

ANEXO IV

SERONEUTRALIZACION PARA VDVB

La prueba de seroneutralización para la detección de Ac contra VDVB emplea el método Suero variable-virus fijo: donde diluciones variables de sueros problema (seriadas base 2 o base 4) se enfrentan a una cantidad establecida y fija de virus (100 DICT50). La mezcla suero-virus se coloca en un sistema susceptible a la infección por BDV, en este caso células de línea MDBK.

El título neutralizante del suero se establece por el método de Reed y Muench (virus fijo - suero variable), siempre que se haya dado conformidad al ensayo.

MATERIALES

- Placas de Cultivo de NOVENTA Y SEIS (96) pocillos, estériles
- Tips amarillos (hasta 200µl)
- Tips azules (hasta 1000 µl)
- Tubos plásticos cónicos de 1500 µl
- Tubos cónicos de 50 ml
- Frascos de vidrio con tapa a rosca (GIBCO o similar)
- Pipetas de vidrio estériles de 5-10 ml
- Cubetas descartables
- Descarte
- Bolsas de autoclave verdes
- Papel absorbente.

EQUIPOS

- Micropipeta monocal, hasta 200µl (tolerancia admitida 5)
- Micropipeta monocal, hasta 20µl (tolerancia admitida 5)
- Micropipeta monocal, hasta 1000 µl (tolerancia admitida 10)
- Micropipeta multicanal 8 hasta 1000 µl. Sin restricciones respecto a la tolerancia
- Micropipeta multicanal 12. Sin restricciones respecto a la tolerancia
- Propipeta (Pipetaid, Drummond Scietific Co. O equivalente)
- Incubadora de 37°C y 5% CO₂

- Cabina de seguridad biológica
- Baño termostático (temperatura a $56 \pm 3^{\circ}\text{C}$)
- Heladera $4-8^{\circ}\text{C}$
- Microscopio óptico invertido

REACTIVOS

- Suspensión de células MDBK: con una concentración de 250.000 cel./ml, (rango 200.000-280.000).
- MEM-E
- Suero Fetal Bovino (SFB): controlado (libre de micoplasmas y endotoxinas y probado en cultivos celulares), fraccionado en alícuotas de 10 ± 2 ml y 20 ± 2 ml y conservado a $-20 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Su fraccionamiento debe registrarse con un N° de PR (lote interno).
- Antibiótico 100X

Penicilina sódica G	10,025gr
Sulfato de Streptomina	33,35gr
Gentamicina SO4	25g
PBS (10X)	50ml
Agua destilada c.s.p.	5 litros

Una vez disuelto se esteriliza por filtración (0.22 μm) y se almacena a $-20^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

La fracción en uso se conserva a $4-8^{\circ}\text{C}$. Se adiciona 10 ml de ATB por cada litro de medio de trabajo.

- Virus de trabajo: BDV citopático tipo 1 A - Cepa de Referencia Singer, NADL o cepas autóctonas antigénicamente similares.

CONTROLES

Control Positivo Cobayo: Suero de cobayo vacunado con vacuna conteniendo VDVB de título 10^7 DICT50/dosis o mayor.

Control Negativo Cobayo: Pool de sueros normales de cobayo (sueros de cobayos preinmunización).

Estándar Positivo: Suero de título conocido.

Estándar negativo: Suero normal de cobayo.

PROCEDIMIENTO

SUSPENSION CELULAR

Se necesitan 10 ml de suspensión celular con 250.000 cel./ml por placa.

Una vez que se recibe la suspensión se realiza el recuento celular, si la suspensión contiene menor cantidad de células, ésta se concentra por centrifugación a 1000 rpm, 5 minutos y se elimina el sobrenadante excedente. Si la suspensión contiene más células se diluye con medio de trabajo. Una vez realizado el ajuste se repite el recuento, el rango admitido va desde 200.000-280.000 cel/ml. Una vez ajustada la suspensión se mantiene a temperatura ambiente bajo agitación suave en agitador magnético.

Fórmula a utilizar para el ajuste:

$\text{vol final} = \text{conc inicial} * \text{vol inicial} / 250.000 \text{ cel/ml}$

INACTIVACION DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suero, deben ser inactivadas, previo a su siembra, en baño a $56 \pm 3^\circ\text{C}$, durante 30 ± 5 minutos.

PREPARACION DEL MEDIO DE TRABAJO

El medio de dilución de las muestras y del virus, se prepara a partir del MEM-E + 1% de ATB + 2% de SFB.

ENSAYO DE SERONEUTRALIZACION SUERO VARIABLE-VIRUS FIJO

- Colocar 75 μl /pocillo de medio en todas las placas a utilizar.
- Diseño de la placa de los sueros problema: Agregar 25 μl de la muestra problema, por cuadruplicado, (Fila A o Fila E pocillos 1-4; 5-8; 9-12, respectivamente), ver Figura 1.
- Se comienza desde una dilución mínima de 1/4 que sumado al volumen de virus y células queda en una dilución inicial de 1/8.
- Incluir en forma aleatoria entre las muestras a analizar estándares de título conocido.
- Diseño de la placa control: Se colocan los sueros control positivo y negativo del mismo modo que las muestras. Para realizar el control de células se colocan 150 μl de medio de trabajo por cuadruplicado en cuatro filas (DIECISEIS (16) pocillos totales). Para el control de las 100 DICT de virus, se realizan TRES (3) diluciones en base 10 a partir de la dilución de trabajo. Se siembran 100 μl por cuadruplicado de las 4 diluciones preparadas (ver Figura 2).
- Realizar diluciones en base 4, pasando 25 μl , descartando los últimos 25 μl para todas las muestras y sueros controles.
- Se realiza un control de toxicidad de cada muestra colocando 75 μl de medio en otra placa.
- Preparar la dilución de trabajo de virus (100 DICT) en el medio de trabajo. Preparar el volumen necesario para todas las placas del ensayo considerando que se necesitan 8 ml de virus por placa.
- Una vez preparada la dilución de trabajo del virus, se deben realizar tres diluciones en base 10 (-1, -2 y -3) de la misma. Para ello colocar 900 μl de medio en tres tubos de 1.8 ml (1-2-3). Agregar 100 μl de la suspensión de virus de trabajo en el tubo 1: (dil -1 ó 1/10), sin tocar el medio con el tip, homogeneizar por vortex, cambiar el tip, tomar 100 μl de esta dilución y transferir al tubo 2,

nuevamente sin que el tip toque el medio, (dil -2) homogeneizar, descartar el tip y transferir 100µl al tubo 3 (dil -3).

- Colocar 75µl de la dilución de trabajo del virus en todas las placas, excepto en la placa de controles de toxicidad, en el control de células y en el control de 100 DICT.
- En la última placa colocar donde se colocaron los controles de suero positivo y negativo, incluir la titulación del virus de trabajo para verificar que contenga las 100 UFF. Para ello colocar 4 réplicas de 75µl de cada dilución (tubos 1, 2 y 3), comenzando de la más diluida a la más concentrada -3, -2, -1, puro (ver diseño de placa control).
- Incubar las placas (mezcla suero-virus) durante 1 hora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al $5 \pm 1\%$.
- Agregar sobre la mezcla suero-virus 100µl por pocillo, de la suspensión celular conteniendo 250.000 cel./ml en todas las placas.
- Incubar las placas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 al $5 \pm 1\%$, durante 48-72 hs.

LECTURA E INTERPRETACION

LECTURA

- Al cabo de las 48-72 hs. la lectura se realiza por inspección de las monocapas al microscopio óptico.

- La lectura es por observación de efecto citopático. Se considera positivo aquel pocillo que presente un foco de CPE característico de VDVB. En los controles de toxicidad se debe observar la monocapa igual que los controles de células.

ACEPTACION DEL ENSAYO (CONFORMIDAD)

El ensayo se considera conforme cuando:

1. Las monocapas de los controles de células se encuentran en buen estado (MC confluentes, células refringentes, sin alteraciones morfológicas, sin rastros de contaminación y sin CPE de VDVB).
2. El título de la suspensión viral debe contener 100 DICT 50, con un rango admitido entre 50-150 DICT, ver Tabla 1.
3. El control positivo debe dar el título esperado ± 1 pocillo. Ejemplo: $2.30 < 2.4 < 2.50$
4. El control negativo debe dar negativo. Se le coloca un valor arbitrario de 0.6 para los cálculos.

Figura 1. Diseño de placa de sueros problema

Placa N°	100ul de Suspensión de células en todos los pocillos (250.000 cel/ml)												diluciones
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Muestra 1				Muestra 2				Muestra 3				8
B													32
C													128
D													512
E	Muestra 4				Muestra 5				Muestra 6				8
F													32
G													16
H													128
	Virus 100 DICT				Virus 100 DICT				Virus 100 DICT				512

Nota: Para el control de toxicidad de los sueros, una replica de cada dilución de los mismos deberá enfrentarse a la suspensión celular en una placa aparte.

Figura 2. Diseño de placa Control

Tabla 1. Titulación de las 100 DICT de la suspensión de virus de trabajo

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	-	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
DICT	50			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	-	-
4	+	+	-	-
DICT	100			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	-	-
DICT	150			

dil→	PURO	-1	-2	-3
1	+	+	+	-
2	+	+	+	-
3	+	+	+	-
4	+	+	+	-
DICT	200			

INTERPRETACION

El título neutralizante del suero analizado se obtiene según la cantidad de replicadas protegidas en las diluciones seriadas en base al método de interpolación de Reed y Muench.

Tabla 2. Titulación de Ac en microplacas (log 10)

Pocillos Protegidos	1/8	1/32	1/128	1/512	1/2048	1/8192	1/32768	1/131072
1	0.70	1.30	1.90	2.50	3.10	3.70	4.30	4.90
2	0.90	1.50	2.10	2.70	3.30	3.90	4.50	5.10
3	1.10	1.70	2.30	2.90	3.90	4.10	4.70	5.30
4	1.20	1.80	2.40	3.00	4.10	4.20	4.80	5.40