

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA

Madrid, 27 – 29 de junio de 2011

CEPAS DE REFERENCIA DE VIRUS DE PECES

Pilar Fernández Somalo
Dpto. Ictiopatología

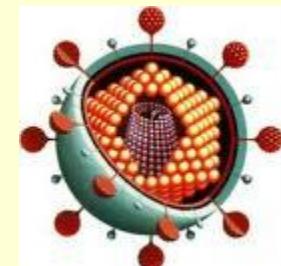
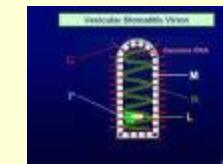
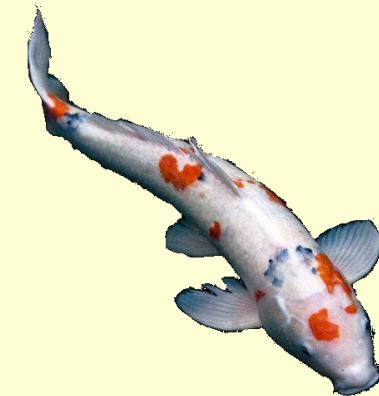
LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (ALGETE)

Laboratorio Central de Veterinaria

LCV

INTRODUCCIÓN

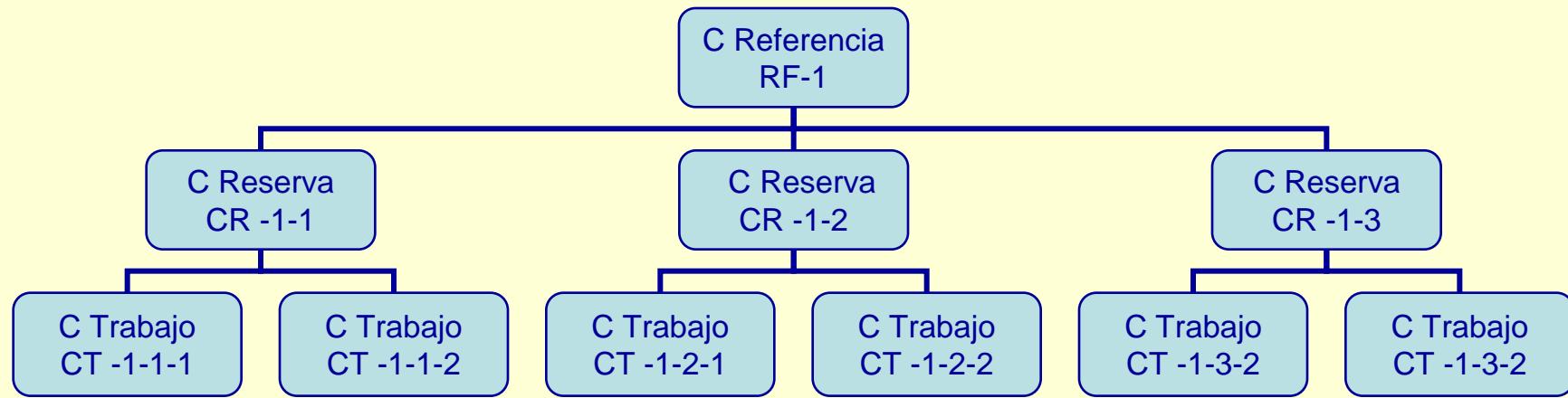
- El presente procedimiento tiene por objeto describir el registro, la propagación, conservación y control de cepas víricas de referencia de las principales enfermedades de peces.
 - **VHS** Septicemia Hemorrágica Viral
 - **NHI** Necrosis Hematopoyética Infecciosa
 - **NPI** Necrosis Pancreática Infecciosa
 - **VPC** Viremia Primaveral de la Carpa
 - Etc..





CULTIVOS DE REFERENCIA

- **Término colectivo que se refiere a:**
- **Cepas de referencia:** Microorganismos definidos por lo menos a nivel de género y especie, catalogados y descritos según características y preferiblemente de origen conocido.
[ISO 11133-1:2000] Normalmente obtenidos de una colección nacional o internacional reconocida.
- **Cepas de reserva:** Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.
- **Cepas de trabajo:** Subcultivos obtenidos de una cepa de reserva.





Cepas de Referencia

- Adquisición
- Registro
- Reconstitución
- Alicuotado
- Identificación
- Titulación

Adquisición Cepa RF

- ❖ **Laboratorio Europeo de Referencia para Enfermedades de los Peces**
 - ❖ Solicitud expresa por parte del LCV
 - ❖ Ensayos de intercomparación de aptitud.
- ❖ **Laboratorio OIE** para determinadas enfermedades de peces
 - ❖ VER Retinopatía y Encefalopatía Vírica de la lubina
 - ❖ AIS Anemia Infecciosa del Salmón
- ❖ **Colecciones Internacionales**
 - ❖ ATCC

Acompañada de información ⇒ Certificado

- ❖ Definir correctamente las características del cultivo
 - ❖ Identificación del virus aislado
 - ❖ Identificación del lote
 - ❖ Línea celular y nº de pase
 - ❖ Especie de pez de la que se aisló
 - ❖ Referencias de la publicación,etc.
- ❖ Su alcance en términos de la aplicación
- ❖ Su homogeneidad, estabilidad y pureza





Registro y Almacenamiento Cepa RF



LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA#

CÓDIGO Nº:
VHSV DK-5151 RF#
PÁGINA Nº:
01#

FICHA DE REGISTRO DE CEPAS DE REFERENCIA#

DESCRIPCIÓN: VHSV DK-5151 Serogrupo III, Genogrupo Ia#

PNTs APLICABLES: PESCHCT-02, PESCHCT-04, PESCHCT-06#

NOMBRE DEL COMERCIANTE/SUMINISTRADOR: L.C.R (Danish Veterinary Institute)º

LOCALIZACIÓN: EQ/G-14, caja: N-8.3.3.3#

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: -60 °C#

PRECAUCIONES: #

Nº LOTE#	Nº UNIDADES#	FECHA# RECEPCIONADA	FECHA# PRODUCCIÓN	FECHA# APERTURA#	FECHA# FINAL#	OBSERVACIONES#
RF-1#	1#	Octubre-2001#	Octubre 2021#	16.10.01#	#	Colaborativo DK 2001, VIAL 1#
RF-2#	1#	Octubre-2002#	Octubre 2022#	23.10.02#	#	Colaborativo DK 2002, VIAL 2#
RF-3#	1#	Octubre-2003#	Octubre-2023#	27.10.03#	#	Colaborativo DK 2003, VIAL 2#
RF-4#	1#	Octubre-2003#	Octubre-2025#	18.10.04#	#	Colaborativo DK 2005, VIAL 4#
#	#	#	#	#	#	#
#	#	#	#	#	#	#
#	#	#	#	#	#	#
#	#	#	#	#	#	#
#	#	#	#	#	#	#

Reconstitución, alicuotado e identificación Cepa RF

• Liofilizado

- Estos viales se **almacenan** en oscuridad y refrigeración desde su recepción hasta reconstitución.
- La **reconstitución** se hará siguiendo instrucciones del fabricante.
- En general con medio de cultivo celular, filtrar por membrana de 0.45 µm de Ø de poro .

• Ultragongelado

- Estos viales se **almacenan** en ultracongelador a – 80°C hasta su reconstitución.
 - Se **descongela** en refrigeración o en baño de hielo.
- Se inoculan par obtención de CR
 - Se **alicuota** en criotubos e identifican.
VHSV Dk 51/51 RF-1
 - Se **almacenan** en ultracongelador en ubicación conocida. **Cepario**.



 MINISTERIO DE SANIDAD Y POLITICAS SOCIALES DIRECCIÓN GENERAL DE INSPECCIÓN Y CONTROL	LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA		RIF:ES/CV-106-11
	DESCRIPCION CEPAS DE REFERENCIA (RF)		
IDENTIFICACION			
CEPA: INSBU-01-115 (Sangre) II, Genotipo 1a*			
PESO APLICAIBLE: RPES/01-C/001*			
Nº IDENTIFICACION DE LA CEPA EN EL LOU: INSBU-01-1151 RF-2*			
COLECCION DE PROcedENCIa: EU-PR. Fish & sea***			
Nº LOTE O IDENTIFICACION: Ampuleta Probarimay Test 2002*			
LINEA CELULAR: VNP-DEF/AGE: (p-vnB-2) y (p-vnEPC) +			
ESTADO DE CONSERVACION:			
Ok - Isolate IN-1151 (Nov 1992), neutralization pattern II, from rainbow trout [1]			
Cell culture passage number: 08-230; and EPC<10 ⁻¹			
Gleasen, N.L., Jaramillo, R.M., Argandoña, P.E.V. (1992) Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. Diseases of Aquatic Organisms 16:183-170*			
ALMACENAMIENTO			
LOCALIZACION ALMACENAMIENTO: Bodega inferior*			
CONDICIONES ALMACENAMIENTO: 4°C*			
FECHA DE RECEPCION: 21/10/02	FECHA DE CADUCIDAD: julio de 2003*		
FECHA DE APERTURA: 29/10/02	RELENADO POR: MFB*		
FECHA ALMACENTO: 28/10/02	RELENADO POR: MFB*		
FECHA FINAL: *	*		
Nº DE ALICUOTAS: 1*			
IDENTIFICACION ALICUOTAS: INSBU-01-1151 RF-2-0*			
LOCALIZACION ALICUOTAS: SEQ-01, qd-01 S230*			
TITULO DICCIONARIO			
COLECCION PROCEDENCIA*	*		
CALCULADO EN LOU*	2,2x10 ⁴ (EF-1) y 8,2x10 ⁴ (EF-2)		
1)			
2)			
Relado por:	→		Fecha:

IDENTIFICACIÓN	
CEPA: VHSV DK-51/51 Serogrupo III, Genogrupo Ia	
PESCs APLICABLES: F/PESC/ICT-06/01	
Nº IDENTIFICACIÓN DE LA CEPA EN EL LCV: VHSV DK 51/51 RF-2	
COLECCIÓN DE PROCEDENCIA: EU- RL Fish Diseases	
Nº LOTE O IDENTIFICACIÓN : Ampoule V Proficiency Test 2002	
LÍNEA CELULAR Y Nº DE PASE: 3p en BF-2 y 4p en EPC)-	
ESPECIFICACIONES: Ok Isolate DK-5151,(Nov. 1992), neutralization pattern III, from rainbow trout. Cell culture passage number in BF-2: 3 th ; and EPC: 4 th . <i>Olesen N.J., Lorenzen N and Jørgensen P.E.V. (1993) Serological differences among isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus detected by neutralizing monoclonal and polyclonal antibodies. Diseases of Aquatic Organisms 16:163-170</i>	
ALMACENAMIENTO	
LOCALIZACIÓN: EQ/ ICT-10-Cajón derecho.	
CONDICIONES ALMACENAMIENTO: 4 °C	
FECHA DE RECEPCIÓN: 21.10.02	FECHA DE CADUCIDAD: octubre 2 021
FECHA DE APERTURA: 29.10.02	REALIZADO POR: PFS
FECHA ALICUOTADO: 29.10.02	REALIZADO POR: PFS
FECHA FINAL:	
Nº DE ALÍCUOTAS: 1	
IDENTIFICACIÓN ALICUOTAS: VHSV DK 5151 RF-2-A	
LOCALIZACIÓN ALICUOTAS: EQ/ G-14, caja N 8.3.3.3	
TÍTULO DICC ₅₀ / mL:	
COLECCIÓN PROCEDENCIA	
CALCULADO EN LCV	$2,2 \times 10^4$ (BF-2) y $9,2 \times 10^4$ (EPC)

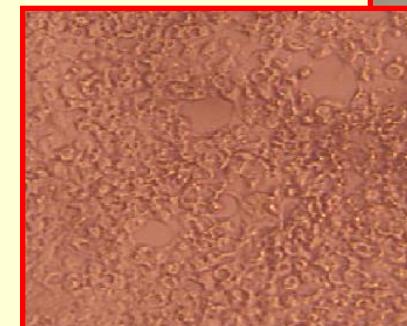
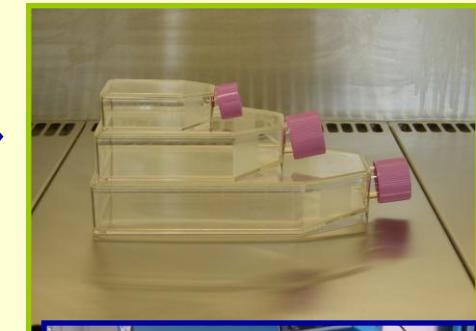
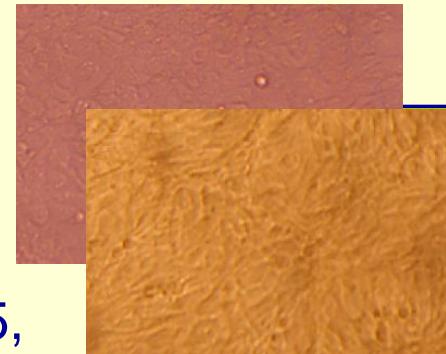


CEPAS DE RESERVA CR

- **Cepas de reserva:** Cepas idénticas obtenidas mediante un único subcultivo de una cepa de referencia.
 - **Cepas de trabajo:** Subcultivos obtenidos de una cepa de reserva para ser utilizados en los ensayos que lo precisen.
-
- ❖ Producción
 - ❖ Alicuotado
 - ❖ Identificación
 - ❖ Preservación
 - ❖ Controles
 - ❖ Homogeneidad
 - ❖ Pureza
 - ❖ Conservación
 - ❖ Certificado

PRODUCCIÓN

- Elección de línea celular.
 - La más susceptible. **BF-2**, EPC, RTG-2, FHM, etc
 - Tamaño de frasco: 150, 75, 25 cm²
- Inoculación cepa RF:
 - Emplear MOI (Multiplicidad de infección) baja (<1).
 - Periodo de adsorción.
- Condiciones crecimiento.
 - Temperatura 15°C
 - Observación hasta de ECP (efecto citopático) total.



ALICUOTADO

- Tras ECP total
- Recoger el sobrenadante de cultivo celular
 - Puede ser necesario ciclos de congelación descongelación.
- Filtración por 0,45 µm Ø.
- Envases:
 - Congelación → criotubos
 - Liofilización → viales



Identificación criovial

- Identificación de la cepa
- Nº de cepa de reserva
- Nº de tubo o criovial 
- Fecha de realización del CR (cepa de reserva)
- Fecha de caducidad del criovial.

VHS Dk 5151

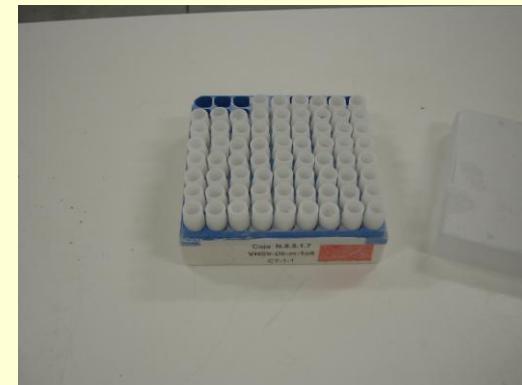
CR-1-1(1) a CR-1-1(91)

VHSV DK 5151

CR-1-1-(9)

Fecha realización: dd/mm/aa

Fecha caducidad:





Preservación

Liofilización

- **Definición:** método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío.
- **Preservador:** Lactoalbúmina bovina al 2% p/v a partes iguales con el sobrenadante de cultivo celular.
- **Envases:** Viales de liofilización
- **Liofilizador**
- **Equipo de conservación:** Refrigerador 4º C.

Preservación

Congelación a baja temperaturas

Ultracongelación: La temperatura de congelación es de **-70° o -80° C.**

Nitrógeno Líquido: La temperatura de congelación **-196°C**

- **Preservador:** No siempre es necesario.
 - **Glicerol al 5%.** En congelación a -80°C
 - **DMSO (Dimetilsulfóxido)** en nitrógeno líquido
- **Envases:** **Crioviales**
- **Equipo de conservación:** **Ultracongelador -80°C.**





Homogeneidad

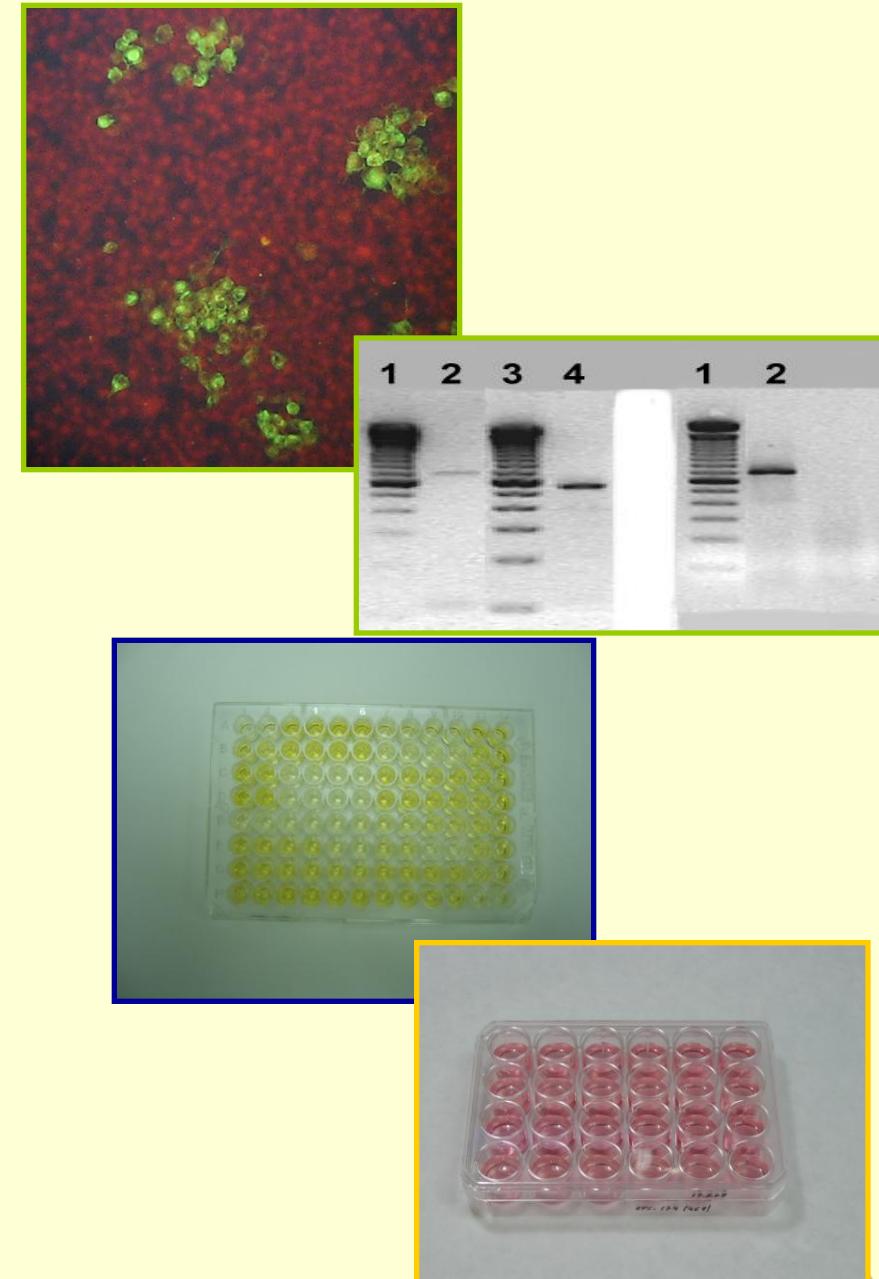
Homogeneidad: Condición de tener composición y estructura uniforme respecto de uno o más de sus caracteres dentro de los límites establecidos.

- Se toman de 3 a 5 viales para comprobar la homogeneidad del lote.
- **Titulación** expresada en DICT₅₀/ml ⇒ Ej.: $4,0 \times 10^6$
 - La concentración de virus debe ser alta.
 - Los títulos deben ser homogéneos.
- Titulación en distintas líneas celulares
 - Fibroblástica: BF-2, RTG-2
 - Epitelial: EPC, FHM

Pureza

Pureza: exento de toda mezcla.

- Se hacen pruebas diagnósticas para verificar que se trata del virus en cuestión y que no se han producido posibles contaminaciones cruzadas.
- Las **técnicas diagnósticas** utilizadas para determinar la pureza pueden ser:
 - IFI
 - PCR
 - ELISA
 - Seroneutralización (SN)
- Frente a distintos virus
 - Homólogos:
 - Heterólogos:





	LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA	F/PESC/ICT-06/02																																																																								
OBSTACIO NY CONTROL DE CEPAS DE RESERVA (CR-1)																																																																										
IDENTIFICACIÓN: IDENTIFICACION CEPAS DE RESERVA: VHSV-DK-51/51 CR-1-1 CEPAS DE REFERENCIA DE PROCEDENCIA: VHSV-DK-51/51 Serogrupo III, Genogrupo la RF-1 RESEÑAS FISICAS DE DATOS LINEA CELULAR: BF-2 FECHA DE INOCULACION: 16.10.01 ALICUOTADO POR: PFS FECHA ALICUOTADO: 21.10.01 Nº ALICUOTAS: 4 en BF-2 IDENTIFICACION ALICUOTAS: de VHSV-DK-51/51, G- la -CR-1-1-(1)... a... CR-1-1-(4) (en BF-2) CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: TEMPERATURA CONSERVACION:-80 °C LOCALIZACION: EQ/G-14, Caja N 8.3.3.3 FECHA DE CADUCIDAD: Octubre 2021 TITULO DICC ₅₀ /mL: 4x10 ⁶ en BF-2 a los 7 días de inoculación CONTROL DE IDENTIDAD: TECNICAS: <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th colspan="2">SHU</th> <th colspan="2">HHU</th> <th colspan="2">IPHU</th> <th colspan="2">SUCU</th> </tr> <tr> <th></th> <th>Resultado</th> <th>Fecha</th> <th>Resultado</th> <th>Fecha</th> <th>Resultado</th> <th>Fecha</th> <th>Resultado</th> <th>Fecha</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>IF</td> <td>++</td> <td>07.11.01</td> <td>+</td> <td></td> <td>-</td> <td>16.11.01</td> <td>-</td> <td>24.10.01</td> </tr> <tr> <td>SN</td> <td>-</td> <td>22.10.01</td> <td>-</td> <td>22.10.01</td> <td>-</td> <td>22.10.01</td> <td>-</td> <td>22.10.01</td> </tr> <tr> <td>ELISA</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td>PCR</td> <td>++</td> <td>20.10.01</td> <td>-</td> <td>20.10.01</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> <tr> <td></td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> <td>+</td> </tr> </tbody> </table> Cumple → No Cumple ← Releido por: Fecha:				SHU		HHU		IPHU		SUCU			Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	IF	++	07.11.01	+		-	16.11.01	-	24.10.01	SN	-	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01	ELISA	+	+	+	+	+	+	+	+	PCR	++	20.10.01	-	20.10.01	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	SHU		HHU		IPHU		SUCU																																																																			
	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha																																																																		
IF	++	07.11.01	+		-	16.11.01	-	24.10.01																																																																		
SN	-	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01																																																																		
ELISA	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																		
PCR	++	20.10.01	-	20.10.01	+	+	+	+																																																																		
	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																		
	+	+	+	+	+	+	+	+																																																																		

IDENTIFICACIÓN

IDENTIFICACIÓN CEPA DE RESERVA: **VHSV-DK-51/51 CR-1-1**

CEPA DE REFERENCIA DE PROCEDENCIA: **VHSV-DK-51/51 Serogrupo III, Genogrupo la RF-1**

PESCs APLICABLES: **F/PESC/ICT-06/02**

LÍNEA CELULAR: **BF-2** FECHA DE INOCULACIÓN: **16.10.01**

ALICUOTADO POR: **PFS** FECHA ALICUOTADO: **21.10.01**

Nº ALICUOTAS: **4** en **BF-2**

IDENTIFICACIÓN ALÍCUOTAS: de **VHSV-DK-51/51, G- la -CR-1-1-(1)... a... CR-1-1-(4)** (en **BF-2**)

CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

TEMPERATURA CONSERVACIÓN: **-80 °C** LOCALIZACIÓN: **EQ/G-14, Caja N 8.3.3.3**

FECHA DE CADUCIDAD: **Octubre 2021**

TÍTULO DICC₅₀/ mL: **4x10⁶** en **BF-2** a los **7** días de inoculación

CONTROL DE IDENTIDAD



	VIRUS							
	SHV		NHI		IPNV		SVCV	
TECNICAS	Resul-tado	Fecha	Resul-tado	Fecha	Resul-tado	Fecha	Resul-tado	Fecha
IFI	+	07.11.01			-	16.11.01	-	24.10.01
SN	+	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01	-	22.10.01
ELISA								
PCR	+	30.10.01	-	30.10.01				



Certificado



CERTIFICADO DE CALIDAD:

Laboratorio Nacional de Referencia de INFLUENZA AVIAR

PRODUCTO:	SV-AN H6N2-L
PROCEDENCIA:	Collección Departamento Aves LCV ÁIV H6N2 Lote 02/05
Nº DE LOTE:	01
DESCRIPCIÓN/VALOR:	Cl RT-PCR en tiempo real (PESC/PCR-01 + IESC/PCR-16) Puro: 24,51 ± 0,14 Dilución 1/10 ⁻¹ : 28,17 ± 0,39 Dilución 1/10 ⁻⁵ : 34,47 ± 0,42 Dilución 1/10 ⁻² : 31,33 ± 0,07 Dilución 1/10 ⁻⁶ : Señal no repetitiva
PRESENTACIÓN:	Liofilizado
CONSERVACIÓN:	Vial liofilizado: en lugar fresco, seco y protegido de la luz. Una vez reconstituido, almacenar las aliquotas a -70 °C.
FECHA DE PRODUCCIÓN:	2005
FECHA DE CADUCIDAD:	Septiembre 2015 Una vez reconstituido, debe: - mantenerse a -70 °C en pequeñas aliquotas (deben evitarse descongelaciones numerosas) y - controlarse la estabilidad de la señal de RT-PCR
USO PREVISTO:	Para utilizar como control positivo de RT-PCR
INSTRUCCIONES DE USO:	Diluir con 2 ml de agua libre de ARNases. Ensayar diferentes diluciones para establecer la dilución de uso

Edo.: Elena San Miguel
Responsable de Departamento
Fecha: 15 de septiembre de 2010

1
Dpto. de Aves, SV-AN
2010-05-15-1040-1
ver documento

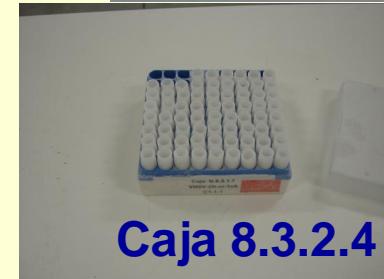
Mantenimiento y conservación

Registro en el cepario:

Incluir en Base de datos

Caja: 8.3.2.4

- Cuando se descongela un criotubo de la CR no debe volver a congelarse.
- El vial utilizado se elimina del cepario y se registra.





GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO



C~~E~~PARIO



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

GRACIAS POR SU ATENCIÓN