

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA

Madrid, 27 – 29 de junio de 2011

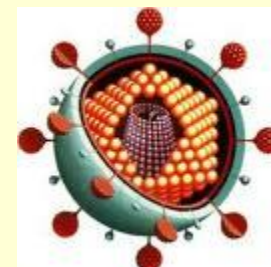
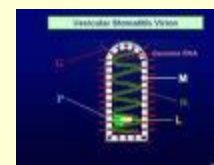
CEPAS DE REFERENCIA DE VIRUS DE PECES

Pilar Fernández Somalo
Dpto. Ictiopatología

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (ALGETE)

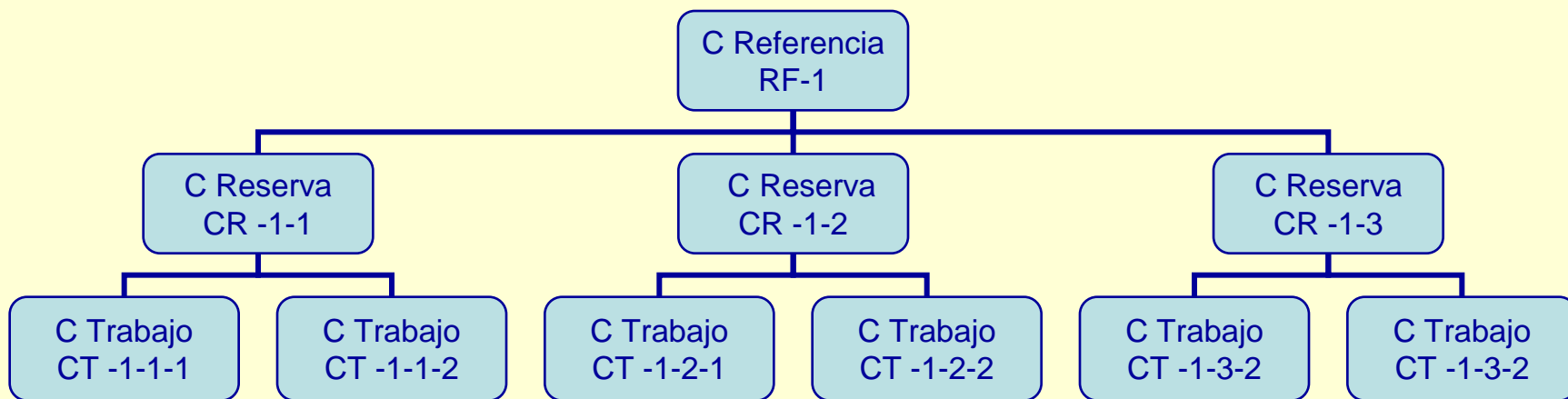
INTRODUCCIÓN

- 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

ATCCTM American Type Culture Collection
10801 University Blvd.
Manassas, VA 20220-2209
FAX: (703)365-2730
Phone: (703)365-2700
World Wide Web URL: <http://www.atcc.org/>

Certificate of Analysis

PRODUCT: ATCC 25922 *Escherichia coli*

LOT: 1171225 **ORIGIN:** 70-10 seed

EXPIRATION: 2005-09

CONCENTRATION: >10⁸ cfu/vial **STORAGE:** +2°C to +8°C

PRODUCT DESCRIPTION: Bacterial cells freeze-dried in a menstruum of Trypticase soy broth plus bovine serum Frac V and sucrose.

PURITY: Sample vials from this lot were opened into nonselective broth media and incubated for 48 hours. Plates were then inoculated and examined after growth, both visually and by staining methods, to check the purity of the culture.

NOTES:

1. Gram stain: Gram negative rods
2. Within range for susceptibility control values
3. The following biochemical reactions were recorded:

Indole	Positive
Urease	Negative
Simmon's citrate	Negative
ONPG	Positive
Lysine decarboxylase	Positive
Ornithine decarboxylase	Positive

Date: June 26, 1998

Signature
Bacteriology Program

Registro y Almacenamiento

Cepa RF



LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA#

FICHA DE REGISTRO DE CEPAS DE REFERENCIA#

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

DESCRIPCIÓN: - VHSV-DK-5151 Serogrupo III, Genogrupo Ia#
PNTs APLICABLES: PESCT-02, PESCT-04, PESCT-06#
NOMBRE DEL COMERCIANTE/SUMINISTRADOR: L. C. R. (Danish Veterinary Institute)#
LOCALIZACIÓN: EQ-G-14, caja: N-8.3.3.3#
CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO: -60 °C#
PRECAUCIONES: #

Nº LOTE#	Nº UNIDADES#	FECHA# RECERCIÓN#	FECHA# CADUCIDAD#	FECHA# ABERTURA#	FECHA# FINAL#	OBSERVACIONES#
RF-1#	1#	Octubre-2001#	Octubre-2021#	16.10.01#		Colaborativo DK-2001, MAL-1#
RF-2#	1#	Octubre-2002#	Octubre-2022#	25.10.02#		Colaborativo DK-2002, MAL-3#
RF-3#	1#	Octubre-2003#	Octubre-2023#	27.10.03#		Colaborativo DK-2003, MAL-2#
RF-4#	1#	Octubre-2005#	Octubre-2025#	18.10.05#		Colaborativo DK-2005, MAL-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 ϕ 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**.





LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA
DESCRIPCIÓN CEPAS DE REFERENCIA (RF)

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: 3th and EPC: 4th.
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.

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 ALICUOTAS: 1

IDENTIFICACIÓN ALICUOTAS: VHSV DK 5151 RF-2-A

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

TÍTULO DICC₅₀/ mL:

COLECCIÓN PROCEDENCIA:

CALCULADO EN LCV:

2,2 x 10⁴ (BF-2) y 9,2 x 10⁴ (EPC)

Elaborado por:

Fecha:

MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

DESCRIPCIÓN CEPAS DE REFERENCIA (RF)

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: 3th and EPC: 4th.
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

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 DICC₅₀/ mL:

COLECCIÓN PROCEDENCIA

CALCULADO EN LCV

2,2 x 10⁴ (BF-2) y 9,2 x 10⁴ (EPC)

Laboratorio Central de Veterinaria

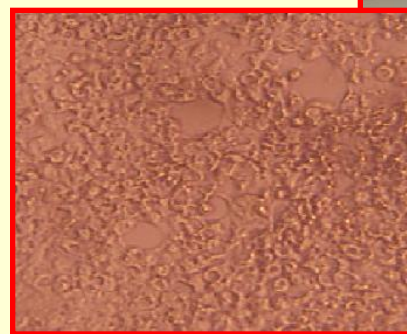
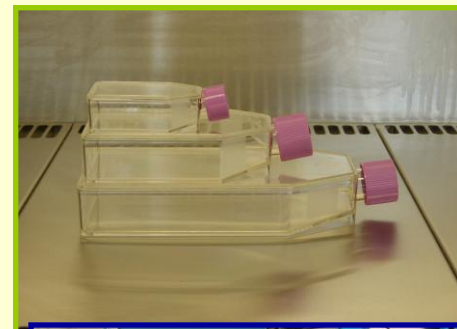
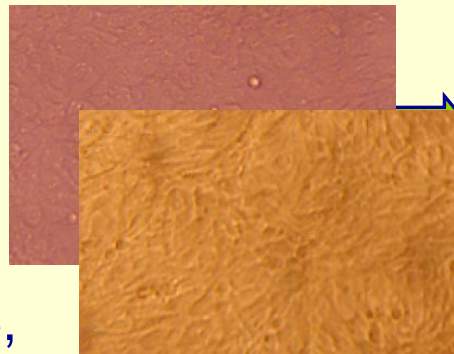
LCV

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.




ALICUOTOTADO

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



Identificación criovial

- Identificación de la cepa
- N° de cepa de reserva
- N° de tubo o criovial 
- Fecha de realización del CR (cepa de reserva)
- Fecha de caducidad del criovial.

VHS Dk 5151

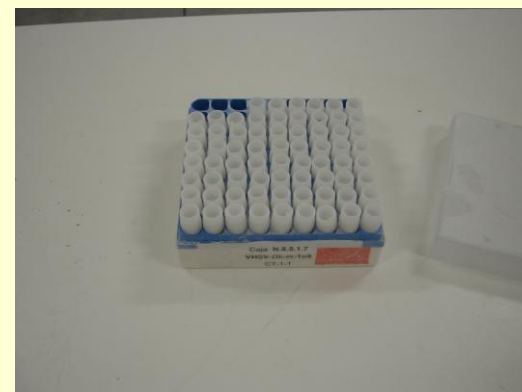
CR-1-1(1) a CR-1-1(91)

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

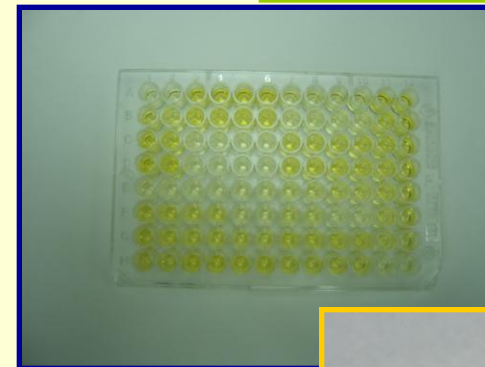
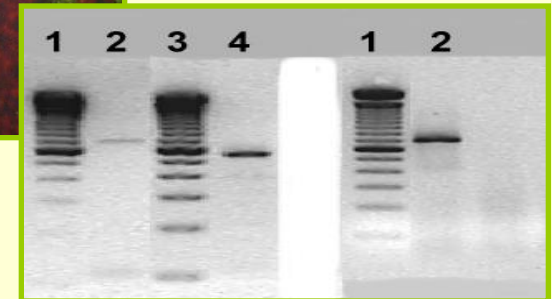
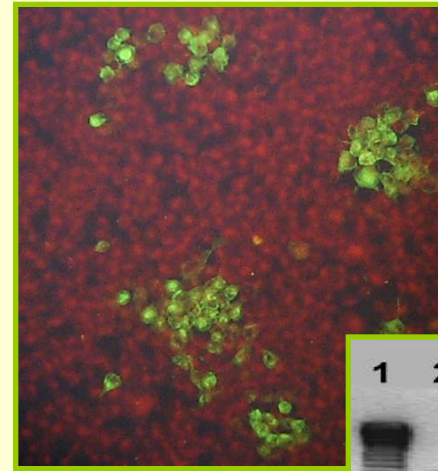
Homogeneidad: Condición de tener composición y estructura uniforme respecto de uno o más de sus caracteres dentro de los límites establecidos.

- Se toman de 3 a 5 viales para comprobar la homogeneidad del lote.
- **Titulación** expresada en $\text{DICT}_{50}/\text{ml} \Rightarrow \text{Ej.: } 4,0 \times 10^6$
 - 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
	OBTENCIÓN Y CONTROL DE CEPAS DE RESERVA (C.R.)	

IDENTIFICACIÓN								
IDENTIFICACIÓN CEPA DE RESERVA: VHSV-DK-51/51 CR-1-1								
CEPA DE REFERENCIA DE PROCEDENCIA: VHSV-DK-51/51 Serogrupo III, Genogrupo Ia 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-1a 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 DICC ₅₀ /mL: 4x10 ⁶ en BF-2 a los 7 días de inoculación								
CONTROL DE IDENTIDAD								
TECNICA	MUESTRA							
	SHU		HHI		IPHU		SHCU	
	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha	Resultado	Fecha
IF	+	07.11.01	+		+	16.11.01	+	24.10.01
SH	+	22.10.01	+	22.10.01	+	22.10.01	+	22.10.01
ELISA	+		+		+		+	
PCR	+	30.10.01	+	30.10.01	+		+	
	+		+		+		+	
	+		+		+		+	

Cuñado: Ha Cuñado
 Redado por: Fecha:

IDENTIFICACIÓN	
IDENTIFICACIÓN CEPA DE RESERVA: VHSV-DK-51/51 CR-1-1	
CEPA DE REFERENCIA DE PROCEDENCIA: VHSV-DK-51/51 Serogrupo III, Genogrupo Ia 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-1a -CR-1-1-(1)... a... CR-1-1-(4) (en BF-2)	
NNCONDICIONES DE ALMACENAMIENTO	
TEMPERATURA CONSERVACIÓN: -80 °C	LOCALIZACIÓN: EQ/G--14, Caja N 8.3.3.3
FECHA DE CADUCIDAD: Octubre 2021	
TÍTULO DICC ₅₀ /mL: 4x10 ⁶ 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				

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.





CEPARIO

GRACIAS POR SU ATENCIÓN