

PFA

Formazione Interdisciplinare su Attività di Sanità Animale presso le Strutture di Biotecnologie e Diagnosi delle Malattie Virali

2° Modulo

Caratteristiche Fondamentali del Laboratorio di Virologia Pratica

29 novembre – 11 dicembre 2018

Preparazione Antigeni virali per diagnostica sierologica

Marina Cittadini

Lab. Microscopia elettronica e Virologia speciale



Preparazione ANTIGENI su colture cellulari per tecniche immunologiche

- Antigeni virali: EHV-1, EHV-4, EAV, EHV-2, BoHV-1, CDV, BuHV-1, ERV A-B, BVDv, IHNv, VHSV, BLV, EIAV
- antigeni batterici: Ehrlichia canis
- antigeni protozoari: Toxoplasma gondii



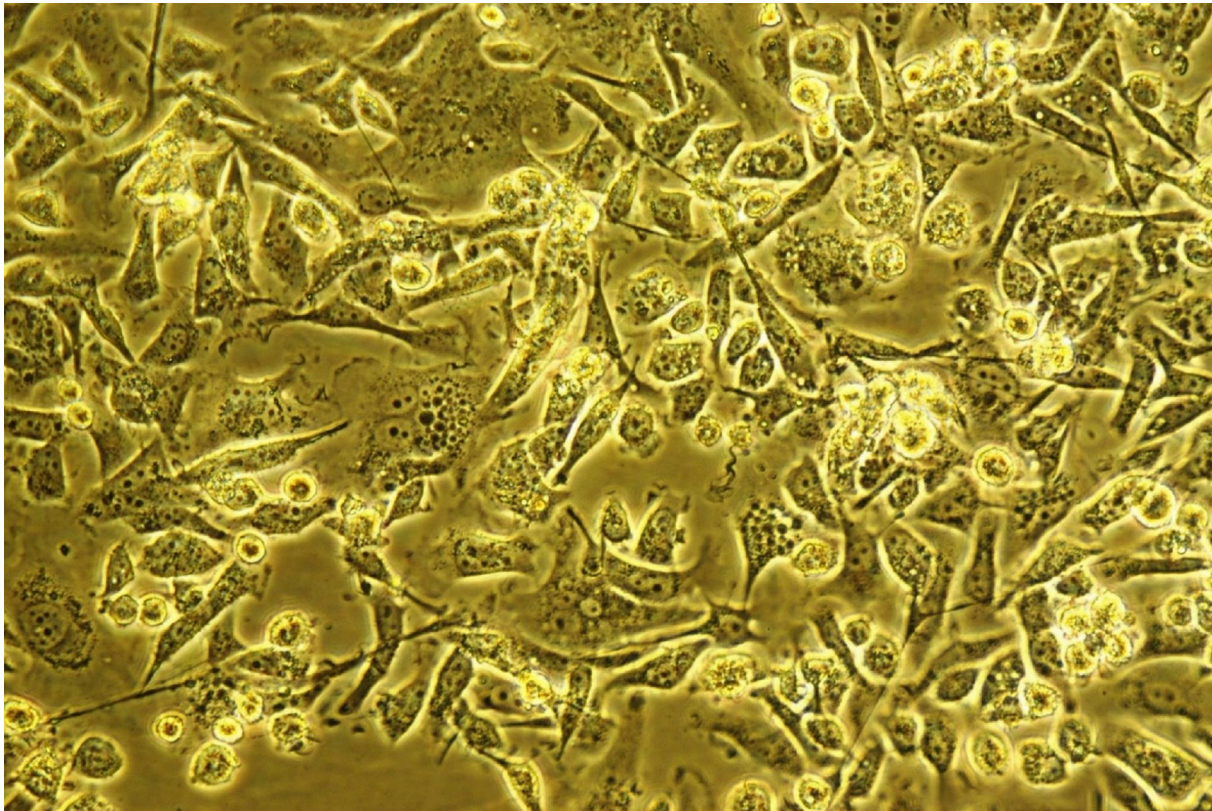
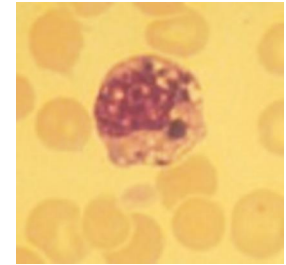
Altre POS, attualmente non in uso:

POS VIR 012 SUP: Virus Leucosi bovina enzootica su FLK

POS VIR 013 SUP: Virus Anemia Infettiva Equina su ED

POS VIR 014 SUP: Ehrlichia canis su DH₈₂

Altre POS, attualmente non in uso:
POS VIR 014 SUP: Ehrlichia canis su DH-82 (40x)



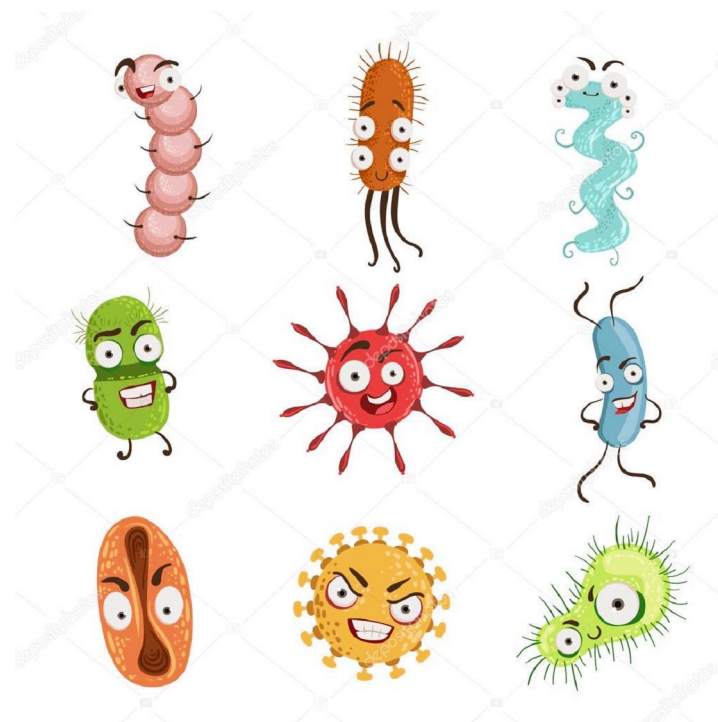
Principali virus prodotti

EHV-1; EHV-4; EAV; EHV-2 → RK₁₃ ATCC
AsHV-1 → RK₁₃ ATCC

BoHV-1 BuHV-1 → MDBK
SBV → BHK₂₁ e Vero E6

CDV → VERO E6
CAV-1 e CAV-2 → MDCK

IHNv e VHSV → EPC e BF2



Stock virale :



Ceppo virale di referenza: virus standard a genealogia accertata, coltivato in condizioni controllate

Stock virale: riserva di un ceppo virale di referenza o di un ceppo isolato e precedentemente identificato; dopo la titolazione, viene utilizzato come antigene in prove sierologiche o virologiche oppure conservato per ulteriori ricerche



Ceppo virale di campo: virus isolato da un focolaio d'infezione, su colture cellulari a partire da materiale biologico e riconosciuto o no omologo al ceppo di referenza mediante tecniche sierologiche e molecolari

Produzione Ag virale (POS VIR 022 SUP)

POS VIR 068 SUP/2 rev. 6 pag. 1 di 1

RICHIESTA APPROVVIGIONAMENTO CEPPI VIRALI DI RIFERIMENTO

Struttura di: DO DMV

Per poter espletare le seguenti Prove:

a. POS DMV 003
b. POS DMV 005 FOR - CHV4
c. POS DMV 001 NOR CHV4
d. IF AN
e. POS DMV 003
f. POS DMV 005 NOR - CHV4
g.

CHIEDE che gli vengano consegnati
i seguenti ceppi virali: entro il: quantità:

a. VIRUS BHV2 - 10/01/18 -
b. VIRUS CHV4 - 01/06/18 -
c. ANTIGENI BUCYRUS - 11/3/18 -
d. MANCOWANE 1610 x AN - 11/3/18 - 5
e. VIRUS BHV1 - 15/01/18 -
f. VIRUS CHV4 - 15/01/18 -
g.

Data: 02/01/18 Il Responsabile: [Signature]

Richiedente: es. DO DMV
(POS VIR 068 SUP)



Produzione Ag virale

(POS VIR 022 SUP)

Coltura Cellulare í í í í í í í í í í Tipo e n. di contenitore í í í í í í í í

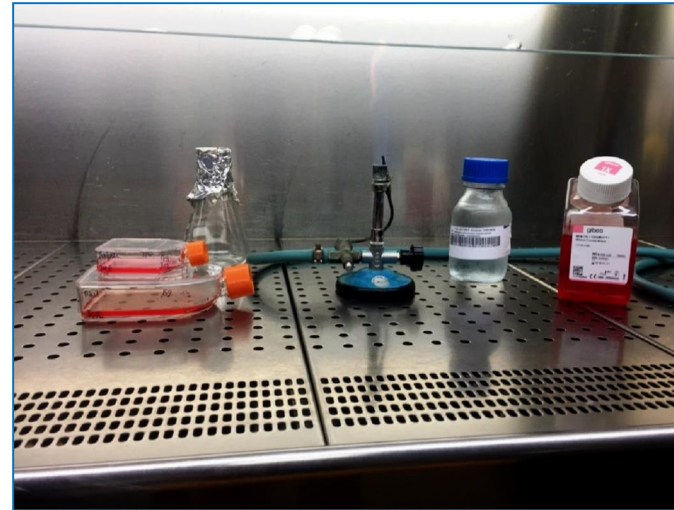
Pass. N. í í í í del í í í í í í í í í

N. registrazione/Ceppo Virale í í í ..í í í í í í í í

Data	Firma
...°p í í í í .	.í í í .
24 h í í í í .	í í í ..
2 gg í í í í .	í í í ..
3 gg í í í í .	í í í ..
4 gg í í í í .	í í í ..
5 gg í í í í .	í í í ..
6 gg í í í í .	í í í ..
í gg í í í í .	í í í ..
Cong. í í í í .	
Risultato í í í í í í	

Firma Verificatore

í í í í í í í í í .



Il quantitativo di virus da inoculare dipende dal titolo del virus di partenza, dalla sensibilità della linea cellulare, dalla MOI, dalla superficie della fiasca. Ciclo di crescita “one step”: infezione di tutte le cellule disponibili inoculando virus con un rapporto di X particelle virali per cellula

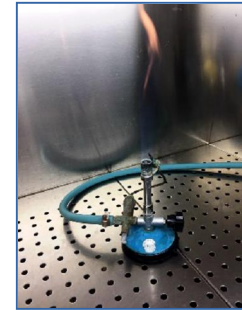
Modalità operative

Produzione antigene virale
(POS VIR 022 SUP)

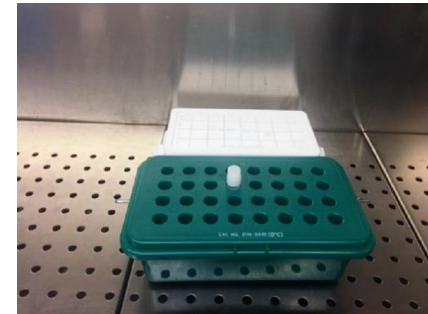
Tutte le operazioni in
condizioni di sterilità
sotto cappa a flusso
laminare



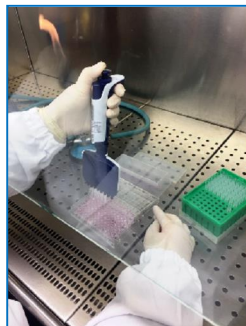
Utilizzando
bunsen acceso



Uso di Cooler



DPI e materiale
sterile



Uso di disinfettanti



Produzione Ag virale

(POS VIR 022 SUP)

Modalità di inoculo

- “ Allontanare il terreno di crescita
- “ Lavare con PBS
- “ Aggiungere il virus (titolo e superficie)
- “ Lasciare a contatto x 2h
- “ Aggiungere il Terreno di coltura al 2% SFB + 2% PSF
- “ Incubare a 37°C al 5% Co2



In parallelo fiasca con stessa linea non infetta = Ctrl neg

Modalità operative

Produzione antigene virale

(POS VIR 022 SUP)

CC infettata → $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ al $5\% \pm 0,5$ di CO_2



Osservata → al microscopio
ottico rovesciato (80-90% ECP)



Controllare quotidianamente al microscopio ottico rovesciato la comparsa e l'evoluzione dell'ECP, registrando le osservazioni nel modulo

Produzione Ag virale

(POS VIR 022 SUP)

Congelare a $(-70 \pm 7) ^\circ\text{C}$ la coltura cellulare infetta (ECP 80-90%)

Scong. a T° ambiente eseguendo due cicli di congelamento-scongelamento.

Centrifugare in centrifuga da tavolo a 2.000 g/10' a + 4°C.

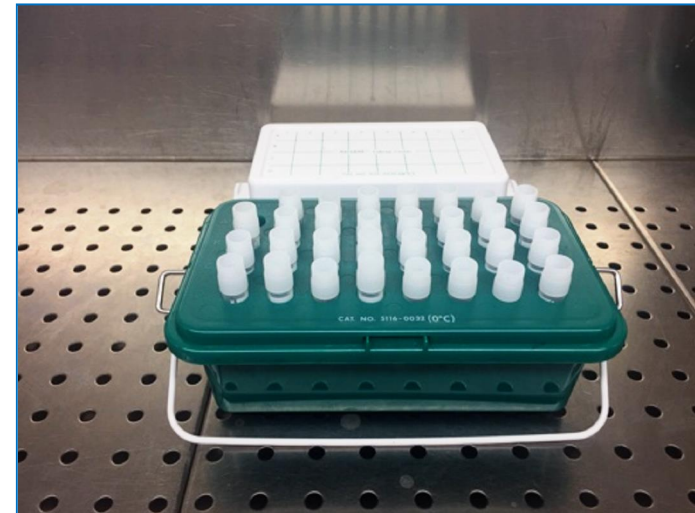
Aliquotare la sospensione virale (0,7 mL / fiala) e congelare a -70°C



Stoccaggio del virus

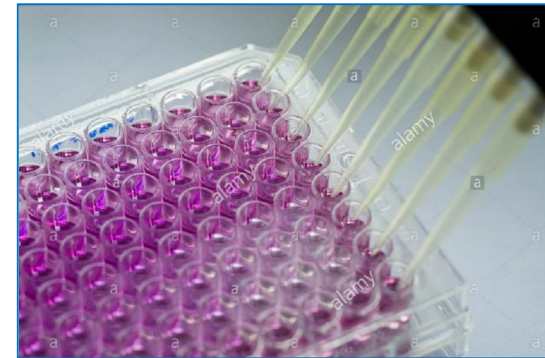
Dopo centrifugazione a 2000g x 10 minuti si distribuisce in nunc da 0,7 ml mantenendo il provettone in ghiaccio e ponendo le nunc in cooler a temperatura controllata

Tutte le operazioni vengono eseguite sempre in sterilità sotto la cappa a flusso laminare



POS VIR 023 SUP: Titolazione Ag virale

Per il calcolo del titolo virale,
testare in doppio nei 2 laboratori



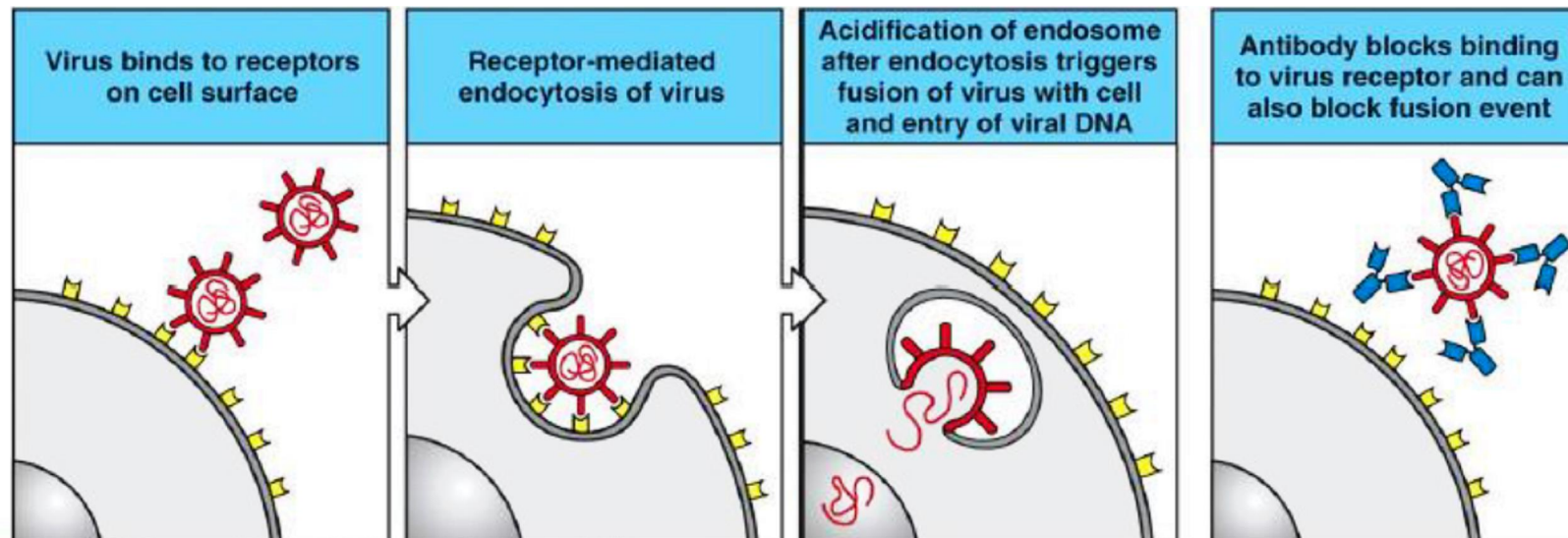
3 sedute
Lab DMV

2 sedute
Lab ME-Virologia sp.

Principi della Titolazione

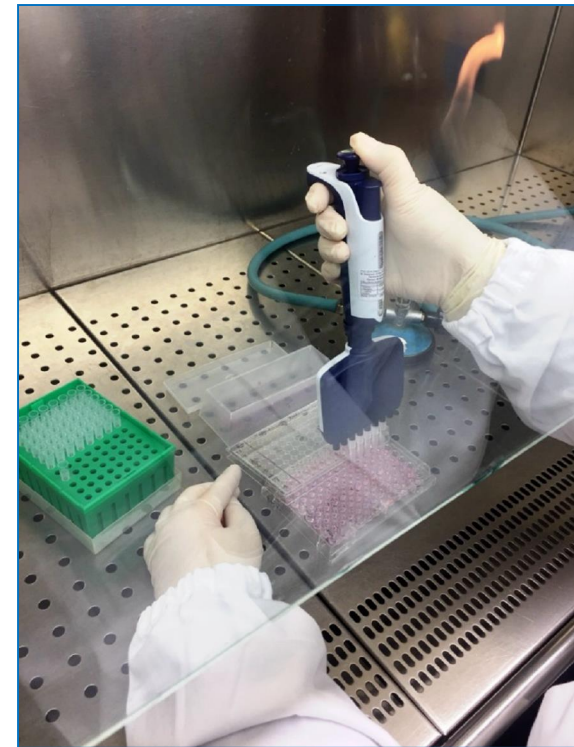
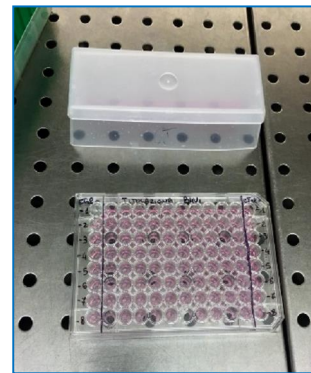
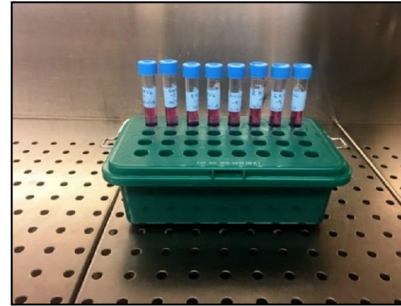
Per usare il virus come Antigene nella SN, è necessario TITOLARE l'attività infettante dei virus, cioè determinare quante particelle virali infettanti sono presenti.

“Attività infettante con calcolo della TCID₅₀”



Descrizione Fasi:

- 0,5 µL virus in 4,5 terreno
- 8 provette in base 10 (dil. -1 -> -8) mantenute in ghiaccio
- Distribuire con multicanale partendo dalla diluizione più alta
- Lasciare le colonne 1 e 12 x ctrl neg
- Incubare a 37°C + 0,5% CO₂
- Aggiungere ad ogni pozzetto 50 o 100 µL della sospensione cellulare
- Eseguire la lettura ogni giorno per 4-5 gg



Calcolo del titolo

Calcolare il titolo applicando la formula di Spearman-Kaerber.

Formula:

$$\text{Titolo} = 10 [X - d/2 + (d \times S)]$$

dove:

X: logaritmo assoluto della diluizione più alta del virus in cui tutte le repliche presentano ECP o focolai di fluorescenza

d: differenza di logaritmo tra diluizioni successive

S: Σ dei rapporti di N° repliche con evidenza di virus / N° repliche totali esaminate, calcolati tra X e la diluizione oltre la quale non c'è più evidenza di virus.

Si considerano **pos (+)** i pozzetti che presentano anche 1 focolaio di ECP

Si considerano **neg (-)** i pozzetti a monostrato integro

Formule per calcolo titolo

Formula di Reed and Muench

Table 1 Calculation of virus titre in mice using the Reed and Muench method

Log ₁₀ virus dilution	Mice		Cumulative total			Percent mortality
	Died	Survived	Died	Survived	Total	
-1	10	0	57	0	57	57/57 × 100 = 100
-2	10	0	47	0	47	47/47 × 100 = 100
-3	10	0	37	0	37	37/37 × 100 = 100
-4	10	0	27	0	27	27/27 × 100 = 100
-5	10	0	17	0	17	17/17 × 100 = 100
-6	6	4	7	4	11	7/11 × 100 = 63
-7	1	9	1	13	14	1/14 × 100 = 7

Difference of logarithms = (63-50)/(63-7) = 0.23; log₁₀ 50% end point dilution = -6 - (0.23 × 1) = -6.23; 50% end point dilution = 10^{-6.23}; the titre of the virus = 10^{6.23} LD₅₀/mL.

Table 2 Calculation of virus titre in mice using the Spearman-Kärber method

Log ₁₀ virus dilution	Mice	
	Died	Inoculated
-1	10	10
-2	10	10
-3	10	10
-4	10	10
-5	10	10
-6	6	10
-7	1	10

x₀ = 5; d = 1; log₁₀ of 50% endpoint dilution = - [5 - 1/2 + 1 (17/10)] = -6.2; 50% end point dilution = 10^{-6.2}; the titre of the virus = 10^{6.2} LD₅₀/mL.

Formula di Spearman-Kärber

$$\text{Titolo} = 10^{[X - d/2 + (d \times S)]}$$

dove:

X: logaritmo assoluto della diluizione più alta del virus in cui tutte le repliche presentano ECP o focolai di fluorescenza

d: differenza di logaritmo tra diluizioni successive

S: somma dei rapporti di N° repliche con evidenza di virus / N° repliche totali esaminate, calcolati tra X (compreso) e la diluizione oltre la quale non c'è più evidenza di virus.

Stoccaggio del virus (POS VIR 068 SUP)

Numero di Lotto: (a) lettere che identificano il virus; (b) lettere che eventualmente identificano il ceppo; (c) 6 numeri che identificano la data di arrivo o di congelamento in Laboratorio del ceppo di riferimento originario; (d) numero progressivo di lotto; (e) anno di produzione [es. (a) EHV1 (b) K (c) 020501/ (d) 01/ (e) 05]



Congelatore – 80°C



Contenitori Criogenici a
vapori di azoto

Modulistica

Per ogni stock virale si compila LA SCHEDA DI
REGISTRAZIONE DEI MATERIALI DI RIFERIMENTO

Distribuito con IL
FOGLIO DI
DISTRIBUZIONE CEPPI
VIRALI DI RIFERIMENTO

[illegible]

PG QUA 004/2a rev.9

PCV VIRUS SUIZO ann. 8

pag. 1 di 1

SCHEDA DI DISTRIBUZIONE CEPPI VIRALI DI RIFERIMENTO														
ATCC o altro:		N° <u>0518</u>												
VIRUS:	<u>BHV1</u>													
Strain:	<u>COLORADO</u>													
Ceppo di <u>ITA</u> linea:	N. Lotto <u>P4V1/CCL/CEP/CO/18</u>	Data prep: <u>18/08/88</u>	Data Scad: <u>18/08/90</u>											
Cultura cellulare:	<u>Ambic</u>	n. Pass.suTC	<u>4°</u>											
Terr. cultura utilizzato:	<table border="1"><thead><tr><th>Tipo di MEM</th><th>% SFB</th><th>% aa NE</th><th>% PSF</th><th>Altro</th></tr></thead><tbody><tr><td><u>GEM</u></td><td><u>2%</u></td><td><u>-</u></td><td><u>1%</u></td><td><u>-</u></td></tr></tbody></table>	Tipo di MEM	% SFB	% aa NE	% PSF	Altro	<u>GEM</u>	<u>2%</u>	<u>-</u>	<u>1%</u>	<u>-</u>			
Tipo di MEM	% SFB	% aa NE	% PSF	Altro										
<u>GEM</u>	<u>2%</u>	<u>-</u>	<u>1%</u>	<u>-</u>										
Condiz. incubazione:	Temp <u>37°C</u>	Atmosfera <u>5% CO₂</u>	Operatore <u>JR</u>											
Aspetto ECP conforme a "product sheet"	<u>Sì</u> <input checked="" type="checkbox"/> <u>No</u> <input type="checkbox"/>													
Morfologia al microscopio elettronico:	<u>HERPESVIRUS</u>													
Presenza contaminazioni:	<u>Sì</u> <input type="checkbox"/> <u>No</u> <input checked="" type="checkbox"/>													
Operatore	<u>[Signature]</u>													
Titolazione:														
Prova effettuata (POS VIR):	Data esecuzione	Data lettura	Ytoto x10 ⁴											
<u>0518 sul</u>	<u>050818</u>	<u>130818</u>	<u>10⁴</u>											
<u>023 sul</u>	<u>050818</u>	<u>130818</u>	<u>10⁴</u>											
			Operatore <u>[Signature]</u>											
Esito prove conforme a Certificato di Qualità:														
<u>Sì</u> <input checked="" type="checkbox"/> <u>No</u> <input type="checkbox"/>														
n. Cryobute/Fiasche	<u>64</u>	Vol. Cryobute/Fiasche	<u>0.7ml</u>											
Temperatura Conservaz.	<u>-80°C ± 10°C</u>													
Operatore:	<u>[Signature]</u>	Responsabile:	<u>[Signature]</u>											

POS VIR 068 SUP/3

[illegible]

POS VIR 068 SUP 4



Preparazione Antigeni virali per diagnostica virologica

Roma, 11 Dicembre 2018

EHV-1 ó ceppo Kentucky D

Equid Herpesvirus 1
Virus dell'aborto equino



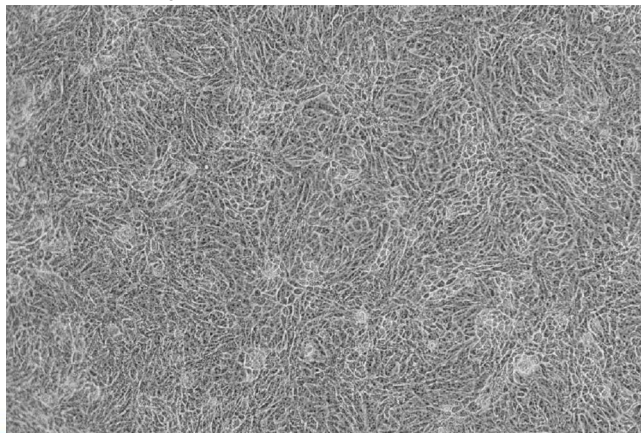
Virus DNA a doppio filamento famiglia *Herpesviridae*, sottofam. *Alfaherpesvirinae*. Nel cavallo -> forme respiratorie e aborto.

Trasmissione x via respiratoria, venerea, transplacentare.

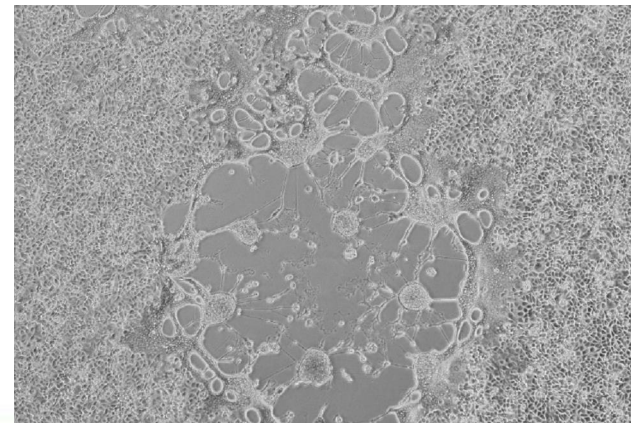
Linea cellulare utilizzata - >RK-13 (ATCC, CCL 37)

-CeRME

-Utilizzo: SN ricerca Ac contro la FORMA ABORTIVA o RESPIRATORIA del cavallo (POS DMV 004 NOR)



RK13 non
infette
(10X)



ECP su
RK13
(10X)

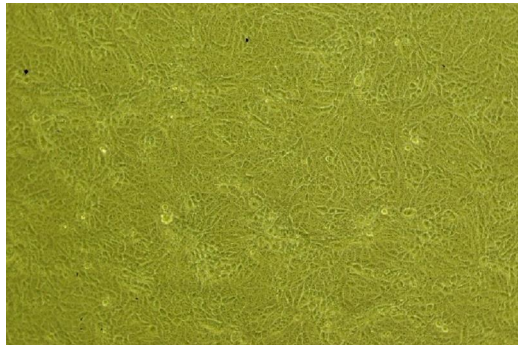
EHV-4 ó ceppo VR 2230

Equid Herpesvirus 4
Virus della rinopneumonite equina

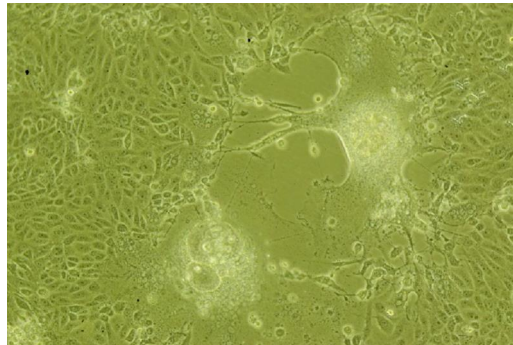


Come EHV-1
patologie delle prime vie respiratorie nei cavalli giovani.

- Linea cellulare utilizzata -> ED
- CeRME
- Utilizzo: SN per ricerca Ac (POS DMV 005 NOR)

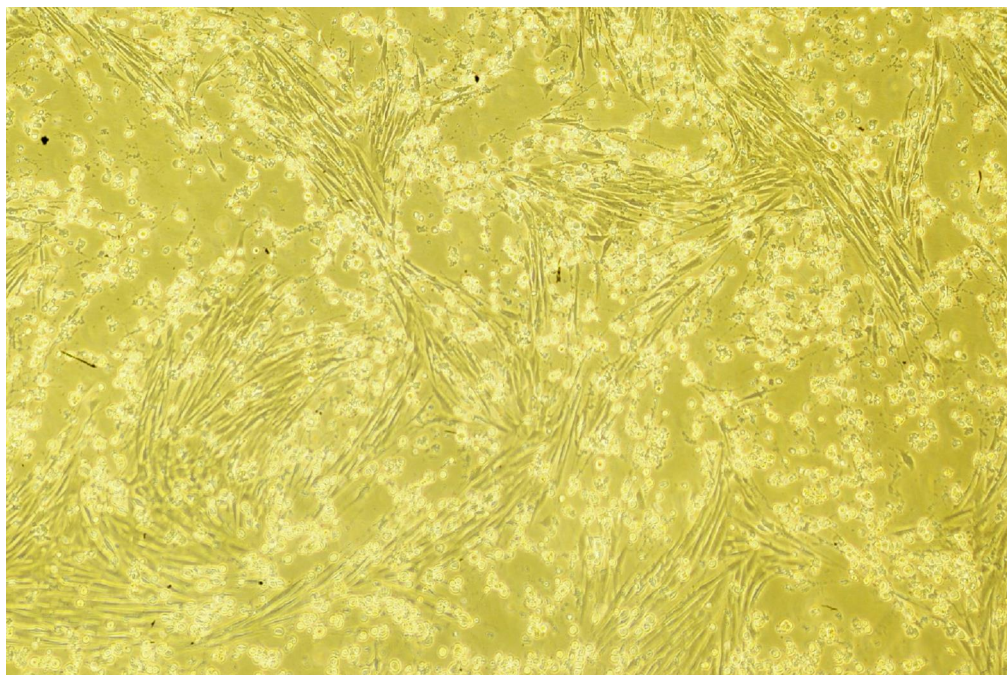


Vero non infette



ECP su Vero (20X)

EHV4



ECP EHV4 su ED – 20X



ED non infette - 20X

EAV ó ceppo Bucyrus



Virus ad ssRNA, famiglia *Arteriviridae*

Trasmissione x via respiratoria, venerea, transplacentare.

La cavalla infetta può abortire o generare un puledro con infezione congenita

- Linea cellulare utilizzata -> RK-13 (ATCC, CCL 37)) effetto citopatico (arrotondamento, vacuolizzazione, aumento densità ottica)
- CeRME
- Utilizzo: SN ricerca Ac contro l'agente eziologico dell'Arterite virale equina (POS DMV 001 NOR)



ECP su RK13 (10X)

EHV-2 ó ceppo VR 701



Herpesvirus Equino tipo 2 causa principalmente immunosoppressione e quindi di predisposizione ad infezioni causate da altri agenti patogeni, di solito di tipo respiratorio, con temperatura elevata, scolo nasale acquoso, ingrossamento dei linfonodi mandibolari e tosse

- Linea cellulare utilizzata RK13 ATCC)
- CeRME
- Utilizzo: SN ricerca Ac contro l'infezione (forme respiratorie) nel cavallo

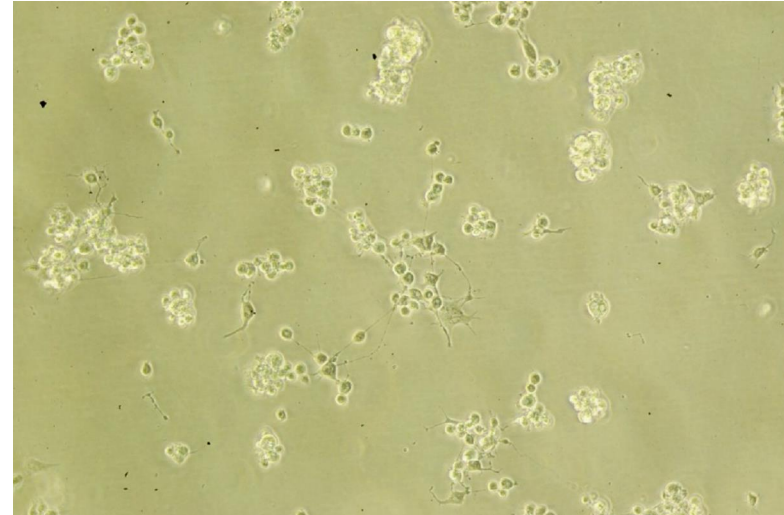
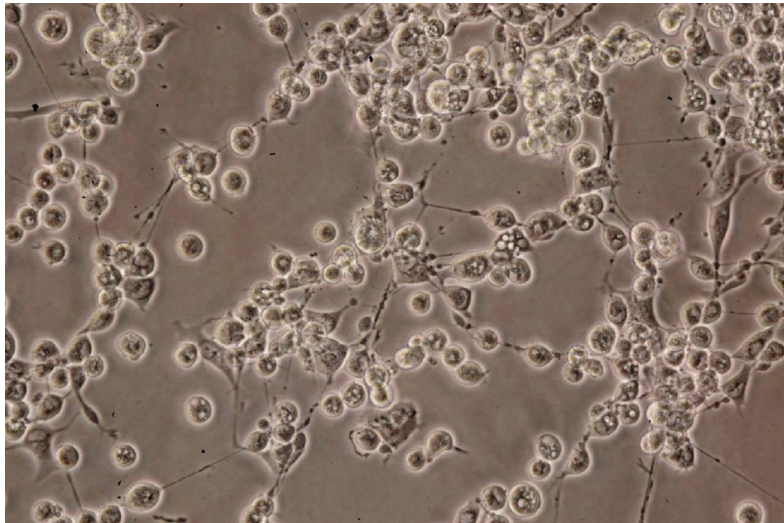
AsHV-1 – ceppo 470/11-B



- ” Stessa famiglia EHV-1, EHV-4, EHV-2
- ” Linea cellulare utilizzata -> EDe
- ” CeRME
- ” Utilizzo: SN ricerca Ac contro l'infezione (forme respiratorie)

AsHV-1

ECP su COC (40X)



ECP su EDe (20X)

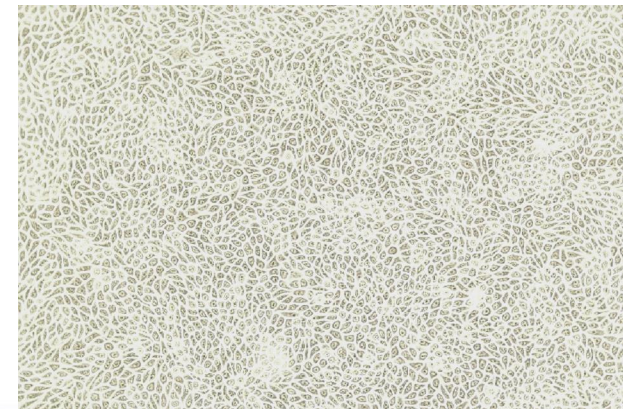


BoHV-1 – ceppo Copper Colorado

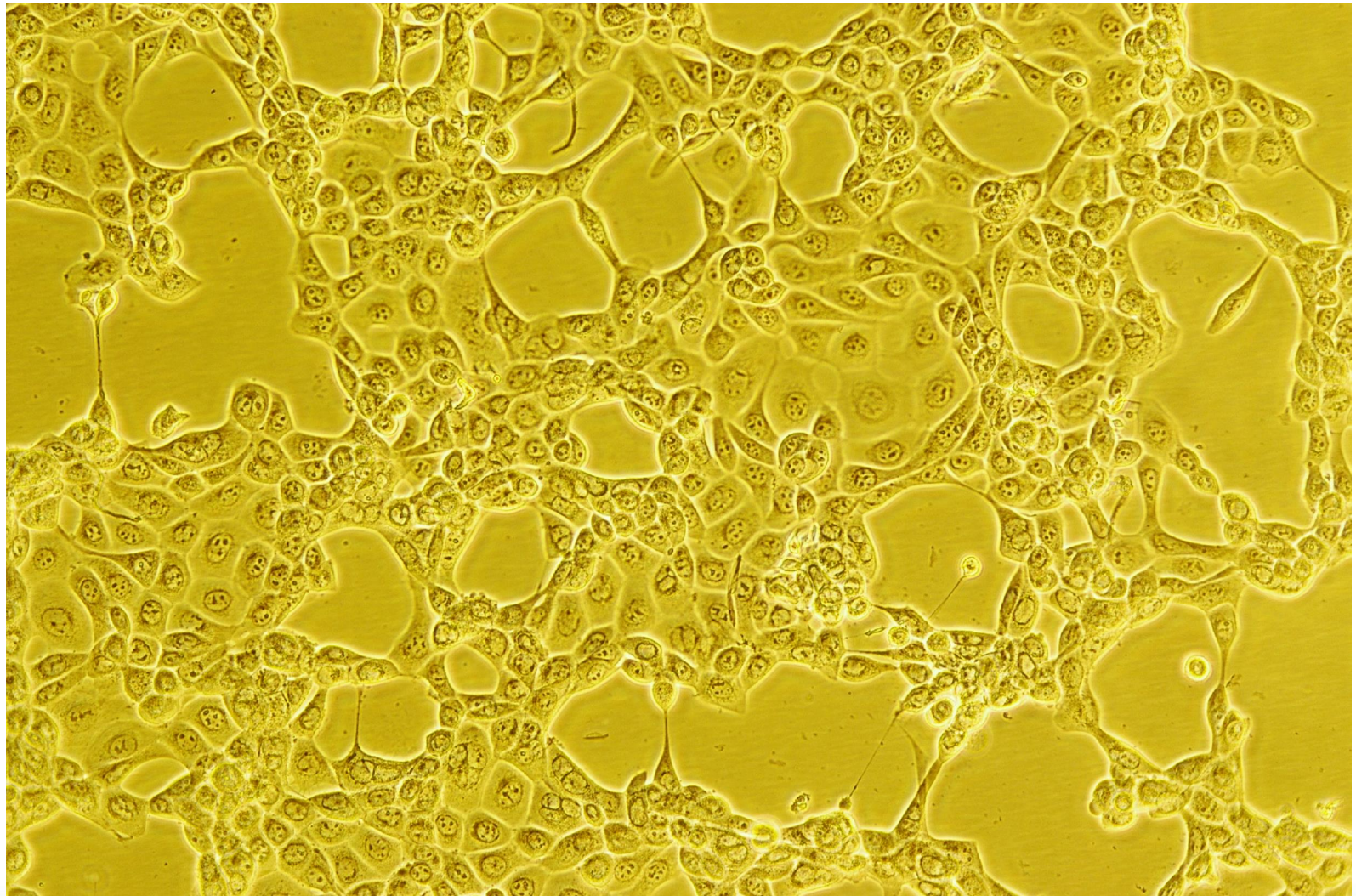


- ” *AlfaHerpesvirus* fam. *Herpesviridae*
- ” Responsabile dell'IBR, forme respiratorie e apparato riproduttivo
- Linea cellulare utilizzata -> Aubek
- DO DMV
- Utilizzo: SN ricerca Ac contro la Rinotracheite infettiva (IBR) del bovino (POS DMV 003 NOR)

Aubek 20x



BoHV-1: ECP su Aubek a 24h-20X

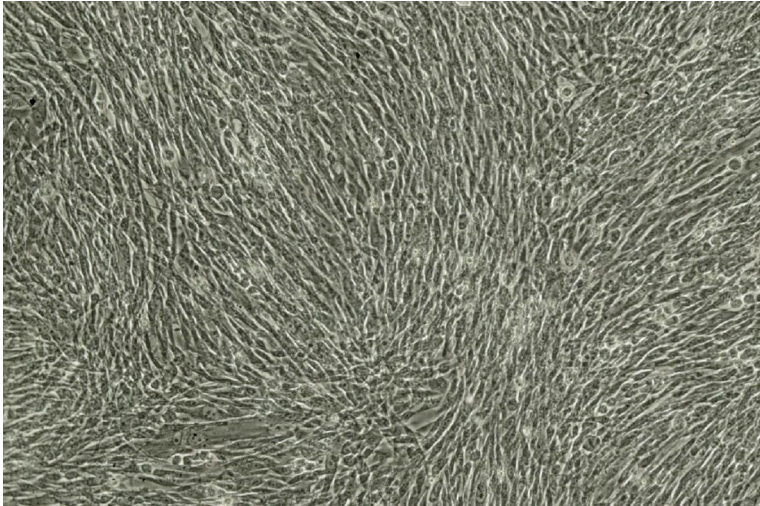


Virus di Schmallenberg (SBV) ó ceppo BH80/11-4

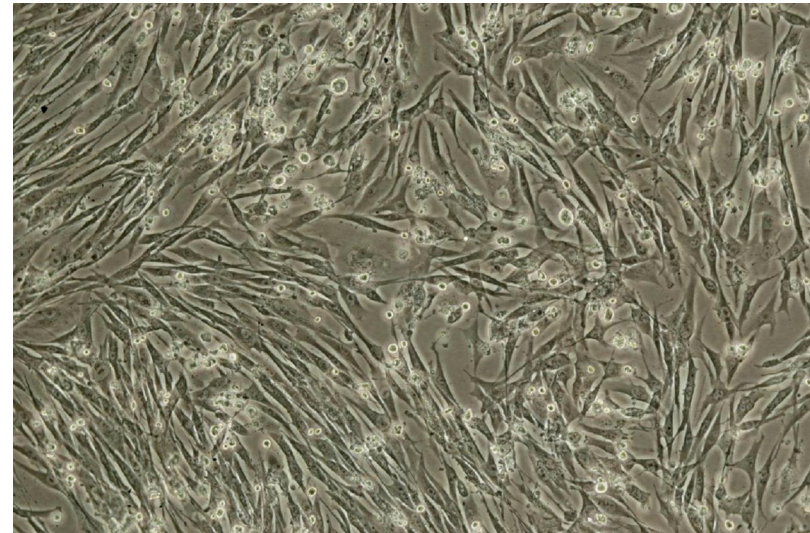


- Famiglia *Peribunyaviridae* -> genere *Orthobunyavirus* -> SBV
- Linea cellulare utilizzata -> BHK-21
- DO DMV
- Utilizzo: SN ricerca Ac contro forme abortive dei ruminanti (bovino, ovino, caprino)

SBV_Virus di Schmallerberg



- Foto BHK-21 sane e con ECP (20x)



BuHV-1 ó ceppo Metzler

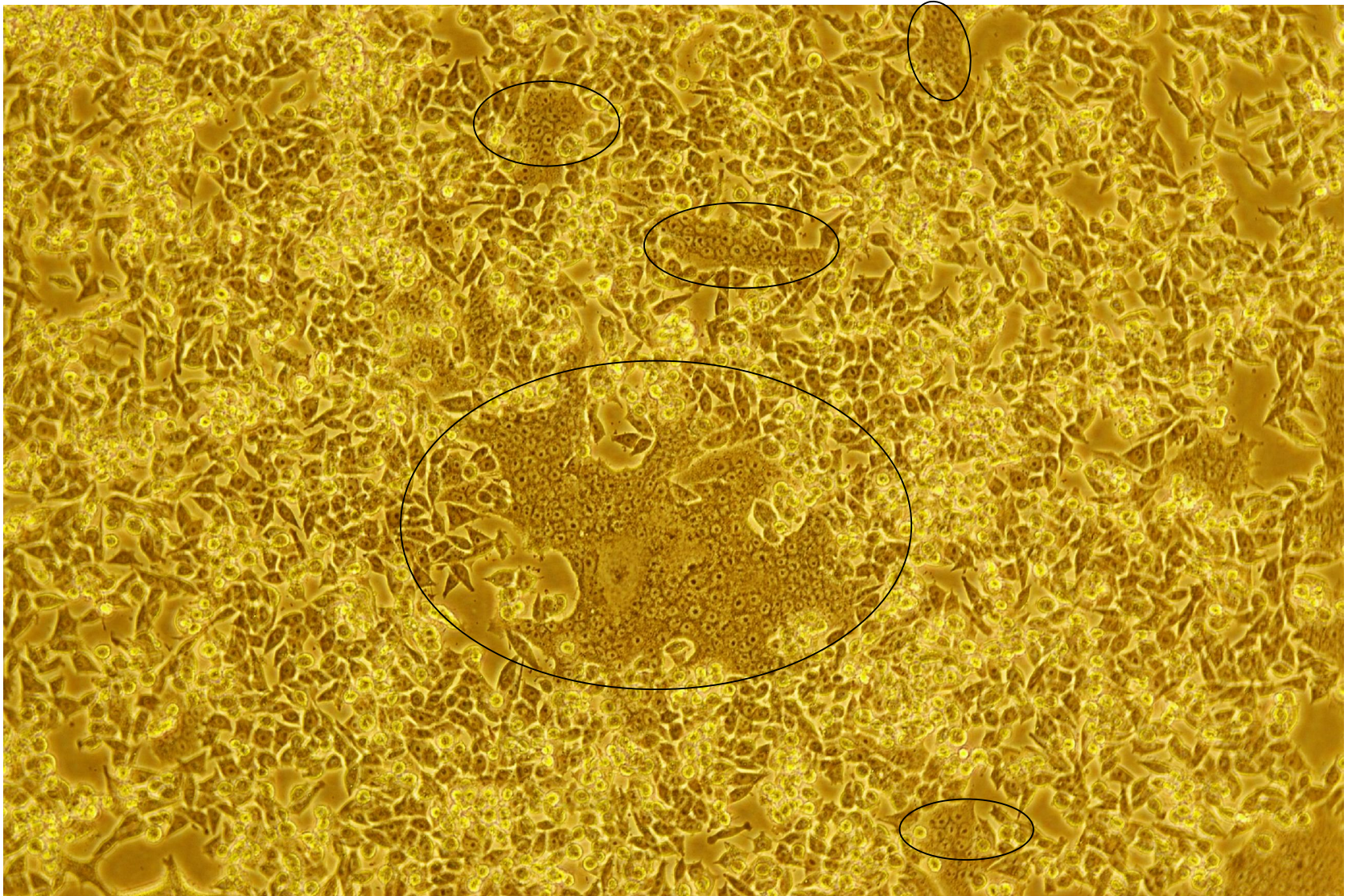


- ” *AlfaHerpesvirus* fam. *Herpesviridae*
- ” Linea cellulare utilizzata -> MDBK
- ” DO DMV
- ” Utilizzo: SN ricerca Ac contro forme respiratorie (simil IBR) del bufalo

CDV – ceppo Bussel



- “ Virus CD (genere *Morbillivirus*; Fam: *Paramyxoviridae*) spesso letale colpisce giovani cani e canidi (volpe, lupo, coyote, ecc.), il furetto e alcuni felidi (anche se mai il gatto domestico), caratterizzata da turbe del sistema nervoso
- Linea cellulare utilizzata -> B95a
 - DO DMV
 - Utilizzo: SN su Vero x ricerca Ac contro l'agente eziologico del cimurro del cane
 - Ricerca corrente

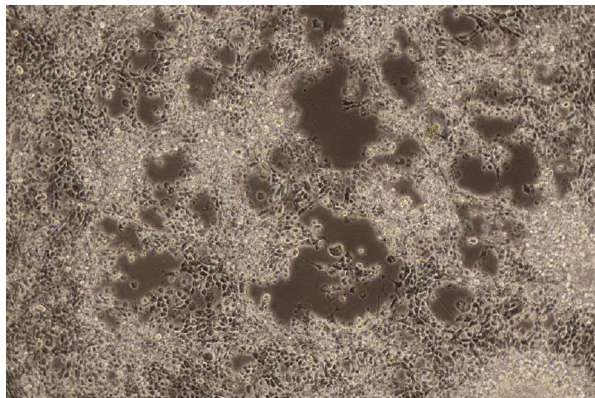
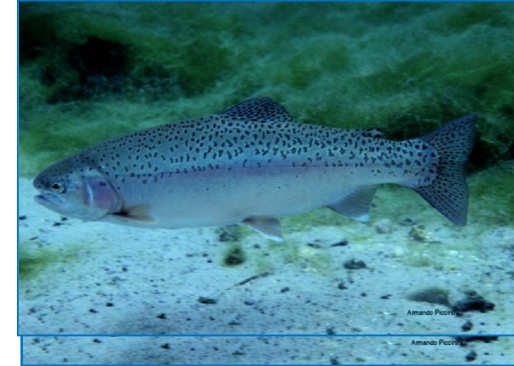


Virus Cimurro: Sincizi su cellule Vero (MO, 20x)



Antigeni virali da usare come Ctrl (+) in PCR

- ERV A-B in PCR real time c/o CeRME
- BVDv in PCR real time c/o DO DMV
- IHNv, VHSV, IPNV, SVCv in PCR c/o Lab. Analisi biomolecolare Biotecnologie

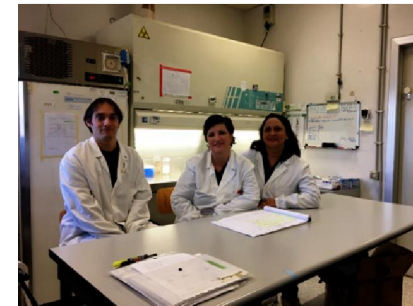


Virus VHS ECP su BF2 (20x)





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*



Grazie per l'attenzione

Marina Cittadini
marina.cittadini@izslt.it

Preparazione Antigeni virali per diagnostica virologica

Roma, 11 Dicembre 2018