

EJEMPLO DE VALIDACIÓN

AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL VIRUS DE LA LENGUA AZUL EN CULTIVO CELULAR (IGSC/EM-07)

Laboratorio Central de Veterinaria
Madrid, 28 de junio de 2011

CONCEPTOS

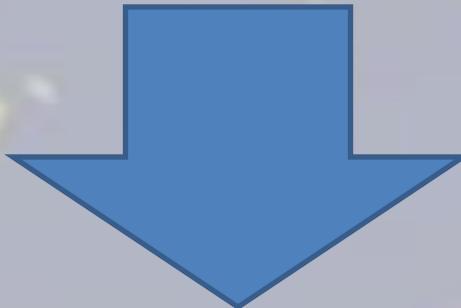
- **Métodos de referencia (Tipo I).** Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional.
- **Métodos basados en métodos de referencia (Tipo II).** Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados en métodos de referencia .
- **Otros métodos (Tipo III)** Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia.

CONCEPTOS

- **Métodos de referencia (Tipo I).** Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional.
- **Métodos basados en métodos de referencia (Tipo II).** Métodos descritos en procedimientos internos del laboratorio, que están basados en métodos de referencia .
- **Otros métodos (Tipo III)** Son aquellos métodos desarrollados por el propio laboratorio o por cualquier otra parte y que no disponen del reconocimiento de los métodos de referencia.

CONCEPTOS

- **Métodos de referencia (Tipo I).** Son métodos que gozan de reconocimiento nacional o internacional.



No requieren de una validación completa. No obstante, el laboratorio debe determinar las características de Funcionamiento del método en su propia situación, por lo que deberá llevar a cabo la **Verificación Interna** del método, así como **disponer de los datos de la validación**

INDICE

- *Referencias del método*
- *Ensayos para determinar el límite de detección (LD) y demostrar la sensibilidad celular*
- *Ensayos de aislamiento con diferentes matrices*
- *Aislamiento del BTV-1 durante el brote de 2007 en España*
- *Participación en Ensayos de aptitud organizados por el CRL*

REFERENCIAS DEL MÉTODO

“Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres” de la **OIE**, en el Capítulo 2.1.3

DETERMINACIÓN DEL LD

Células BHK-21

CEPA	DOSIS	Nº INOCULACIONES	% POSITIVOS
BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	100* DICC ₅₀ /200 µl **Ct PCR 25-28	5	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		5	100%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		5	100%
		15	100%

BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	10* DICC ₅₀ /200 µl **Ct PCR 30-32	5	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		5	40%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		5	60%
		15	67%

* → Calculado el título por dilución límite en células BHK-2

** → Toussaint J.F. et al. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. Journal of Virological Methods 140 (2007) 115-123.

Se detecta hasta la dilución 1 DICC₅₀/200 µl

DETERMINACIÓN DEL LD

Células VERO

CEPA	DOSIS	Nº INOCULACIONES	% POSITIVOS
BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	100* DICC ₅₀ /200 µl	5	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		5	100%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		5	100%
		15	100%

BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	10* DICC ₅₀ /200 µl	5	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		5	80%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		5	80%
		15	87%

* → Calculado el título por dilución límite en células Vero

DETERMINACIÓN DEL LD

Células AA C6/36 (pase posterior en BHK-21)

CEPA	DOSIS	Nº INOCULACIONES	% POSITIVOS
BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	100* DICC50/200 µl **Ct PCR 25-28	10	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		10	100%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		10	100%
		30	100%

* → Calculado el título por dilución límite en células BHK-21 (5 inoculaciones) y Vero (5 inoculaciones)

** → Toussaint J.F. et al. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. Journal of Virological Methods 140 (2007) 115-123.

Se detecta hasta la dilución 1 DICC50/200 µl

COMPROBACIÓN MATRIZ

HOMOGENEIZADOS HUEVO EMBRINADO

CEPA	DOSIS	Nº INOCULACIONES MACERADO PURO	Nº INOCULACIONES MACERADO DILUIDO 1/2	% POSITIVOS
BTV4 SPA 2004/01 3P BHK	100* DICC ₅₀ /200 µl **Ct PCR 25-28	5	5	100%
BTV1 ALG 2006/01 5P BHK 21/04/2009		5	5	100%
BTV8 BEL 2006/01 4P BHK 18/08/2008		5	5	100%
		15	15	100%

* → Calculado el título por dilución límite en células BHK-21

** → Toussaint J.F. et al. Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. Journal of Virological Methods 140 (2007) 115-123.

Se detecta hasta la dilución 1 DICC₅₀/200 µl

**DEMOSTRACIÓN DE QUE LA MATRIZ
MACERADO DE HUEVO EMBRIONADO NO
INTERFIERE**

BROTE BTV1 ESPAÑA 2007

Ct (RRT-PCR)	Nº MUESTRAS SANGRE	Nº HUEVOS INOCULADOS	Nº HUEVOS POSITIVOS	Nº MUESTRAS SANGRE CON ALGÚN HUEVO POSITIVO	Nº POSITIVOS EN CÉLULAS DE LOS POSITIVOS EN HUEVO
20-25	22	59	39 (66%)	19 (86%)	22* (92%)
25-35	9	32	6 (19%)	5 (56%)	3 (50%)
>35	3	7	0	0	

* De los 39 huevos positivos se inocularon en células 24.

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- Tenemos capacidad técnica para realizar el aislamiento del virus de la Lengua azul.
- Partiendo de Cts en sangre bajos (20-25) la eficacia del aislamiento está en torno a un 80%, siendo el pase en huevo embrionado el paso de mayor pérdida de eficacia.
- Si tenemos Cts en sangre entre 25-30, la eficacia del aislamiento baja a valores en torno al 30%. Aunque aparentemente hay más huevos positivos por PCR (56%), de ellos solo el 50% son aislados en cultivo celular. Esto se debe en parte a que algunos positivos por PCR en huevo son debidos al “efecto arrastre” del virus que contiene la sangre original, tal y como se ha comprobado en otros casos.
- Con valores de Ct >35, la eficacia del aislamiento desciende hasta valores que, en este caso, no pueden ser estimados estadísticamente debido al bajo número de muestras

PARTICIPACIÓN ENSAYOS DE APTITUD

Dentro de la parte de diagnóstico virológico, el CRL no ha estimado necesario incluir el aislamiento, por lo que no será posible presentar información alguna. Además, tanto los Ensayos Intercomparación como las Reuniones anuales que organiza el CRL hasta el momento nunca han tratado la técnica de aislamiento, centrado la identificación del agente en la técnica de PCR. No obstante, en el año 2008, con motivo del brote de serotipo 6 en Países Bajos, el CRL envío una muestra conteniendo el virus inoculado sobre células de mosquito (KC), para que los NRLs la introdujesen en línea celular de mamíferos.

El 11 de diciembre de 2008 el CRL realiza el envío de virus vivo de BT (cepa BTV6 NET 2008/04). El DEE realiza la inoculación en la línea celular BHK-21. Tras realizar dos pases ciegos, se evidencia efecto citopático (ECP) sobre el cultivo celular. Es confirmado por PCR como positivo a BTV6.



MUCHAS GRACIAS