

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA

Madrid, 27 – 29 de junio de 2011

PREPARACIÓN DE PANELES PARA EL ENSAYO DE INTERCOMPARACIÓN DE PCR

Elena San Miguel Ibáñez. Dpto. de PCR

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (ALGETE)

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

- Son ensayos de aptitud
- Objetivo: determinar la capacidad del laboratorio participante en la detección del genoma del virus o bacteria objeto del ensayo

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

Matriz: deben simular, en lo posible, las que van a analizar en su trabajo rutinario los laboratorios participantes

Representantes de todos o de un espectro amplio de los **subtipos / serotipos** de interés en el momento actual en el país

Valores diferentes:

- positivos fácilmente detectables
- positivos cercanos al límite de detección de la técnica
- negativos



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

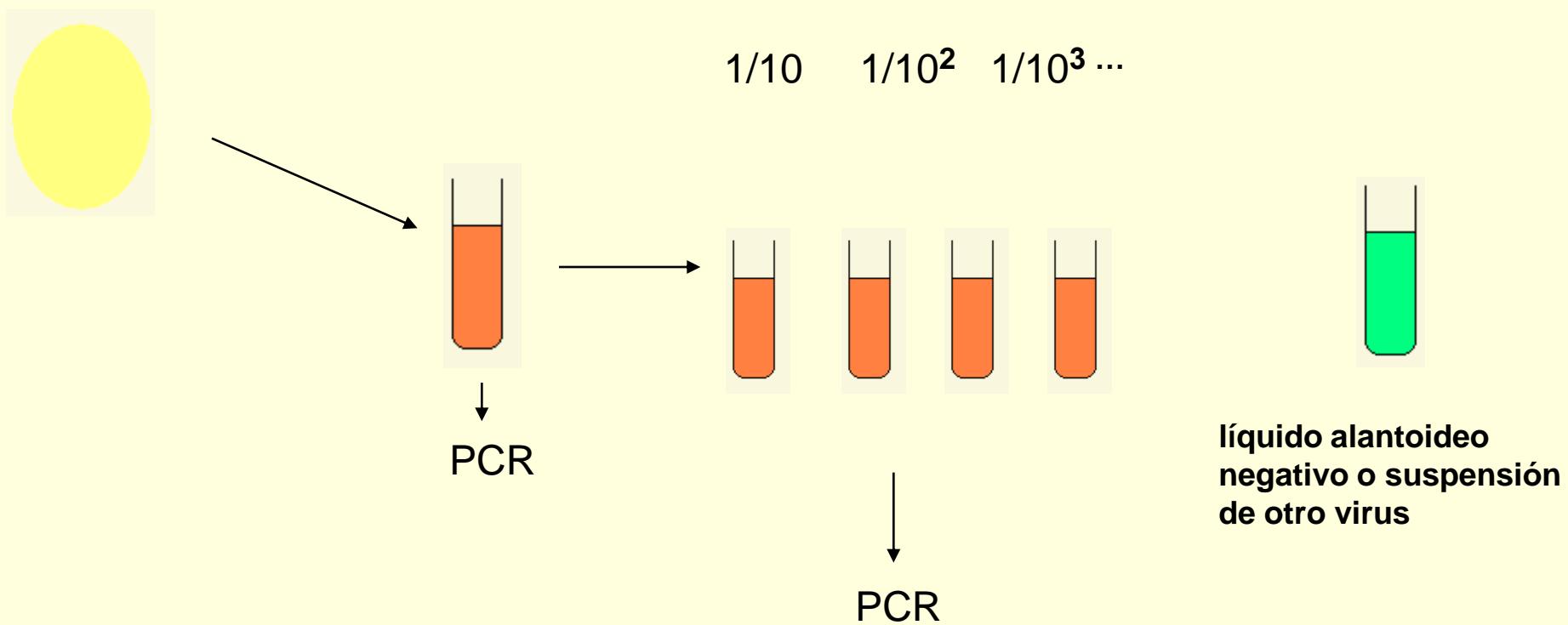
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

| POSITIVAS | NEGATIVAS |
|--|--|
| <p>Suspensiones de virus: ej. cultivo en líquido alantoideo de virus de Enfermedad de Newcastle, de la Influenza Aviar</p> | <p>Líquido alantoideo de huevos no inoculados o inoculados con un virus que interese diferenciar del que es objeto del Ensayo de aptitud (ej. Virus de la Enfermedad de Newcastle en un ensayo de Influenza Aviar)</p> |
| <p>Muestras reales: ej. sangres de rumiantes infectados con el virus de la Lengua Azul</p> | <p>Sangres de animales sanos</p> |
| <p>Muestras positivas preparadas artificialmente: matrices de diferentes muestras animales dopadas con virus: ej. heces porcinas + virus de la Enfermedad Vesicular Porcina</p> | <p>Heces de animales sanos</p> |

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

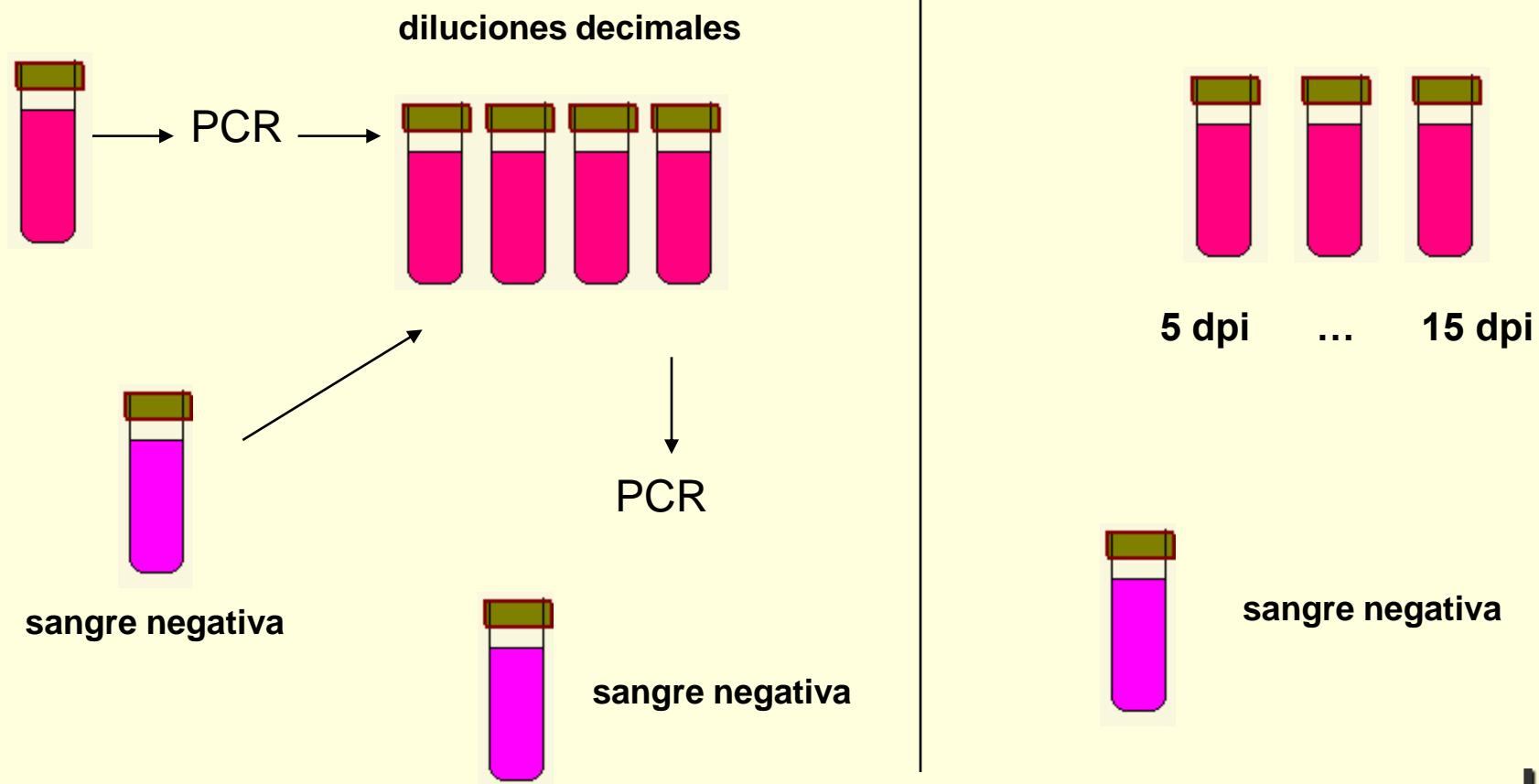
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Ensayos AIV ó NDV:



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

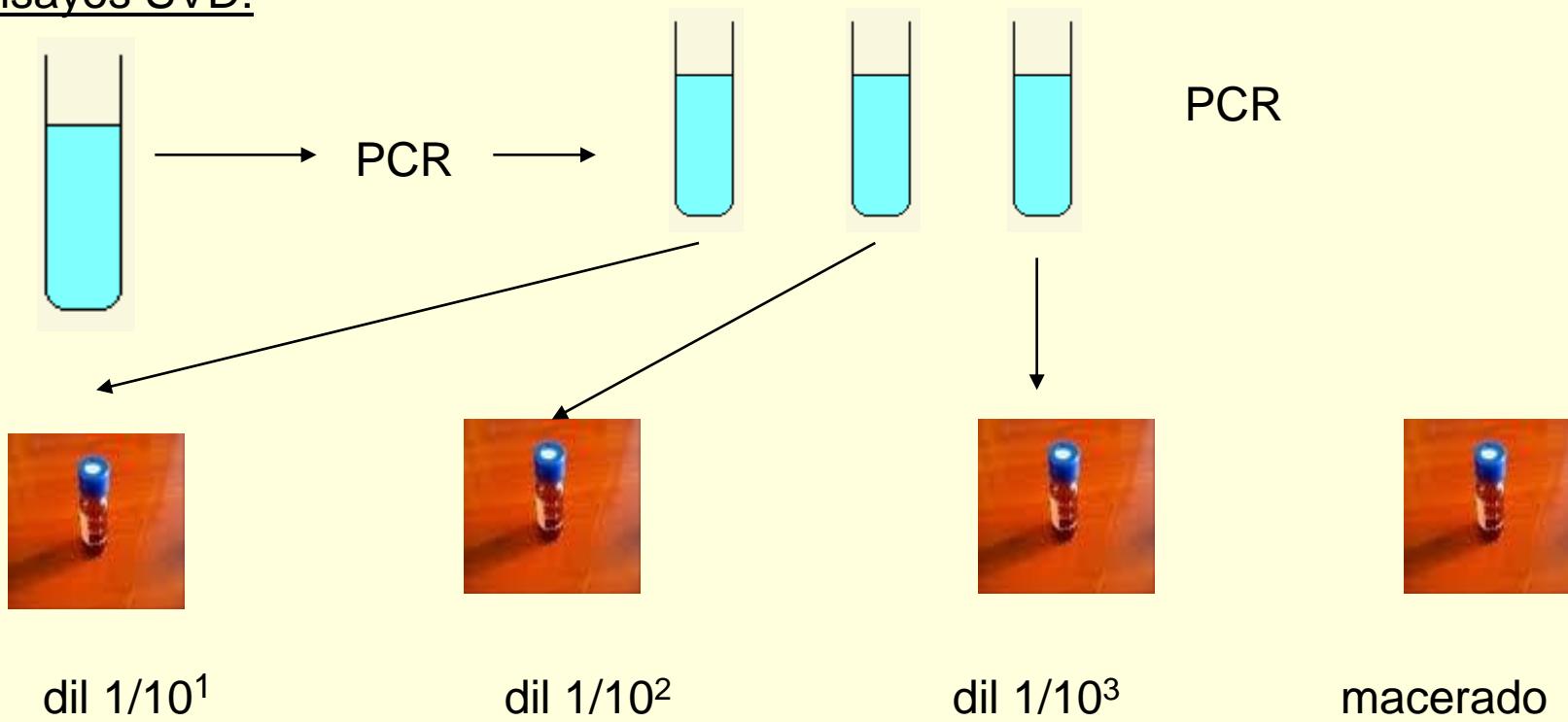
MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Ensayos BTV:

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Ensayos SVD:





ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Ensayo cualitativo: resultados POSITIVO / NEGATIVO / NO CONCLUYENTE

Técnicas de extracción y PCR: las utilizadas habitualmente en cada laboratorio

Condiciones de envío y conservación de las muestras:

- En viales conteniendo 800 – 100 µl
- En refrigeración

* Otra posibilidad: liofilizado.

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Evaluación de la homogeneidad:

- sobre viales ya preparados
- 10 paneles: sobre estos datos se obtiene el **VALOR ASIGNADO**

Evaluación de la estabilidad:

- experiencia de años anteriores
- se mantiene algún panel en las mismas condiciones de refrigeración hasta la finalización del periodo de recepción de resultados

ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS:

- Evaluación cualitativa

-Resultado correcto:

muestras conteniendo virus → POSITIVO o NO CONCLUYENTE
muestras negativas → NEGATIVO

•Se analizan con el laboratorio participante las causas de los resultados incorrectos.

*** Los valores de Ct sirven para analizar el funcionamiento de la técnica en cada laboratorio.**



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

-Ej. Panel ensayo AIV 2010

| Código de la MUESTRA | VALOR MEDIO | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | INTERPRETACIÓN DEL RESULTADO |
|------------------------|-------------|---------------------|------------------------------|
| 1 - A sv AIV H9N7 | 27,2 | 0,6 | POS |
| 2 - B sv NDV Ulster 2C | No Ct | -- | NEG |
| 3 - C sv AIV H5N2 | 35,2 | 0,9 | NO CONCLUYENTE |
| 4 - A sv AIV H9N7 | 28,0 | 0,8 | POS |
| 5 - D sv AIV H7N9 | 32,4 | 2,3 | POS |
| 6 - C sv AIV H5N2 | 35,0 | 2,7 | POS |
| 7 - C sv AIV H5N2 | 33,2 | 0,7 | POS |
| 8 - E sv AIV H7N4 | 27,8 | 0,3 | POS |
| 9 - E sv AIV H7N4 | 28,1 | 0,2 | POS |
| 10 - D sv AIV H7N9 | 32,0 | 1,2 | POS |



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Ej. Panel ensayo BTV 2010

| MUESTRA | VALOR DE REFERENCIA | | INTERPRETACIÓN |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|----------------|
| | VALOR MEDIO | DESVIACIÓN ESTÁNDAR | |
| 1 - A Sangre bovino BTV+ Ser 1 | 28,3 | 0,7 | POSITIVO |
| 2 - B Sangre bovino BTV + Ser 1 | 28,8 | 2,5 | POSITIVO |
| 3 - C Sangre bovino BTV - | No Ct | - | NEGATIVO |
| 4 - D Sangre ovino BTV + Ser 8 | 28,7 | 1,0 | POSITIVO |
| 5 - B Sangre bovino BTV+ Ser 1 | 29,8 | 1,2 | POSITIVO |
| 6 - C Sangre bovino BTV - | No Ct | - | NEGATIVO |
| 7 - E Sangre ovino BTV - | No Ct | - | NEGATIVO |
| 8 - D Sangre ovino BTV + Ser 8 | 30,1 | 2,5 | POSITIVO |
| 10 - B Sangre bovino BTV + Ser 1 | 31,3 | 1,5 | POSITIVO |



ACTIVIDADES DE LABORATORIOS DE REFERENCIA. Madrid, 27-29 de junio de 2011

MATERIALES DE REFERENCIA. PCR

Muchas gracias por su atención