

16. Titulação viral por PFU

CRISTAL VIOLETA C/FORMALINA (ensaio de placa).
62,5ml formol 37-40%, 0,65g cristal violeta, 500ml água destilada

1. Com 24h de antecedência, preparar uma placa com células susceptíveis. Para vírus que produzem placas grandes utilizar placas de 6 cavidades e placas de 24 para vírus que fazem placas pequenas.
2. Diluir o vírus na base 10 de acordo com o título esperado, geralmente 10^{-1} até 10^{-7} (ou seja 900µL de meio e 100µL de vírus).
3. Remover o meio de cultivo e adicionar o 200µL de cada diluição em duplicada na placa.
4. Incubar por 1 hora à 37°C na estufa de CO₂.
5. Adicionar 1 mL de 1,6% carboximetilcelulose em cada poço, para placas de 24 cavidades e 2mL para placas de 6 cavidades. Obs.: Pode ser realizado com agar a 1%.
6. Incubar na estufa de CO₂ por 48 ou 72 horas dependendo do vírus.
7. Adicionar 10% formalina até preencher o poço, sem remover a carboximetilcelulose. Deixar fixar por pelo menos 2 horas. Lavar com água corrente até remover todo o resíduo de carboximetilcelulose.
8. Corar com 0.35% de cristal violeta durante 2 horas (mínimo). Lavar com água corrente e deixar secar a temperatura ambiente ou na estufa à 37°C.
9. Com auxílio de um estereoscópio (ou lupa) contar as placas virais presentes na maior diluição (área azul indica células vivas e placas brancas não coradas são resultado da replicação viral).
10. Calcular o título viral da seguinte forma:

Título PFU/mL = média das placas na maior diluição x diluição x 5 (corrigir para mL)

	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Réplica	incontáveis	incontáveis	incontáveis	83	19	0
Réplica	incontáveis	incontáveis	Incontáveis	89	15	0
Média				86	17	0

Título = $17 \times 10^6 \times 5 = 85 \times 10^6$ ou então 8.5×10^7 PFU/mL