

18. Titulação viral em microplacas de 96 cavidades

1. Preparar o material: vírus, ponteiras, placas, placas de Petri, meio e microtubos.
2. Adicione 50µL de meio nos poços de uma placa de 96 cavidades.
3. Preparar as diluições. Geralmente utiliza-se 10^{-1} até 10^{-7} , porém de acordo com o vírus pode-se diluir mais ou menos.
4. Adicione 900µL de MEM em sete microtubos e identifique de -1 a -7.
5. Pipetar 100µL da solução de vírus a ser titulada e transfira para o tubo -1, agite no vórtex, pipete 100µL do tubo -1 e transfira para o tubo -2, agite no vórtex e assim por diante até a última diluição. Obrigatoriamente troque de ponteiras entre as diluições.
6. Adicione 50µL de cada diluição em uma coluna da placa (8 réplicas), iniciar pela maior diluição e seguir até a menor diluição (-7 até a -1).
7. Deixar uma linha como controle, sem adicionar vírus. Manter a placa à 4°C (gelo ou geladeira) e preparar as células (tripsinizar, ressuspender com meio + soro).
8. Adicionar 50µL de células em cada cavidade da placa e incubar por 96 horas na estufa de CO₂. A quantidade de célula a ser colocada em cada poço deve ser em torno de 20.000 células. Para completar o volume necessário, utilize MEM acrescido de 10% de soro (SFB ou equino).
9. Visualizar os efeitos citopáticos e anotá-los. A validação da técnica depende da ausência de efeitos citopáticos no controle celular e da diminuição do número de efeitos com a progressão da diluição.
10. Calcular o título.

15.1 Titulação viral TCID₅₀ - Método de Reed & Muench (1938)

Diluição	Réplicas	Poços		Acumulados		Soma (NI + I)	Porcentagem [NI/(NI + I)]x100
		NI	I	NI	I		
10 ⁻¹	8	0	8	0	41	41	41/41=100%
10 ⁻²	8	0	8	0	33	33	33/33=100%
10 ⁻³	8	0	8	0	25	25	25/25=100%
10 ⁻⁴	8	0	8	0	17	17	17/17=100%
10 ⁻⁵	8	2	6	2	9	11	9/11=81%
10 ⁻⁶	8	5	3	7	3	10	3/10=30%
10 ⁻⁷	8	8	0	15	0	15	0/15=0%
10 ⁻⁸	8	8	0	23	0	23	0/23=0%

NI – poços não infectados; I – poços infectados; Acumulados NI – somatório dos NI iniciando-se pela menor diluição; Acumulados I – somatório dos I iniciando-se pela maior diluição.

Índice= $(\% \text{ imediatamente superior a } 50\%) - 50\%$
 $(\% \text{ imediatamente superior a } 50\% - \% \text{ imediatamente inferior a } 50\%)$

Logo: $\frac{81 - 50}{81 - 27} = 0,57$

Esse índice é utilizado para o cálculo do título através da seguinte maneira: (log da diluição que infectou mais de 50% dos cultivos celulares) + (índice x – log do fator de diluição), teremos então; $(-5) + (0,57 \times -1,0) = -5,57$, desta maneira a diluição limitante capaz de infectar 50% do cultivos celulares será 10^{-5,57}. A recíproca deste número será o título viral por unidade de volume empregado para a realização da prova, ou seja 10^{5,57}TCID₅₀ em 50μL. Rotineiramente os valores são expressos em mililitros (mL), para isso deve-se multiplicar o valor obtido por 20, e assim teremos 20 x 10^{5,57}TCID₅₀/mL da suspensão viral, que é o equivalente a 2 x 10^{6,57}TCID₅₀ ou 10^{6,87}TCID₅₀/mL.

15.2 Cálculo de título viral simplificado

Núm. de efeitos	Subtrai	Adiciona
8		0,5
7		0,43
6		0,33
5		0,2
4	zero	zero
3	0,2	
2	0,33	
1	0,43	
0	0,5	

Fórmula: $20 \times 10^{\text{Dil} + x}$

Onde: Dil = diluição máxima onde foi visualizado ECP na diluição limitante,

X = número de poços positivos na maior diluição.

Multiplica-se por 20 para corrigir o título por 1mL, pois utilizou-se 50µL de cada diluição para realizar a técnica.

$$E : 20 = 2 \times 10 = 2 \times 10^1 =$$

$$\text{Log } 2 \times \log 10 = 0,301 + 1 = 1,301$$

Exemplo: 6 efeitos na diluição 10^{-4}

$$10^{4+0,33+1,301} = 10^{5,33} \text{DICC}_{50}/\text{ml}$$

15.3 Cálculo da diluição para uso em Soroneutralização (SN)

1.Divide-se o título viral em mL por 2000;

Exemplo:

Uma alíquota de vírus apresentou 5 poços na diluição 10^{-6}

Logo, 5 poços = 0,2 (tabela)

$$\text{Cálculo: } 20 \times 10^{6,2} = 2 \times 10^{7,2} = 10^{7,501} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$$

Se o título viral for expresso em número absoluto, este será aproximadamente 31.700.000TCID₅₀/mL. Este número deve ser dividido por 2000 (20 x100, onde 20 é o fator de correção para transformar o título de mL para 50 µL, e 100 é referente à quantidade de TCID₅₀ que desejamos por poço/por 50 µL). Temos então que a diluição deve ser feita de 1:15.850.

Fazendo isso, tem-se um total de 100TCID₅₀/50µL de solução.