

### **32. Soroneutralização para BVDV**

1. Inativar as amostras teste no banho-maria à 56°C por 30 minutos.
2. Organizar e preencher a ficha de controle com informações sobre o vírus, amostras de soro controle e identificações das amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatro primeiras colunas da primeira placa (1 até 4) para controle do vírus e de célula. Nestes poços adicione 50µL de meio.
4. Adicionar 60µL de meio nas linha A e B (colunas 5 até 12, na primeira placa, e em todas as linhas das demais placas). Nas demais colunas adicionar 50µL de meio.
5. Adicionar 40µL dos soros para testes somente nas linhas A e B. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o soro controle positivo e soro controle negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. A linha “A” permanecerá como controle de toxicidade do soro. Inicie a diluição do soro na linha “B”, transferindo 50µL da linha B para a linha C, e assim por diante até a linha H.
7. Realize a diluição do vírus BVDV-Singer. Baseado no título do vírus, prepare uma diluição com 100TCID<sub>50</sub>/50µL ou então 200TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 50µL do vírus em todos os poços da coluna 5 à 12, na primeira placa, e em todas as colunas das demais placas, com exceção da linha A (pois esta coluna servirá apenas para o controle de toxicidade).
9. A diluição final do soro na linha B será 1:5, na linha C é 1:10, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:320.
10. Para fazer a titulação do vírus utilizado no teste, faz-se 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionando 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das linhas 3, 2 e 1, respectivamente. Na coluna 4 adicione 50µL de meio.
11. Incubar as placas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 2 horas.
12. Durante o processo de incubação, prepare células MDBK. Tripsinize uma garrafa e ressuspensa em MEM + 5% soro equino. Uma garrafa de células confluenta de células

é suficiente para 4 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço. Opcionalmente, pode-se realizar a contagem das células, sendo adicionado 20.000 células por poço ou  $2 \times 10^6$  células por placa.

13. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.
14. Após 96 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado.
15. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:160 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 80.

**OBS.:**

- Embora a leitura seja realizada apenas no 4º dia, é importante que se acompanhe diariamente o crescimento celular e o aparecimento de efeito citopático nas placas.

### **33. Soroneutralização para herpesvírus bovino tipo 1 e 5**

1. Inativar as amostras teste no banho-maria à 56° por 30 minutos.
2. Organizar e preencher a ficha de controle com informações sobre o vírus, soro controle e identificações das amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatros primeiras colunas da primeira placa (1 até 4) para controle do vírus e de célula. As demais serão utilizadas para o teste das amostras
4. Adicionar 50µL de MEIO nas linhas B até H nas colunas utilizadas para o teste das amostras. Não coloque meio na linha “A” pois nestas será colocado apenas o soro teste e o vírus.
5. Adicionar 50µL dos soro-teste somente nas linhas A e B. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o soro controle positivo e soro controle negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. Inicie na linha B, transfira 50µL da linha B para a linha C, e assim por diante até a linha H. A diluição final do soro na linha A será 1:2, na linha B é 1:4, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:256.
7. Realize a diluição do vírus BoHV-1 Cooper. Baseado no título do vírus, prepare uma diluição com 100TCID<sub>50</sub>/50µL ou então 2000TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 50µL do vírus em todos os poços da coluna 5 à 12 da primeira placa, e em todas as colunas das demais placas.
9. Para fazer a titulação do vírus utilizado no teste, faz-se 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000, adicionando 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das linhas 3, 2 e 1, respectivamente. Na coluna 4 adicione 50µL de meio.
10. Incubar as placas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 2 horas.
11. Durante o processo de incubação, prepare células CRIB. Tripsinize uma garrafa e ressuspensa em MEM + 5%SBF. Uma garrafa de células confluenta de células é suficiente para 4 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço.

12. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.
13. Após 96 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado.
14. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:64 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 32.

### **34. Soroneutralização para herpesvírus equino**

1. Inativar as amostras teste no banho-maria à 56° por 30 minutos.
2. Organizar e preencher ficha de controle e identificação com informações sobre o vírus, soros controle e amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatro primeiras colunas (1 até 4) para controle do vírus e de célula.
4. Adicionar 50µL de meio nas linhas B até H.
5. Adicionar 50µL dos soros para testes somente nas linhas A e B. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o controle positivo e negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. Inicie na linha B, transfira 50µL da linha B para a linha C, e assim por diante até a linha H. A cada diluição substitua as ponteiros.
7. Realize a diluição da amostra viral. Baseado na titulação do vírus, dilua a sua amostra para obter 100TCID<sub>50</sub>/50µL ou então 2000TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 50µL do vírus em todos os poços da coluna 5 à 12.
9. A diluição final do soro na linha A será 1:2, na linha B é 1:4, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:256.
10. Fazer a titulação do vírus utilizado no teste. A partir da solução de vírus usada realize 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000.
11. Adicionar 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das linhas 3, 2 e 1, respectivamente.
12. Incubar as placas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 2 horas.
13. Durante o processo de incubação, prepare células RK-13. Tripsinize uma garrafa e ressuspensa em MEM + 5%SBF. Uma garrafa de células confluenta de células é suficiente para 3 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço.
14. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 120 horas.
15. Após 120 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os

controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:64 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 32.

### **35. Soroneutralização para cinomose (APPEL & ROBSON, 1973)**

1. Inativar as amostras de soro para teste no banho-maria à 56°C por 30 minutos.
2. Organizar e preencher a ficha de controle com informações sobre o vírus, soros controle e identificações das amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatro primeiras colunas (1 até 4) para controle do vírus e de célula. Nesses poços adicione 50µL de meio.
4. Adicionar 30µL de meio na linha A (coluna 5 até 12). Nas demais linhas adicionar 20µL de meio.
5. Adicionar 20µL dos soros para testes somente na linha A. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o controle positivo e negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. Transfira 20µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha H. A cada diluição substitua as ponteiros.
7. Realize a diluição do vírus. Baseado no título do vírus prepare uma solução com 100TCID<sub>50</sub>/20µL ou então 5000TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 20µL do vírus em todos os poços das colunas 5 à 12.
9. A diluição final do soro na linha A será 1:5, na linha B é 1:10, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:640.
10. Fazer a titulação do vírus utilizado no teste. A partir da solução de vírus usada realize 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000.
11. Adicionar 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das colunas 3, 2 e 1, respectivamente. Na coluna 4 adicione 50µL de meio.
12. Incubar as placas 60 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C e 60 minutos à temperatura à 4°C.
13. Durante o processo de incubação, prepare células MDCK. Tripsinize uma garrafa e ressuspensa em MEM + 5% SFB. Uma garrafa confluenta de células é suficiente para 4 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço.
14. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.

15. Após 96 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado.
16. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:160 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 80.



**36. Soroneutralização para adenovírus canino (BOHM et al., 2004)**

1. Inativar as amostras de soro para teste no banho-maria à 56°C por 30 minutos.
2. Organizar e preencher a ficha de controle com informações sobre o vírus, soros controle e identificações das amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatro primeiras colunas (1 até 4) para controle do vírus e de célula. Nesses poços adicione 50µL de meio.
4. Adicionar 30µL de meio na linha A (coluna 5 até 12). Nas demais linhas adicionar 20µL de meio.
5. Adicionar 20µL dos soros para testes somente na linha A. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o controle positivo e negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. Transfira 20µL da linha A para a linha B, e assim sucessivamente até a linha H. A cada diluição substitua as ponteiros.
7. Realize a diluição do vírus CAV-(cepa padrão). Baseado no título do vírus prepare uma solução com 100TCID<sub>50</sub>/20µL ou então 5000TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 20µL do vírus em todos os poços das colunas 5 à 12.
9. A diluição final do soro na linha A será 1:5, na linha B é 1:10, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:640.
10. Fazer a titulação do vírus utilizado no teste. A partir da solução de vírus usada realize 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000.
11. Adicionar 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das colunas 3, 2 e 1, respectivamente. Na coluna 4 adicione 50µL de meio.
12. Incubar as placas em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C por 60 minutos, seguida de mais 60 minutos à temperatura ambiente.
13. Durante o processo de incubação, prepare células MDCK. Tripsinize uma garrafa e ressuspensa em MEM + 5% SFB. Uma garrafa confluenta de células é suficiente para 4 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço.
14. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.

15. Após 96 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado.
16. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:160 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 80.

**37. Soroneutralização para coronavírus canino (PRATELLI et al., 2002)**

1. Inativar as amostras de soro para teste no banho-maria à 56°C por 30 minutos.
2. Organizar e preencher a ficha de controle com informações sobre o vírus, soros controle e identificações das amostras a serem testadas.
3. Utilize microplacas de 96 cavidades. Reserve as quatro primeiras colunas (1 até 4) da primeira placa para controle do vírus e de célula. Nesses poços adicione 50µL de meio.
4. Adicionar 30µL de meio na linha A (coluna 5 até 12 da primeira placa e em todas as colunas das placas de soro teste). Nas demais linhas adicionar 20µL de meio.
5. Adicionar 20µL dos soros para testes somente na linha A. Reserve os poços das colunas 11 e 12 para o soro controle positivo e soro controle negativo, respectivamente.
6. Com auxílio da pipeta multicanal dilua as amostras. Transfira 20µL da linha A para linha B, e assim sucessivamente até a linha H. A cada diluição substitua as ponteiros.
7. Realize a diluição do vírus CCoV-(cepa padrão). Baseado no título do vírus prepare uma solução com 100TCID<sub>50</sub>/20µL ou então 5000TCID<sub>50</sub>/mL.
8. Adicionar 20µL do vírus em todos os poços das colunas 5 à 12.
9. A diluição final do soro na linha A será 1:5, na linha B é 1:10, assim sucessivamente até a linha H onde a diluição será 1:640.
10. Fazer a titulação do vírus utilizado no teste. A partir da solução de vírus usada realize 3 diluições seriadas na base 10, ou seja, 1:10, 1:100 e 1:1000.
11. Adicionar 50µL de cada diluição em ordem decrescente em todos os poços das colunas 3, 2 e 1, respectivamente. Na coluna 4 adicione 50µL de meio.
12. Incubar as placas 90 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> à 37°C.
13. Durante o processo de incubação, prepare células CRFK. Tripsinize uma garrafa e ressuspenda em MEM + 5% SFB. Uma garrafa confluenta de células é suficiente para 4 placas. Prepare um volume de 5mL por placa e adicione 50µL em cada poço.
14. Incubar a placa na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> durante 96 horas.

15. Após 96 horas realizar a leitura do teste. Iniciar pelos soros controle e depois pela diluição do vírus. Somente deve ser considerado válido o teste quando os controles e a diluição do vírus estiverem de acordo com o esperado.
16. O título neutralizante será dado pela recíproca da maior diluição capaz de inibir o aparecimento de efeito citopático. Por exemplo: a diluição 1:160 do soro#1 possui efeito citopático, então o título de anticorpos neutralizantes será 80.