicas producen en la inducción un lisado que contiene proporciones casi iguales de partículas transductoras y de tipo salvaje⁶

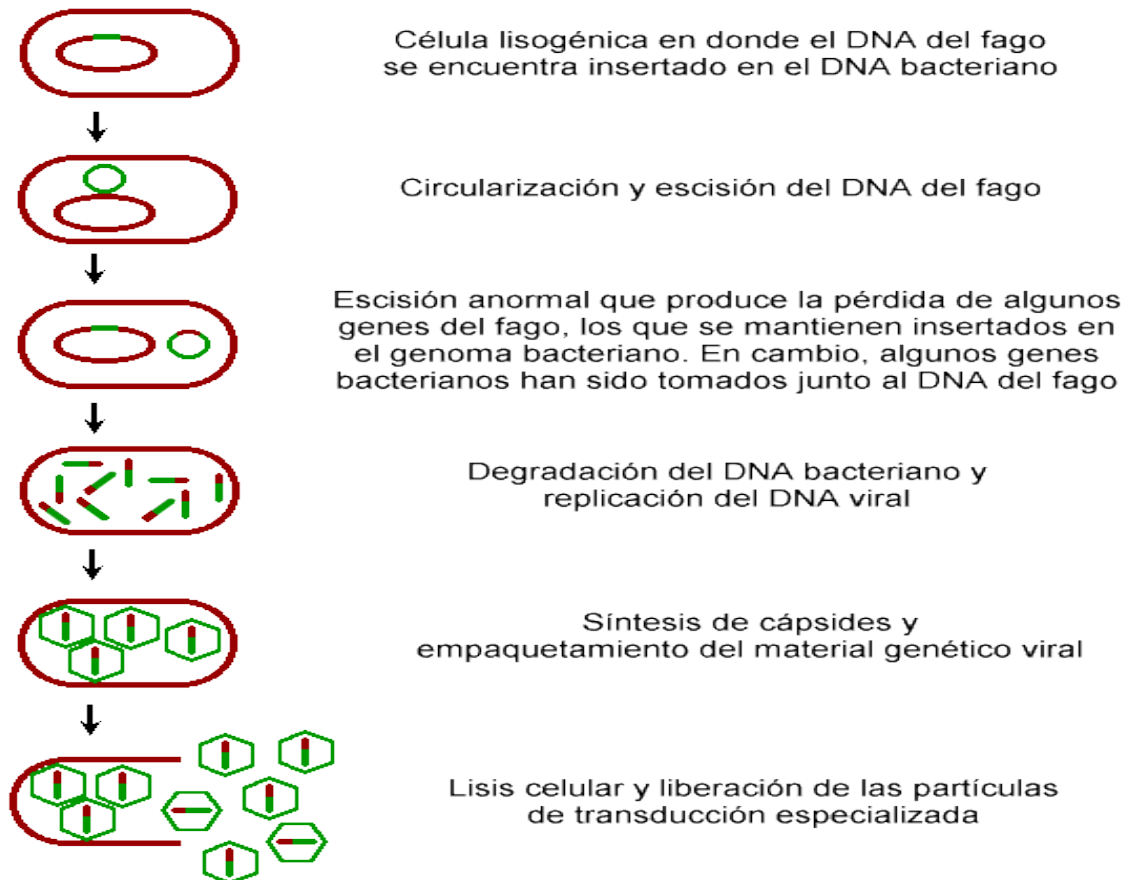


Figura 8.- Transducción Especializada.

Cuadro 4. Diferencias entre traducción generalizada y especializada.

Transducción generalizada	Transducción especializada
Cualquiera de los genes del huésped pueden transducirse	Sólo pocos genes específicos (adyacentes al sitio de integración del profago)
Las partículas transducidas contienen sólo DNA del huésped	Contienen DNA del fago y del huésped unidos covalentemente
Una célula puede producir una mezcla de partículas transducidas y partículas fágicas	Una célula puede producir tanto partículas transducidas como fágicas
Las partículas transducidas se forman por error en el empaquetamiento del DNA del fago en su cápside	Las partículas transducidas se forman como resultado de errores en la excisión del profago

CURVA DE MULTIPLICACION DE UN PASO.

La curva de multiplicación de un paso adopta el aspecto de la progenie de un fago en un cultivo infectado en las condiciones de un paso. Estudiando el paso después de la centrifugación de las células, se obtiene el título extracelular; estudiando el cultivo después de la ruptura de las células infectadas, se obtiene el título total (extracelular, más intracelular). Representando gráficamente estos estímulos (expresados en general como unidades infecciosas por célula productiva).

Periodo de eclipse.

El título vírico total es considerablemente menor que la concentración de las células productivas. El final de periodo de eclipse se toma como el tiempo en que, en promedio, se ha conseguido una unidad infecciosa por cada célula productiva.

Periodo de acumulación intracelular.

Los fagos descendientes se acumulan intracelularmente por qué no son liberados de una manera espontanea en el medio. El final de este periodo es el tiempo en que una unidad infecciosa vírica por célula-productiva, en promedio, ha aparecido extracelularmente. El final de este periodo corresponde al final del de latencia.

Periodo de crecimiento.

El título del fago extracelular se incrementa hasta el final del ciclo de multiplicación. El número medio de unidades infecciosas del virus por célula productiva presente en este momento es el rendimiento vírico.

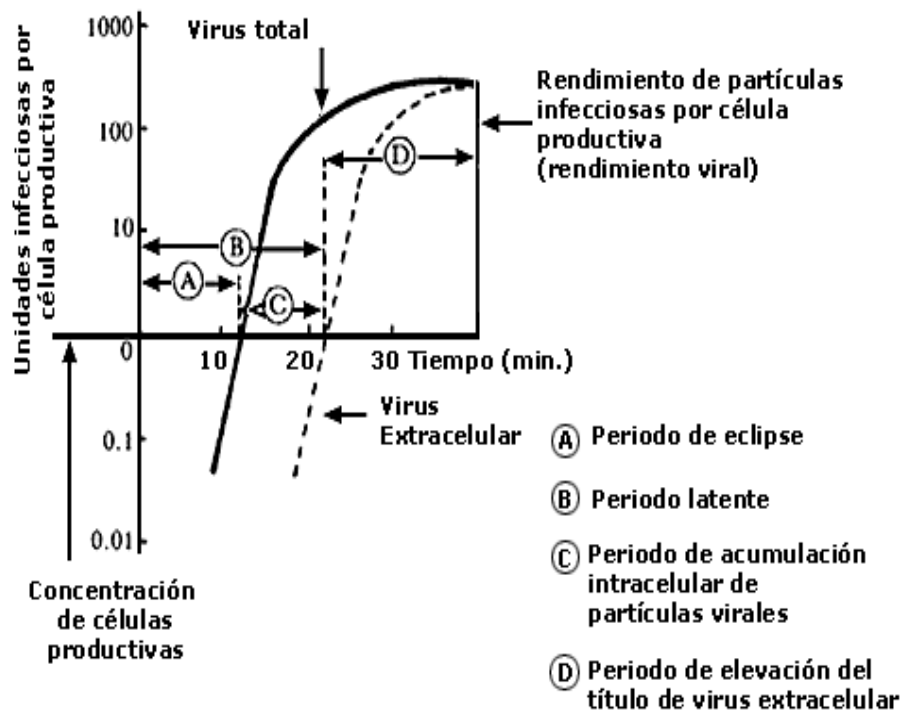


Figura 9.- Diagrama de la curva de multiplicación en un solo paso (o escalón) del bacteriófago T2.

La lisis de la célula libera la progenie del fago, que pasa en medio y da lugar a una disminución de la turbidez del cultivo en caso de que la mayoría de las células se hallen infectadas. En el caso de los fagos de tipo T-PAR, este fenómeno puede observarse mediante microscopía de campo oscuro que permite visualizar los viriones. En el caso de estos fagos, la lisis se retrasa más de una hora en caso de que el cultivo infectado por una cepa de tipo salvaje sea re inoculado antes de que produzca la lisis normal con la misma cepa (inhibición de la lisis). Los mutantes de la lisis rápida (r) no retrasa la lisis en estas condiciones. Las distintas propiedades líticas de los fagos r+ (tipo salvaje) y r se reflejan en la forma de sus halos: los halos r poseen un diámetro de 2mm, son transparentes y presentan un borde bien definido; los halos r+ son de menor tamaño y se hallan rodeados por una sombra de turbidez creciente. La sombra está formada por bacterias infectadas más de una vez, y por lo tanto su lisis se halla inhibida.

La inhibición de la lisis resulta extraordinariamente útil en la investigación de fagos, ya que prolonga la duración del periodo de síntesis vírica. En consecuencia, la célula produce una mayor cantidad de virus; además los procesos de multiplicación vírica que se hallan en relación con el tiempo pueden estudiarse con más facilidad ⁷

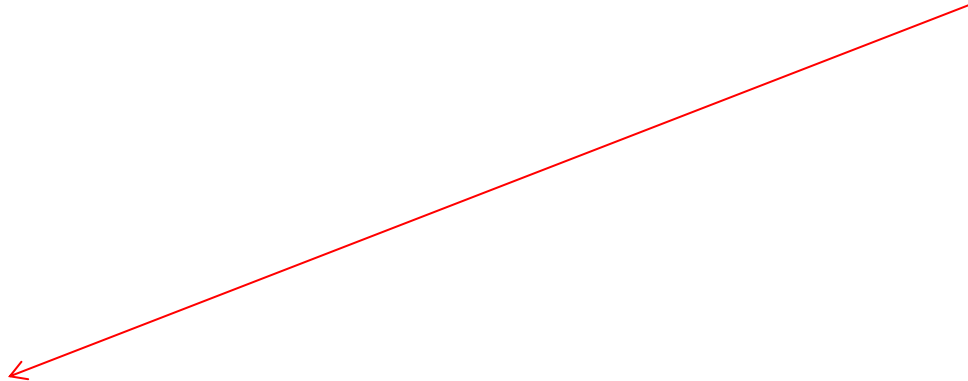
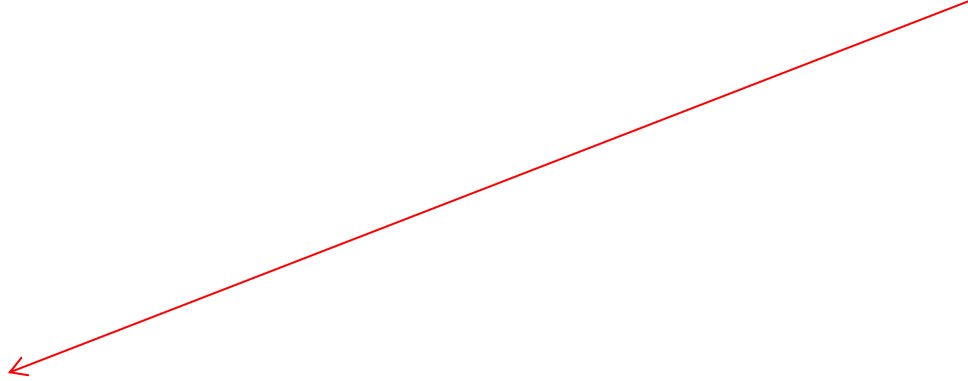
MATERIAL POR EQUIPO.

- Moscas caseras frescas de 20 a 30
- Aguas residuales como fuente del bacteriófago aproximadamente 45 mL
- Cepa de *Escherichia coli* sembrado en forma masiva en una caja de agar nutritivo
- Dos matraces erlenmeyer de 125 mL
- 5 tubos de ensaye para centrifuga de 13 x 100 mm
- 5 tubos con tapón de rosca de 18 x 150 mm
- 8 pipetas de 1 mL estériles
- 1 filtro de membrana estéril de 0.45 micrometros marca Millipore
- 1 jeringa de 10 mL estéril
- 4 tubos de 13 x 100 de contienen 2 mL de caldo soya tripticaseina
- 4 cajas que contienen agar nutritivo
- 4 tubos de 13 x 100 que contiene 3 mL de agar blando (0.7% de agar) de soya tripticaseína
- Mortero y pistilo para aproximadamente 250 mL
- 2 frascos estériles de 50 a 100 mL
- 5 mL de caldo nutritivo de decaconcentrado en un matraz de 50 mL
- 4 pipetas de 1 mL estériles

METODO.

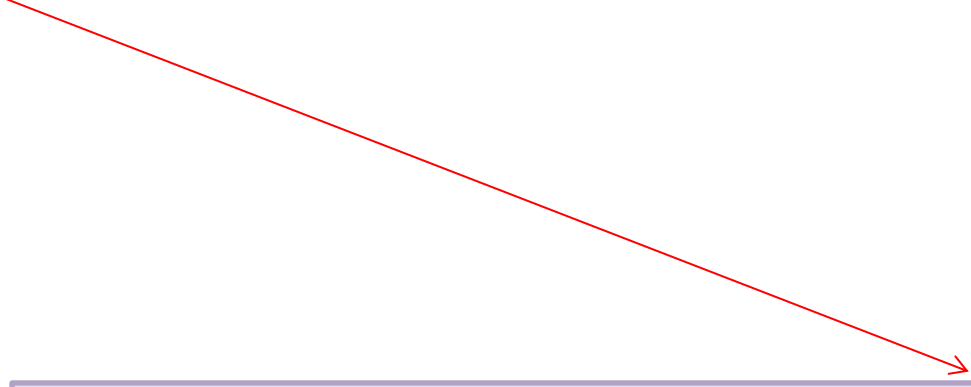
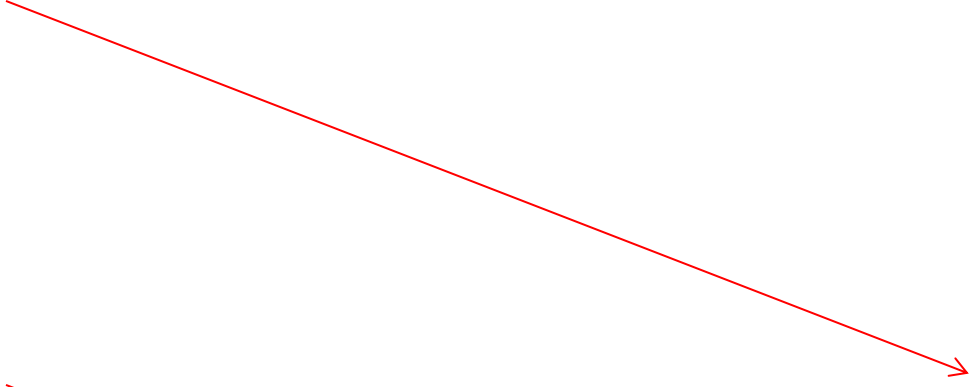
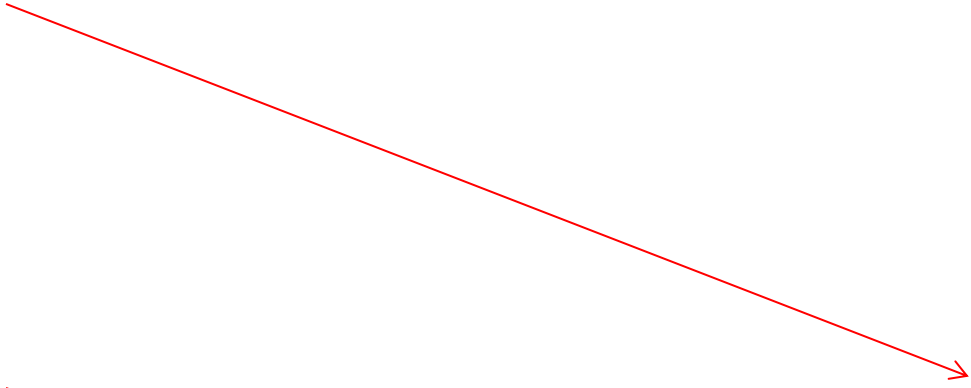
*****MANEJE LAS MOSCAS Y EL AGUA RESIDUAL CUIDADOSAMENTE DEBIDO A LA PRESENCIA DE INFINIDAD DE MICROORGANISMOS INFECCIOSOS*****

Enriquecimiento A



Adicionar 2 ml de caldo de E.coli en cultivo

*Adicionar mas caldo soya tripticaseína
hasta completar 20 ml*

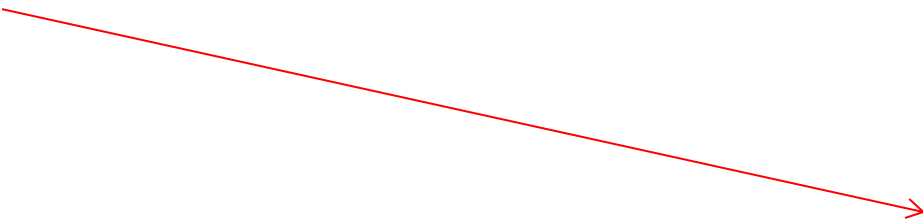


Transferir la mezcla a un frasco estéril

Macerar hasta hacer una pulpa fina

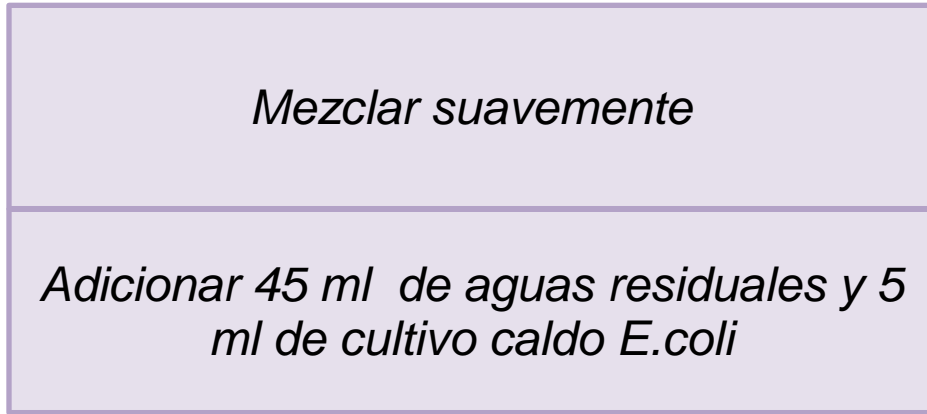
Adicionar caldo soya tripticaseína

Colocar las moscas en un mortero



*Colocar en un frasco estéril 5 ml de
caldo nutritivo*

Enriquecimiento B

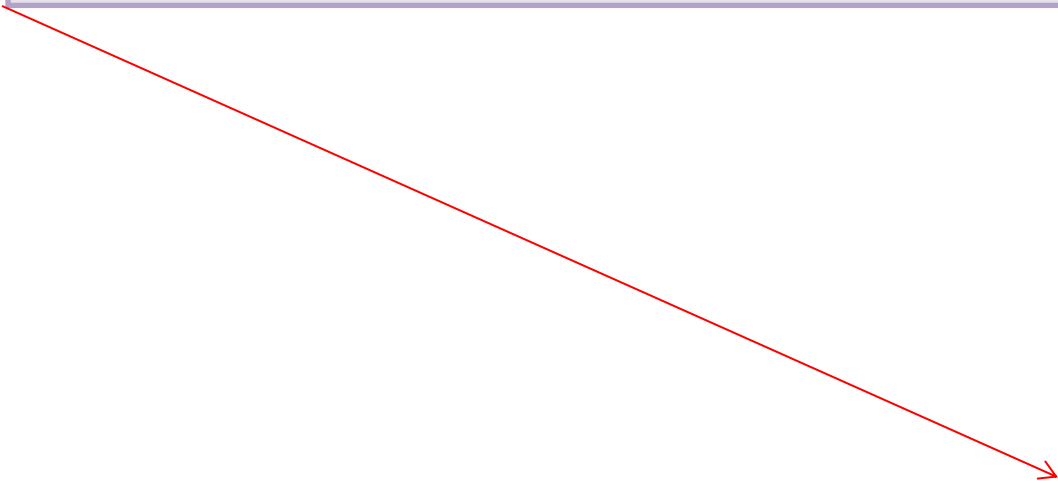


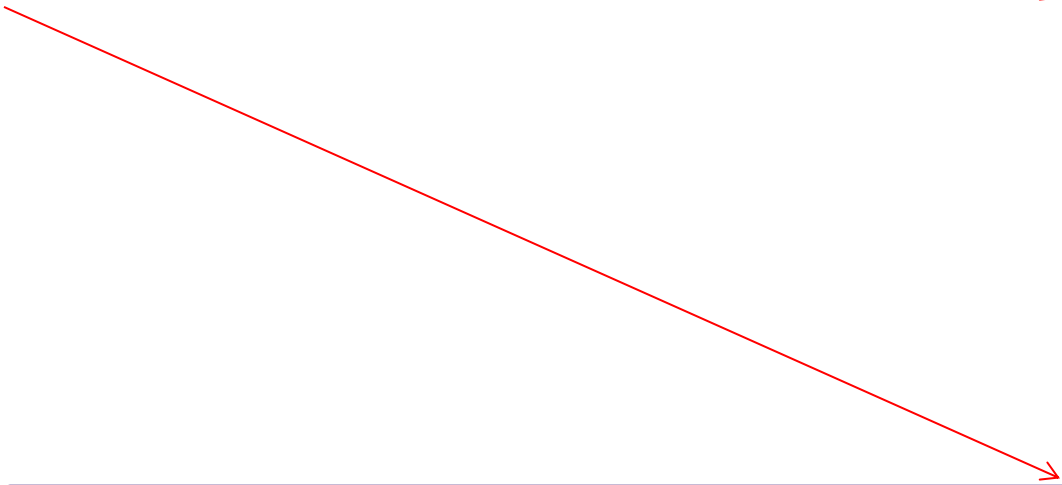
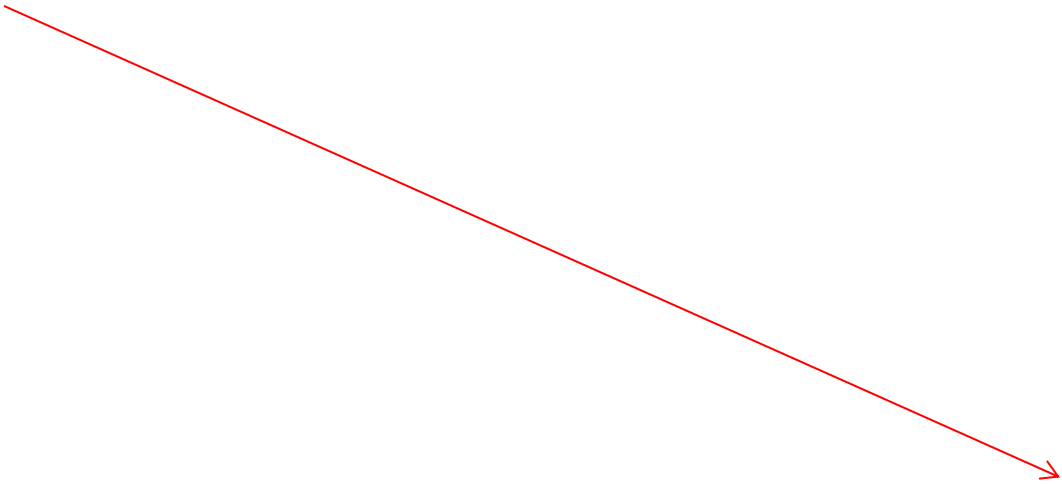
Mezclar suavemente

Adicionar 45 ml de aguas residuales y 5 ml de cultivo caldo E.coli

Decantar el liquido claro en un tubo de tapón de rosca

Filtrar el sobrenadante (usar filtro de membrana)



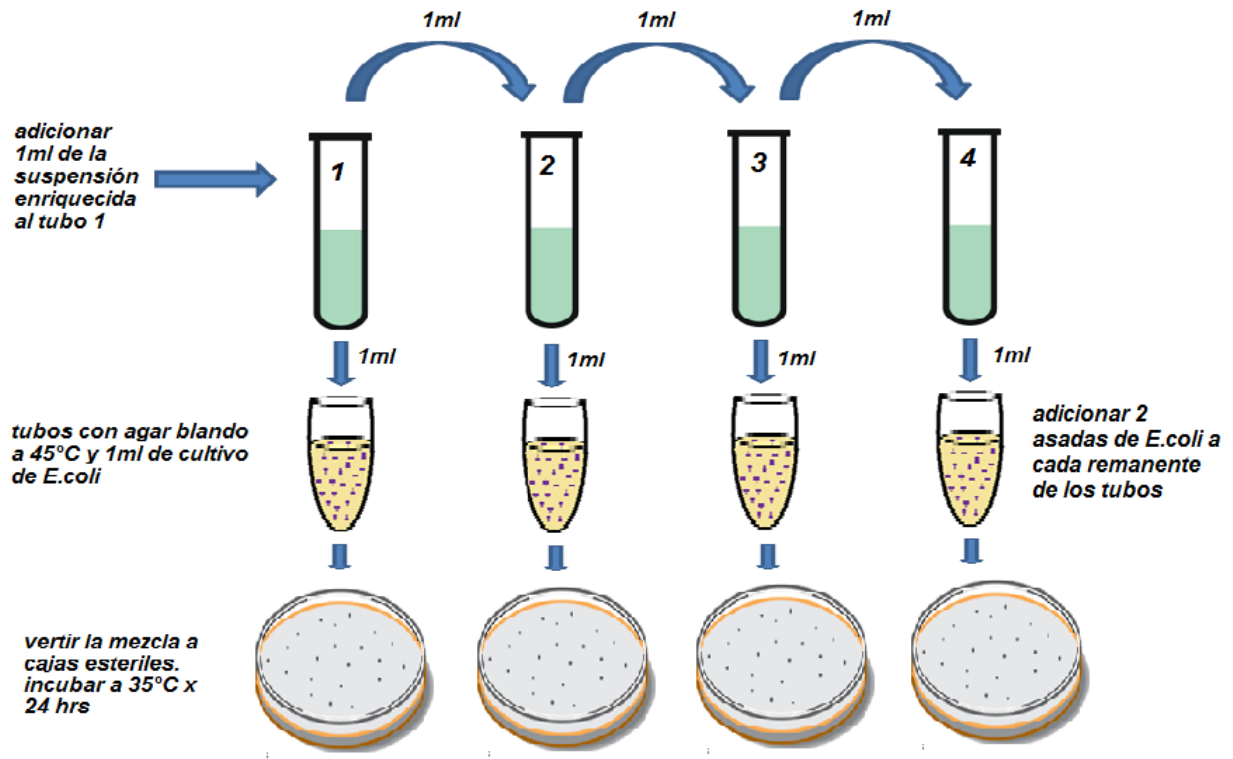


Centrifugar a 2500 rpm x 10 min

Decantar 10 ml en un tubo para centrifuga

Incubar 24 hrs a 35°C

*Seguir el enriquecimiento
A o B*



1.- Seguir el enriquecimiento A o B.

a) Adicionar moscas a una pequeña cantidad de caldo de soya tripticaseína y macere con un pistilo hasta hacer una pulpa fina. Transfiera esta mezcla a un frasco estéril y adicione más caldo soya tripticaseína hasta completar 20 mL más 2 mL de caldo de *E. coli* en cultivo

b) Adicionar 45 mL de aguas residuales a 5mL de caldo nutritivo decaconcentrado en un frasco estéril. Adicione 5 mL de cultivo en caldo de *E.coli*. Mezcle suavemente.

2.- Incubar 24 hrs a 35°C

3.- Decantar 10mL del enriquecimiento dentro de un tubo para centrifuga. Centrifugue a 2500 rpm por 10 minutos para remover bacterias y material sólido.

4.- Filtrar el sobrenadante a través de un filtro de membrana. Decante el líquido claro dentro de un tubo con tapón de rosca.

5.- Marcar 4 placas y 4 tubos de caldo del 1 al 4.

6.- Asépticamente adicione 1 mL de la suspensión enriquecida al tubo 1. Mezcle cuidadosamente aspirando y bajando el volumen tres veces. De este tubo(1) transfiera 1 mL al segundo tubo mezcle bien y transfiera de este segundo tubo. 1mL al tubo (3) mezcle bien y transfiera de este tubo al tubo (4) de este tubo transfiera 1mL a un contenedor con desinfectante.

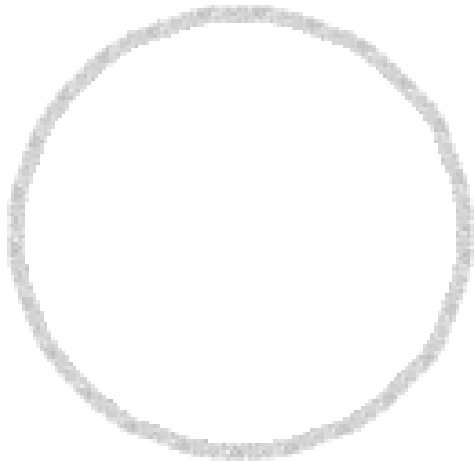
7.- Adicionar 1mL de cultivo de *E. coli* a los tubos de agar blando previamente fundido y manteniéndolo a 45°C continúe manteniéndolos a 45°C sin permitir que solidifique.

8.- Con la pipeta añadir el caldo enriquecido y asépticamente transfiera 1mL del tubo 1 a el agar blando. Mezcle por agitación y rápidamente vierta este tubo sobre la caja marcada con el número cuatro y mezcle en forma de ochos, usando la misma técnica continúe con los tubos 2,3 y 4.

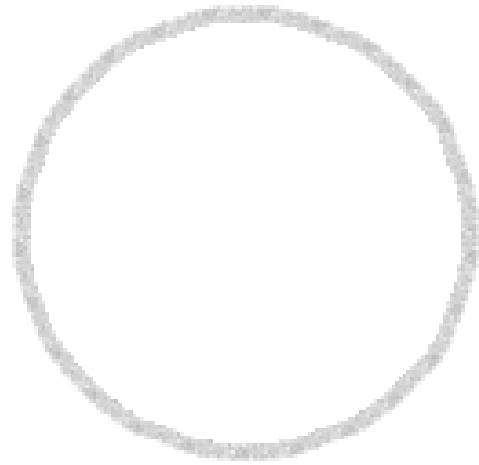
9.- Agregar dos asadas de cultivo de *E.coli* a cada remanente de los tubos de caldo y mezcle.

10.- Incubar las cajas y los tubos del paso 9 a 35°C . Obsérvese a las 24 hrs.

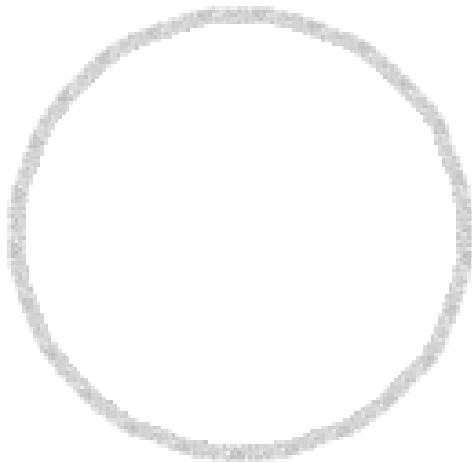
RESULTADOS



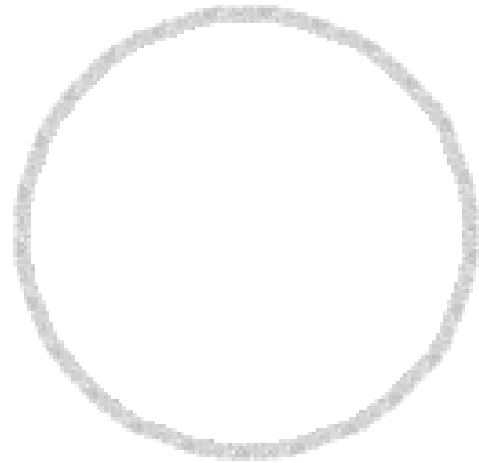
sin diluir



1a dilución



2a dilución



3a dilución

- Características de los virus: DNA y RNA.
- Bacteriófagos: Composición y Estructura.
- Experimento de Harshey y Chase.
- Infección por bacteriófagos: Lítica y Lisogénica.
- Multiplicación de los bacteriófagos.
- **Ciclo vírico de los fagos.**
- Curva de multiplicación de un paso.
- Tipos de transducción de los fagos.
- Características generales del VIH.
- Características generales del virus de la Hepatitis.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Cómo se pueden clasificar los virus?
- 2.- Explique. ¿Qué es un bacteriófago?
- 3.- ¿Cuántos virus de la hepatitis hay y cuál es la forma de transmisión de cada uno de ellos?
- 4.- Describe la forma que presenta el virus VIH
- 5.- ¿Cuáles son las células que infecta el virus del VIH y que tipo de replicación utiliza?
- 6.- Explique el experimento de Harshey y Chase.
- 7.- Explique la diferencia entre ciclo lisogénico y ciclo lítico.
- 8.- Mencione los pasos de la replicación de los fagos.
- 9.- ¿Cuántos y cuáles son los tipos de transducción de los fagos?
- 10.- Explica el diagrama de la curva de multiplicación en un solo paso (o escalón) del bacteriófago T2.

ANEXO DE LA PRÁCTICA 1. AISLAMIENTO DE BACTERIOFAGOS.

GENERALIDADES DE LA INFECCIÓN POR BACTERIOFAGOS.

- ✓ Los bacteriófagos se absorben a las moléculas receptoras de la superficie de las células bacterianas durante el primer paso de la infección.
- ✓ Los receptores pueden ser: pili, proteínas, oligosacáridos o lipopolisacáridos del huésped.
- ✓ Estructuras especializadas como las fibras de la cola median la adsorción.
- ✓ El bacteriófago T4 tiene una cola y ancla las fibras de ésta en los receptores lipopolisacáridos del huésped.
- ✓ Esto causa un cambio conformacional que lleva a la contracción de la vaina de la cola y a la penetración de la membrana de la célula y del bacteriófago.
- ✓ El ADN luego es inyectado a la célula huésped a través del tubo de la cola.
- ✓ Otro bacteriófago puede unirse a un segundo receptor.
- ✓ Los bacteriófagos que no tienen cola penetran en la bacteria huésped produciendo enzimas degradadoras de polisacáridos que rigen los componentes de la envoltura o pared celular bacteriana.
- ✓ Las bacterias desarrollan resistencia a la infección, por bacteriófagos cuando los receptores de la célula huésped son alterados por una mutación.
- ✓ El genoma del bacteriófago penetra en la célula huésped a través del tubo de la cola.
- ✓ El bacteriófago T4 empaqueta lisozimas en la base de la cola de una infección previa y usa la enzima para degradar una porción del peptidoglucano de la pared celular bacteriana.
- ✓ El DNA ingresa en la célula una vez en el interior de la célula huésped, circulariza su ADN rápidamente por medio de las terminaciones o extremos adhesivos o más bien las terminaciones adhesivas o las terminaciones lineales se modifican y quedan protegidas de las nucleasas bacterianas.
- ✓ Tan pronto como el ADN genómico entra en la célula, la RNA polimerasa del huésped reconoce a los promotores virales en el DNA y comienza la transcripción de los genes tempranos benignos. Durante este periodo el genoma del bacteriófago se replica
- ✓ Posteriormente un conjunto de genes tardíos es transcrito y traducido.
- ✓ La lisozima es empaquetada en la cola de alguno de los bacteriófagos con el fin de iniciar una nueva infección.²

Lisogenia.

La mayoría de los bacteriófagos son virulentos, se multiplican vegetativamente y destruyen las células al final del ciclo de crecimiento. Por el contrario los fagos temperados además de multiplicarse vegetativamente, dan lugar al fenómeno de la Lisogenia: la persistencia indefinida del ADN del fago en las células huéspedes sin producción de fagos. Sin embargo en ocasiones el ADN vírico en una célula lisogénica iniciara la multiplicación vegetativa, y generara viriones maduros. La Lisogenia es importante como método que favorece la persistencia y difusión de un virus de una manera más sutil que la virulencia.

Los fagos temperados tienen implicaciones productivas para muchos problemas biológicos: sirven para aclarar el origen de los virus y la evolución de las bacterias proporcionan un mecanismo importante para la transferencia de genes entre bacterias (transducción) y suministra un modelo para la oncogénesis vírica además la conmutación entre el estado lisogénico y vegetativo es útil como modelo en el estudio de diferenciación.

Naturaleza de la Lisogenia.

La Lisogenia caracteriza numerosas cepas bacterianas recién aisladas a partir de un medio ambiente natural. Estos cultivos lisogénicos contienen una escasa concentración de bacteriófagos, que puede ser detectada gracias a que resulta capaz de lisar otras cepas bacterianas relacionadas, llamadas cepas sensibles o indicadoras.

- ✓ Cuando una cepa bacteriana sensible es infectada por un bacteriófago temperado, puede producir dos tipos de respuesta.
- ✓ Algunas de las células son lisadas por la multiplicación del fago, mientras otras son lisogenizadas.
- ✓ Las cepas lisogénicas producidas de esta forma reciben el nombre de la cepa sensible, seguida del nombre del fago lisogenizante entre paréntesis: por ejemplo, *Escherichia coli* K12 (λ). Como los fagos temperados lisan tan solo una pequeña parte de las células sensibles infectadas, producen halos con turbidez.

Las cepas bacterianas lisogénicas son fácilmente detectadas realizando una estría con ellas en medio sólido y sobre una cepa sensible al fago liberado: en tal caso se observa una estrecha zona de lisis a los largo del borde de la cepa lisogénica. Dado que la Lisogenia no puede ser detectada, a menos que se disponga una cepa sensible, es posible que muchas cepas bacterianas sean lisogénicas, pero no se reconozcan como tales. Además numerosas cepas son lisogénicas para diversos fagos.

Relación con el ciclo de crecimiento vegetativo.

La Lisogenia fue reconocida a principios de los años 20 pronto se cayó en la cuenta de que las cepas lisogénicas no son simplemente cultivos bacterianos contaminados por fagos, puesto que el fago no podía ser eliminado por clonación repetida de las bacterias o cultivando las células en presencia de antisuero específico de fago para prevenir la infección celular por viriones existentes en el medio. En 1925, Bordet reconoció que la capacidad para reproducir fagos era una propiedad hereditaria de las células. Sin embargo la ruptura de las células lisogénicas no produce fago infeccioso; por tanto el fago tiene que existir en las células de una forma no infecciosa. No obstante, la capacidad de los cultivos lisogénicos para producir virus sin lisis evidente siguió siendo desconcertante hasta que Lwoff, en 1950 observando pacientemente el comportamiento de las células aisladas en microgotitas, demostró que el fago es producido por una pequeña proporción de células: estas lisan y liberan fagos en un estallido (**inducción**), lo mismo que las células infectadas por el fago T4. Las otras células del cultivo no dan lugar a una infección productiva y se estima que son inmunes al fago liberado.

El fago se adhiere a las células inmunes e inyecta su ADN, pero el ADN no se multiplica y no causa lisis celular. Por lo tanto la inmunidad es diferente de la resistencia, que según lo indicado impide la absorción e inyección. Estos experimentos aclararon que la Lisogenia implica una forma especial no infecciosa, heredada de manera estable, del virus llamado profago asociada con la inmunidad. En ocasiones el profago se desplaza súbitamente hacia la forma vegetativa y se reproduce después exactamente igual que un fago virulento. Lwoff proporciono también una herramienta poderosa para el estudio de la Lisogenia al demostrar que el desplazamiento desde el ciclo profágico al lítico, normalmente es un hecho raro podía ser inducido en todas las células de un cultivo por unos determinados influjos ambientales, como una moderada irradiación ultravioleta.

Estado lisogénico.

Cuando una bacteria sensible es infectada por un fago temperado, el ADN entrante puede escoger entre la multiplicación vegetativa y la lisogenización. La proporción de células infectadas que son lisogenizadas puede variar desde un escaso porcentaje hasta casi la totalidad, dependiendo tanto del sistema como de las condiciones.

Inmunidad y Represión.

La inmunidad, que al principio fue considerada una derivación simplemente curiosa del estado lisogénico constituye su característica más importante, ya que se debe a la represión de genes del fago. La represión puede ponerse de manifiesto en las células lisogénicas por la demostración de la ausencia de ARNm correspondiente a las regiones vegetativas. Estos ARNm son sustituidos por ARNm de pequeño tamaño que transcribe parte de la región reguladora, el operón de la inmunidad, de la cadena izquierda del ADN. Las células lisogénicas contienen un represor de inmunidad, pero carecen de proteínas vegetativas, justamente al revés que las células inducidas. El represor es especificado por el gen *ci*, en la región de inmunidad. Las mutaciones que alteran al represor impiden la lisogenización, pero permiten el crecimiento vegetativo produciendo así halos transparentes. La inmunidad a la infección exógena es también el resultado de represión: no es producida por el fago *ci*- y cuando se inducen células lisogénicas normales se derrumba simultáneamente con la represión. En presencia de represión, el ADN infectante cicliza, pero no replica sobrevive sobre muchas generaciones celulares como un profago abortivo, que se transmite de manera unilineal como los genes involucrados en la transducción abortiva; puede ser reconocido mediante apropiadas pruebas genéticas.

Especificidad de Inmunidad.

La inmunidad es altamente específica: incluso fagos estrechamente relacionados forman receptores *ci* de diferentes especificidades, y cada fago reconoce exclusivamente el suyo propio. No se sabe que una mutación puntual en un gen receptor cambie su especificidad por la de un fago diferente, incluso uno muy relacionado. Los recombinantes heteroinmunes que tienen la mayoría de las propiedades genéticas de un fago, pero la inmunidad de otro, han desempeñado un papel importante en la revelación de los mecanismos de Lisogenia.⁶

EL CICLO DEL PROFAGO.

Al producirse la lisogenización, el ADN vegetativo de λ , de forma cíclica, se inserta en el ADN celular en forma de profago. En cambio durante la inducción el profago es separado para producir de nuevo un ADN cíclico vegetativo. Es decir, el ciclo del profago constituye una vía alterna en el ciclo vegetativo del ADN.

Localización y estado del profago en las células lisogénicas.

- La mayoría de los profagos se integran en un punto fijo del cromosoma bacteriano. Los profagos son transferidos junto con el cromosoma Hfr en los cruces bacterianos y su localización puede establecerse en el mapa genético de las bacterias en relación con los genes bacterianos.
- En *E.coli* los fagos λ y otros fagos de tipo parecido se sitúan en un punto fijo del cromosoma del huésped: p2 puede ocupar 9 puntos distintos, de los cuales dos son elegidos de forma preferencial mientras que Mu puede situarse en diversos lugares.
- Sin embargo, ciertos profagos, como por ejemplo P1, están separados del cromosoma en forma de plásmidos. En algunos casos, P1 debe interactuar con el cromosoma bacteriano, ya que da lugar a un tipo de transducción especializada.
- En las células lisogénicas, el ADN del profago puede detectarse mediante hibridación con ADN del fago marcado radiactivamente.
- Los profagos integrados están conectados al cromosoma bacteriano por enlaces covalentes: después de la desnaturalización del ADN el ADN vírico continúa sedimentándose en un gradiente alcalino de sacarosa con el ADN celular.

Multiplicación del profago.

Mientras que la multiplicación vegetativa del ADN del fago es autónoma, es decir, está controlada por genes del fago, la replicación del profago está regulada por el sistema que controla la replicación del cromosoma bacteriano. Así a 40°C ciertos mutantes del fago termosensibles persisten en forma de profagos, aun cuando no pueden iniciar la replicación vegetativa además pruebas genéticas demuestran que un profago se duplica cuando un punto en crecimiento del ADN bacteriano que se replica alcanza un lugar de integración.

Inserción.

Los experimentos genéticos demuestran que el profago se inserta de manera lineal en el cromosoma bacteriano. Los cruces de bacterias por profagos genéticamente marcados dan lugar a un mapa de profagos lineal; sin embargo, el orden de los genes está permutado con respecto al mapa vegetativo. Champbell explicaba esta permuta sugiriendo que en la lisogenización el ADN vírico en forma cíclica está linealmente insertado en el cromosoma bacteriano por un entrecruzamiento recíproco simple que abre el anillo en un punto distinto de aquel en que las terminaciones del ADN maduro se encuentran. La inserción implica recombinación entre un punto de unión del fago específico en el ADN vegetativo de λ y un punto de unión del profago recombinantes situados a dos extremos del profago.

Los experimentos con isótopos pesados han demostrado que la mayoría de los profagos proceden del ADN replicado; no obstante el ADN del fago infectante puede ser directamente integrado si se evita su replicación. Dado que las probabilidades de inserción de una molécula de ADN son escasas, varias generaciones de células pueden intervenir entre la infección y la aparición de un clon lisogénico.

La necesidad de una enzima especial en la inserción es evidente en los experimentos con una capa parcialmente diploide de *E.coli* portadora de dos puntos de unión de λ idénticos. Inicialmente λ se integra a uno u otro punto con igual y alta probabilidad. Sin embargo, después del que el primer profago ha establecido la inmunidad, una nueva infección λ causa rara vez la integración en el punto vacante. Por el contrario, si el fago infectante es heteroinmune, pero tiene el mismo punto de unión es muy probable que se integre de nuevo en el punto libre. Por lo tanto la inserción necesita un producto específico por un gen que es reprimido en las células lisogénicas. El gen es *int* porque los mutantes *int-* no se integran.

La expresión de *int* es regulada con la del *cl*. Así al comienzo de la infección es estimulado por los productos *cII* y *cIII*, que inician también la síntesis del represor *cl* y tras el establecimiento del estado lisogénico *int* continúa siendo expresado a un bajo nivel porque su transcripción es iniciada en un promotor privado, que es independiente del producto *N* y no está reprimido por el represor *cl*. En consecuencia, la integración puede producirse en las células bajo represión de *cl*. La semejanza entre la regularización de *int* y *cl* coordina los dos principales acontecimientos de la lisogenización: represión e integración.

Escisión.

La escisión del profago queda explicada en el modelo de Champbell como una inversión de la integración, es decir, un entrecruzamiento recíproco entre los puntos de unión en los dos extremos de un profago, produciendo una molécula de ADN cíclico de fago y un cromosoma bacteriano intacto. Dos predicciones de este modelo se han verificado experimentalmente: la escisión de un profago en forma de un anillo de ADN cerrado por covalencia, no duplicado, puede ser demostrada si los genes del fago para la replicación del ADN son inactivados; y la integridad del ADN bacteriano tras la escisión es corroborada por los experimentos de curación revisados más adelante. Sin embargo, estudios detallados han demostrado que existen importantes diferencias entre inserción y escisión.

Así la escisión necesita otra función vírica además de *int*, ya que algunos mutantes de λ se integran pero no cortan. Estos están alterados en el gen *xis*, adyacente a *int*. El producto *int* puede ser la enzima de recombinación básica tanto para inserción como la escisión, y el producto *xis* haría entonces que se adaptase a la configuración diferente del punto durante la escisión.

Transducción abortiva.

- El fragmento de ADN bacteriano introducido (el oxogenato) no siempre sufre la inserción parcial (por recombinación) o la destrucción.
- Existe una tercera opción la transducción abortiva, en la que el exógeno persiste y expresa la función de sus genes; pero al carecer de un origen de replicación no puede multiplicarse es transmitido de forma unilineal, es decir, desde una célula o solamente una de sus dos hijas.
- La transducción abortiva es fácilmente reconocida cuando un gen del oxogenato codifica para una enzima necesaria para el crecimiento en un medio selectivo, ya que, si bien la cantidad es restringida por la herencia unilineal, los transductantes abortivos prototrófico puede hacer microcolonias en medio mínimo que son detectables con aumento.
- La proporción entre microcolonias y megacolonias prototróficas pone de manifiesto que la transducción abortiva es varias veces mas frecuente que la correspondiente transducción completa; de ahí la que la probabilidad de integración del oxogenato es bastante pequeña.
- Las colonias prototróficas grandes (que indican transducción completa) se forman por recombinación entre dos mutaciones tanto si son alélicas como si no; en cuanto las microcolonias de la transducción abortiva están formadas por complementación, lo que indica generalmente que las mutaciones no son alélicas es decir que están en genes diferentes.⁷

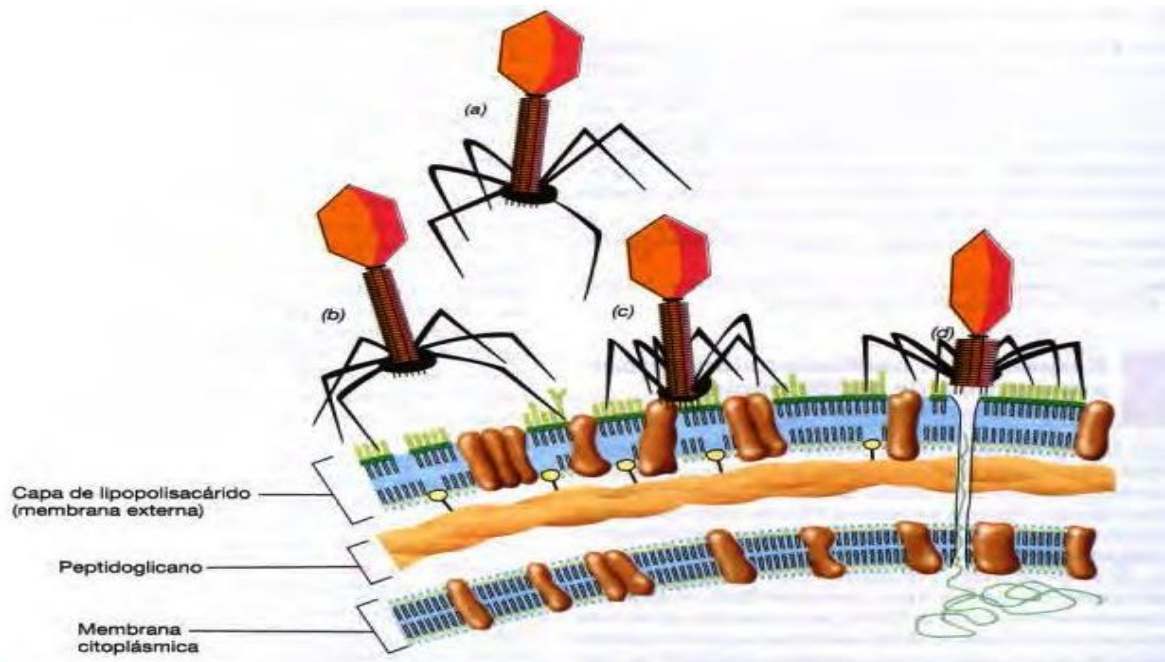


Figura 1.- (a) Partícula no fijada. (b) Fijación a la pared por fibras de la cola interaccionando con el polisacárido. (c) Contacto entre la pared celular y las espículas de la cola. (d) Contracción de la vaina de la cola e inyección del DNA

ADSORCIÓN.

La unión inicialmente reversible del fago a los receptores se convierte rápidamente en irreversible (es decir, el fago no puede ser desprendido) a una potencia iónica y temperatura apropiadas.

La adsorción puede ser destruida por mutaciones bacterianas a la resistencia a los bacteriófagos. Estas mutaciones cambian los receptores y pueden cambiar también la especificidad antigénica de las células; y al contrario si B/2 es expuesto a una fuerte concentración de T2, mutantes de tipo de huéspedes raros (T2h) pueden adherirse a B/2 e iniciar la multiplicación vírica. Mutantes similares aparecen en la mayoría de los fagos.

Los mutantes de tipos de huéspedes desempeñan un papel importante en el desarrollo precoz de la genética de los bacteriófagos. Su selección ilustra la conexión entre la envoltura de los virus y de las células huésped.

Lugares víricos para la adsorción.

- Todos los viriones tienen una estructura especializada para la adsorción.
- Los colifagos de tipo T-par es una estructura compleja: la fibra caudal. Así las fibras caudales aisladas se adhieren al mismo tipo de bacterias que el bacteriófago del que se derivaron y el antisuero frente a las fibras inhibe la adsorción del fago.
- El virión adsorbido adquiere una posición característica con la cabeza perpendicular a la pared celular. En los fagos RNA el lugar de adsorción es una molécula proteica simple.
- Los receptores de la célula huésped son a menudo polisacáridos complejos con especificidad de unión con el fago y antigénica.

Mecanismo de penetración del ácido nucleico (inyección)

- ✓ Al ácido nucleico generalmente asociado con algunas proteínas internas del virión, es liberado de la cápsida después de los viriones hayan sido absorbidos de forma irreversible.
- ✓ Penetran a las células, aparentemente por lugares en los que las membranas externas e internas están en contacto y permanecen asociadas con la membrana.
- ✓ El ADN liberado de los viriones está protegido de las nucleasas de membrana por las proteínas asociadas y por las modificaciones del ADN.
- ✓ Los fagos de tipo T-par tienen un mecanismo altamente especializado para la liberación de su ADN.
- ✓ Cuando el tubo alcanza la membrana plasmática, el ADN es expulsado. La concentración es el resultado de cambios de conformación de cadena iniciados por la adhesión de las fibras y las espículas a la célula.
- ✓ La placa basal hexágona adquiere forma de estrella y se separa del tubo, después la vaina se acorta y condensa.
- ✓ La contracción es un desplazamiento recíproco e irreversible de los monómeros. Impulsado por la liberación de energía potencial en los enlaces que hay entre ellos.

Los virus pueden penetrar en las células animales mediante uno de los tres sistemas siguientes:

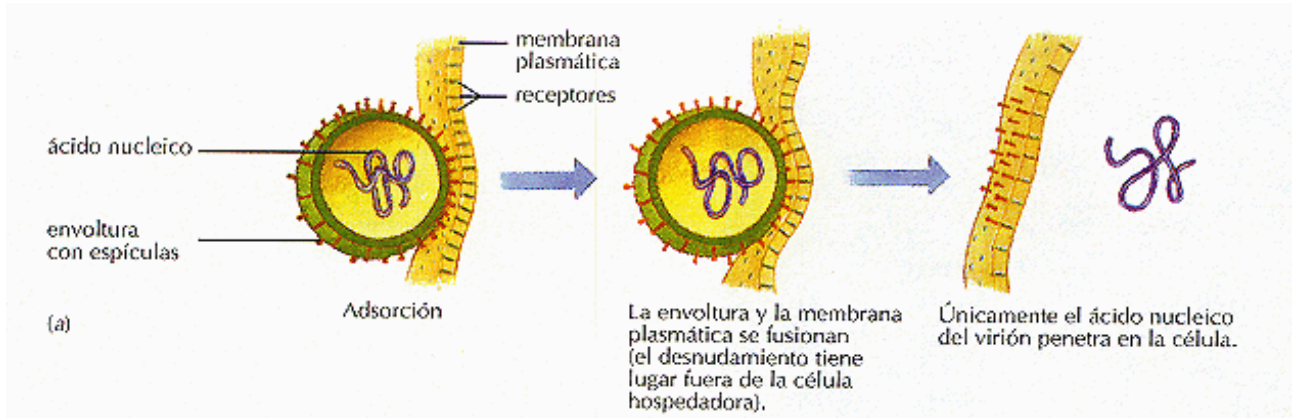


Figura 2.- (a) La envoltura vírica puede fusionarse con la membrana plasmática celular produciéndose el desnudamiento del virus. El ácido nucleico penetra dentro de la célula.

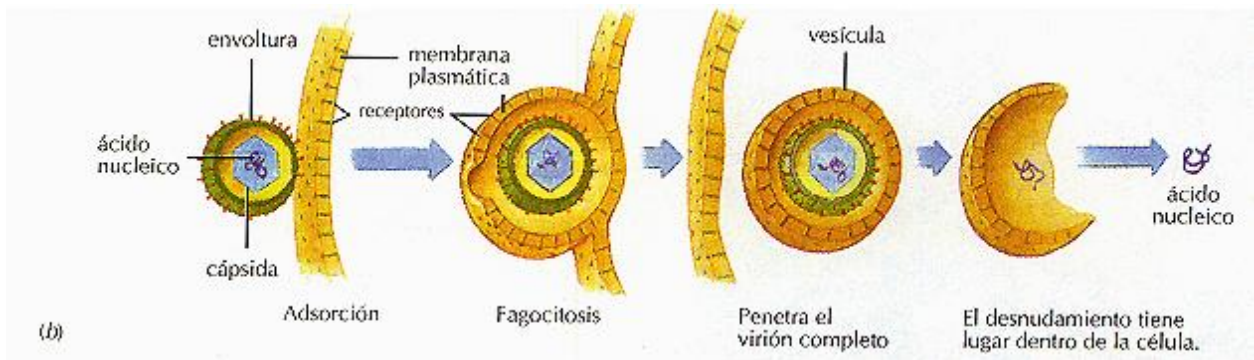


Figura 3.- (b) Un virus envuelto puede sufrir un proceso de endocitosis, en cuyo caso el virión completo penetra y se desnuda dentro de la célula.

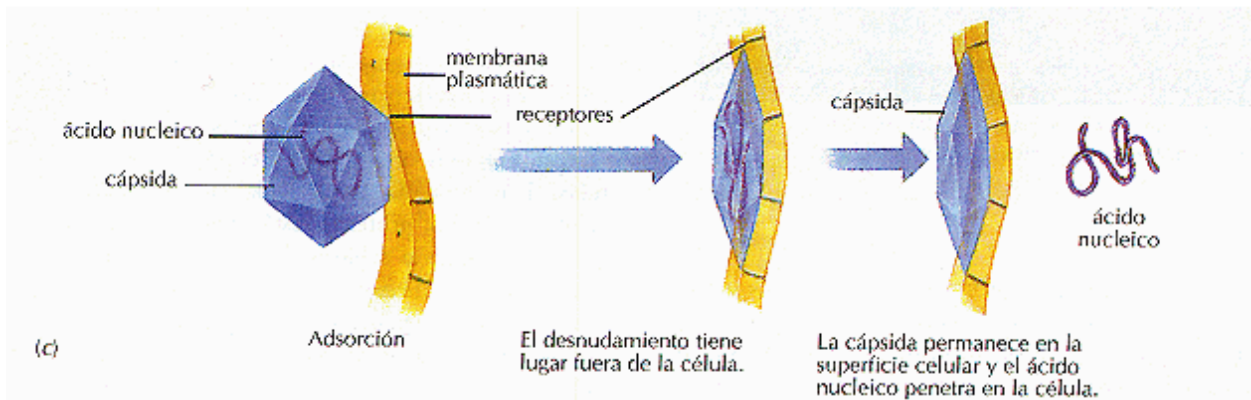


Figura 4.- (c) La mayoría de los virus desnudos se adsorben a la superficie celular. La cápsida permanece unida en el exterior de la célula, desnudándose el virus. El ácido nucleico penetra en la célula **Ciclo vírico de los fagos ADN dúplex.**

1.-CONTACTO CON EL VIRUS.

- La adsorción se da en sitios específicos para un determinado fago.
- Se fijan en la pared celular, a fimbrias, pelos, flagelos. Este primer contacto es reversible, con lo que obtenemos virus infectivos.
- Al poco tiempo se hace irreversible y no podemos recuperar fagos infectivos porque han inyectado el ADN en la bacteria.
- El Rc celular para el fago suelen ser polisacáridos complejos con especificidad de unión con el fago y antigénica. El fago lambda se adhiere a una proteína transportadora de manosa.

2. INYECCIÓN DEL ADN EN EL ESPACIO PERIPLÁSMICO.

- Cada tipo de virus tiene algo de especial.
 - En los fagos complejos, la fijación se da a nivel de la placa o la vaina, y la inyección depende del tipo de morfología.
 - En el caso más complejo, se da la penetración del tallo por una contracción de la vaina
 - Es un proceso activo y usa ATP (hay unas 100 moléculas de ATP en el virión) y ATPasa virus específica.
 - Después de la inyección, la bacteria repara la zona lisada.
 - Si son muchos los fagos que infectan la célula o el metabolismo de la bacteria no está al 100 %, la reparación no se lleva a cabo y hay debilitamiento de la pared celular y lisis de la bacteria (lisis desde fuera) y no se forman fagos infectivos porque no hay replicación.

- El fago T7 inyecta siempre el genoma con la misma polaridad (polaridad constante).
- El fago T5 inyecta primero una serie de genes que se traducen en el interior de la bacteria y permiten la entrada del resto del genoma.
- La unión del fago produce cambios en la membrana plasmática y cambios en el metabolismo de la célula (se detiene el metabolismo celular).

3. MULTIPLICACIÓN DEL ÁCIDO NUCLEICO: FASE DE ECLIPSE.

La fase de eclipse es aquella en la que no podemos recuperar viriones infectantes, después de lisis de la célula. En el momento de la inyección del ADN hay inhibición de la síntesis y del metabolismo bacteriano. El DNA pasa al citoplasma y hay inducción de enzimas que van a dirigir la síntesis fágica. Comienza la transcripción en varias fases:

a) RNAm inicial:

- son proteínas que van a intervenir en la síntesis del RNAm tardío y en la síntesis de DNA vírico.
- Hay síntesis de "novo" proteínas como la dCTPasa (el fago G4 porta su RNA poli); también se aprovecha de la maquinaria celular (DNA poli, RNA poli, enzimas metilantes y glicosilantes, DNAasa):
- Proteínas fágicas que detienen la síntesis de RNA bacteriano, que conducen al desplegamiento del DNA y su posterior degradación.
- Proteínas que regulan la transcripción vírica.
- RNA polimerasa que necesaria para la transcripción de los genes tardíos (fago T7).
- Enzimas glicosilantes: unen un resto de glucosa a citosina.
- Enzimas metilantes que van a metilar las bases del DNA vírico en las dianas de restricción presentes en el genoma (mecanismo de protección del DNA vírico).
- Esta señal sirve para evitar a las enzimas de restricción de la bacteria. En algunos virus está atrofiado y a estos virus se los llama virus confinados.

Estos virus pueden infectar a bacterias como *Salmonella* y *Shigella* que no tienen este sistema de restricción y sí el sistema de metilación. El virus, cuando infecta, va a generar virus que pueden infectar a otras bacterias porque tienen el DNA metilado, pero no van a poder generar viriones de nuevo porque no tienen sistemas de metilación (virus desconfiados).

- dCTPasa: hidrolizan el dCTP y dCDP, con lo que la citosina no puede incorporarse al DNA vírico y sí se incorpora la citosina glicosilada.
- DNAasa que interviene en la rotura del DNA celular: cesa la replicación, transcripción y síntesis bacteriana. Los fragmentos de DNA celular que se forman se utilizan para sintetizar el DNA vírico y los RNAm. Además, la maquinaria vírica cuenta el ARNr y ARNt de la bacteria.

b) RNAm de genes medios:

- Sus productos son requeridos para la duplicación del DNA y la recombinación.

c) RNAm tardío (codifica dos tipos de proteínas):

1. Proteínas capsidales.
 2. Proteínas enzimáticas del virus: lisozima que realiza la lisis celular y las polimerasas.
- La síntesis de DNA vírico se realiza en el momento en el que se sintetizan las proteínas iniciales.

4. MADURACIÓN.

Comienza con una condensación de las proteínas capsidales para formar la procabeza. En esta procabeza entra el ADN para formar la cabeza, y a continuación van a fijarse la cola que se ha sintetizado por separado. Pueden formar partículas vacías, colas, cabezas, etc. Todo el proceso está controlado por un sistema regulador del ADN fágico.

5. LIBERACIÓN.

La pared bacteriana es atacada por una lisozima fágica de fase tardía que rompe la pared bacteriana y libera partículas víricas completas e incompletas.

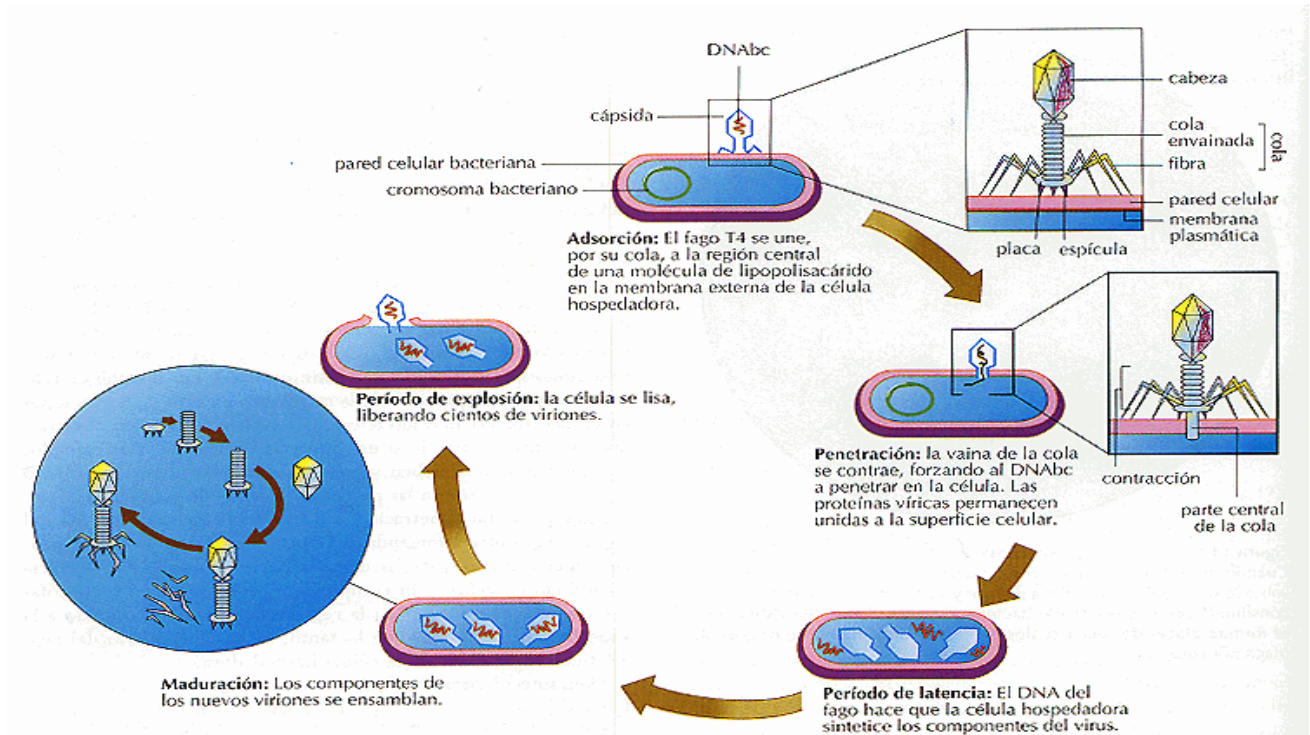


Figura 5.- Ciclo vírico de los fagos.

Efecto de la unión del fago sobre el metabolismo celular.

La unión de la cola del fago de tipo T-par sin expresión de genes virales, causa una desorganización de la membrana plasmática celular. El aumento de su permeabilidad permite que las pequeñas moléculas se filtren al medio. Alteraciones similares son producidas por la adherencia de fagos fantasmas y de algunas bacteriocinas.

Estas alteraciones causan profundos cambios metabólicos, incluyendo un cese casi inmediato de síntesis proteica celular. En las células infectadas por fago las alteraciones de la membrana y sus efectos metabólicos son solo transitorios y son rápidamente anulados por la incorporación de varias proteínas específicas por fagos en la membrana. Estas proteínas causan otros efectos hacen a la célula resistente frente a la superinfección por fago del mismo tipo y frente a la lisis desde fuera por fantasmas superinfectantes y causan fenómenos de inhibición de lisis.

El ciclo de la multiplicación vírica.

- El proceso de la multiplicación vírica, iniciando por la penetración en el interior de la célula del ácido nucleico de los viriones parentales, es un proceso secuencial que comprende muchos pasos que, al final, conduce a la liberación de los viriones hijos producidos en la célula.
- La secuencia de pasos se denomina ciclo de multiplicación. Para el análisis cinético de las distintas fases de este proceso se precisa un elevado número de células en las que la infección se produzca de forma sincrónica, es decir, las células deben ser infectadas de forma simultánea, evitándose una infección secundaria por la progenie del virus.
- Estas condiciones fueron obtenidas con facilidad en los estudios clásicos de Delbruck, permitiendo que el virus infectase las células durante un corto periodo de tiempo y evitando una infección posterior mediante dilución de la mezcla virus-células o por adición de antisuero específico para el fago.
- Las células infectadas son en aquel momento liberadas del virus no absorbido y del antisuero por centrifugación.
- Es necesario seleccionar cuidadosamente la multiplicación de la infección (es decir el número de viriones por célula) de acuerdo con las condiciones del experimento, ya que si esa multiplicidad es demasiado elevada, la replicación vírica puede ser anormal, mientras que si es demasiado escasa, las células pueden seguir sin ser infectadas.
- Como sea que no todas las partículas víricas se absorben durante la breve incubación inicial, la multiplicación de la infección es controlada determinando la proporción de células productivamente infectadas. Estas células son identificadas como centros infecciosos, es decir, células capaces de producir un halo en las pruebas habituales empleadas para el virus.⁶

REFERENCIAS.

1.- Romero Cabello Raul, Microbiología y Parasitología Humana, 3ª ed. México: Panamericana; 2007.

2.- Epidemiología molecular. Unidad de Infección Viral e Inmunidad Centro nacional de microbiología. Resino García Salvador [actualizado en enero del 2013] disponible en:

<http://epidemiologiamolecular.com/15/11/2011/bacteriofagos/>

3.- Short, Teri. Virus Estudio Molecular con Orientación Clínica. 1ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2009

4.- Douglas John. Bacteriofagos. 1ª ed. Barcelona: Ediciones Omega; 1978

5.- Tortora G, Funke B, Case C. Introduccion a la microbiologia. 9ª ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2007. 988p

6.-Biblioteca digital. En la frontera de la vida: los virus. Aranda Anzaldo Armando[actualizado 28 de noviembre del 2013] disponible en:

http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen2/ciencia3/071/htm/sec_5.htm

7.- Biblioteweb. Departamento de Genética y biología Molecular, CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional. Kameyama Luis, Oviedo Norma, Guarneros Gabriel disponible en:

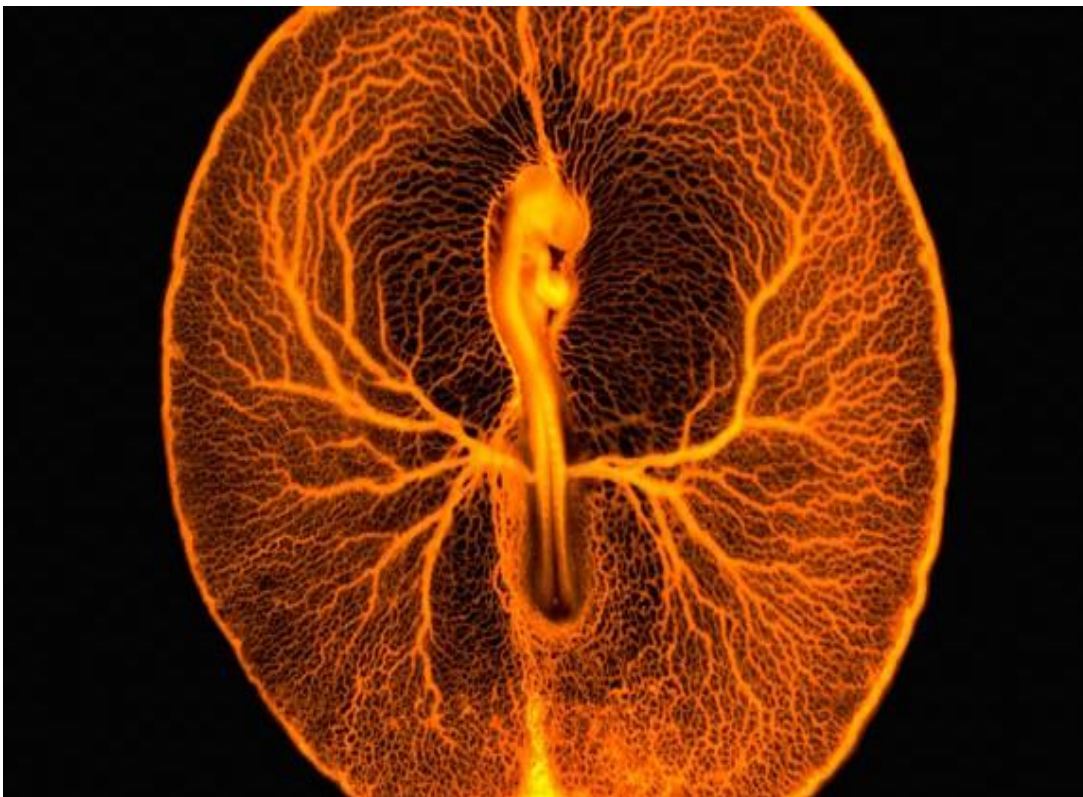
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap18/>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



PRÁCTICA 2
ESTRUCTURAS DEL EMBRIÓN DE POLLO
Y SUS VÍAS DE INOCULACIÓN



PRÁCTICA 2

ESTRUCTURAS DEL EMBRIÓN DE POLLO Y SUS VÍAS DE INOCULACIÓN.

OBJETIVOS.

- Adiestrar al alumno en el manejo de la técnica de la inoculación de embrión de pollo por las vías más utilizadas.
- Conocer las diversas partes del embrión de pollo de 9 días de incubación.

INTRODUCCIÓN.

Los virus pueden cultivarse en: células, embrión de pollo o en animales de experimentación. Esto nos permite conocer la patogenia de las enfermedades virales y de la oncogénesis viral. En los laboratorios de diagnóstico se identifica parte del virus o bien a los anticuerpos que se producen en la respuesta inmune. En los laboratorios de investigación se cultivan virus como base de los análisis detallados de la expresión y la replicación virales.

La disponibilidad de células desarrolladas in vitro ha facilitado la identificación, el cultivo de virus recién aislados y la caracterización de los que ya se conocían. Existen tres tipos básicos de cultivo celular:

Los cultivos primarios se efectúan mediante dispersión de células (por lo general con tripsina) de tejidos huéspedes recién extirpados. En general no pueden crecer más allá de unos cuantos pasos en cultivo, como cultivos secundarios. Las líneas celulares diploides son cultivos secundarios que han experimentado un cambio que permite su cultivo limitado (hasta 50 pasos), pero que retienen su patrón cromosómico normal. Las líneas celulares continuas son cultivos capaces de crecimiento más prolongado, quizá indefinido, y que se han obtenido de líneas celulares diploides o de tejidos malignos. Invariablemente tienen números alterados e irregulares de cromosomas. El tipo de cultivo celular que se emplee para cultivar virus depende de la sensibilidad de las células a ese virus en particular.¹

CULTIVO EN ANIMALES.

La inoculación de animales de laboratorio con material infeccioso se utilizó, en el pasado como primer paso para el diagnóstico de una infección viral. Sin embargo, actualmente no se utilizan en el laboratorio, ya que se requiere de bioterios apropiados para su mantenimiento y existe regulación muy estricta para la justificación de uso de animales, manipulación, número necesario de animales para cada experimento y otras consideraciones. El animal mayormente utilizado es el ratón blanco; depende del virus por estudiar se utilizan adultos o recién nacidos. Los ratones se utilizan principalmente, en el estudio de virus neurotrópicos como los virus coxsackie y algunos arbovirus. La inoculación es usualmente intracerebral con un inóculo de 0.03 mL. La inoculación también puede ser subcutáneas, intramusculares o intraperitoneales, donde se pueden administrar dosis mayores de inóculo.

Parámetros que se deben tomar en cuenta: Sitio de inoculación, la especie, edad del animal y la patología que se produce.

CUADRO 1. Uso de animales de laboratorio	
<i>ventajas</i>	<i>desventajas</i>
El sistema permite aislar algunos virus que no crecen en otros sistemas de cultivo viral o son sistemas más sensibles.	Pueden ser portadores de virus que producen infecciones latentes, por lo que podría causar errores en el estudio de aislamiento de un agente a partir de una muestra clínica
Sirven como modelos para estudiar patogénesis viral	El costo de mantener colonias sanas, bien alimentadas y la infraestructura necesaria para mantener los animales sanos y enfermos separadamente.
Son un medio para estudiar el efecto de antivirales	Los virus pueden crecer en hospederos diferentes, edad diferente, por lo tanto se necesitaría mantener varias especies según las necesidades de un laboratorio de diagnóstico viral.

Permiten la producción de vacunas contra algunas virosis como sarampión, rabia, fiebre amarilla.	Para algunos de los sitios de inoculación se necesita experiencia, así como también para identificar las diferentes manifestaciones clínicas que presentaran los animales inoculados.
--	---

Hoy la inoculación en animales se realiza en las siguientes ocasiones:

- a) Cuando se requiere aislar a un microorganismo patógeno, bacteria, virus o protozoos a partir de material contaminado, y no se puede realizar por métodos artificiales.
- b) Para completar la identificación de una especie bacteriana, o clasificar a un virus.
- c) Para comprobar la atenuación de una vacuna.
- d) Para la valoración de la eficacia terapéutica *in vivo* de ciertos fármacos frente a algunos microorganismos. Es insustituible para el estudio de la patogénesis de ciertas enfermedades infecciosas.²

EMBRIÓN DE POLLO.

La introducción del embrión de pollo como sistema de aislamiento para virus, resulto un avance significativo sobre el uso de animales que era el único sistema disponible.

En el año 1911, Rous y Murphy utilizaron, por primera vez, la membrana corioalantoidea para el estudio de los virus, pero no fue hasta 1931 que por las contribuciones de Goodpasture, utilizo embriones de pollo para el aislamiento de virus y este fue uno de los métodos disponibles hasta el descubrimiento de los cultivos celulares. Se utilizan embriones de 7 a 14 días. Dependiendo del sitio de inoculación de la muestra, Se puede reconocer el crecimiento vírico a los 2 o 5 días por producir diversas alteraciones que identificamos.

La inoculación en la cavidad amniótica o la cavidad alantoidea, el virus en multiplicación activa pasa el saco amniótico y es posible detectarlo por hemaglutinación. Cuando la inoculación se realiza en saco vitelino, se produce la

muerte del embrión. Si la inoculación tiene lugar en la membrana corioalantoidea, se producen zonas con necrosis, pústulas y hemorragia identificables.

Los embriones de pollo son fáciles de mantener en el laboratorio en grandes cantidades a un costo relativamente bajo. Por otro lado, ofrecen un medio estéril y prácticamente libre de anticuerpos. Las únicas limitaciones que se presentan son la baja susceptibilidad a la mayoría de los virus humanos.

Los huevos embrionados pueden inocularse utilizando diferentes métodos de acuerdo con el agente que se pretende estudiar.³

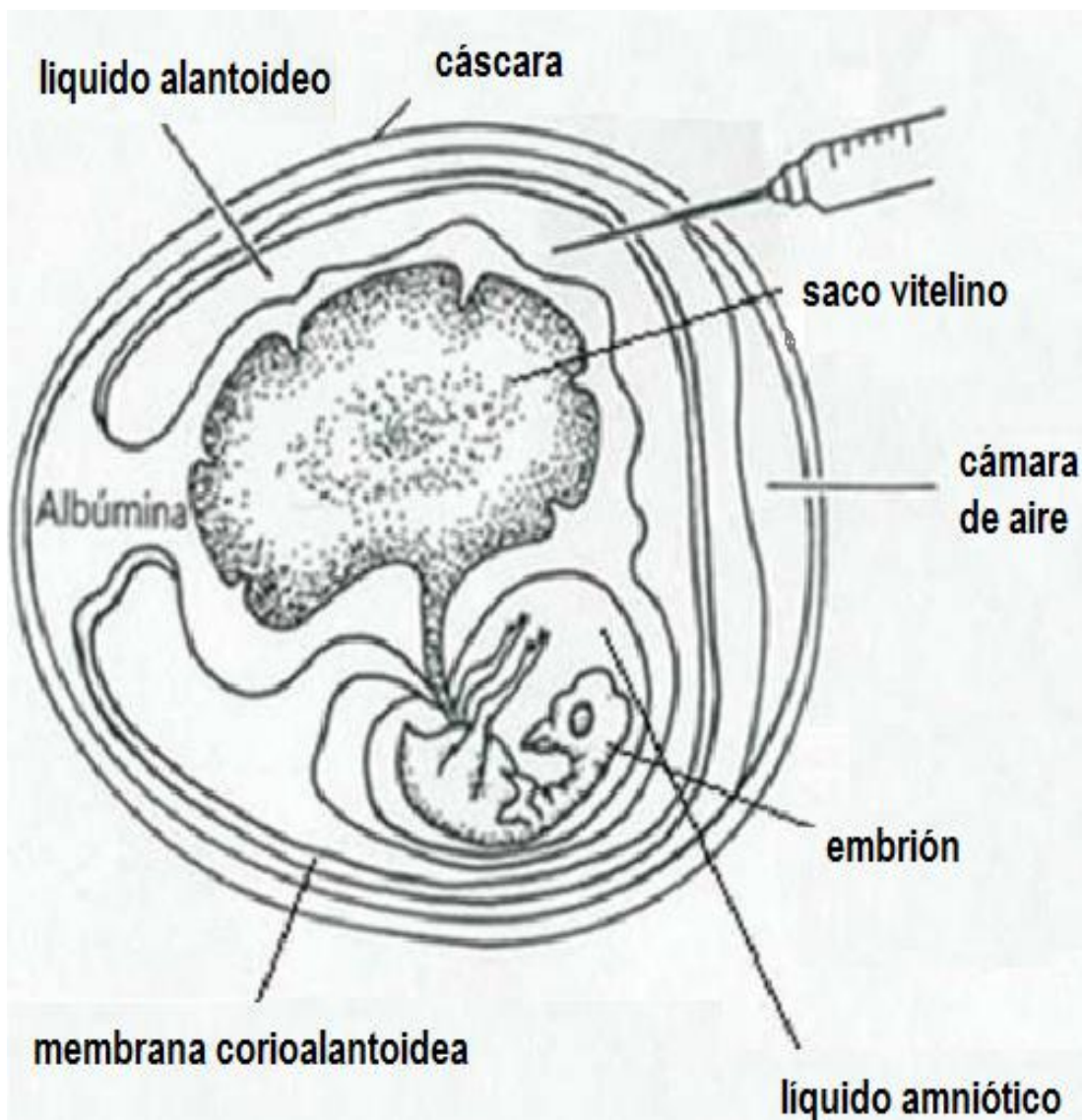


Figura 1.- Estructura de un huevo embrionado.

DESARROLLO DE UN HUEVO EMBRIONADO.

Las estructuras más importantes en orden de formación de un huevo son:

- La célula reproductiva femenina (oocito) formada en el ovario de la gallina, unida estrechamente a la yema y envuelta en la membrana vitelina.
- La albumina o clara de huevo, envuelve a la yema y se adhiere al saco vitelino.
- Las membranas de la cascara son dos, la interna y la externa unidas estrechamente, excepto en el extremo más ancho, donde se separan para formar la cámara de aire.
- La cascara y la cutícula son envolturas rígidas compuestas de cristales irregulares de calcita llena de poros, que se extienden en toda la superficie y permite el intercambio gaseoso.
- Las membranas embrionarias:
 - a) Saco vitelino con su endotelio vascular, por el cual se nutre el embrión. Sus funciones son la formación de sangre, absorción de material nutritivo de la yema y transporte de nutrientes del embrión.
 - b) Saco amniótico se forma junto con el corion y envuelve al embrión. Este saco membranoso y transparente se llena de un líquido incoloro, el líquido amniótico, que empieza a acumularse desde el 5 día y alcanza su máximo volumen (3-4 mL) al cabo del 13° día.
 - c) La membrana corioalantoidea envuelve todo el ambiente intraembrionario.
 - d) La cavidad alantoidea está llena de líquido alantoico que aumenta en volumen de 1 mL al 7° día a un máximo de 4-10 mL en el 13° día.³

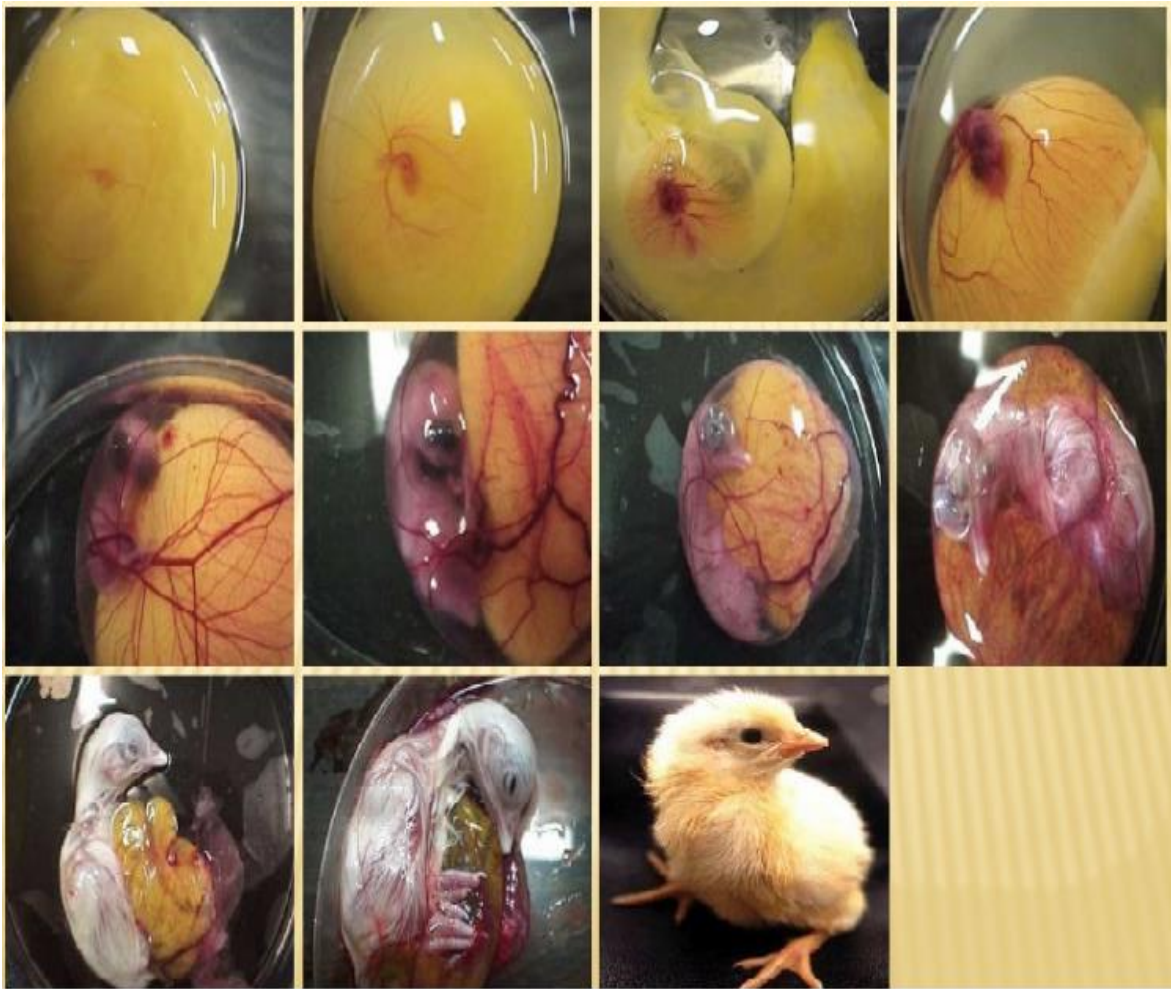


Figura 2.- Etapas de desarrollo de un huevo embrionado.

CUIDADOS DEL HUEVO EMBRIONADO.

Se deben utilizar incubadoras con temperatura óptima de 39.5°C, con humedad relativa de 60%. Es mejor mantenerlos con la concentración de oxígeno normal de aire (2%) y se deben mover los huevos por lo menos dos veces diarias.

Los huevos se colocan con la parte ancha hacia arriba, es el extremo por donde nacen los pollos y por lo que se hacen la mayoría de las inoculaciones.

VIAS DE INOCULACION DE UN HUEVO EMBRIONADO.

Siembra en Cavidad alantoidea

- 1.- Tomar el huevo y verificar su viabilidad.
- 2.- Desinfectar por medio de algodón y alcohol yodado.
- 3.- Abrir un agujero en el centro de la cámara de aire y otro encima del embrión, con cuidado de que la zona no esté muy vascularizada.
- 4.- Observar con el ovoscopio, e introducir la aguja dirigiéndola hacia el embrión. En este momento se hace la inoculación.
- 5.- Cerrar los agujeros con esmalte de uñas.

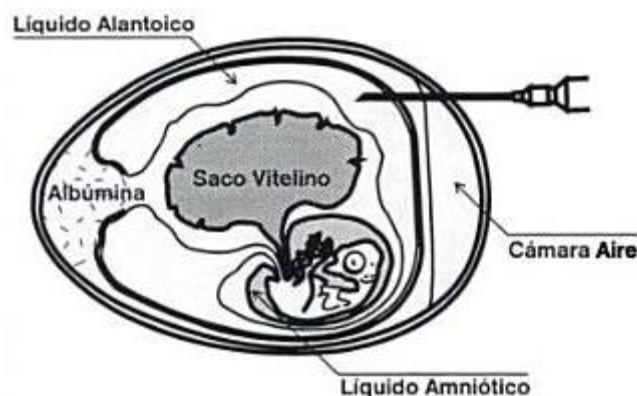


Figura 3.- Inoculación en cavidad alantoidea.

Siembra en Saco vitelino.

El saco vitelino alcanza su máximo desarrollo al quinto o sexto día de incubación. Es una cavidad empleada sobre todo para el crecimiento de rickettsias y clamidias.

- 1.- Localizar la cámara de aire y verificar la viabilidad del embrión.
- 2.- Limpiar con alcohol yodado. Perforar con el punzón en el centro de la cámara de aire.
- 3.- Con la ayuda de una jeringa de tuberculina provista de aguja 26 larga (pulgada y media), introducir el inoculo (0.5 mL). La aguja se lleva hasta $\frac{3}{4}$ de su longitud. Inocular lentamente.
- 4.- Cerrar el agujero con esmalte de uñas. Incubar a 36°C

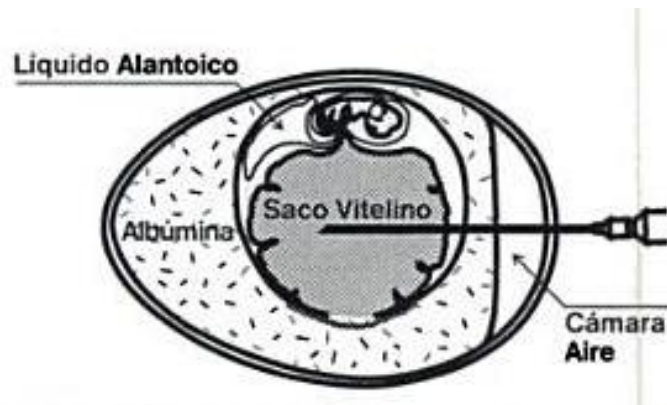


Figura 4.- Inoculación en saco vitelino

Siembra en Membrana corioalantoidea

Su empleo se restringe a aquellos virus que producen lesiones (pocks) en forma de placas tales como poxvirus y herpes simplex.

- 1.- Verificar la viabilidad del embrión y marcar la cámara de aire. Con ayuda del punzón perforar un agujero en el centro de la cámara.
- 2.- Localizar el embrión y marcar su posición.
- 3.- Colocar el huevo horizontalmente y darle vuelta para escoger una zona contraria a la posición del embrión. Con la ayuda del punzón tratar de levantar una pequeña porción de la cascara con sumo cuidado, para evitar la hemorragia

4.- Depositar unas gotas de su inóculo sobre ese agujero y ejercer succión con ayuda de una pera pegada al agujero de la cámara de aire. Las gotas penetran y se produce la caída de la membrana corioalantoidea formando una cámara artificial.

5.- Restituir la cascara y pegar un pedazo de cinta adhesiva.

6.- Incubar los huevos en forma horizontal en la incubadora a 36°C por 4-5 días.

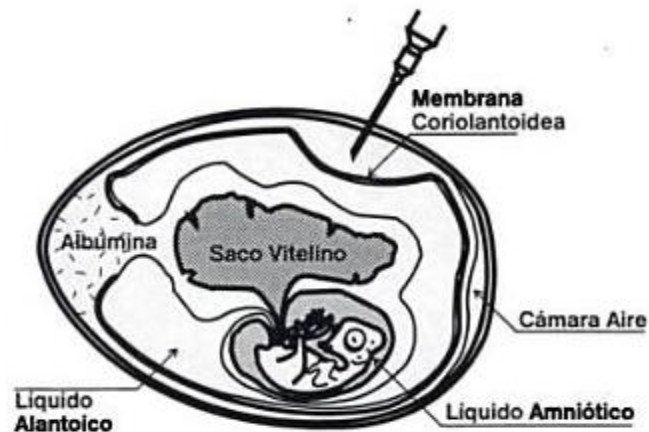


Figura 5.- Inoculación de membrana corioalantoidea.

Apertura del huevo

1.- Quebrar, de un golpe, la cámara de aire. Con pinzas eliminar la cascara.

2.- Con las mismas pinzas estériles, romper la membrana de la cascara y la corioalantoidea, jalar la membrana corioalantoidea con el objeto de sacarla. Ahora, tratar de tirar con la ayuda de las pinzas y tijeras el saco vitelino (amarillo) para depositarlo esterilmente en una placa Petri. En clase se puede inocular un colorante en vez de un microorganismo y luego se sacara el embrión después de quebrar la cascara, con el objeto de ver el saco vitelino teñido. El colorante no debe aparecer en ningún otro lugar.



Figura 6.- Embrión en caja petri después de la apertura.

Cosecha del líquido amniótico.

- 1.- Eliminar toda la cascara de la cámara de aire en iguales condiciones que las señaladas para la técnica de la cavidad alantoidea.
- 2.- Recoger el líquido alantoideo.
- 3.- Con una pipeta pasteur punzar el embrión que se tiene a la vista y retirar el líquido de cavidad que contiene el embrión. El líquido (unos 2 mL) debe salir transparente. Colocarlo en un tubo estéril marcado y congelarlo a -70°C hasta su uso posterior.³

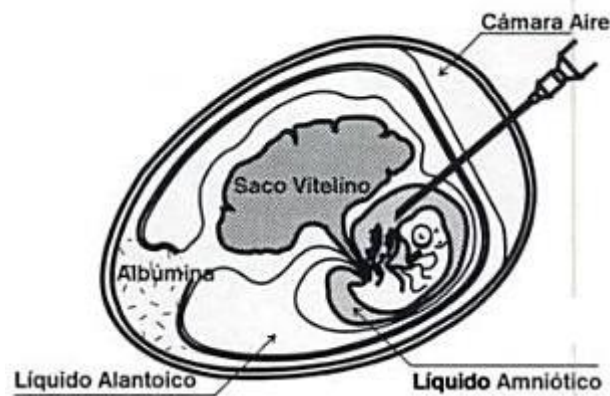


Figura 4.- Inoculación en líquido amniótico.

Cuadro 2 Ejemplos para inocular algunos virus en un embrión de pollo. ⁴

MEMBRANA	VIRUS	EMBRIÓN (días)	CANTIDAD DE INOCULACIÓN	SIGNOS DE CRECIMIENTO
<i>Alantoidea</i>	Influenza	9-12	0.1-0.2 mL	Hemaglutinación
	New Castle			
	Aviadenovirus			
<i>Amniótica</i>	Parotiditis	7-15	0.1-0.2 mL	Muerte
	influenza			Hemaglutinación
<i>Saco vitelino</i>	Herpes simplex	5-8	0.2-1mL	Muerte
	Neumonía			
	rickettsias			
<i>Corioalantoidea</i>	Herpes simplex	10-12	0.1-0.5 mL	Muerte
	Poxvirus			Pustulas

MATERIAL POR EQUIPO.

- Un ovoscopio
- Cinco embriones de pollo de 9 a 10 días
- Algodón 100 gr
- Cinco jeringas de un mL
- Cuatro agujas del número 27
- Una aguja del número 27
- Un aguja del número 22 larga
- Azul de metileno 10 mL
- Un lápiz de número 2
- Barniz de uñas transparentes, un frasco
- Pinzas de disección
- Tres cajas de petri
- Lugol 50 mL

METODO.

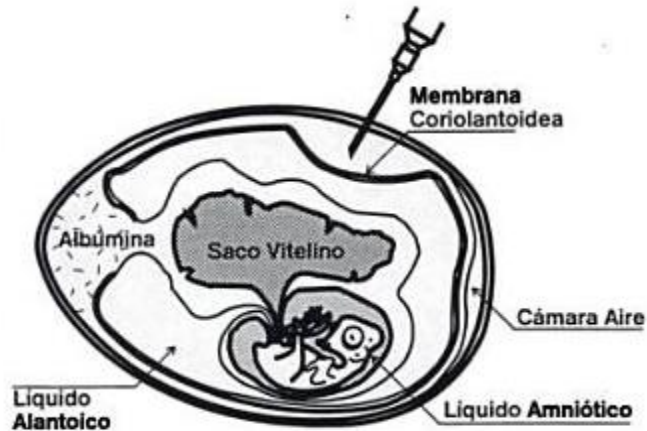
A. Estructura Normal

- 1.- Iluminar con el ovoscopio el embrión de pollo, identificando y marcando la cámara de aire y la mancha ocular.
- 2.- Cortar el cascaron a la altura de la cámara de aire, procurando que no queden bordes filosos.
- 3.- Depositar el contenido del embrión en una caja petri.
- 4.- Identificar las estructuras del embrión de pollo de 9 dias.

B. Inoculación de la Membrana Corioalantoidea.

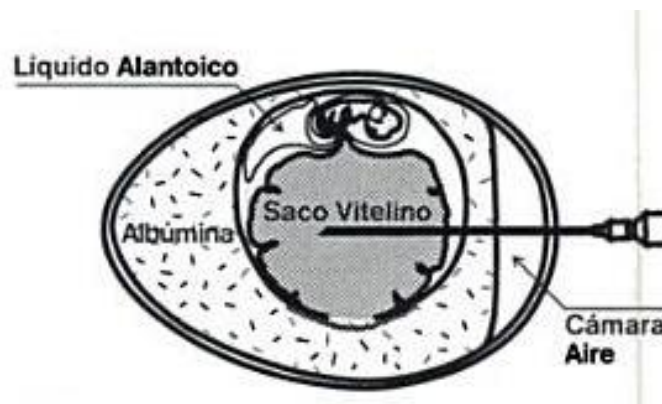
- 1.- Iluminar con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire.
- 2.- Dividir imaginariamente al embrión en tres partes, al final del primer tercio señalar el punto de inoculación entre los vasos sanguíneos.
- 3.- Perforar sobre la cámara de aire y el punto de inoculación.
- 4.- Succionar con una boquilla por el orificio de la cámara de aire. Se debe formar una cámara más menos 1 cm de diámetro.
- 5.- Con una aguja del 27 corta depositar 0.1 mL del colorante.

****cuide de no perforar la membrana corioalantoidea****



C. Inoculación en saco vitelino.

- 1.- Iluminar con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire.
- 2.- Coloque el embrión en plano horizontal y localice el saco vitelino (mancha oscura y densa).
- 3.- Introducir una aguja del 22 larga verticalmente a través de la cámara de aire y depositar 0.1 mL del colorante.

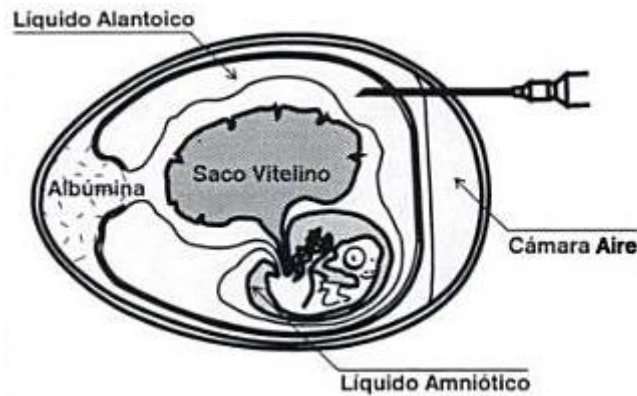


D. Inoculación de la cavidad Alantoidea

- 1.- Iluminar con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire y marcar un punto en la cima.
- 2.- Aproximadamente 5 mm. Por debajo de la cámara de aire localice una zona libre de vasos y del lado opuesto al embrión marcar el punto de inoculación.

3.- Perforar los puntos marcados e inocular 0.1 mL, de colorante con una aguja del 27 corta.

4.- La inoculación se puede realizar también a través de la cámara de aire con una aguja del 22 larga.



E. Inoculación en cavidad amniótica.

1.- Iluminar con el ovoscopio el embrión y marcar la cámara de aire y marcar un punto en la cima.

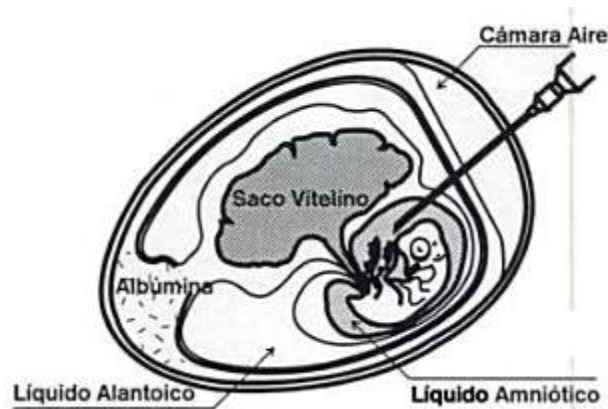
2.- Marcar el punto de inoculación exactamente donde se ve el embrión (localizar las manchas oculares).

3.- Iluminar el embrión se inocular con la aguja del 22, 0.1 mL del colorante

Notas:

Después de cada inoculación ilumine al embrión y haga sus observaciones.

Después de cada inoculación vacíe el embrión en una caja petri y haga sus observaciones.



RESULTADOS.

- Después de cada inoculación ilumine al embrión y haga sus observaciones.
- Después de cada inoculación vacíe el embrión en una caja de petri y haga sus observaciones realizando los esquemas respectivos.

Inoculación	observaciones
Membrana corioalantoidea	
Saco vitelino	
Cavidad alantoidea	
Cavidad amniótica	

GUÍA DE ESTUDIO.

- Medios de cultivo para virus
- Virus que se pueden inocular en embrión de pollo
- Estructura del embrión de pollo
- Etapas de crecimiento del embrión de pollo
- Vías de inoculación en el embrión de pollo
- Importancia del cultivo de virus

CUESTIONARIO.

1. ¿Qué otros tipos de cultivos se cuentan para desarrollar virus?
2. Además del desarrollo de virus ¿Qué otra utilidad tienen los cultivos virales?
3. ¿Qué ventajas o desventajas tiene el uso del embrión de pollo?
4. ¿Qué tipos de virus se pueden inocular en cada una de las partes del embrión de pollo?
5. ¿Qué factores influyen en el desarrollo del virus en embrión de pollo?
6. ¿Qué efectos causa la inoculación de un virus en un embrión de pollo?
7. ¿En qué semana de gestación del embrión de pollo se debe inocular y porque?
8. ¿Cómo se realiza la recolección del virus en las diferentes vías de inoculación?
9. ¿Cuáles son los signos de crecimiento que desarrolla un embrión infectado?
10. Indique ventajas y desventajas de otros medios de cultivo diferentes a del embrión de pollo.

ANEXO DE LA PRÁCTICA 2. ESTRUCTURAS DEL EMBRIÓN DE POLLO Y SUS VÍAS DE INOCULACIÓN

Cultivos celulares.

El cultivo celular o cultivo de tejidos , como también le llaman, tiene su origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento. Estas técnicas iniciaron con el cultivo de fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales restringían la mitosis de las células cultivadas y por tanto su crecimiento. Después se realizaron cultivos con fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales aumentan el crecimiento celular en cultivo ya que se utilizaban células dispersas; esto fue un gran avance y provoco una explosiva expansión en esta área desde los años 50.

Evolución de los cultivos celulares.

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Reichlinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado(suporte y alimento) el inicio del cultivo de células in vitro . El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo (Burrows, 1910); posteriormente, se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente (Carrel, 1912). Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1955), el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Moscona y Moscona, 1952) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

El empleo de técnicas de fusión celular (Barski, 1960; Littlefield, 1964) estableció las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre); igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales (Kohler y Milstein, 1975) ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su

crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo. Los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización han llevado a la búsqueda de modelos experimentales.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio. Por último, hay cierto tipo de investigaciones que no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos, conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras. Así mismo, la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo* (Cohen, 1995).

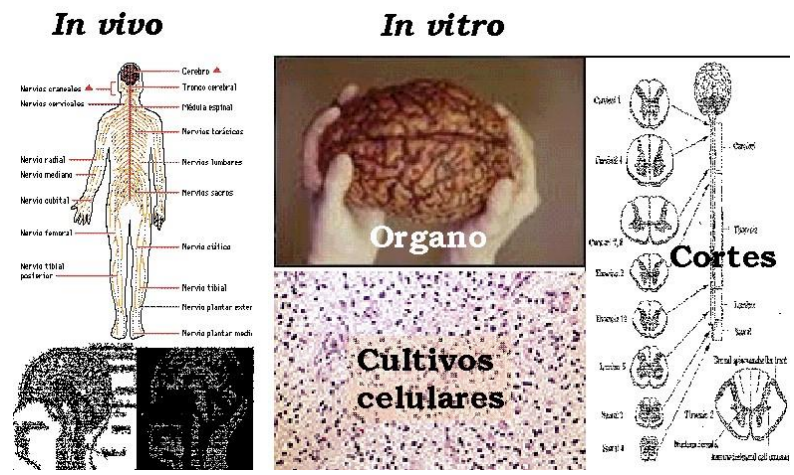


Figura 1.- Tipos de cultivos celulares.

Biología del cultivo celular.

La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido criticado, ya que se presentan problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular; la proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células hallada *in vivo*, además porque el medio hormonal y

nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas. La provisión de un ambiente apropiado, nutriente, hormonas y sustratos son fundamentales para la expresión de funciones especializadas.

En un cultivo celular la mayoría de las células crecidas a partir de un tejido sólido disgregado o de un subcultivo tienen la capacidad de adherirse en monocapa, transformarse o anclarse independientemente. Esta adherencia celular es mediada por receptores celulares específicos de superficie en la matriz extracelular y la dispersión celular podría ser precedida por la secreción de proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos por parte de la célula. Las células se pueden anclar y difundir en el vidrio donde se cultivan por medio de ligeras cargas negativas y al plástico, como el poliestireno, si tienen una propiedad o tratamiento con descargas eléctricas o con radiación ionizante de alta energía. El cultivo en vidrio o plástico provee condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular.

El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario es mantenido por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro. Las células capaces de proliferar podrían aumentar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar y otras podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que unas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan.

Se cultivan células de plantas, animales y humanos en un caldo de cultivo en el laboratorio. Las células de humanos y tejidos se pueden obtener de biopsias, post-mortem, placentas o de procedimientos quirúrgicos. Se pueden cultivar una amplia variedad de cultivos de células, así como células de cáncer y sangre humanas para investigar cómo los virus provocan infecciones; las células de la placenta humana se pueden utilizar para probar si los medicamentos pueden atravesar la placenta, o células de las articulaciones humanas para estudiar medicamentos contra el reuma.

Los cultivos de células y tejidos pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permitir a los investigadores estudiar partes del cuerpo específicamente identificadas. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer.

Son el producto de la colección de células vegetales o animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificación. De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa.

Cultivo primario: proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado.

Líneas celulares: se obtienen cuando el cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación.

Cultivos secundarios: El cultivo primario genera otro tipo de células que se pueden separar.

Cocultivo: En el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar.⁵

TIPOS DE CULTIVO CELULAR.

a) Cultivos en monocapa.

Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (confluencia), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (quiescencia).

Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal.

Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (Roux), entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina.

b) Cultivos en suspensión.

Las líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación.

Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; éstas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes. Dentro de éstas matrices está el Methocel, esencial para el crecimiento de cultivos en suspensión.

Aunque el cultivo estacionario es ideal cuando se busca la elaboración de productos extracelulares, el cultivo en suspensión es deseable cuando los productos son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de anclaje de un determinado tipo de célula.

El proceso de cultivo continuo ofrece factores económicos decisivos (utilización de mejores equipos, reducida manipulación) cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación.

c) Cultivos primarios.

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento in vitro es limitado y hay inhibición por contacto.

El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una Línea Celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los

cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos.

Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad.

d) Líneas celulares.

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo. Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida. El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación.

Una transformación puede inducirse fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortisona o utilizando inductores no fisiológicos como el DMS.

e) Cultivos tridimensionales.

Son aquellos que buscan mantener la característica o arquitectura del tejido in vivo. Los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación y morfología epitelial y su interacción con otras células como son las del tejido conectivo; igualmente con ellos se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden influenciar en tales interacciones intercelulares. Actualmente se producen Kits dérmicos comerciales con base en cultivos, que permiten evaluar la citotoxicidad de componentes químicos presentes en lociones, preservativos, detergentes, perfumes, shampoos y solventes entre otros. Los intentos de producción de éste tipo de cultivo van desde el uso de telaraña (Harrison, 1914), pasando por el crecimiento de explantes en esponja de celulosa, (Leighton, 1951), así como la utilización de fibras de sílica (Curtis y Varde, 1964) o de mallas de colágeno hidratado (Elsdale y Bard, 1972). El método desarrollado por Bergenholtz (1977) es uno de los que mayor información han dado en cuanto a visualización de morfología celular. Mediante éste sistema, se colocan trocitos de superficie epitelial sobre una membrana de Millipore, sistema que se deposita sobre una plataforma y ésta en una caja de Petri con medio de cultivo.

f) Cultivo in vitro de tejidos vegetales.

Se ha utilizado como la opción para producir metabolitos secundarios (Balandrín et al., 1985). Sin embargo, con excepción de contados casos, la identificación de los tejidos vegetales, para producir callos o células en suspensión, se ve acompañada de una disminución en su capacidad para producir estos compuestos (Barz et al., 1977, Aird et al., 1988). No obstante esta dificultad, los cultivos de células y órganos derivados de plantas productoras de metabolitos secundarios son cada vez más utilizados como modelos para estudiar la biosíntesis de compuestos con actividad farmacológica, así como los mecanismos que regulan su síntesis (Kutchan et al., 1991). El cultivo de órganos permite la ampliación de un cultivo de células de tejido no disgregadas a un cultivo tridimensional que muestre en algo o en todo las características histológicas de los tejidos in vivo, para esto se utiliza un medio con interfase líquido gaseosa.

El cultivo de cortes de tejido el cual utiliza fragmentos de tejidos colocados en vasos de vidrio o plástico con un medio con interfase líquida que va a promover la migración de las células cultivadas hacia un plano sólido provisto de un sustrato específico para cada célula.

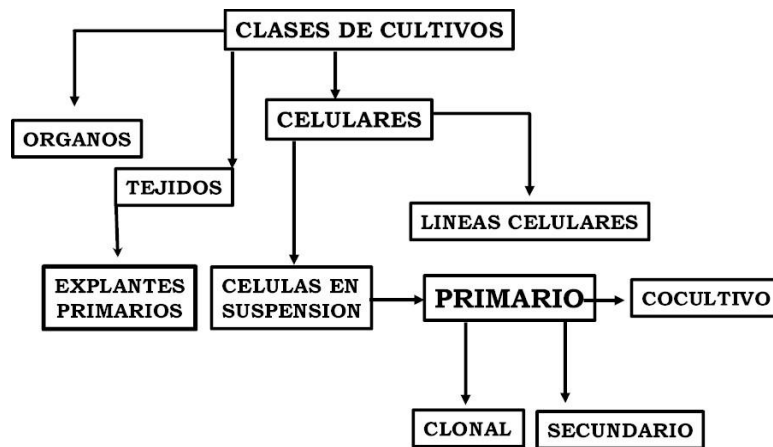


Figura 2.- Tipos de cultivos celulares.

El cultivo de células dispersas en suspensión se refiere al cultivo de células tomadas del tejido original, de cultivos primarios de células o de una línea o cadena celular por disgregación enzimática, mecánica o química, este cultivo necesita de una monocapa adherente o un sustrato sólido que le provea a las células un medio adecuado para desarrollarse.

Se realiza también el cultivo primario en el cual las células han sido reasociadas para recrear la estructura tridimensional del tejido; esto realizado por perfusión y por el crecimiento de una monocapa, la reagregación en suspensión, o la infiltración de una matriz tridimensional como el colágeno. En la actualidad se están realizando cultivos que permiten la recombinación de células de diferentes linajes como los queratinocitos de la epidermis en combinación con los fibroblastos de la dermis; a estos cultivos se les denomina cocultivos (Frashney, 1995). Dentro de estos cultivos encontramos los cultivos de neuronas y astrocitos en conjunto, en los cuales se ha confirmado el ciclo de la glutamina-glutamato por medio de análisis de los isótopos del glutamato y la glutamina, donde la glutamina es producto de los astrocitos y el glutamato y el aspartato producto de las neuronas. Además, se ha estudiado el acetato en estas células, el cual es metabolizado por ambas células, neuronas y astrocitos (Brand, 1997).

El cultivo de células transformadas generalmente se obtiene por la inyección de un carcinógeno, después de una serie de cultivos alternados y pasaje por animales (Benda, et al., 1968; McMorris, et al., 1973). Estas líneas celulares son capaces de desempeñar sus funciones órgano específicas generalmente durante el período de un año. La forma de estas células depende en gran parte, de las condiciones del cultivo utilizadas. Las células que crecen en cultivos en suspensión son casi siempre redondas con pocas prolongaciones. Sin embargo, cuando las células de origen cerebral crecen sobre superficies planas muestran una diversidad morfológica notable, con prolongaciones celulares y neuritas, que se forman con facilidad, mientras que los cuerpos celulares adoptan una forma alargada (ATCC, 1992; Benda, et al., 1968).

Ventajas del cultivo celular.

Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico, a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee infinidad de elementos como hormonas y otras sustancias reguladoras (Borg, et al., 1985). El control del medio fisicoquímico y de las condiciones fisiológicas permiten el cultivo de células específicas.

Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas, lo que ahorra en un 90% lo requerido para la inyección del reactivo in vivo, su excreción y su posterior distribución a los tejidos en estudio. Aunque los estudios in vivo resulten más económicos que los in vitro son descartados porque el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en aspectos legales, morales y éticos.

Permiten el estudio del transporte y la utilización de metabolitos.

Desventajas del cultivo celular.

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al in vivo (Freshney, 1995). Una mayor limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido. Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc. (Brand, et al., 1997). En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas, esto por que en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; para esto es necesario utilizar marcadores de células los cuales van a ser de gran ayuda en el momento de caracterizarlas en cultivo porque van a garantizar que las células crecidas en cultivo son las mismas que se sembraron y no otras. Además, suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación (Driscoll, et al., 1993).

Usos de los cultivos celulares.

- Para el estudio de células específicas, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer, como es su bioquímica. Para investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética.
- Para la búsqueda de modelos experimentales en estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular.
- Técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras (animales transgénicos).
- La tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular.⁶

REFERENCIAS.

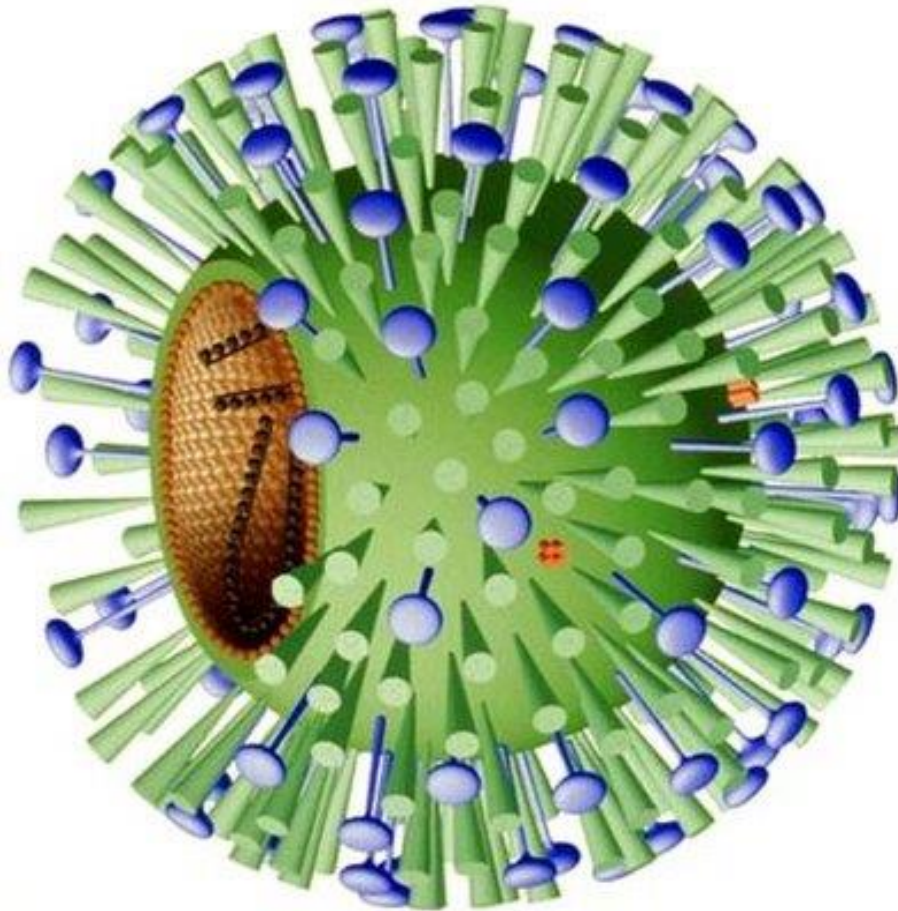
- 1.- Gil-Loyzaga Pablo, Cultivo de Celulas Animales y Humanas. 2ª ed. Mexico: Editorial Vision libros; 2004.
- 2.- Rodriguez J, Picazo J. Microbiologia Medica. 2ª ed. España: Editorial Harcourt Brace; 1998.
- 3.- Herrera Uribe. Procedimientos en virología medica, 1ª ed. Costa Rica: Libia editorial; 2004.
- 4.- Romero Cabello Raul, Microbiologia y Parasitologia Humana, 3ª ed. Mexico: Panamericana; 2007.
- 5.- Javeriana. Edu. Programa sistémico para el calculo del tamaño de muestra y el poder de diseños de investigación . Pérez, A., Rodríguez, N., Gil, J. y Ramírez, G: 2001[actualizada el 20 de noviembre del 2012]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neurobioquimica/libros/celular/cultivos.htm>
- 6.-lookfordiagnosis.Proceeding of the 3rd starting A1 ressearchers Symposium [actualizada en septiembre el 2006] disponible en: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Embri%C3%B3n+De+Pollo&lang=2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



PRÁCTICA 3
HEMAGLUTINACIÓN VIRAL E INHIBICIÓN DE
LA HEMAGLUTINACIÓN VIRAL



PRÁCTICA 3

HEMAGLUTINACIÓN VIRAL E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN VIRAL

OBJETIVOS.

- Aprender el manejo y aplicación de la técnica de microhemaglutinación viral.
- Realizar la titulación del virus mediante la técnica de microhemaglutinación viral.
- Determinar el título de anticuerpos anti HA mediante la prueba de Inhibición de la hemaglutinación viral

INTRODUCCIÓN.

Cuando las reacciones de aglutinación implican la aglutinación de eritrocitos las reacciones se denominan hemaglutinación. Estas reacciones, en las que participan los antígenos de superficie de los eritrocitos y sus anticuerpos complementarios, se utilizan de modo sistemático en la determinación del grupo sanguíneo y en el diagnóstico de la mononucleosis infecciosa.

Ciertos virus, como los que causan parotiditis epidémica, sarampión y gripe, tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos sin una reacción antígenos-anticuerpo; este proceso se denomina **hemaglutinación viral**.¹

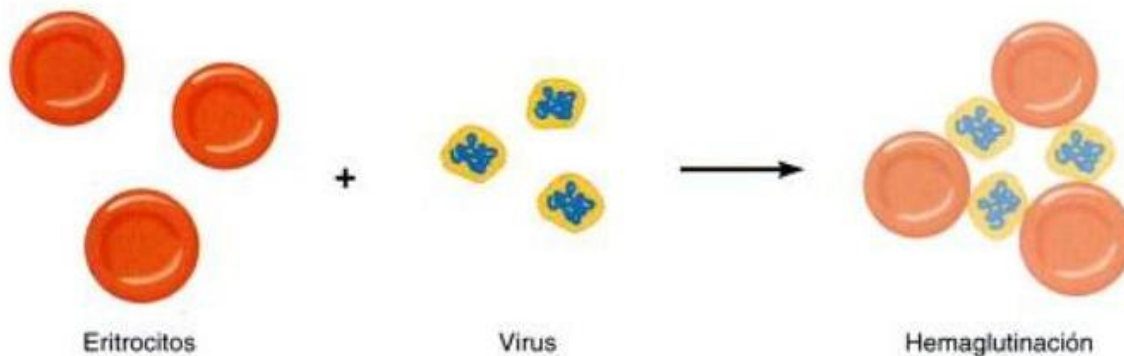


Figura 1.- Hemaglutinación viral. La hemaglutinación viral no es una reacción antígeno- anticuerpo.

Este tipo de hemaglutinación puede ser inhibida por los anticuerpos que neutralizan al virus aglutinante. Las pruebas diagnósticas basadas en estas reacciones antígeno-anticuerpo son las siguientes:

Reacciones de neutralización.

La neutralización es una reacción antígeno anticuerpo en la cual los efectos perjudiciales de una exotoxina bacteriana o de un virus pueden ser bloqueadas por anticuerpos específicos. Estas reacciones se describieron por primera vez en 1890, cuando los investigadores observaron que el suero inmune podría neutralizar las sustancias tóxicas producidas por el patógeno que causa la difteria, *Corynebacterium diphtheriae*. Esta sustancia neutralizante, denominada antitoxina, es un anticuerpo específico producido por un hospedero cuando responde contra una exotoxina bacteriana o su toxoide correspondiente (toxina inactivada). La antitoxina se combina con la exotoxina para neutralizarla.

Estas aplicaciones terapéuticas de reacciones de neutralización condujeron a su empleo como pruebas diagnósticas. Los virus que exhiben sus efectos citopáticos (daño celular) en cultivos celulares o en huevos embrionados pueden utilizarse para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes virales. Si el suero que se va a evaluar contiene anticuerpos contra el virus particular, los anticuerpos impedirán que el virus infecte las células del cultivo celular o los huevos y no se observarán efectos citopáticos. Estas pruebas, conocidas como pruebas de neutralización *in vitro*, pueden utilizarse tanto para identificar un virus como para determinar el título de anticuerpos antivirales. Comparativamente, la realización de estas pruebas es compleja y cada vez se las utiliza menos en los laboratorios clínicos modernos.

Una prueba de neutralización utilizada con más frecuencia es la prueba de inhibición de la hemaglutinación viral. Esta prueba se utiliza para el diagnóstico de gripe, sarampión, parotiditis epidémica y varias otras infecciones causadas por virus que pueden aglutinar eritrocitos. Si el suero de una persona contiene anticuerpos contra estos virus, estos anticuerpos reaccionarán con los virus y los neutralizarán. Por ejemplo, si la hemaglutinación se produce en una mezcla de virus del sarampión y eritrocitos; pero no sucede cuando se agrega suero del paciente a la mezcla, este resultado indica que el suero contiene anticuerpos que se unieron al virus del sarampión y lo neutralizan.

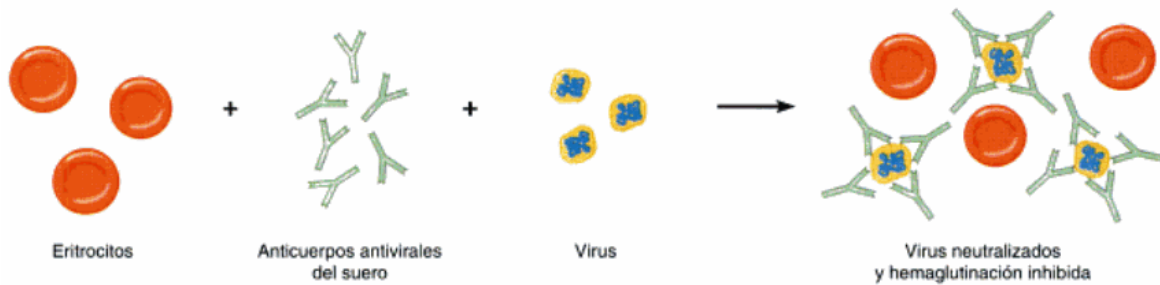


Figura 2.-Prueba de hemaglutinación viral para detectar anticuerpos contra un virus. Estos virus normalmente causan hemaglutinación cuando se mezclan con eritrocitos. Si hay anticuerpos contra el virus, como se muestra aquí, neutralizan e inhiben la hemaglutinación.

Los ácidos nucleicos de muchos virus codifican proteínas de superficie que aglutinan eritrocitos de varias especies. El fenómeno se emplea con mucha frecuencia para el diagnóstico de infecciones causadas por ortomixovirus, paramixovirus y los arbovirus-togavirus (incluido el virus de la rubeola), flavivirus y bunyavirus. La presencia del virus en cultivos celulares infectados pueden detectarse por hemaglutinación; la identidad del virus o de los anticuerpos presente en el suero de un paciente pueden determinarse por la inhibición específica de esta hemaglutinación. Aunque los virus de la gripe pueden detectarse por hemadsorción, la tipificación del aislamiento más eficiente se logra por la inhibición de la hemaglutinación. Los reactivos y las condiciones de la prueba varían según el virus.

La reacción de las hemaglutininas virales con los eritrocitos da como resultado un retículo de las células aglutinadas que sedimentan en forma irregular en un tubo o cubeta de microtitulación. Las células no aglutinadas sedimentan en forma de botón compacto.²

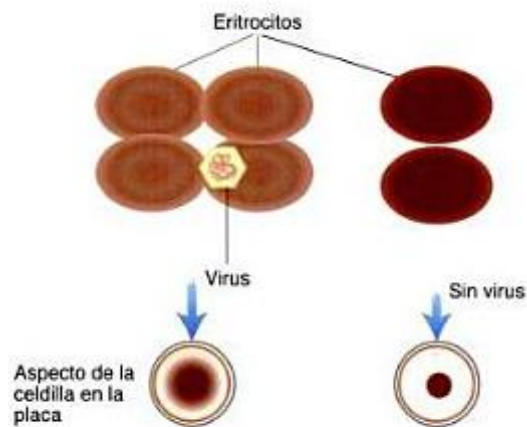


Figura 3.- Teoría de la prueba de hemaglutinación.

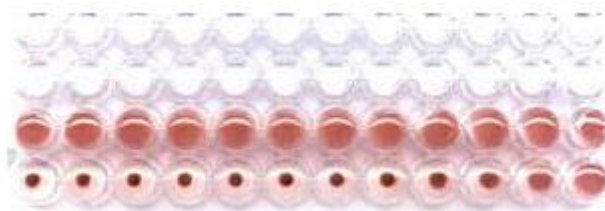


Figura 4.- Diferentes muestras del virus de la gripe se diluyeron en forma seriada y se incubaron con eritrocitos de pollo. Las primeras 9 celdillas no contienen virus. Los botones o puntos en las 9 celdillas inferiores son eritrocitos de pollo no aglutinados. El título viral en el ensayo sería la última dilución que muestra actividad hemaglutinante.¹

Virus de la influenza.

Casi todo el mundo ha sido infectado alguna vez en su vida por el virus de la gripe, y virus relacionados causan enfermedades en muchas especies de animales incluidos los cerdos, perros, gatos y aves. La palabra influenza, con la cual se denomina la gripe en algunas lenguas proviene de la palabra italiana influenza que se refiere a la creencia popular que existía en Italia en el XV de que las epidemias de dicha enfermedad eran el resultado de la influencia.

Este virus de RNA, que tiene una morfología esférica con un diámetro de unos 100 nm, pertenece a la familia de los orthomyxovirus. Algunas de las características de las características inusuales de su estructura explican la patogénesis de la gripe;

su genoma consta de ocho segmentos separados de RNA de cadena sencilla que posibilitan que se produzcan recombinaciones genéticas cuando dos virus diferentes infectan al mismo hospedero. Este fenómeno contribuye en gran medida a la variabilidad genética del virus y su capacidad de causar epidemias.

La capsida helicoidal que rodea el RNA contiene los antígenos que diferencian a los tres tipos principales de los virus de la gripe el A, el B, y el C. Los virus de la gripe del tipo A son los que causan las infecciones mas graves, y son los responsables de todas las pandemias (a escala mundial); los virus B causa comúnmente la gripe en los niños y los virus del tipo C no tienen importancia desde el punto de vista clínico.

El virus de la gripe posee una cubierta constituida por una membrana lipídica con una serie de proyecciones de naturaleza proteica, a modo de espículas. La hemaglutinina, o espícula H, es la que permite la adsorción del virus a las membranas de las células epiteliales del hospedero, y su posterior ingreso en dichas células; los anticuerpos IgA frente a los antígenos H impiden la adhesión del virus y , por tanto, proporcionan inmunidad frente a la gripe. La neuraminidasa, o espícula N, rompe el enlace existente entre la hemaglutinina y la célula hospedera, lo que permite que el virus se libere de una célula e infecte otras células de las cercanías, propagándose así la infección; los anticuerpos frente a la neuraminidasa no impiden la infección, si bien contribuyen a reducir su diseminación.

Epidemiología: Aunque la infección por el virus de la gripe estimula la producción de anticuerpos que protegen contra una reinfección, las personas de la gripe una y otra vez tienen recaídas; esta recurrencia es posible debido a que los antígenos H y N cambian con mucha frecuencia, dando origen a nuevas cepas que no se inactivan por los anticuerpos anteriormente inducidos. Las variaciones menores que se producen dan lugar a la llamada deriva antigénica, causada por mutaciones espontaneas puntuales que se afectan a un solo aminoácido de la proteína H o N; en cambio, a veces se produce una variación mucho más radical, llamada cambio antigénico, que se origina como consecuencia de procesos de recombinación entre cepas víricas diferentes y que afecta a muchos aminoácidos y da lugar a una nueva proteína H o N y por tanto, origina una nueva cepa del virus.

Las cepas de la gripe se identifican mediante una sigla en la cual las letras H y N se refieren a la hemaglutinina y a la neuraminidasa, respectivamente, y los subíndices indican el numero de cambios antigénicos producidos en cada uno de estos antígenos; por ejemplo, la cepa responsable de la mayoría de los casos de la gripe A producidos durante el invierno de 1989-1990 fue la cepa H₃ N₂; las

nuevas cepas también se denominan atendiendo al lugar donde se identificaron por primera vez.

Cuando los antígenos del virus de la gripe varían ligeramente por un proceso de deriva antigénica, se producen anticuerpos que proporcionan una protección limitada frente a una infección causada por la nueva cepa, pero si se producen variaciones radicales debidas a un cambio antigénico, los anticuerpos preexistentes son totalmente ineficaces. Es decir, que si se producen un cambio antigénico- hecho que sucede aproximadamente cada diez años- todas las personas son susceptibles de ser infectadas por la nueva cepa, sentándose las bases para que tenga lugar una nueva pandemia de gripe.

Con mucho, la pandemia más grave de gripe tuvo lugar en el año 1918, un poco antes del final de la primera guerra mundial. Es posible que haya sido la pandemia más devastadora que ha afectado a la humanidad; al menos murieron 20 millones de personas en solo 120 días.³

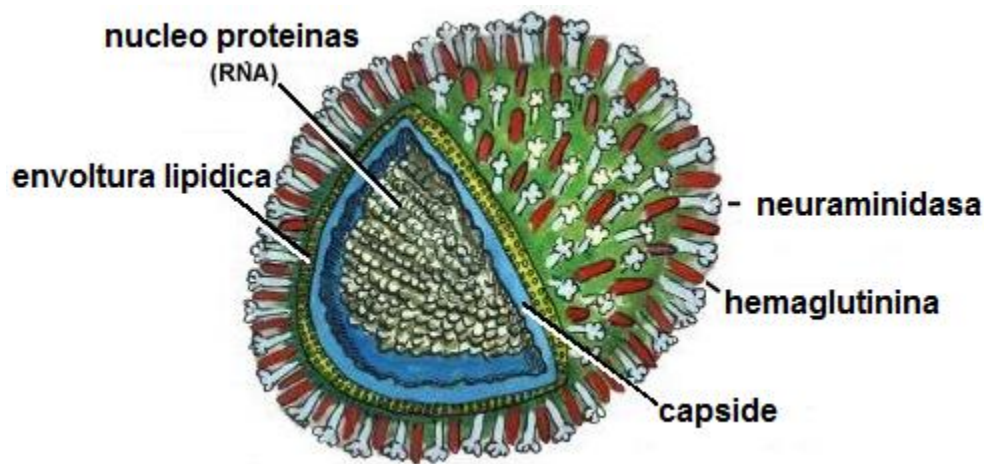


Figura 5.- Estructura del virus de la influenza.⁴

Virus de Newcastle.

El virus de la enfermedad de Newcastle (VEN), también conocido como virus 1 de la parainfluenza aviaria (PMVA-1) es de genoma ARN y pertenece al género *Avularius*, de la familia Paramyxoviridae. Esta familia comprende también otros 8 paramixovirus de aves (PMVA-2 a PMVA-9), además de los virus de la parainfluenza y el virus de la parotiditis. El VEN es la especie prototipo del genero. En la naturaleza existen varios tipos de virus que son genéticamente distintos y difieren tanto por su virulencia como por la patología que producen en las aves. Según el criterio utilizado- esto es, el tiempo que tarda en morir un embrión de

pollo inoculado- estos virus lentogénicos de virulencia atenuada, virus mesogénicos de virulencia, también llamados asiáticos o exóticos.

El reservorio del virus son las aves. El hombre es susceptible a todos los patotipos del virus, incluso a los virus lentogénicos de las vacunas, El periodo de incubación dura entre 1 y 2 días, pero pueden prolongarse hasta cuatro días. El cuadro clínico consiste esencialmente en la conjuntivitis con congestión, lagrimeo, dolor y tumefacción de los tejidos subconjuntivales. El VEN se aisló de numerosas especies de aves y pájaros. La enfermedad natural se presenta en aves domesticas, sobre todo en pollos, pavos, y palomas. Existen varias formas de la enfermedad, en función de patotipo del virus actuante y la resistencia del huésped. Este periodo de incubación dura un término medio de 5 ó 6 días, pero puede variar de 2 a 15 días, o más.

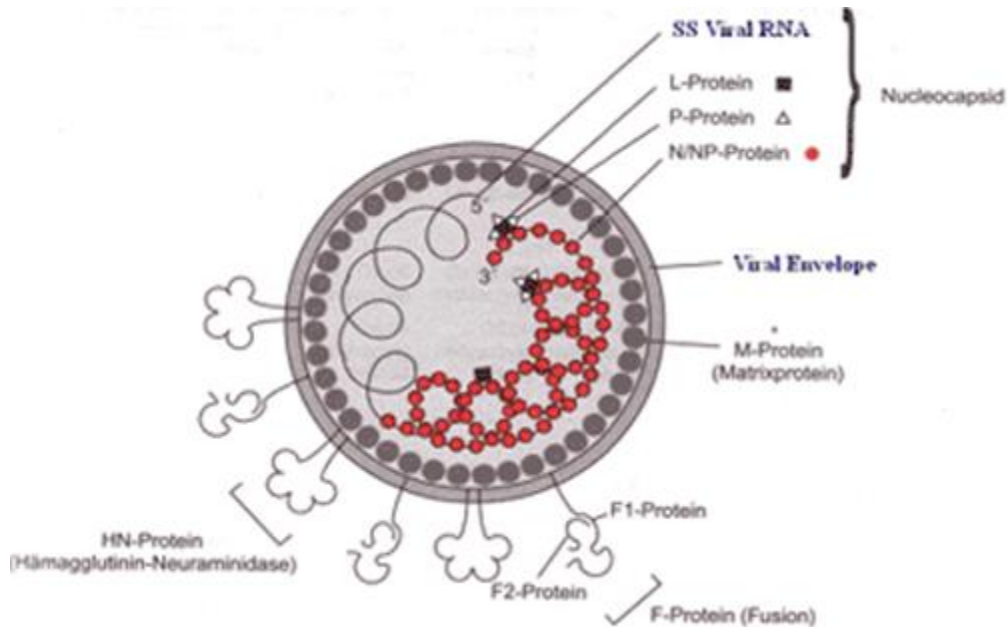


Figura 6.- Estructura del virus del Newcastle.³

MATERIAL POR EQUIPO.

En esta práctica se sustituirá el virus de la influenza por el virus Newcastle que también tiene la capacidad de aglutinar glóbulos rojos.

se debe manejar con precaución pues puede producir conjuntivitis viral leve

- Virus del Newcastle cepa vacunal
- Amortiguador de salina de fosfatos (PBS), 250 ml
- Suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% en solución de PBS, 2 ml
- Suero de conejo anti virus de Newcastle, tratado con KIO_4 , 0.5 ml
- Una placa de microhemaglutinación.
- Una micropipeta tipo Ependorf de 20 a 100 μl

METODO.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION VIRAL (HA)

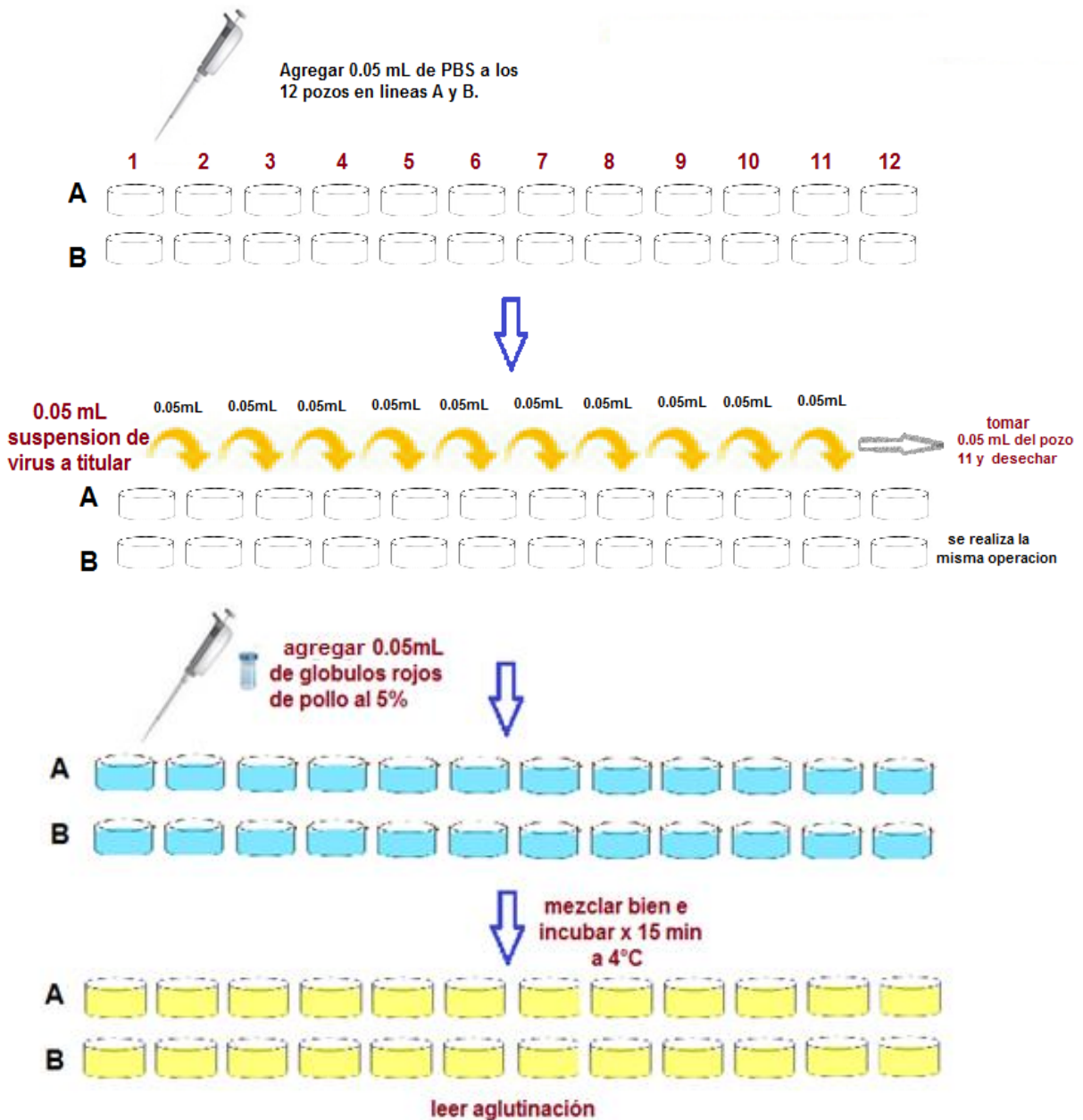
1.- Se colocan en los 12 pozos 0.05 mL de PBS (diluyente), usando una micropipeta Ependorf (el proceso se realiza por duplicado en las líneas A y B de la placa de microtitulación de policarbonato).

2.- Se colocan en el pozo numero 1 de la línea A y B, la cantidad de 0.05 ml de la suspensión de virus a titular, con una micropipeta tipo Ependorf, y con la misma pipeta se mezcla en el pozo y se pasan 0.05 mL. Al siguiente pozo siguiendo este procedimiento hasta el pozo 11, del cual se toman 0.05 mL y se desechan.

3.- En el pozo 12 se queda solo con 0.05 mL de PBS y es el testigo de la prueba en la línea A y B de la placa.

4.- Se adicionan a todos los pozos de las líneas A y B de la placa 0.05 mL de glóbulos rojos de pollo al 0.05%, se mezcla bien y se incuba por 15min a temperatura de 4°C o a temperatura ambiente.

5.- Leer la aglutinación.



PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN VIRAL (HI)

1.- Se colocan en los 12 pozos 0.025 mL de PBS(diluyente), usando una micropipeta Ependorf(el proceso se realiza por duplicado en las líneas D y E de la placa de microtitulacion de policarbonato).

2.- Se coloca en el pozo numero 1 de la línea D y E, la cantidad de 0.025 mL del suero de conejo antiviral de Newcastle a probar, con una micropopeta tipo

Ependorf, y con la misma pipeta se mezcla en el pozo y se pasan 0.025 mL al siguiente pozo siguiendo este procedimiento hasta el pozo 11, del cual se toman 0.025 mL y se desechan.

3.- En el pozo 12 se queda con solo 0.025 mL de PBS y es el testigo de prueba en la línea D y E de la placa.

4.- Adicionar a todos los pozos 4 unidades hemaglutinantes(HAU) de virus del Newcastle en un volumen de 0.025 mL, usando una micropipeta Ependorf.

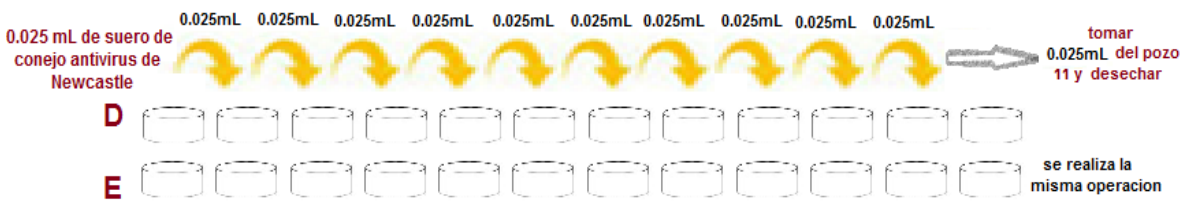
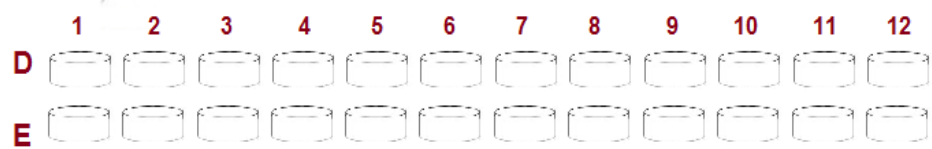
5.- Mezclar bien e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

6.- Adicionar 0.05mL de glóbulos rojos de pollo al 0.5%, agitar e incubar a temperatura ambiente durante 15 min.

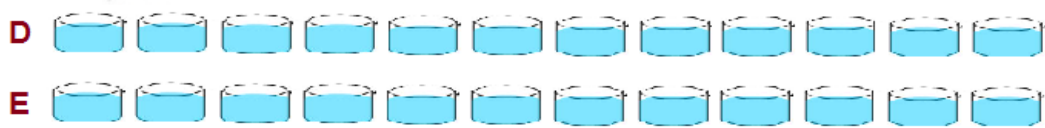
7.- Leer el título de hasta donde se inhibe la hemaglutinación.



Agregar 0.025 mL de PBS a los 12 pozos de las líneas D y E



agregar 4 unidades HAU del virus de newcastle en un volumen de 0.025mL



mezclar bien e incubar a temperatura ambiente x 15 min

adicionar 0.05mL de globulos rojos de pollo al 0.5%



agitar e incubar a temperatura ambiente x 15 min



leer el título hasta donde se inhibe la hemaglutinación

RESULTADOS.

Para la prueba HA; la dilución más alta del virus que causa una aglutinación completa es considerada el título final y tenemos una unidad hemaglutinante en ese volumen de suspensión viral. Dibuje sus observaciones en cada dilución.

No. pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	testigo
Lectura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>



Malla: HEMAGLUTINACION



Botón: No hay HEMAGLUTINACION

Para la prueba HI; el título se define como el factor de dilución más alta del suero que inhibe completamente la hemaglutinación y tenemos una unidad inhibidora de la hemaglutinación en ese volumen 0.025 mL; para conocer el título en el suero original se realizan los cálculos tomando en cuenta los volúmenes y las diluciones realizadas. Dibuje sus observaciones en cada dilución.

No. pozo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Dilución	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	testigo
Lectura	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

$$UHI/ml = \left(\frac{\text{título}}{0.025mL} \right) \left(\frac{1000\mu l}{1 mL} \right)$$

GUÍA DE ESTUDIO.

- Hemaglutinación viral
- Inhibición de la hemaglutinación viral
- Técnica de ELISA
- Estructura del virus de *la influenza*
- Generalidades del virus del Newcastle
- Fijación del complemento
- RIA

CUESTIONARIO.

- 1.- ¿Cuál es el fundamento de la hemaglutinación viral?
- 2.- ¿Qué tipo de enfermedades virales son imposibles de diagnosticar por medio de la técnica de inhibición?
- 3.- Esquematiza el fundamento de la técnica de HA e HI
- 4.- ¿Qué precauciones se debe tener en cuenta con la realización de la técnica de inhibición de la hemaglutinación?
- 5.- ¿Con qué otra técnica inmunológica se puede suplir la técnica de la inhibición de la hemaglutinación?
- 6.- ¿En qué consiste la prueba de ELISA?
- 7.- ¿Cuántos tipos de ELISA hay y esquematice cada uno de ellos?
- 8.- Describa la prueba de fijación al complemento
- 9.- ¿Qué nos identifica la prueba de Western blot?
- 10.- ¿En qué consiste la técnica de RIA?

ANEXO DE LA PRÁCTICA 3 HEMAGLUTINACIÓN VIRAL E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN VIRAL

Reacciones de Fijación del Complemento.

Este proceso de fijación del complemento puede utilizarse para detectar cantidades muy pequeñas de anticuerpos. Los anticuerpos que no producen una reacción visible, como precipitación o aglutinación pueden demostrarse mediante la fijación del complemento durante la reacción antígeno – anticuerpo. Esta técnica alguna vez se utilizó para el diagnóstico de sífilis (prueba de Wassermann) y aun se usa para el diagnóstico de ciertas enfermedades producidas por virus, hongos y rickettsias. La prueba de fijación del complemento requiere gran cuidado y buenos controles, una razón de la tendencia a sustituirla por pruebas más nuevas y más simples. Esta prueba se desarrolla en dos etapas: fijación del complemento y la del sistema indicador.⁵

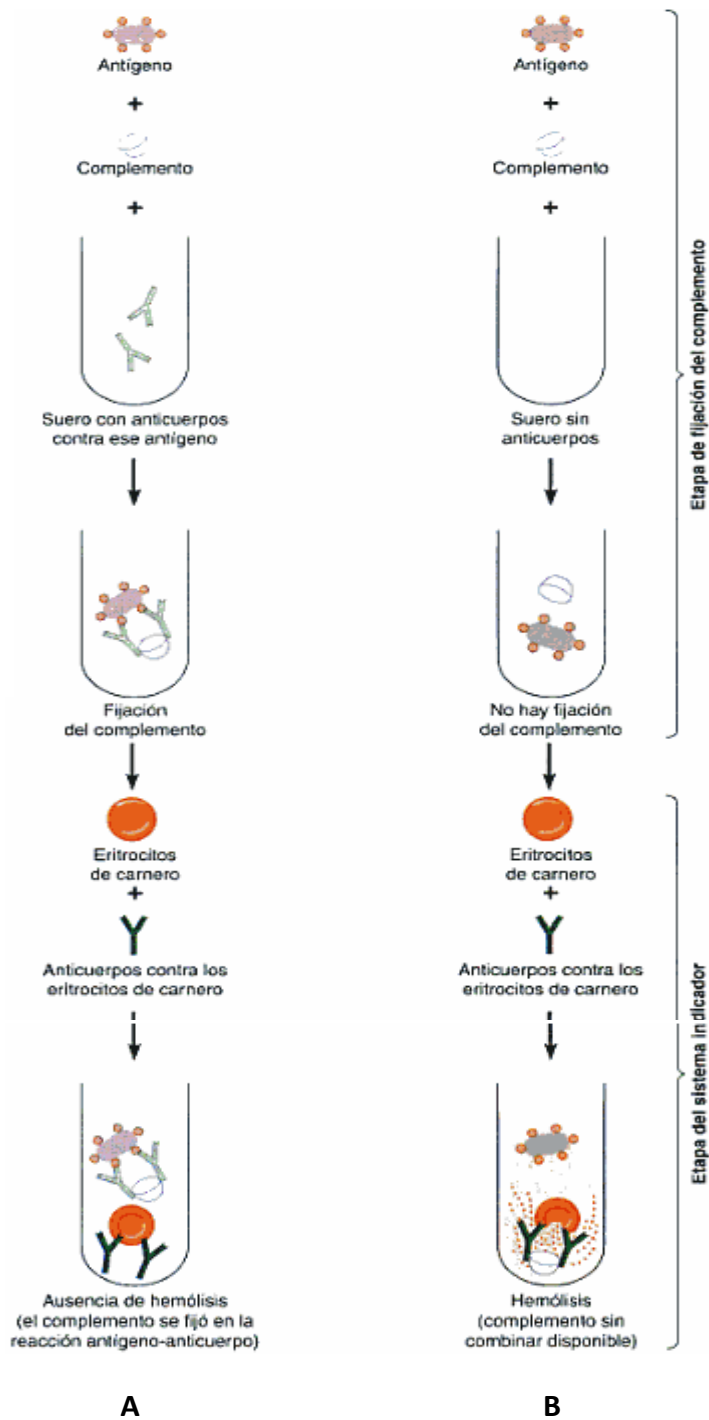


Figura 1.- A Prueba positiva. Todo el complemento disponible se fija en la reacción antígeno- anticuerpo; pero no hay hemólisis, de modo que la prueba es positiva para la presencia de anticuerpos. **B Prueba negativa.** No se produce la reacción antígeno-anticuerpo. El complemento queda libre y produce la lisis de los eritrocitos en la etapa del sistema indicador, de modo que la prueba es negativa.⁵

Técnicas de inmunofluorescencia.

Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) permiten identificar microorganismos en muestras clínicas y detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero. Estas técnicas combinan colorantes fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) con anticuerpos para conferirles fluorescencia cuando se exponen a luz ultravioleta. Estos procedimientos son rápidos, sensibles y muy específicos; la prueba de IF para el diagnóstico de rabia se realiza en horas y tiene una tasa de precisión cercana al 100%. Hay pruebas de inmunofluorescencia, directa e indirecta.

Las pruebas de IF directa suelen utilizarse para identificar un microorganismo en una muestra clínica. Durante este procedimiento la muestra que contiene el antígeno por identificar se fija sobre un portaobjetos. A continuación se agrega anticuerpos marcados con fluoresceína y tras una breve incubación del portaobjetos se lava para eliminar todo el anticuerpo no unido al antígeno. Luego se lo examina con un microscopio de fluorescencia a fin de determinar la fluorescencia amarillo verdosa.

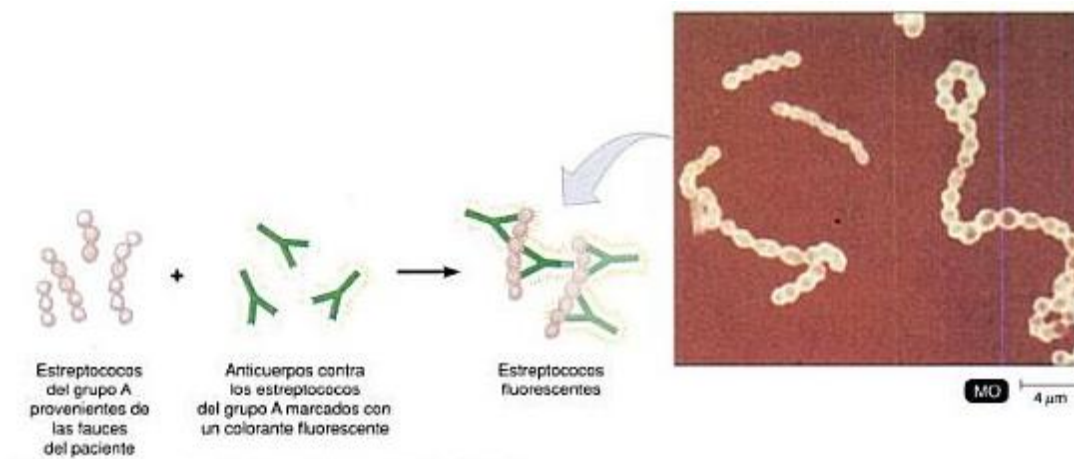


Figura 2.- Reacciones en una prueba de inmunofluorescencia directa positiva.

Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta se utilizan para detectar la presencia de un anticuerpo específico en el suero tras la exposición a un microorganismo. A menudo son más sensibles que las pruebas directas. Durante este procedimiento se fija un antígeno conocido sobre un portaobjetos. A continuación se agrega suero de prueba que, si está presente el anticuerpo específico contra ese microbio, reacciona con el antígeno hasta formar un complejo. Para que este complejo antígeno-anticuerpo puede verse se agrega al portaobjetos una anti-inmunoglobulina sérica humana (anti-IgSH), un anticuerpo

que reacciona específicamente como cualquier anticuerpo humano, marcado con fluoresceína.

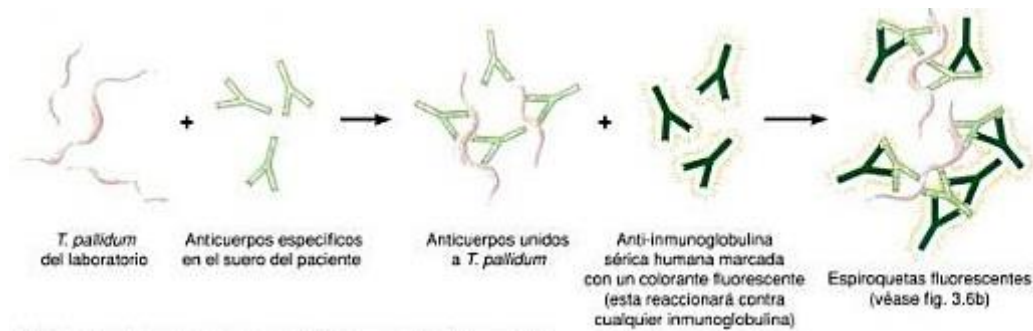


Figura 3.- Reacciones en una prueba de inmunofluorescencia indirecta positiva

La anti-IgSH solo estará presente si el anticuerpo específico ha reaccionado con su antígeno y por consiguiente también está presente. Tras la incubación y el lavado del portaobjetos (para eliminar los anticuerpos no unidos) se lo examina con microscopio de fluorescencia. Si el antígeno conocido fijado al portaobjetos aparece fluorescente eso significa que hay anticuerpos específicos contra el antígeno prueba.

Una adaptación especialmente interesante de los anticuerpos fluorescentes es la citometría de flujo activada por fluorescencia(FACS).

FACS es una modificación de la citometría de flujo, técnica en la cual una suspensión de células sale de un microtubulo en forma de gotitas que no contienen más de una célula cada una. Un haz de laser impacta sobre cada gota (con una célula) y luego es recibido por un detector que determina ciertas características, por ejemplo el tamaño. Si las células poseen marcadores IF para identificarlas como linfocitos T CD4 o CD8 el detector puede medir su fluorescencia. Cuando el haz de laser detecta una célula de un tamaño o una fluorescencia preseleccionados, le imparte una carga eléctrica, positiva o negativa. Cuando la gota con carga eléctrica cae entre placas que también poseen carga eléctrica es atraída hacia un tubo receptor o hacia otro, lo que permite separar de manera eficaz las células de diferentes tipos. Con este proceso pueden separarse millones de células en una hora, todas en condiciones estériles, lo que posibilita su empleo en el trabajo experimental. ²

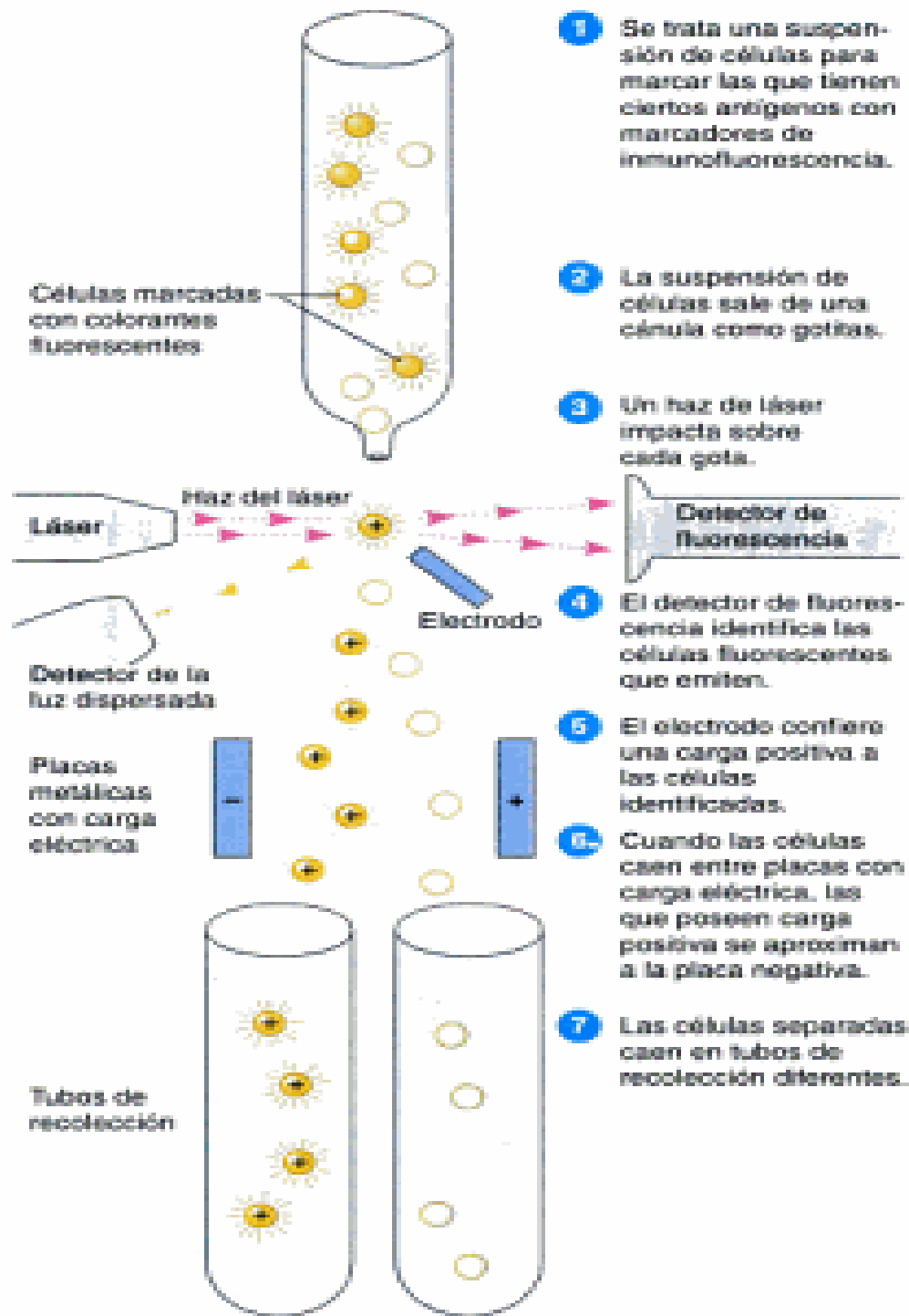


Figura 4.- Citometría de flujo activada por fluorescencia (*fluorescence-activated cell sorter; FACS*). Esta técnica puede utilizarse para separar diferentes clases de linfocitos T. Un anticuerpo con marcación fluorescente reacciona con, por ejemplo. El receptor CD4 presente en un linfocito T. ⁵

ENSAYO INMUNOADSORVENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).

Es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable como cambio de color o algún otro tipo; en ocasiones, con el fin de reducir los costos de ensayo, nos encontramos con que existe un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado la enzima anteriormente mencionada. La aparición de colorantes permite medir indirectamente espectrofotométría el antígeno en la muestra.

Se usa en muchos laboratorios para determinar si un anticuerpo particular está presente en la muestra de sangre de un paciente. Aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra a un gran número de variables, tales como la selección de reactivo, temperatura, medición de volumen y tiempo, que si no se ajusta correctamente puede afectar a los pasos sucesivos y al resultado de la prueba.

La interacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio puede ser utilizada para determinar si un paciente tiene una infección o una enfermedad autoinmune. Pero como prueba diagnóstica, posee diversas limitaciones que conviene conocer:

- En primer lugar, un resultado positivo que confirma la presencia de anticuerpos no significa necesariamente que el paciente esté enfermo. El cuerpo de una persona que ha estado enferma y que ya se ha recuperado, puede seguir produciendo anticuerpos. Esto originaría un falso positivo.
- En segundo lugar, hay personas que producen una baja cantidad de anticuerpos, por lo que éstos pueden pasar desapercibidos y no ser medidos, dando lugar a un falso negativo. Sería el caso, por ejemplo, de personas que padezcan una inmunodeficiencia, o que se encuentren en el periodo ventana de la infección en el momento de realizar la prueba, o que estén infectadas por una cepa extraña.
- En tercer lugar, pueden aparecer falsos positivos cuando se da inespecificidad entre antígeno-anticuerpo.

En estos casos de diagnóstico de enfermedad es recomendable la eliminación (mediante centrifugación) de células de la sangre que puedan interferir con el ensayo y pueda ocasionar un resultado falso positivo, careciendo aquél de especificidad. También, debemos tener en cuenta que cuando se trata de diagnosticar una enfermedad que posee un valor predictivo positivo bajo en una

determinada población, es decir, que esa enfermedad tiene muy baja incidencia en dicha población, es necesario volver a confirmar el resultado positivo mediante otro método de diagnóstico independiente. Normalmente, se lleva a cabo un western blot donde se detecta la presencia de varios anticuerpos, simultáneamente, frente a la misma infección en una muestra. El resultado del western se considera positivo cuando aparecen al menos 5 bandas, que indica que 5 anticuerpos diferentes están presentes en el sujeto frente a esa infección, entonces es cuando se diagnostica como positivo a dicho paciente.

Además se han propuesto y desarrollado diferentes métodos de amplificación de la señal (luminiscentes, cascadas enzimáticas...) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA a la obtenida en el RIA ([radioinmunoensayo](#)) hormonal.

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de [anticuerpos monoclonales](#), etc. ²

Dispositivos empleados en ELISA.

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de adsorción (en su superficie) de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos.

Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

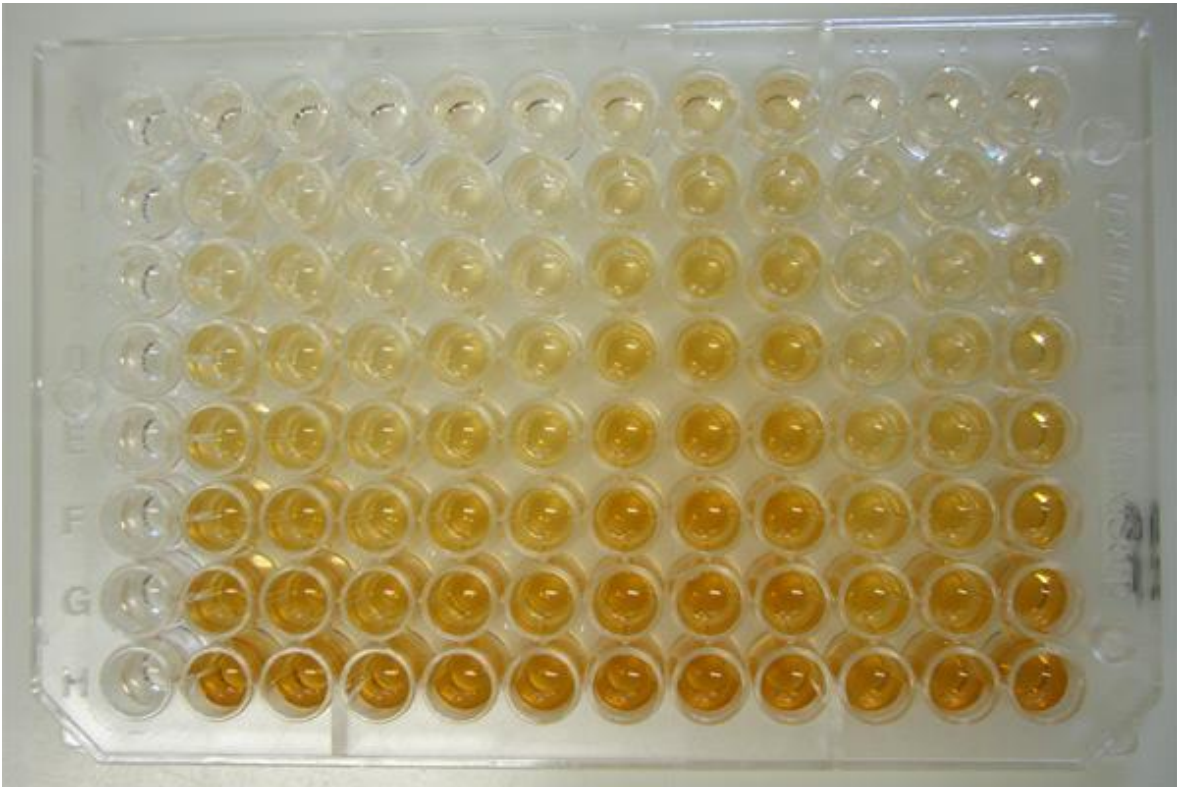


Figura 5.- ELISA Anti IgG humana.⁵

Fases de un ensayo ELISA.

Son cuatro fases:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina...). El anticuerpo conjugado a la enzima se emplea en los ensayos directos e indirectos, sandwich, etc. El antígeno marcado se emplea en ensayos de competición de antígeno. Dicha unión anticuerpo-enzima o antígeno-enzima ha de producirse durante un determinado periodo de tiempo en aras de producir una solución coloreada y que pueda ser valorada visualmente o cuantificada por medio de un espectrofotómetro (normalmente a una longitud de onda de 414 nm). Si no transcurre el tiempo adecuado para que ocurra la reacción, no se evidenciará ningún color, interpretándose este resultado como un falso negativo, disminuyendo la sensibilidad de la técnica.
2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos. La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas. Así, el procedimiento de recubrimiento de los pocillos debe realizarse cuidadosamente. Si se usa mucho antígeno,

se pueden obtener falsos positivos. Por el contrario, si se usa poco antígeno, el exceso dará lugar a una reacción falsa negativa.

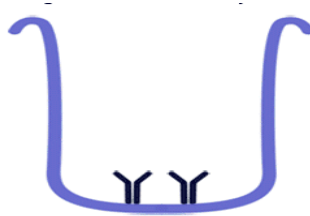


Figura 6.- Unión de Ag o Ac a un pocillo.

3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno [frío](#) frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno. En esta etapa es muy importante controlar los factores tiempo y temperatura de incubación para evitar la aparición de falsos negativos. En el caso del tiempo, si es inferior a 15 minutos, no ocurrirá la interacción antígeno-anticuerpo y el color no será evidente al final del ensayo, dando un falso negativo. Por su parte, si la temperatura de incubación es muy baja, la formación del complejo antígeno-anticuerpo tampoco se completará en el tiempo establecido, mientras que si es muy alta, las proteínas (antígeno y anticuerpo) se desnaturalizan y por tanto disminuyen su capacidad para interaccionar, dando igualmente falsos negativos.

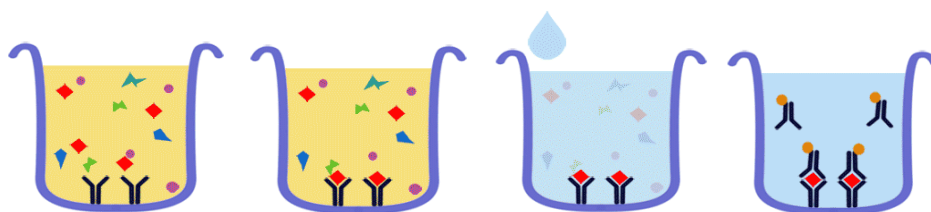


Figura 7.- Formación de capas de inmunocomplejos.

4. Revelado de la reacción enzimática. Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.

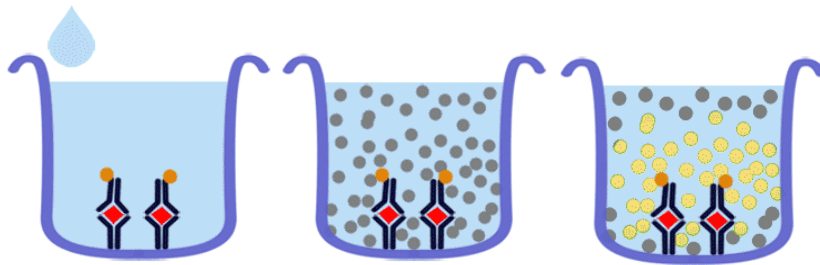
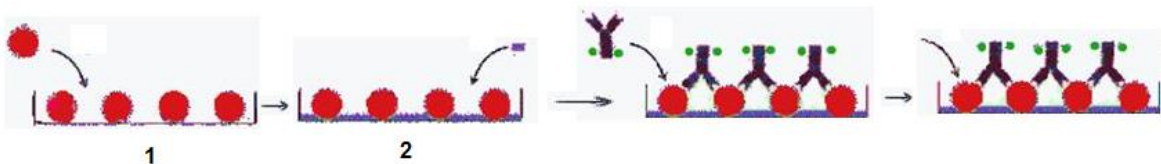


Figura 8.- Revelado de la reacción enzimática prueba positiva.

Tipos de ensayo ELISA.

- ELISA directo (ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina,...) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado).



1. antígeno que se pega al fondo de una placa de plástico
2. proteína bloqueante que cubre el plástico libre sin recubrir por el antígeno
3. anticuerpo marcado con una enzima(puntos verdes)
4. sustrato

Figura 9.- Esquema de reacción de ELISA directo.

- ELISA indirecto. Las placas ELISA se preparan de la misma forma a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de

detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpos secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran variedad de antígenos, por eso es un método más polivalente y barato, aunque se pierda algo de precisión por tener un eslabón más con respecto al método directo. La dilución de la solución que contiene el anticuerpo primario (por ejemplo: suero sanguíneo) es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar la aparición de falsos negativos, ya que si la muestra está muy diluida no saldrá positiva si la titulación de anticuerpos es muy baja. Es decir, aunque los anticuerpos están presentes, la prueba no da positivo porque la concentración de anticuerpos específicos contra el antígeno que está pegado en el fondo del pocillo no es suficiente como para dar una señal detectable.

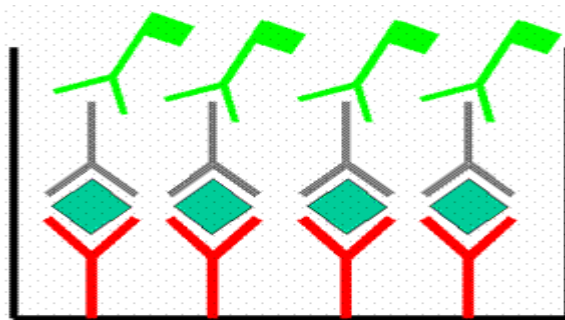


Figura 10.- Muestra de un ELISA indirecto. En esta reacción se usan dos tipos de Ac vs el mismo Ag, el rojo se pega a la placa y sirve de anclaje al Ag, el segundo es para revelar la presencia del Ag ya que se encuentra unido a una enzima u otro reactivo que pueda ser revelado.

- [ELISA "sándwich"](#) (Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

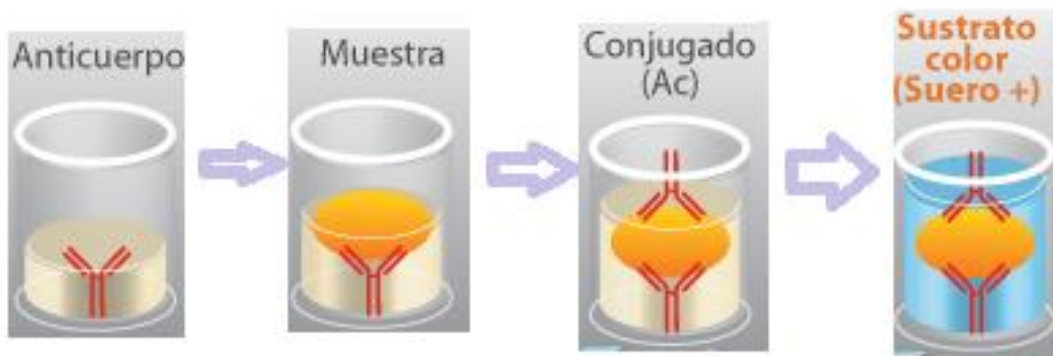


Figura 11.- Esquema de ELISA sándwich.⁴

REFERENCIAS.

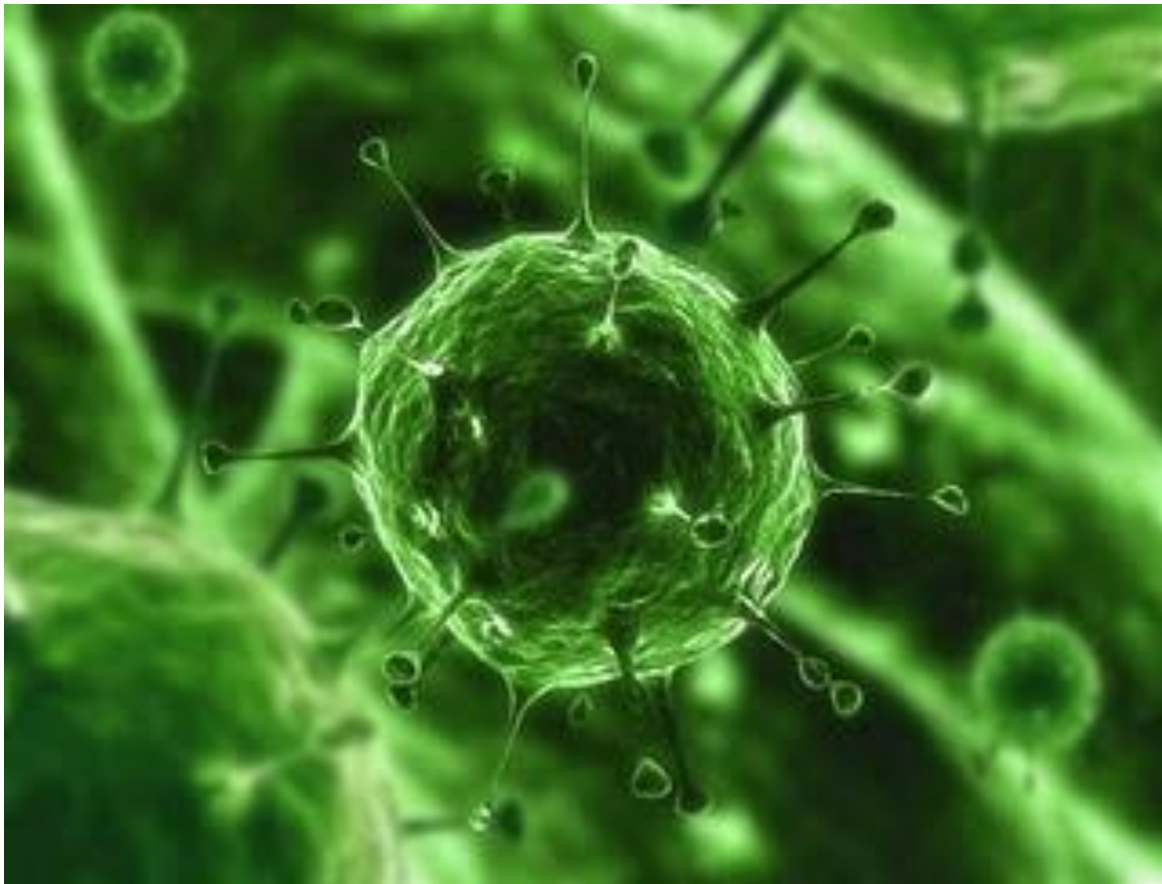
- 1.- Romero Cabello Raúl, Microbiología y Parasitología Humana, 3ª ed. México: Panamericana; 2007.
- 2.- Colombia Médica. Crespo María del Pliar. Virus diagnostico infección viral [actualizado 3 de marzo del 2000] Disponible en :
<http://colombiamedica.univalle.edu.co/index.php/comedica/article/viewArticle/166>
- 3.- Organización Panamericana de la Salud, Zoonosis y enfermedades transmitibles comunes al hombre y a los animales, 3ª ed. Washington, 2003.
- 4.- Química viva. Curso de introducción al conocimiento científico experimental. Celia E. Coto [actualización 5 de enero del 2013] Disponible en :
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/contratapa/aprendiendo/capitulo9.htm>
- 5.- Ingraham John L, Ingraham Catherine A. Introducción a la Microbiología. 2ª ed. Barcelona España: editorial Reverté.1998, p 594



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



PRÁCTICA 4
EFFECTO CITOPÁTICO



PRÁCTICA 4

EFECTO CITOPÁTICO

OBJETIVO.

- Demostrar que la infección viral puede alterar la morfología de la célula.
- Identificar tentativamente al virus infectante, observar la alteración en la morfología celular.

INTRODUCCIÓN.

En general, los virus causan varios cambios morfológicos comunes en las células que infectan. Los efectos citopáticos son cambios visuales en el hospedero que se deben a la infección viral. Los efectos citopáticos, como la formación de cuerpos de inclusión y la hemadsorción, son muy comunes y se usan para reconocer las células infectadas por virus en un cultivo.

Los efectos citopáticos inducidos por virus se pueden examinar con un microscopio de luz invertida de baja potencia. Se busca redondeamiento y contracción de las células, aumento de la refractabilidad, fisión o formación de sincitios, agregación, pérdida de adherencia y lisis o muerte de la célula. ¹

Cambios morfológicos.

Son muy diversos y afectan a casi cualquier organelo y estructura celular, incluyendo el núcleo, las membranas y el citoesqueleto.

Lisis: La lisis celular es la conclusión del conjunto de alteraciones que se producen secuencial o simultáneamente en la célula infectada, liberando finalmente al medio las nuevas partículas virales. Inicialmente se producen alteraciones en la funcionalidad de membrana, seguido de cambios en la morfología del núcleo y la desorganización de ciertos organelo y del citoesqueleto, lo cual provoca la pérdida de adherencia al sustrato y el redondeamiento celular ya mencionado. El virus de la polio, en un cultivo de células HeLa (el primer sistema en el que se observó el efecto citopático), provoca un corto periodo de la deformación del núcleo y la desorganización del citoesqueleto y el sistema vascular, apareciendo un gran número de vesículas membranosas, que llegan a ocupar la mayor parte del citoplasma en estadios tardíos de infección.

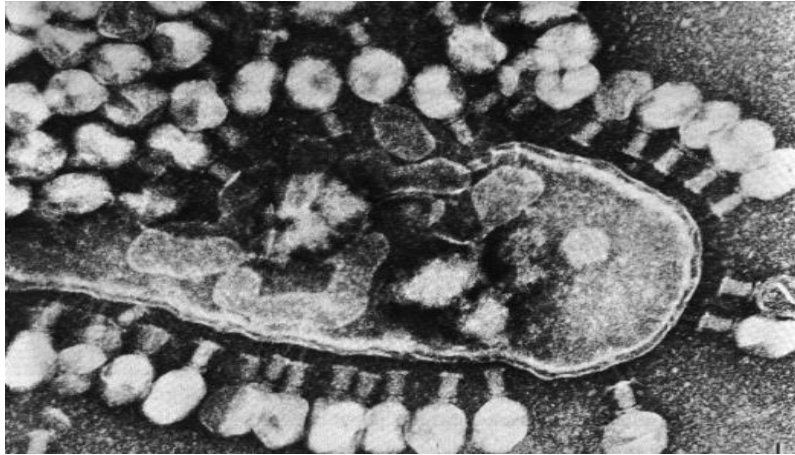


Figura 1.- Lisis celular por infección viral.

Cuerpos de inclusión: Muchos tipos de virus inducen la aparición de estructuras membranosas en el citoplasma, en algunos casos en forma de grandes vacuolas citoplasmáticas y en otros como pequeñas vesículas. En varios virus se ha comprobado que estas regiones corresponden a zonas muy ricas en proteínas virales, siendo centros de replicación viral. Los cuerpos de inclusión son estructuras observables a microscopía óptica y constituyen centros activos del ciclo vírico intracelular. Corresponden a complejos replicativos, transcripcionales o de ensamblaje; situados en el núcleo o en el citoplasma, asociados al citoesqueleto.

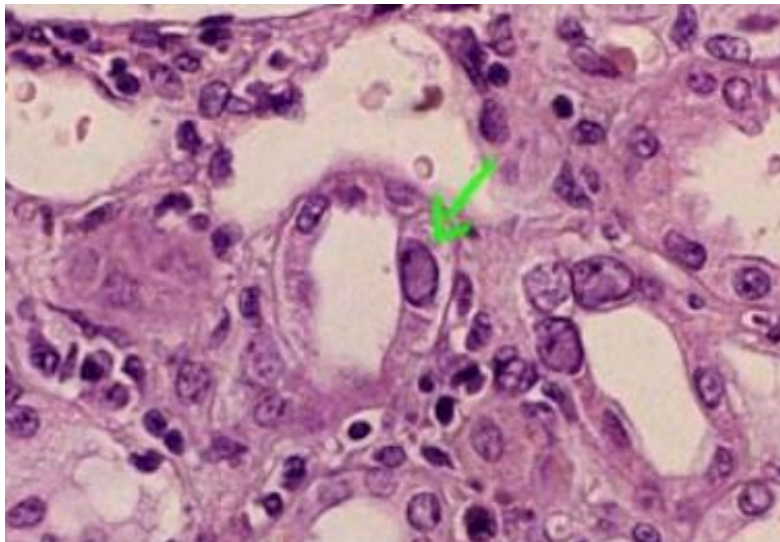


Figura 2.- Inclusión intranuclear muy característico de la infección por poliomavirus.

Sincitios: Son grupos de células fusionadas apreciables como una masa celular multinucleada. La inducción de sincitios se ha observado en la infección por VIH, en concreto por variantes virales muy patogénicas que surgen en etapas tardías de la enfermedad, por lo que tienen valor pronóstico (que lleva su nombre precisamente por este fenómeno). Su observación generalmente se ha realizado en células en cultivo, pero dicho fenómeno permite in vivo la infección de nuevos linfocitos T CD4+ sin la parte extracelular del ciclo, en la que son más vulnerables a la respuesta humoral.

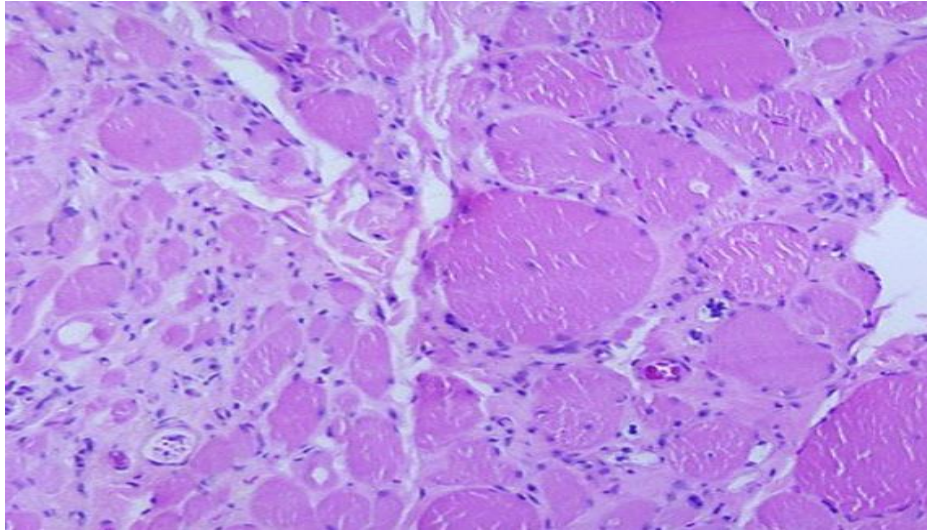


Figura 3.- *Micrografía de musculo esquelético. En la periferia de cada célula cortada transversalmente (con forma aproximadamente circular) pueden verse varios núcleos.*

Transformación celular: Es una alteración en el crecimiento normal de las células en cultivo con evidentes manifestaciones morfológicas. Se asocia a una serie de cambios moleculares, que causan la desregulación de los sistemas de control de la proliferación celular y la apoptosis, que se manifiestan en la pérdida de la inhibición por contacto, formando cultivos multicapa e incluso tumores, la desorganización del citoesqueleto, que acompaña a una cierta indiferencia morfológica, alteraciones en la superficie celular (cambios antigénicos y cambios en la funcionalidad de la membrana), alteraciones nucleares y cromosómicas, independencia de anclaje, disminución de la capa externa de fibronectina, bajos requerimientos de factores de crecimiento, aumento en la secreción de proteasa. La transformación celular está especialmente ligada a virus que insertan su genoma en el de la célula infectada, pudiendo causar mutagénesis al interrumpir antioncogenes o activar pro-oncogenes, o alterando la correcta regulación de la expresión génica celular.²

Alteraciones bioquímicas.

Las alteraciones morfológicas están totalmente fundamentadas en alteraciones moleculares, estructurales y funcionales (vías metabólicas, reguladoras, de transporte, de expresión génica). Las alteraciones bioquímicas son muy diversas y específicas de cada virus, si bien pueden señalarse las más importantes a nivel general.

Alteraciones en la síntesis de macromoléculas celulares: Algunos virus son capaces de mostrar esta inhibición etapas tempranas de la infección (por ejemplo poxvirus) pero la mayoría de los virus animales lo hacen en etapas tardías. El efecto más drástico suele producirse en la inhibición de la expresión de proteínas celulares por traducción preferente o casi exclusiva de proteínas virales.

1.- Inhibición de la síntesis de proteínas celulares: se conoce que principalmente actúa a nivel de iniciación de la síntesis de proteínas celulares en los ribosomas.

2.- Inhibición de la síntesis de DNA celular: en general, todos los virus provocan inhibición de la síntesis de DNA celular, los virus RNA probablemente por el bloqueo de la síntesis de proteínas, y los virus DNA para proveerse de nucleótidos, enzimas y otros factores implicados en la replicación.

3.- Inhibición de la síntesis de RNA celular la transcripción esta inhibida probablemente por competición por la RNA polimerasa II y los factores de transcripción celulares.

Alteraciones de las membranas celulares.

1.- Cambios en la actividad de enzimas presentes en las membranas.

2.- Modificaciones en la funcionalidad del sistema vesicular.

3.- Aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática. ³

Identificación de células infectadas por virus.

Es posible vigilar la multiplicación de un virus de diversas maneras:

1. Desarrollo de efectos citopáticos: son cambios morfológicos en las células. Los tipos de efectos citopáticos inducidos por virus consisten en lisis o necrosis

celulares, formación de inclusiones, formación de células gigantes y vacuolización citoplásmica. La mayor parte de los virus producen algún efecto citopático manifiesto en las células infectadas que es, en general, característico del grupo del virus.

2. Aparición de una proteína codificada por el virus, como la hemaglutinina del virus de la influenza. Se pueden emplear antisueros específicos para identificar la síntesis de proteínas virales en las células infectadas.

3. Adsorción de eritrocitos a las células infectadas, técnica que se llama hemadsorción, a causa de la presencia de hemaglutinina codificada por el virus (parainfluenza, influenza) en las membranas celulares. Esta reacción se vuelve positiva antes que sean visibles los cambios citopáticos y, en algunos casos, ocurre en ausencia de éstos.

4. Interferencia por un virus no citopatógeno (por ejemplo, el de la rubéola) con la replicación e inducción de efectos citopáticos por un segundo virus de carga (por ejemplo, echovirus) que se añade como indicador.

5. Transformación morfológica por un virus oncógeno (por ejemplo, virus del sarcoma de Rous), que suele acompañarse de pérdida de la inhibición de contacto y acumulación de células en focos definidos.

6. Durante la multiplicación de los virus en el interior de las células, pueden producirse estructuras específicas de virus, denominadas cuerpos de inclusión. Estas estructuras llegan a ser mucho más grandes que las partículas individuales del virus, y a menudo muestran afinidad para los colorantes ácidos (por ejemplo, la eosina). Pueden situarse en el núcleo (herpesvirus), en el citoplasma (poxvirus) o en ambos (virus del sarampión). En muchas infecciones virales, los cuerpos de inclusión son el sitio de desarrollo del virión (la fábrica del virus). En algunas infecciones (poxvirus, reovirus), el cuerpo de inclusión consiste en masas de partículas virales en el proceso de replicación. Aun en otros casos más, como en el cuerpo de inclusión intranuclear del [herpes](#), el virus se multiplica en una etapa más temprana de la infección y el cuerpo de inclusión parece ser un producto

residual de la multiplicación viral. Las variaciones en el aspecto del material de inclusión, dependen de la composición del fijador tisular empleado.

La presencia de cuerpos de inclusión puede ser de considerable utilidad en el diagnóstico. Las inclusiones intracitoplásmicas de las células nerviosas, denominadas **cuerpos de Negri**, son patognomónicas de la rabia.

Los efectos citopáticos son los criterios más simples y los utilizados con más frecuencia para reconocer las infecciones virales, aunque no todos los virus causan estos efectos. Por tal razón deben usarse otros métodos para detectar las infecciones virales.

Los cuerpos de inclusión son anomalías intracelulares sutiles que solo tienen un lugar en las células infectadas. Estos gránulos intracelulares son los sitios viables de la replicación o ensamblaje viral. La presencia de un tipo específico de cuerpos de inclusión puede ser indicativa o diagnóstico de una infección viral determinada. Para visualizar los cuerpos de inclusión las células infectadas se fijan a la placa de cultivo, se tiñen con un colorante como la eosina y se observan al microscopio óptico. Los poxvirus, los paramixovirus, los reovirus, el virus de la rabia, los herpesvirus, los adenovirus y los parvovirus inducen cuerpos de inclusión viables en las células. Además de los cuerpos de inclusión se observan la lisis celular, vacuolización, producción de sincitios.

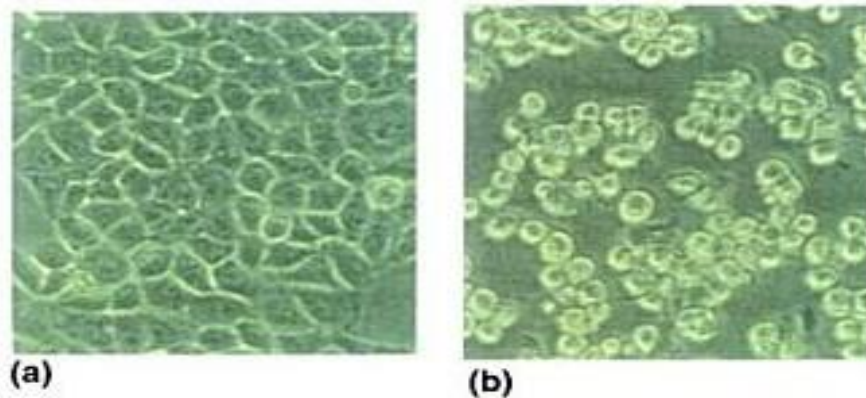


Figura 4.- a) Células de riñón de mono no infectadas, vistas con microscopio de luz invertida de baja potencia. Las monocapas de células confluentes permanecen adheridas a su sustrato e intactas. b) Células de riñón de mono infectadas por el virus de la vacuna. **Los efectos citopáticos son**

redondeamiento y desprendimiento de las células de la placa de cultivo de tejido.²

La hemadsorción se emplea para detectar la presencia de virus unidos a los eritrocitos. El fenómeno se produce cuando los eritrocitos de un hospedero infectado se unen al virus. Si se tiene un virus en solución y se agregan eritrocitos, el virus puede interactuar con las células sanguíneas y formar una estructura reticular como consecuencia de la aglutinación de los eritrocitos. Esto se denomina hemaglutinación. Los ensayos de hemadsorción y de hemaglutinación pueden ser útiles para detectar virus que producen poco o ningún efecto.

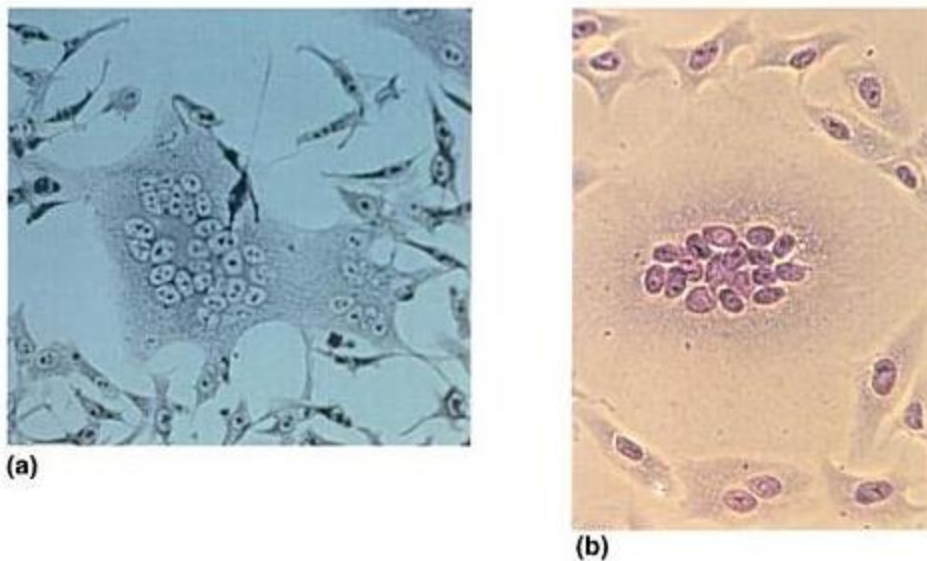


Figura 5.- a) células de mono infectadas por el virus de la vacuna modificado que expresa genes del virus del sarampión y que produce sincitios y fusión de las células L de ratón b)Muestra una célula gigante multinucleada(también conocida como sincitio), un mecanismo de diseminacion viral.

Varios virus como el HIV, pueden inducir la formación de sincitios. Las variantes de HIV inductoras de sincitios se correlacionan con una rápida progresión de la enfermedad en los pacientes infectados con HIV.⁴

El efecto citopático depende del virus infectante y de la célula hospedera. No todos los virus lo originan. Sin embargo, algunos grupos virales producen efecto citopático característico que se utiliza para identificarlos tentativamente.

El RV(virus de rubeola) y el RSV(virus sincitial respiratorio) son virus que ocasionan infecciones en humanos. El RV origina infección exantémica que sería intrascendente si no fuese por su efecto teratogénico. El RSV produce infecciones del tracto respiratorio y se le considera como agente principal de las infecciones respiratorias graves.⁵

MATERIAL POR EQUIPO.

- Una caja multipozos con células RK_13(son células epiteliales provenientes de riñón de conejo) infectadas con RV y células sin infectar(caja 1)
- Una caja multipozos con células Vero(son fibroblastos y provienen de riñón de mono verde) infectadas con RSV y células sin infectar(células control) (caja 2)
- Un frasco con amortiguador de fosfato salino (PBS)
- Dos pipetas de 5 ml
- Un frasco con metanol y H₂O₂ a 3% en PBS
- Un frasco con metanol absoluto.
- Un frasco con metanol en PBS al 1:1 en volumen
- Un gotero con cristal violeta
- Un gotero con Giemsa.

METODO.

1.- Caja no. 1 Observar con el microscopio invertido las células infectada y las células control.

2.- Caja no. 2 (costar no. 3590) En 16 pozos habrá células, es decir, las hileras 1 y 2 con las letras de la A a la H. Los pozos de la hilera 1 tendrán células Vero(control), los pozos de la hilera 2 tendrán células infectadas con el RSV. La distribución de los pozos se muestran en el esquema.

Las cajas se prepararon de la siguiente manera: en cada pozo se pusieron 100 000 células ya sea infectadas o sin infectar. El pozo A de la línea 2, infectadas con 5×10^4 virus, es decir, con multiplicidad de infección (moi; relación virus/célula) de 0.5. En los otros pozos de la B a la H se siguió el mismo diseño solo que se utilizaron moi descendientes en un logaritmo base 10. Es decir en el pozo B la infección se hizo con 5×10^3 virus, los del pozo C con 5×10^2 , los del pozo D con 5×10^1 y los del E con 0.5×10^1 y así sucesivamente.

3.- Después de observar el efecto citopático del RSV en las células, se lavan añadiendo a cada pozo 0.5 ml de PBS, se retira el líquido, la operación anterior se hace por tres veces.

4.- Las células se fijan a la caja, para esto se le agrega a cada pozo 0.5 mL de metanol con H₂O₂ se les deja a temperatura ambiente 20 min. Después se lavan con 0.5 ml de PBS tres veces en la forma descrita. Los pozos con el número 1 se tiñen con cristal violeta y con Giemsa los del número 2

5.- Tinción con cristal violeta, se retira el PBS y se añade 5 gotas del colorante a cada pozo y se retira, se lava con PBS en la forma descrita. Se observan al microscopio.

6.- Tinción con Giemsa, se retira el PBS y se añade 5 gotas de PBS/metanol, se retira el PBS/metanol y se agrega metanol, se deja 10 min a temperatura ambiente.

7.- Se retira el metanol, se enjuaga nuevamente con metanol absoluto y se le añade 5 gotas del colorante de Giemsa.

8.- Después de 1-3 min se añade 0.2 ml de agua y se deja por 2-3 min.

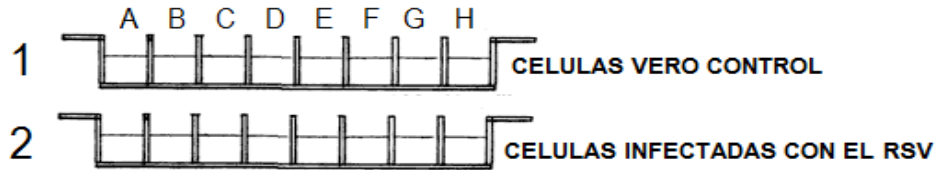
9.- Se lava con agua de la llave y se observa con el microscopio invertido.

caja no. 1



observar con el microscopio
invertido las células infectadas
y las células control

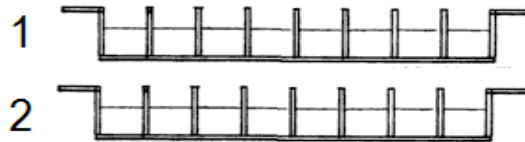
caja no. 2



observar el efecto citopático
y lavar con 0.5 ml de PBS en
cada pozo (repetir 3 veces)



fijar con 0.5 ml
de metano-H₂O₂
cada pozo



dejar a temperatura ambiente
20 min y lavar con 0.5 ml de
PBS (3 veces en cada pozo)



teñir con cristal violeta
5 gotas en cada pozo / 10 min y retirar



lavar con PBS
y
observar al microscopio

añadir 5 gotas de PBS/metanol
retirar y agregar metanol / 10
min a temperatura ambiente



retirar el metanol
y enjuagar con
metanol absoluto



observar al microscopio

1-3 min se añade
0.2 ml de agua y se
deja por 2-3 min
lavar con agua de
la llave

añadir 5 gotas de
colorante de giemsa

RESULTADOS.

Describir los cambios observados en las líneas celulares producidas por la infección viral.

CULTIVO	EFECTO CITOPATICO
RV en RK 13	
RSV en células Vero	

GUÍA DE ESTUDIO.

- Efecto citopático y manifestaciones de este.
- Técnica de hemadsorción y utilidad.
- Virus que generan efectos citopáticos.
- Características de los virus RV y RSV.
- Cultivos de virus en tejidos.

CUESTIONARIO.

- 1.- ¿Qué es efecto citopático?
- 2.- ¿Porque se genera el efecto citopático?
- 3.- Menciona tres tipos de alteraciones que presentan las células por una infección viral.
- 4.- Menciona algunos virus que provoquen efecto citopático. ¿Qué tipo de efecto presentan?
- 5.- ¿Qué tipo de virus integran su genoma viral a las células infectadas?
- 6.- Además del efecto citopático, ¿Qué otras métodos hay para la identificación de células infectadas?
- 7.- ¿Qué precauciones se deben tomar en cuenta para el manejo del RV y el RSV?
- 8.- ¿Qué tipo de células son las RK13 y las vero?
- 9.- Qué tipo de efecto citopático se va a presentar al multiplicarse
 - El RV en células RK 13
 - El RSV en células Vero
- 10.- ¿Cuál es la función de los colorantes cristales violeta y Giemsa?

ANEXO DE LA PRÁCTICA 4. EFECTO CITOPÁTICO

Microscopio Electrónico.

Historia.

Hay dos grandes problemas que dificultan la observación de las microestructuras biológicas: Las pequeñas dimensiones de las células y de su organelos y su transparencia a la luz visible, lo cual tiene como consecuencia inmediata la falta de contraste entre las diferentes estructuras y entre estas y el propio medio que las rodea. Para superar el primer problema, se construyeron y se perfeccionaron instrumentos capaces de aumentar significativamente las imágenes, revelando los pormenores de las estructuras (microscopios); para resolver el segundo problema, se desarrollaron técnicas, fundamentalmente de tipo de las tinciones que permitan aumentar el contraste entre las diferentes estructuras y entre ellas y su entorno, haciéndolas claramente visibles y diferenciables.

Cuadro 1. Evolución del microscopio.

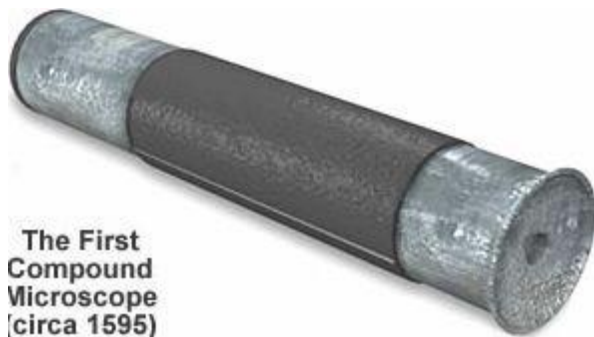
FECHA	AUTOR	IIINVENTO
1609	Z. Jansen	Construye un microscopio con dos lentes convergentes.
1611	Kepler	Sugiere la manera de fabricar un microscopio compuesto
1665	Hook	Utiliza microscopio compuesto para estudiar cortes de corcho y describe los pequeños poros en forma de caja a los que los llamo "células". Publica su libro "Micrographia"
1674	Leeuwenhoek	Informa su descubrimiento de protozoarios. Observa bacterias por primera vez 9 años después.
1683	Leeuwenhoek	Observa bacterias por primera vez.
1828	W. Nicol	Desarrolla la microscopía con luz polarizada
1833	Brown	Publica sus observaciones microscópicas de orquídeas y describe claramente el núcleo de la célula.
1838	Schleiden y Schwann	Propone la teoría de la célula y declaran que la célula nucleada es la unidad estructural y funcional en plantas y animales.
1849	J. Quekett	Publica un trabajo práctico sobre el uso del microscopio.
1857	Kolliker	Describe las mitocondrias en células del músculo.

1876	Abbé	Analiza los efectos de la difracción en la formación de la imagen en el microscopio y muestra como perfeccionar el diseño del microscopio.
1879	Flemming	Describe con gran claridad el comportamiento de los cromosomas durante la mitosis en células animales.
1881	Retzius	Descubre gran número de tejidos animales con un detalle que no ha sido superado por ningún otro microscopio de luz. Desarrollo nuevos métodos de tinción y ponen los fundamentos de la anatomía microscópica.
1882	Koch	Usa tinte de anilina para teñir microorganismos e identificar las bacterias que causan la tuberculosis y el cólera. En las siguientes dos décadas, otros bacteriófagos como Klebs y Pasteur identificaron a los agentes causativos de muchas otras enfermedades examinando preparaciones teñidas bajo el microscopio.
1886	Zeiss	Fabrica una serie de lentes, diseño de Abbé que permiten al microscopista resolver estructuras en los límites teóricos de la luz visible.
1898	Golgi	Ve y descubre por primera vez el aparato de Golgi tiñendo células con nitrato de plata.
1908	Köhler y Siedentopf	Desarrollan el microscopio de fluorescencia
1924	Lacassagne y colaboradores	Desarrollan el primer método autoradiográfico para localizar polonium radiactivo en especímenes biológicas.
1930	Lebedeff	Diseña y construye el primer microscopio de interferencia.
1932	Zernike	Inventa el microscopio de contraste de fases
1937	Ernst Ruska y Max Knoll	Construyen el primer microscopio electrónico.
1941	Coombs	Usa anticuerpos acoplados a tintes fluorescentes para estudiar antígenos celulares.
1952	Nomarski	Inventa y patenta el sistema de contraste de interferencia para el microscopio de luz.
1981		Aparece el microscopio de efecto Túnel. MET

Los instrumentos para aumentar la visión de los objetos, o microscopios (del griego significa “Mikro” = pequeño y “scopeo”= mirar (para mirar cosas pequeñas). Un microscopio es un instrumento óptico compuesto de varias lentes

que sirve para observar objetos muy pequeños. En el microscopio electrónico, los rayos luminosos del microscopio convencional son reemplazados por un haz de electrones (el aumento puede alcanzar en este caso hasta 100 veces el del microscopio convencional).

Ya los antiguos sabían que los espejos curvos y las esferas de cristal llenas de agua aumentaban el tamaño de las imágenes. En las primeras décadas del siglo XVII se iniciaron experimentos con lentes (así llamadas por tener forma de lentejas) a fin de lograr mayor aumento posible. Para ello se basaron en otro instrumento con lentes que obtuvo gran éxito, el telescopio, usado por primera vez con fines astronómicos por Galileo en 1609. Antes de esta fecha, los seres vivos más pequeños conocidos eran los insectos diminutos. Naturalmente se daba por hecho que no existía organismo alguno más pequeño.

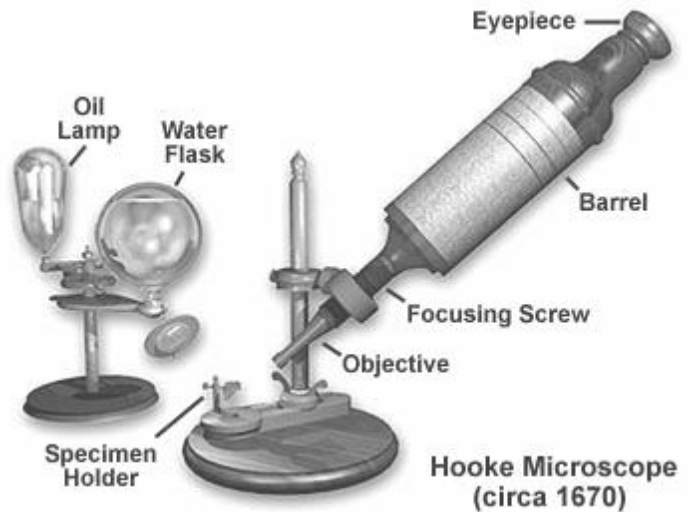


**The First
Compound
Microscope
(circa 1595)**

Figura 1.- Primer microscopio compuesto formado por una combinación de lentes atribuido por Zacharias Jansen en Holanda.

Por primera vez la biología se ampliaba y extendía gracias a un mecanismo que llevaba el sentido de la vista humana más allá de sus límites naturales. Así, los naturalistas podían describir en detalle los pequeños organismos, cosa de otro modo imposible, y los anatomistas podían describir estructuras hasta entonces invisibles. Otro descubrimiento importante fue el de Robert Hooke, realizó uno de los mejores trabajos en esa rama, nueva para ese entonces. En 1665 publicó un libro llamado *Micrographia* en el cual pueden encontrarse algunos de los mejores dibujos que se hallan hechos de observaciones microscópicas. La observación simple más importante fue la del delgado trozo de corcho sobre el cual no se sabía porque flotaba en el agua y era tan liviano y firme. Hooke observó que estaba constituido por una fina trama de pequeñas celdillas rectangulares en las cuales se encontraba aire, que él llamó "células", un término habitual para designar pequeñas habitaciones en los monasterios.

Figura 2.- Microscopio utilizado por Hooke.



La primera persona que vio los microorganismos con algún detalle fue Anton van Leeuwenhoek (1632 – 1723). Este holandés uso microscopios simples contruidos por él mismo (se dedicaba a pulir lentes para fabricar sus microscopios, logro aumentar un objeto hasta 270 veces sin perjuicios de nitidez. Tenía 419 lentes algunas de las cuales eran cristal de roca y hasta de diamante, en algunos casos no eran mayores que el tamaño de un alfiler, por lo que sus microscopios tenían un tamaño diminuto comparados con otros de la época.



Figura 3.- Microscopio diseñado por Leeuwenhoek.

Con esas lentes observaba todo lo que podía y logro describir los glóbulos rojos de la sangre y los capilares con mayor detalle que los verdaderos descubridores. Pero lo mas sensacional de todo ello fue el descubrimiento de pequeños organismos invisibles a simple vista, al estudiar aguas estancadas con su microscopio. Las descripciones de van Leeuwenhoke eran, desde luego, imprecisas, pero no cabe duda que fue el primero en ver lo mas que mas tarde se llamaría bacterias y “animalículos”, como los denomino entonces, conocidos hoy como protozoarios que en griego significa pequeños animales.

El microscopista danés Otto Muller consiguió en 1773 distinguir lo suficientemente bien a aquellos pequeños seres para clasificarlos en dos tipos: bacilos (que significa “pequeños vástagos”) y espirilos (por su forma espiral).

El microscopio fue perfeccionado con gran lentitud, uno de los defectos de los microscopios primitivos era que sus lentes descomponían la luz blanca en los colores que la constituyen. Los objetos pequeños se veían rodeados de anillos de color (aberración cromática) que impedían observar con claridad los detalles. Pero alrededor de 1820 se perfeccionaron cuando Joseph Jackson Lister, un óptico inglés, diseñó un microscopio acromático capaz de eliminar los anillos de color que limitaban la claridad de la imagen. Lister descubrió que los glóbulos rojos eran en realidad discos bicóncavos. El microscopio acromático constituyó un gran avance, iniciando una serie de perfeccionamientos que dieron como resultado el moderno microscopio óptico.



Figura 4.- Microscopio acromático diseñado y utilizado por Lister.

Desde 1660 hasta la actualidad el microscopio óptico ha sido el pilar fundamental en el conocimiento de lo visible. Aunque su poder de resolución aumento a través del tiempo (con la mejora en la calidad de los lentes) al igual que el poder de magnificación, su factor limitante fue la longitud de onda de la luz. En 1930 el mundo submicroscopico se amplió con la aparición del microscopio electrónico

cuya ventaja principal con respecto al microscopio óptico es un aumento de 1000 veces en la magnificación del material observado por primera vez con este microscopio.

Microscopio óptico compuesto.

El microscopio compuesto, que se ha hecho de uso general a partir de mediados del siglo XIX y que fue de importancia crucial para la evolución de la microbiología como ciencia, es todavía, con ciertas variaciones, el primer apoyo de la investigación microbiológica rutinaria. Este tipo de microscopio está formado básicamente por una parte mecánica y una parte óptica y es capaz de conseguir aumentos considerables mayores que el microscopio construido con una sola lente. Este último llamado microscopio simple, se usa principalmente en el formato de lupa.



Figura 5.- Microscopio óptico.

Los elementos básicos mecánicos son: el pie que es el soporte del microscopio, la columna en la que se apoyan las restantes piezas, el tubo que es el elemento de unión entre el ocular y el revólver (pieza giratoria que soporta los objetivos), la platina sobre la que se apoya la preparación a observar, y los tornillos micrométricos y macrométricos que se utilizan para enfocar la preparación (el primero es de pequeño recorrido, para movimientos de pequeña amplitud y el segundo de largo recorrido, para movimientos de gran amplitud).

En cuanto a la parte óptica, un microscopio compuesto tiene dos lentes o sistemas de lentes: el objetivo situado cerca del objeto que se observa, proyecta una imagen ampliada del objeto observado en dirección al ocular que está colocado cerca del ojo y actúa, a modo de lupa, ampliando la imagen que produce el objetivo y el condensador cuya misión es concentrar la luz sobre la preparación y permitir manipular su intensidad.



Figura 6.- Lentes de un microscopio óptico.

La ampliación total aportada por el conjunto objetivo-ocular es igual al producto de multiplicar la capacidad de aumento del objetivo por la ocular, así la mayor parte de los microscopios usados en microbiología tienen oculares de diez aumentos (10x), y objetivos de aumentos diversos, habitualmente x10 (aumento total, x100), x40 (total x400), y x90 ó x100 (objetivos de inmersión en aceite; x9000 ó x1000 total).



Figura 7.-Parte óptica de un microscopio. Lente Bajo Poder: Generalmente 4X
Lente Mediano Poder: Generalmente 10X Lente Alto Poder: Generalmente 40X

Lente Inmersión en aceite:100X

Los lentes de menor aumento se utilizan para rastrear la preparación buscando objetos de interés, el objetivo de 40 aumentos permite la observación detallada de los microorganismos grandes tales como algas, protozoos y hongos y los objetivos de 100 aumentos se emplean para ver las bacterias y los pequeños microorganismos eucariotas.

Además del aumento, una propiedad importante de un microscopio es su poder resolutivo. Este es la capacidad de mostrar distintos y separados dos puntos muy cercanos; por lo tanto cuando mayor sea el poder resolutivo, mayor será la definición con que podremos observar un objeto. Los microscopios de gran poder resolutivo son especialmente buenos para ver pequeñas estructuras.



Figura 8.- *Objetivos de un microscopio.*

- El poder resolutivo de un microscopio compuesto depende de la longitud de onda utilizada y de una propiedad óptica de la lente conocida como apertura numérica.
- Como la longitud de onda habitualmente está fijada, la resolución de un objetivo es función de la apertura numérica; cuando mayor sea la apertura, el objetivo resuelto será más pequeño.
- Hay una correspondencia aproximada entre el aumento de un objetivo y su apertura numérica, de tal modo que las lentes con mayores aumentos habitualmente tendrán mayores aperturas numéricas. (el valor de la apertura está marcado al lado de la lente).

El sistema de iluminación de un microscopio es también de considerable importancia, especialmente cuando se utilizan grandes aumentos. La luz que entra en el sistema debe enfocarse sobre la preparación para que la imagen se traslade de forma adecuada al objetivo y llegue con la mayor calidad posible al ojo del

observador a través del ocular. Actualmente se utiliza un sistema de lentes, incorporado al propio microscopio llamado condensador.

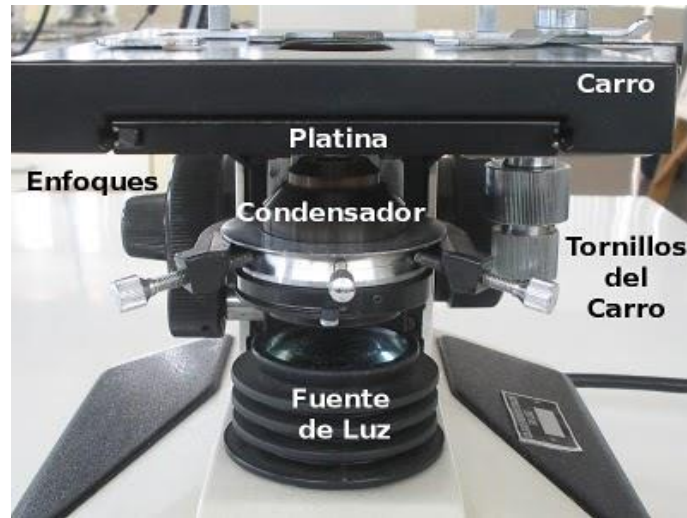


Figura 9.- Caja de Prismas, en la cual hay un prisma quien es el que se encarga de desviar la imagen que se recibe desde el lente objetivo hacia el lente ocular formando un ángulo de 120 grados.

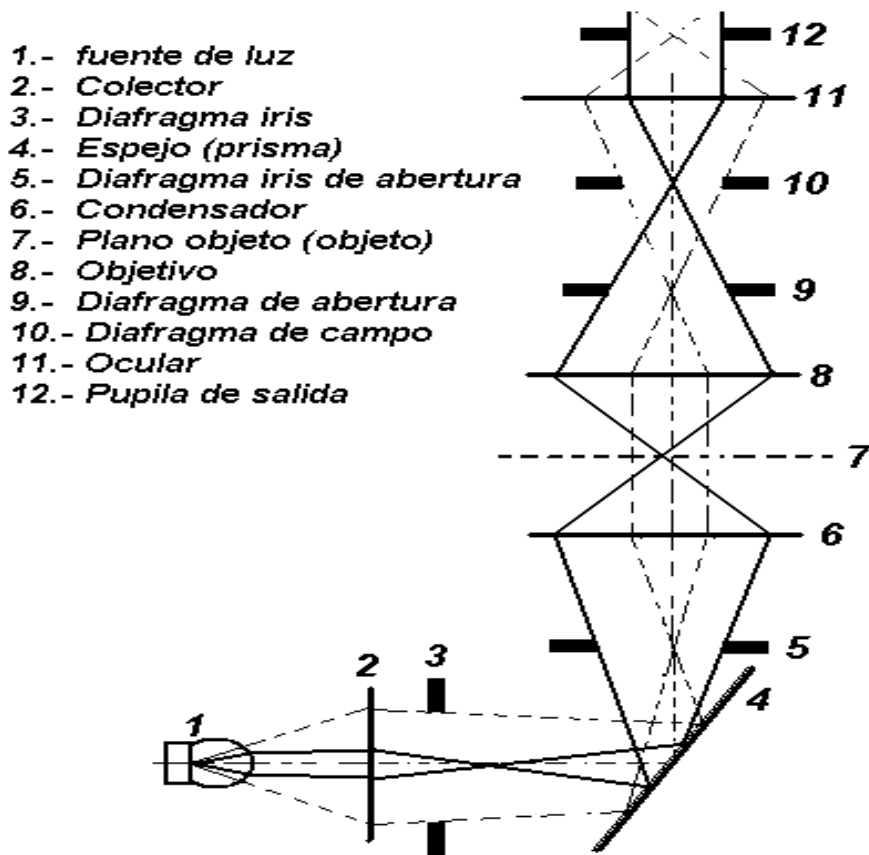


Figura 10.- La fuente de luz (1), con la ayuda de una lente (o sistema) (2), llamada colector, se representa en el plano del diafragma iris de abertura (5) del condensador (6). Este diagrama se instala en el plano focal anterior del condensador (6) y puede variar su abertura numérica. El diagrama iris (3) dispuesto junto al colector (2) es el diafragma de campo. La variación del diámetro del diafragma de campo permite obtener su imagen igual al campo visual lineal del microscopio. La abertura numérica del condensador (6) supera, generalmente la de la abertura del objetivo microscópico. El objeto (7) se proyecta por el objetivo(8) en el plano del diafragma de campo (10), que coincide con el plano focal anterior del ocular (11). La pupila del ojo del observador se hace coincidir con la pupila de salida del microscopio (12). Para el ojo normal los haces de rayos después del ocular son paralelos. El haz de rayos de una fuente de luz con iluminancia irregular (la espiral de una lámpara incandescente) asegura con el sistema de iluminación uniforme del campo visual a merced de que los diafragmas de campo (3) y (10) son conjugados, así como también los son los diafragmas de abertura (5) y (9) del condensador y del microscopio.

Elevando o bajando el condensador puede alterarse el plano del foco de la luz y elegirse una posición que consiga el foco preciso. El condensador tiene también un diafragma iris, que controla el diámetro del círculo de luz que pasa por el sistema.

Lo que se busca con este diafragma iris no es controlar la intensidad de la luz que alcanza el objetivo, sino asegurar que la luz que pasa por el sistema condensador ocupe justamente el objetivo. El diafragma iris es demasiado grande, parte de la luz pasará no solo al objetivo sino también alrededor de él, y no se utilizará. Si la luz es demasiado brillante, no deberá reducirse alterando la posición la posición del condensador o del diafragma iris sino usando filtros de neutralización, o disminuyendo el voltaje de la lámpara. Nunca se insistirá lo suficiente en que el ajuste apropiado de la luz es crucial para la buena microscopía, especialmente a los mayores aumentos.

Figura 11.- Condensador, Diafragma y Perilla del Diafragma.



Figura 12.-Parte inferior del condensador: abertura regulable, o diafragma controlado por una palanca lateral. Controla el abrir y cerrar del diafragma.



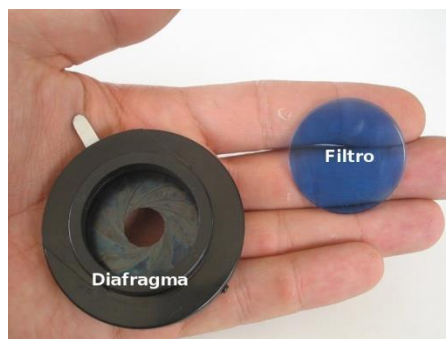


Figura 13.-Filtros coloreados o de luz natural.

Los tornillos macro/micrométrico están engarzados en la platina que soporta las muestras por medio de un mecanismo de cremallera y se utilizan para subir o bajar dicha platina (acercarla o alejarla del objetivo) con el fin de enfocar la imagen que se forma en el ocular. El tornillo micrométrico maneja un engranaje de paso corto, especialmente para movimientos de gran amplitud y largo recorrido, mientras el tornillo micrométrico controla un engranaje de paso corto, especial para movimientos de pequeña amplitud y pequeño recorrido y se utiliza para el enfoque fino de la imagen. ⁴



Figura 14.- Tornillo Micrométrico y Macrométrico.

MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.

En este microscopio se utilizan electrones en vez de rayos de luz, y como lentes funcionan unos electroimanes. Cuando los electrones pasan a través de una preparación algunos son difractados creando entonces una imagen que se hace visible en una pantalla sensible a los electrones. La longitud de onda de la radiación de los electrones es mucho más pequeña que la luz visible y como el poder resolutivo de un microscopio es inversamente proporcional a la longitud de

onda utilizada, la resolución obtenida con el microscopio electrónico es mucho mayor que la conseguida con el microscopio óptico.

Mientras que con el microscopio óptico ordinario o el de contraste de fases las estructuras más pequeñas que pueden observarse tienen unos 0.2 micrómetros, con el microscopio electrónico pueden verse fácilmente objetos de 0.001 micrómetro. Con el microscopio electrónico es posible ver muchas sustancias incluso de tamaño molecular. Sin embargo a causa de la naturaleza de este instrumento sólo pueden examinarse objetos muy delgados.

Para preparar muestras para el microscopio electrónico se necesitan técnicas especiales de cortes ultrafinos. Para seleccionar las células primero deben ser fijadas y deshidratadas, realizándose habitualmente este último transfiriendo las células a un disolvente orgánico. Después de la deshidratación, la muestra es incluida en plástico y en este plástico se cortan secciones finas utilizando un ultramicrotomo, por lo general equipado con una cuchilla de diamante.

Para obtener suficiente contraste, las preparaciones se tratan con colorantes especiales de la microscopia electrónica, tales como ácido ósmico, permanganato, uranio, lantano, o plomo. Estos materiales están compuestos por átomos de elevado peso molecular y por ello, dispersan bien los electrones. Las estructuras celulares teñidas con uno de esos materiales presentan un contraste muy aumentado y por tanto se ve mejor.

Otro modo de conseguir contraste con el microscopio electrónico es la tinción negativa, se aplica el mismo principio que el de la tinción negativa del microscopio óptico. Se utilizan unas sustancias que no penetran la estructura pero que dispersan los electrones. Una de las tinciones negativas más comúnmente utilizadas en la microscopia electrónica se realiza con ácido fosfotúngstico (fosfotúngstico), para examinar directamente al microscopio electrónico.

Otra técnica de la microscopia electrónica recientemente desarrollada es la de criocorrosión que evita la formación de artefactos al eliminar la fijación química y la inclusión. La muestra que se va a examinar es congelada sin tratamiento químico y el bloque congelado se corta con una cuchilla de diamante, de tal modo que se eliminan porciones de las superficies de las células. Se hacen y se examina entonces replicas en carbono de esas superficies, pudiéndose observar estructuras superficiales o internas de las células. La mayoría de las estructuras celulares vistas en secciones ultrafinas de preparaciones fijadas químicamente se ven también en materiales congelados, lo que sugiere que esas estructuras no son artefactos.

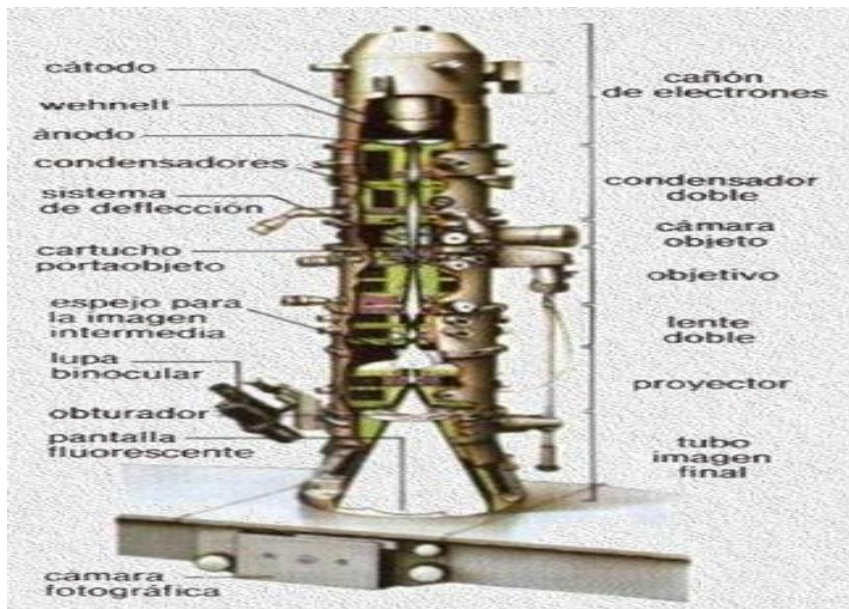


Figura 15.- Microscopio Electrónico.

Microscopio electrónico de transmisión.

El microscopio electrónico de transmisión emite un haz de electrones dirigido hacia el objeto cuya imagen se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan o son absorbidos por el objeto y otros lo atraviesan formando una imagen aumentada de la muestra. Para utilizar un microscopio electrónico de transmisión debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar la imagen de un objeto hasta un millón de veces.

Microscopio electrónico de barrido (MEB).

En el microscopio electrónico de barrido (MEB) la muestra es recubierta con una capa de metal delgado, y es barrida con electrones enviados desde un cañón. Un detector mide la cantidad de electrones enviados que arroja la intensidad de la zona de muestra, siendo capaz de mostrar figuras en tres dimensiones, proyectados en una imagen de TV. Su resolución está entre 3 y 20 nm, dependiendo del microscopio. Permite obtener imágenes de gran resolución en materiales pétreos, metálicos y orgánicos. La luz se sustituye por un haz de electrones, las lentes por electroimanes y las muestras se hacen conductoras metalizando su superficie.⁶

REFERENCIAS.

- 1.- Short Teri. Virus Estudio Molecular con Orientación Clínica. 1ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009
- 2.- Romero Cabello Raúl, Microbiología y Parasitología Humana, 3ª ed. México: Panamericana; 2007.
- 3.- García J, Rodríguez J, Picazo J, Microbiología Medica 2. 1ª ed. España: Harcourt Brace; 1998, 437 p.
- 4.- Collard Patrick. El desarrollo de la Microbiología. 1ª ed. España: Editorial Reverte; 1985, 160 p.
- 5.- Romero Cabello Raúl, Microbiología y Parasitología Humana, 3ª ed. México: Editorial Panamericana; 2007
- 6.- Koneman E, Allen S. Diagnostico Microbiológico. 6ª ed. Buenos aires: Medica Panamericana; 2008, 1696p.

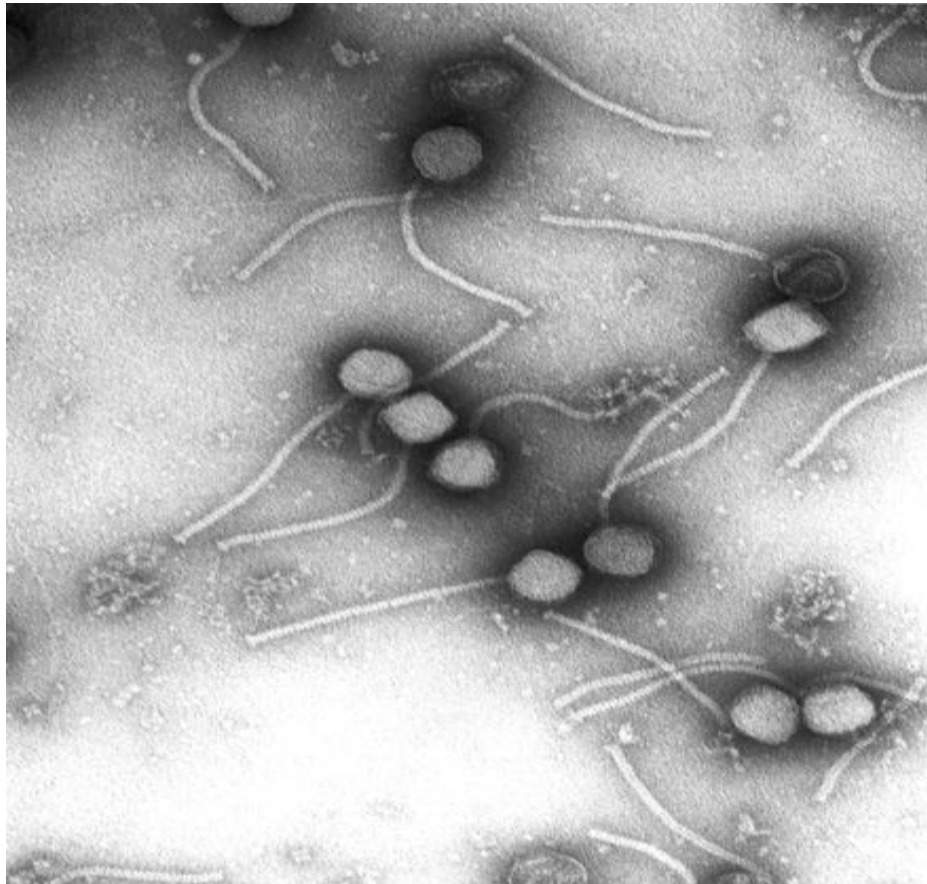


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



PRÁCTICA 5

TITULACIÓN DE BACTERIOFAGO T 7



PRÁCTICA 5

TITULACIÓN DE BACTERIOFAGO T 7

OBJETIVO.

- Demostrar que los virus requieren de una célula metabólicamente activa para multiplicarse.
- Conocer que la multiplicación del virus origina lisis celular.
- El alumno comprenda que la multiplicación viral puede utilizarse para cuantificar las partículas infecciosas.

INTRODUCCIÓN.

El ensayo de placas es un ensayo cuantitativo que permite determinar la cantidad de virus presente en una muestra dada. Se usa para cuantificar el número de virus en una reserva viral o, en los experimentos de crecimiento de un paso, la cantidad de virus que hay en un momento determinado. En resumen, se infectan las monocapas celulares con diluciones seriadas de potencia 10 de un virus. Cuando la partícula viral infecta una célula, se replica y la destruye, lo cual origina una placa. La monocapa de células infectadas generalmente es cubierta con agarosa para restringir el movimiento de los virus nuevos que se liberan. De tal modo, durante la replicación, los virus nuevos solo pueden infectar a las células circulantes, las cuales también son destruidas, Al cabo de varios ciclos de replicación, se forman un área o placa de células muertas.

Las placas se visualizan mediante la tinción de las células con colorantes como el rojo neutro o el violeta cristal. Teóricamente, cada virus en el inóculo original genera un área clara (placa) o una unidad formadora de placa (UFP). En otras palabras un ensayo de placa mide la inefectividad. Sin embargo, es posible que las partículas virales presentes en una muestra dada no sean infecciosas. Entonces más específicamente, un ensayo de placas mide solo el número de partículas infecciosas en una muestra, no el número total de partículas.¹



Figura 1.- Ensayo de placas que se uso para cuantificar una reserva de virus. Después de la incubación, se elimino el medio líquido de las células infectadas y la monocapa de células no infectadas se tiño con una solución de cristal violeta y etanol. Las áreas claras (células infectadas y muertas) representan placas. Obsérvese que las diluciones seriadas se agregaron a una monocapa de células confluentes.²

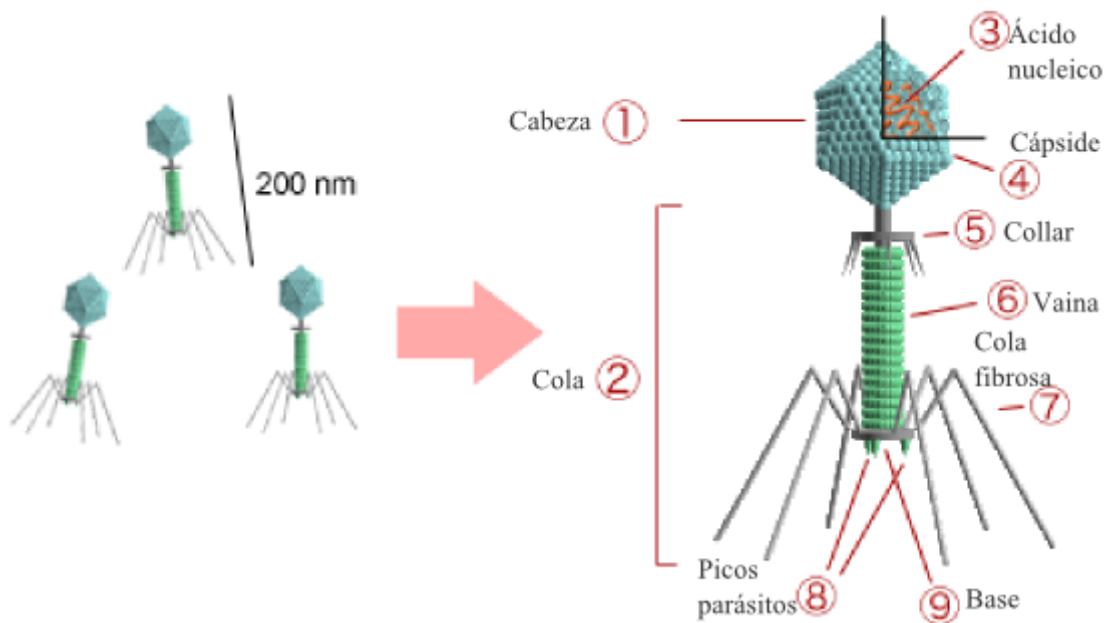


Figura 2.- Estructura del bacteriófago T7.

Titulación de Virus por unidades infecciosas en cultivos celulares

Para titular un virus, primero hay que definir muy bien las lesiones que producen, estas lesiones pueden ser:

- Lisis (mayoría de los virus)
- Fusión (virus sincitiales)
- Agigantamiento (por ejemplo linfocistis)
- Proliferación (virus retro)

Después hay que definir el huésped donde se producen las lesiones, históricamente las lesiones se producían en embriones de pollo(membrana alantoidea) o en ratones recién nacidos, y estos métodos todavía se utilizan cuando no hay otro remedio. Se prefiere utilizar cultivos celulares, ya que se pueden manejar más fácilmente y son mas reproducibles. Existen dos métodos para titular un virus: por unidades formadoras de placa (UFP), aplicable solo a cultivos celulares y por diluciones hasta el 50% del punto final dosis infectante en cultivo de tejidos aplicable tanto a cultivos celulares, como in vivo. En el método de UFP, varias monocapas celulares se infectan con diluciones seriadas de la suspensión de virus. Después de 1-2 horas, se lavan las monocapas y estas se cubren con un medio viscoso (agar metilcelulosa, fibrinógeno-trombina). Allí donde un virus ha infectado a una célula, aparece al cabo de 2-3 ciclos de infección una placa visible (generalmente de lisis) resultante de la infección de las células adyacentes a la inicialmente infectada. El medio semisólido evita que las nuevas partículas virales se difundan por toda la monocapa. El requisito para que este método funcione es que las células infectadas deben poderse distinguir claramente de las no infectadas. Por ejemplo, que se destruyan, que se separen de la superficie, que se tiñan distinto, etc. El método más utilizado es o bien el de retirar el medio semisólido y teñir las monocapas con un colorante citológico, o bien usar rojo neutro como colorante vital. Una vez teñidas, las placas infectadas pueden contarse fácilmente y el título expresarse en unidades formadoras de placa por mililitro. Existe una relación directa entre el numero de virus en la suspensión inicial y el numero de placas resultante.

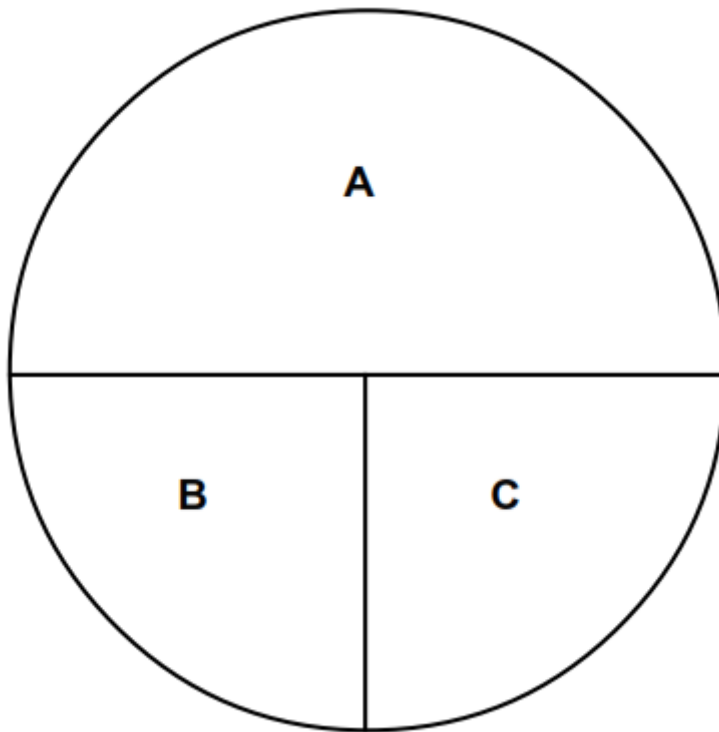
En el método de diluciones hasta el 50 % del punto final, las monocapas u organismos se inoculan con diluciones seriadas de la suspensión viral. Después de incubar para la multiplicación del virus, el punto final es la última dilución que da un efecto citopático positivo. El título se calcula suponiendo que la última dilución que ha dado un efecto citopático positivo contiene una unidad viral infectiva. Debido que el efecto observado depende estadísticamente de cada serie de diluciones del virus. ³

MATERIAL.

- Una suspensión de bacteriófago T7 con título 2×10^4 bacteriofagos /mL
- 5 ml de cultivo de *E.coli* con densidad de $3-5 \times 10^8$ bacterias/mL
- Agar nutritivo
- 3 pipetas estériles de 0.1 mL

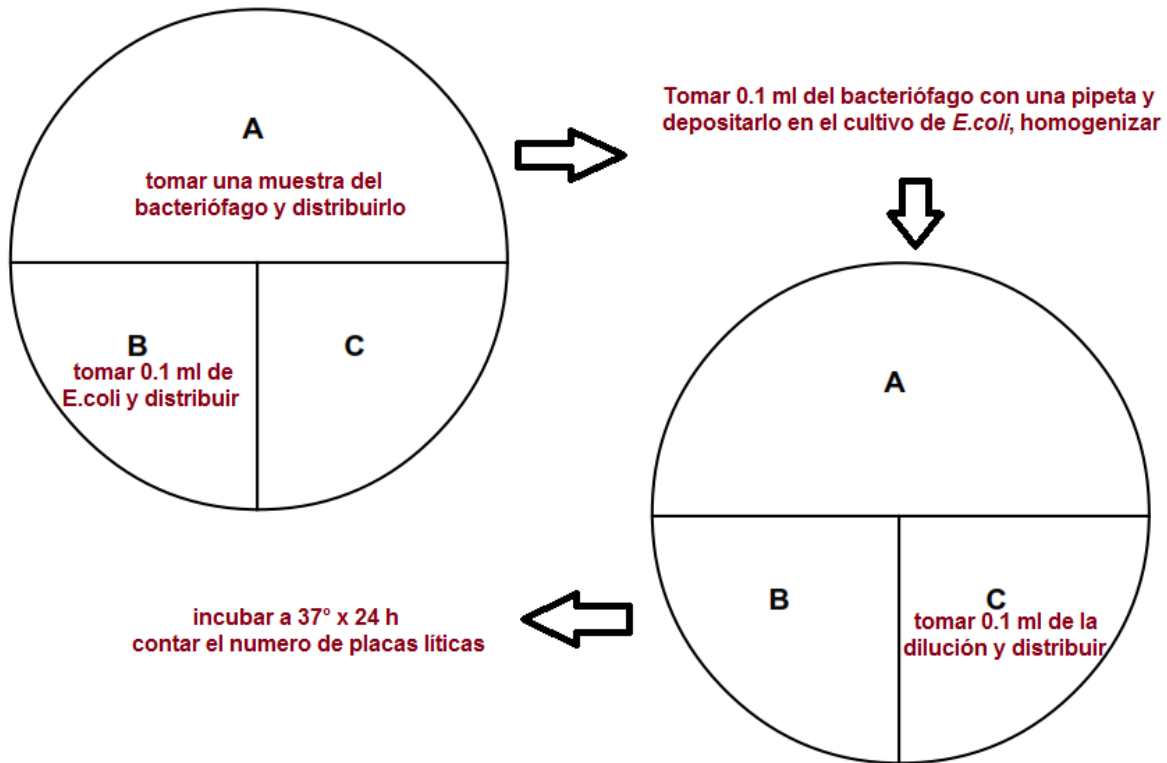
MÉTODO.

1. Dividir la caja petrí en tres secciones



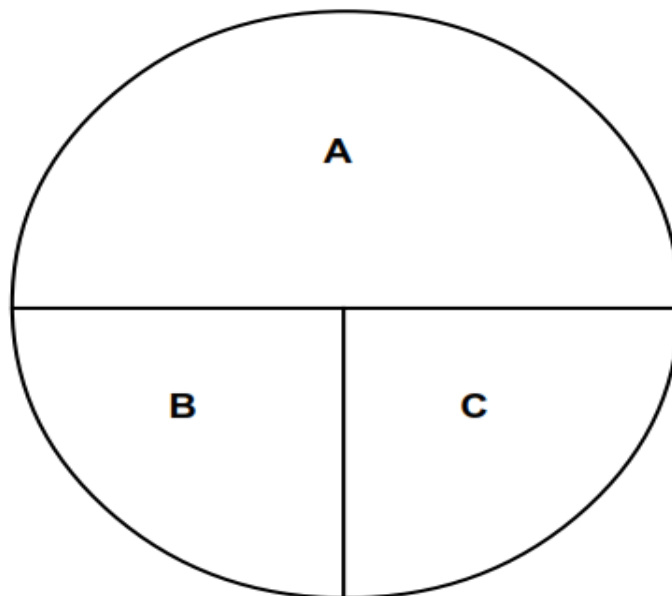
- Con una pipeta tomar una muestra de la suspensión del bacteriófago distribuirlo en la zona A.
- Tomar con otra pipeta 0.1 mL del cultivo de *E.coli*, distribuir en la sección B y dejar secar
- Tomar 0.1 mL del bacteriófago con una pipeta y depositarlo en el cultivo de *E.coli*, homogenizar. Ahora la concentración de bacteriófagos en el cultivo de *E.coli* es de 4×10^2 bacteriofagos/mL. (se hizo una dilución 1:50, se diluyó 1,50 veces)
- Tomar 0.1 mL de esta dilución y sembrar homogéneamente en la zona C de la caja Petri.

- Incubar a 37°C x 24 h.



RESULTADOS.

- Contar el número de placas líticas.
- Calcular la concentración de bacteriófagos/mL de la suspensión original (sobre la base de sus resultados y multiplicar x 500)



GUÍA DE ESTUDIO.

- Estructura del Bacteriófago T7
- Titulación de Virus
- Técnicas de cuantificación viral
- Utilidades de los bacteriófagos
- Fenómenos de Twort y Herelle

CUESTIONARIO.

- 1.- Dibuje la estructura de un bacteriófago.
- 2.- Describa los pasos de infección de un fago a una bacteria.
- 3.- ¿Qué importancia tiene el ensayo de placas?
- 4.- ¿Cuál es el fundamento del ensayo de placas líticas?
- 5.- Mencione algunos colorantes que se utilizan para la observación de placas.
- 6.- ¿Cómo se observaran las unidades formadoras de placas?
- 7.- ¿Cómo se cuantifica el número total de partículas infecciosas?
- 8.- Mencione otros bacteriófagos T de importancia clínica.
- 9.- ¿Que es la fagoterapia?
- 10.- Mencione otras técnicas para cuantificar virus.

ANEXO DE LA PRÁCTICA 5. TITULACIÓN DEL BACTERIOFAGO T7

Los bacteriófagos tienen estilos de vida alternativos: fagos líticos y fagos atemperados.

Los bacteriófagos se adsorben a las moléculas receptoras de la superficie de las células bacterianas durante el primer paso de la infección. Los receptores pueden ser pili, proteínas, oligosacáridos o lipopolisacáridos del huésped. Estructuras especializadas como las fibras de la cola median la adsorción. El bacteriófago T4 tiene cola y anclas de las fibras de esta en los receptores lipopolisacáridos de su huésped. Esto causa un cambio conformacional que lleva a la contradicción de la vaina de la cola y a la penetración de la membrana celular y del bacteriófago. El DNA es luego inyectado en la célula del huésped a través del tubo de la cola.

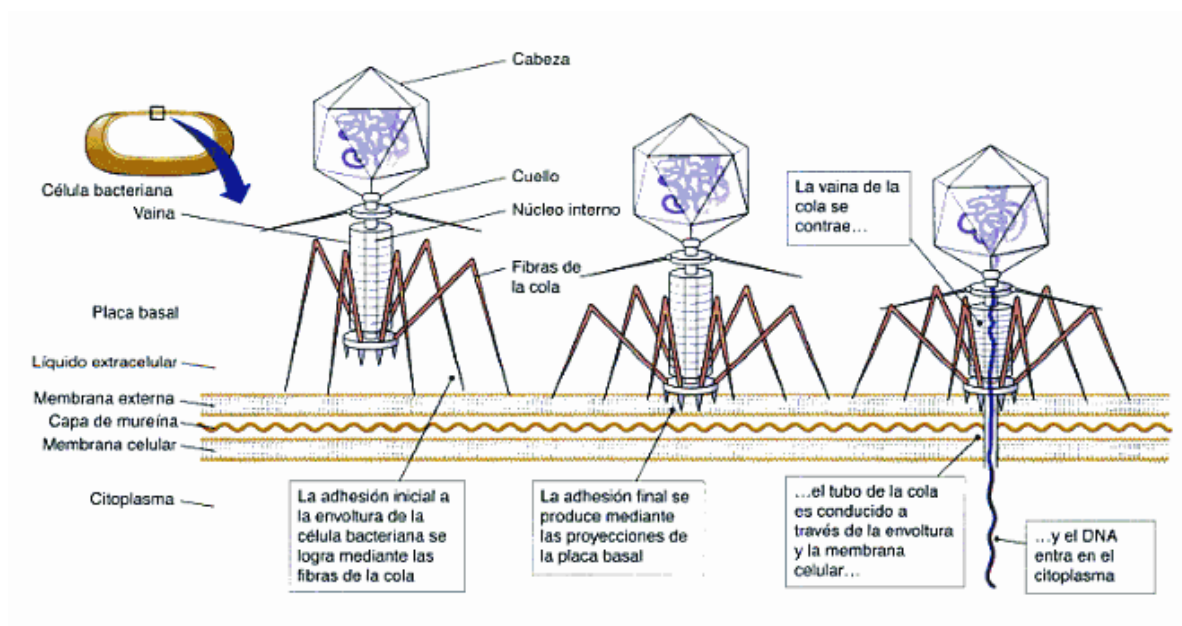


Figura 1 Bacteriófago T4 que está penetrando a través del receptor Omp C de la membrana externa de *E. coli* K12.

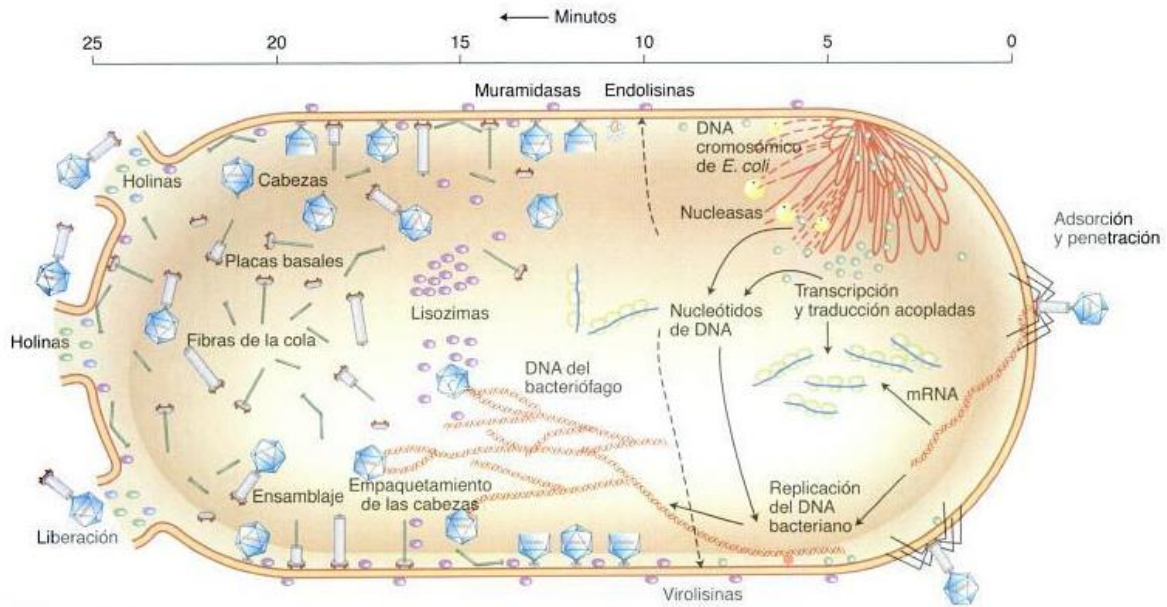


Figura 2.- Ciclo de infección lítica del bacteriófago T4 de *E.coli*.

Otros bacteriófagos pueden unirse a un segundo receptor. Los bacteriófagos que no tienen cola penetran en la bacteria huésped produciendo enzimas de polisacáridos, replica cada vez que la célula copia su DNA cromosómico durante la división celular. Cuando el genoma del fago se integra en un sitio en el cromosoma bacteriano, se le denomina profago. Algunos bacteriófagos atemperados codifican transposasas, las cuales permiten que el fago se inserte aleatoriamente en el cromosoma. Otros bacteriófagos se integran en localizaciones específicas dentro del cromosoma. Durante el estado de profago, todos los genes del bacteriófago están reprimidos, excepto el gen que codifica una proteína represora. La proteína represora impide la síntesis de enzimas y proteínas requeridas para el ciclo lítico.

Si el represor se torna inactivo (pierde su función), el DNA viral es eliminado del cromosoma bacteriano. El DNA separado (genoma del bacteriófago) actúa como un virus lítico capaz de producir nuevas partículas virales que se liberan durante la lisis celular. Esta inducción espontánea se produce una vez cada 10, 000 divisiones celulares, aproximadamente. Los bacteriófagos atemperados producen portan genes del huésped de una bacteria a otra en un proceso que se llama transducción.¹

REFERENCIAS.

- 1.- Julio Coll Morales. Técnicas de diagnóstico en virología. 1ª ed. Mexico: Editorial Diaz de Santos; 2001
- 2.- Short Teri. Virus Estudio Molecular con Orientación Clínica. 1ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009
- 3.- Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la Microbiología. 9ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana, 2007. 988p.

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La información y estructura en la que el manual de microbiología se encuentra es muy escaso, por lo que ameritaba una actualización y modificaciones de sus elementos, la búsqueda de información fue una parte fundamental para la mejora del antiguo manual. Al querer hacer más completo este nuevo manual se encontró que la información consultada para cada práctica era tan amplia que no se podía incluir toda en la introducción y por lo tanto esta se llevo un anexo.

Los anexos se diseñaron de tal manera que los alumnos puedan tener información disponible en cualquier momento al estar realizando la práctica, es decir se incluyen imágenes que permitan al alumno familiarizarse con nuevos procedimientos e información actualizada.

Las prácticas propuestas en este trabajo fueron diseñadas de acuerdo al material con el que cuenta el Laboratorio de Microbiología General II y también se considero la accesibilidad de las muestras. Es importante señalar que las dos practicas propuestas están sujetas al tiempo que se tiene para el modulo de Virología y al criterio de los profesores que imparten la materia, ellos plantearan el desarrollo de las mismas y cuando implementarlas.

CONCLUSIONES.

Se logró la reestructuración de las prácticas del manual del laboratorio de Microbiología General II, esto permitirá en un futuro facilitar la comprensión de cada práctica y mejorar el aprendizaje de los alumnos de 7º semestre de la carrera de QFB.

En este trabajo se logro modificar las prácticas existentes en el manual de Microbiología General II en el componente de virología incorporando: la introducción, esquemas, cuestionarios, guías de estudio, formatos de reporte y un anexo en cada práctica.

También se propusieron dos nuevas prácticas en el modulo de virología para que en un futuro se puedan realizar.

1.- Efecto Citopático

2.- Titulación del bacteriófago T7

REFERENCIAS.

- 1.-Short Teri, Virus Estudio Molecular con Orientación Clínica. 1ª ed. Buenos Aires: Medica Panamericana; 2009.
- 2.- Koneman E Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Diagnostico Microbiológico. 6ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2008.
- 3.-Acton J, Kucera L. Virología. 1ª ed. México: Iberoamérica; 1997.
- 4.-Prats G, Ausina V. Microbiología Medica Cuaderno de Practicas y Demostraciones. 1ª ed. Barcelona: Ediciones Doyma; 1993.
- 5.- Madrimasd.org, Comunidad de Madrid. Alberto Flores Bueno: 2008[actualizada el 29 de octubre del 2012]. Disponible en: <http://www.madrimasd.org/blogs/biocienciatecnologia/2008/04/29/90379>
- 6.- Microbiología e inmunología on-line [internet]. University of South Carolina: Murray et al., Microbiología, 3ra Ed., Capitulo 6 (citado el 5 de febrero de 2013). Disponible en: <http://pathmicro.med.sc.edu/spanish-virology/spanish-chapter1.htm>
- 7.- Publicaciones digitales DGSCA UNAM [internet]. Universidad Nacional Autónoma de México. (citado el 5 de febrero de 2013). Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap18/>
- 8.-Arbiza Juan. Biología de los Virus. 1ªed. Uruguay: Editorial Medica; 1997.
- 9.- Forbes B, Sahm D. Diagnostico microbiológico. 11ª ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2004.
- 10.- Catherine Brahic.Viruses short-circuit the deep-sea food chain.Newscientist [revista en internet]* 2008 Agosto [acceso 15 de enero de 2013]. Disponible en http://www.newscientist.com/article/dn14616-how-viruses-shortcircuit-the-deep-sea-food-chain.html?DCMP=ILC-hmts&nsref=news5_head_dn14616
- 11.- Prats Guillem. Microbiología Clínica. 1a ed. México: Editorial Panamericana; 2006.
- 12.- Davis B, Dulbeco H, Eisen H. Microbiology. 4a ed. London: J.B.Lippincott Company; 1990.
- 13.- Facultad de agronomía [internet]. Universidad de la República de Uruguay. (citado el 5 de febrero de 2013). Disponible en: <http://www.fagro.edu.uy/~microbiologia/docencia/materiales%20teoricos/2011/virus2011.pdf>

14.- Los materiales TIC de Lourdes Luengo [internet]. (Citado el 5 de febrero de 2013). Disponible en: http://www.lourdesluengo.es/animaciones/unidad16/ciclo_litico.swf

15.-Pumarola A, Rodriguez T. Microbiología y Parasitología Medica. 2ª ed. Barcelon