



FUNCIONES Y OBLIGACIONES DE LOS LABORATORIOS NACIONALES Y EUROPEOS DE REFERENCIA

Curso de formación en actividades de Laboratorios de Referencia
MARM-FAO

Madrid 27-29 de junio de 2011

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA
Montserrat Agüero García



ESTRUCTURA DE LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL EN LA UE

(PARA CADA ENFERMEDAD O AGENTE ETIOLÓGICO)

LR-UE

LABORATORIOS NACIONALES
LNR

LABORATORIOS REGIONALES
(CCAA, PROVINCIALES...)



ESTRUCTURA DE LABORATORIOS DE SANIDAD ANIMAL EN LA UE

(PARA CADA ENFERMEDAD O AGENTE ETIOLÓGICO)



REGLAMENTO (CE) No 882/2004 DEL
PARLAMENTO EUROPEO Y DEL
CONSEJO

LR-UE

LNR



LEY 8/2003, de 24 de abril, de
sanidad animal

LNR

LCCAA



REGLAMENTO 882

REGLAMENTO (CE) N° 882/2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO

de 29 de abril de 2004

sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales

(DO L 191 de 28.5.2004, p. 1)

TÍTULO III

LABORATORIOS DE REFERENCIA

Artículo 32

Laboratorios comunitarios de referencia

LR-UE

Artículo 33

Laboratorios nacionales de referencia

LNR



REGLAMENTO 882

Funciones Generales de los LR-UE

- **Coordinar métodos diagnósticos** empleados en los Estados miembros (EM)
- **Contribuir al diagnóstico de brotes** en EM (recepción de patógeno para confirmación y caracterización, estudios epizoóticos)
- Facilitar la **armonización de técnicas** en la UE
- **Colaborar**, en métodos de diagnóstico, con laboratorios competentes de **terceros países afectados**,
- **Formación inicial y continua** de personal de los LNR y expertos de países en desarrollo.



REGLAMENTO 882

Obligaciones de los LR-UE

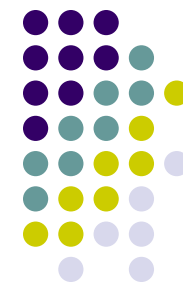
- Contar con **personal cualificado** en las técnicas diagnósticas de su ámbito de competencia
- Poseer los **equipos y productos necesarios** para las tareas asignadas
- Contar con la adecuada **infraestructura administrativa**
- Garantizar que su personal respete la **confidencialidad** de determinados asuntos
- Conocer las **normas y prácticas internacionales**
- **Conocimiento de las actividades de investigación** a nivel nacional y comunitario
- Disponer de **personal formado para situaciones de emergencia** que se produzcan dentro de la Comunidad
- Estar **evaluados/acreditados** conforme a normas europeas (ISO 17025)



REGLAMENTO 882

Funciones adicionales, financiación y control de los LR-UE

- Podrán establecerse **responsabilidades y tareas adicionales** para los LR-UE (listadas en el correspondiente nombramiento)
- Los LR-UE podrán **recibir una contribución económica** de la Comunidad
- Los LR-UE podrán ser **objeto de controles comunitarios** para verificar el cumplimiento de sus funciones y obligaciones



REGLAMENTO 208 **(actualización del 882)**

Anexo VII: Listado LR-UE

Enfermedad	Laboratorio	Normativa de nombramiento
Peste Porcina Africana	Centro de Investigación en Sanidad Animal, Valdeolmos, Madrid, Spain	Directiva 2002/60/CE
Zootecnia	INTERBULL Centre Department of Animal Breeding and Genetics Swedish University of Agricultural Sciences , Uppsala, Sweden	Decisión 96/463/CE
Fiebre Aftosa	Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, United Kingdom	Directiva 2003/85/CE
Brucelosis	ANSES — Laboratoire de santé animale Maisons-Alfort, France	Reglamento 776/2006
Enfermedades de caballos distintas de PEA	ANSES — Laboratoire de santé animale/Laboratoire de pathologie équine, Maisons-Alfort, France	Reglamento 180/2008
Enfermedades de los crustáceos	Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science (Cefas), Weymouth, United Kingdom	Reglamento 737/2008
Rabia	ANSES — Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, Malzeville , France	Reglamento 737/2008



REGLAMENTO 208 **(actualización del 882)**

Anexo VII: Listado LR-UE (cont.)

Enfermedad	Laboratorio	Normativa de nombramiento
Tuberculosis Bovina	VISAVET — Laboratorio de vigilancia veterinaria, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain	Reglamento 737/2008
Peste Porcina Clásica	Institut für Virologie der Tierärztlichen Hochschule, Hanover, Germany	Directiva 2001/89/CE
Peste Equina Africana (PEA)	Laboratorio Central de Veterinaria, Algete, Madrid, Spain	Directiva 92/35/CEE
Gripe Aviar	Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, United Kingdom	Directiva 2005/94/CE
Enfermedad de Newcastle	Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, United Kingdom	Directiva 92/66/CEE
Enfermedad Vesicular Porcina	Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, United Kingdom	Directiva 92/119/CEE
Enfermedades de los peces	Veterinærinstituttet Afdeling for Fjerkræ, Fisk og Pelsdyr Danmarks Tekniske Universitet Aarhus , Denmark	Directiva 93/53/CEE

REGLAMENTO 208 **(actualización del 882)**



Anexo VII: Listado LR-UE (cont.)

Enfermedad	Laboratorio	Normativa de nombramiento
Enfermedades de moluscos	Ifremer — Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer La Tremblade, France	Directiva 95/70/CE
Control de eficacia de vacunas antirrábicas	ANSES — Laboratoire de la rage et de la faune sauvage de Nancy, Malzeville, France	Decisión 2000/258/CE
Fiebre Catarral Ovina	Institute for Animal Health, Pirbright Laboratory, Pirbright, Woking, United Kingdom	Directiva 2000/75/CE
Salud de las abejas	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail Laboratoire de Sophia-Antipolis, Les Templiers Sophia-Antipolis, France	Reglamento 87/2011



DIRECTIVA 92/35

(Nombramiento del LCV LR-UE para Peste Equina Africana)

Funciones del LR-UE para PEA

1) **Coordinar los métodos de diagnóstico** de la peste equina en los Estados miembros, especialmente mediante:

- Clasificación, tenencia y suministro de las cepas del virus de la peste equina
- Suministro a los laboratorios de referencia nacionales de sueros de referencia y otros reactivos de referencia
- Constitución y mantenimiento de una reserva de cepas y de muestras de aislamientos del virus de la peste equina



DIRECTIVA 92/35

(Nombramiento del LCV LR-UE para Peste Equina Africana)

Funciones del LR-UE para PEA (cont.)

- Organización periódica de pruebas comparativas a escala comunitaria de los procedimientos de diagnóstico
- Recogida y cotejo de los datos e informaciones referentes a los métodos de diagnóstico utilizados y a los resultados de las pruebas efectuadas en la Comunidad
- Caracterización de las muestras de aislamientos del virus de la peste equina con arreglo a los métodos más avanzados, a fin de lograr una mejor comprensión de la epizootiología de la peste equina
- Seguimiento de la evolución de la situación, en todo el mundo, en materia de vigilancia, de epizootiología y de prevención de la peste equina.



DIRECTIVA 92/35

(Nombramiento del LCV LR-UE para Peste Equina Africana)

Funciones del LR-UE para PEA (cont.)


- 2) Prestar una **colaboración activa en la identificación de los focos** de peste equina en los Estados miembros mediante el estudio de las muestras de aislamientos de virus que se le remitan para confirmación del diagnóstico, caracterización y estudios epizootiológicos.
- 3) Facilitar la información o la **puesta al día de los expertos** en diagnóstico de laboratorio con vistas a la armonización de las técnicas de diagnóstico en el conjunto de la Comunidad.
- 4) Proceder a **intercambios de información mutuos** y recíprocos con el laboratorio mundial de la peste equina designado por la **Oficina internacional de las epizootias**, en particular en lo que se refiere a la evolución de la situación mundial en materia de peste equina.



Actividades del LCV como LR-UE para PEA

• ORGANIZACIÓN DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACION

- 2004 (ELISA)
- 2006 (ELISA+ RT- PCR)
- 2008 (ELISA+ RT- PCR)
- 2009 (ELISA+ RT- PCR)
- 2010 (ELISA+ RT- PCR)

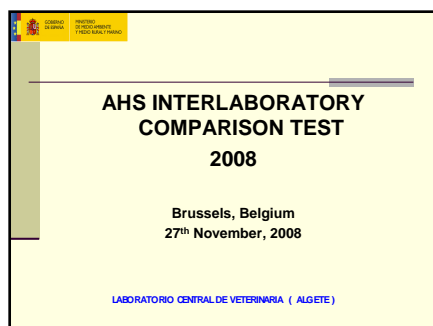


GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE
Y MEDIO RURAL Y MARINO

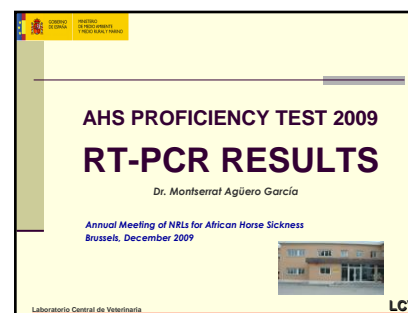
RT-PCR AHS Proficiency Test 2009

NRLs RESULTS (I) :

• ORGANIZACIÓN DE REUNIONES ANUALES CON LOS LNR



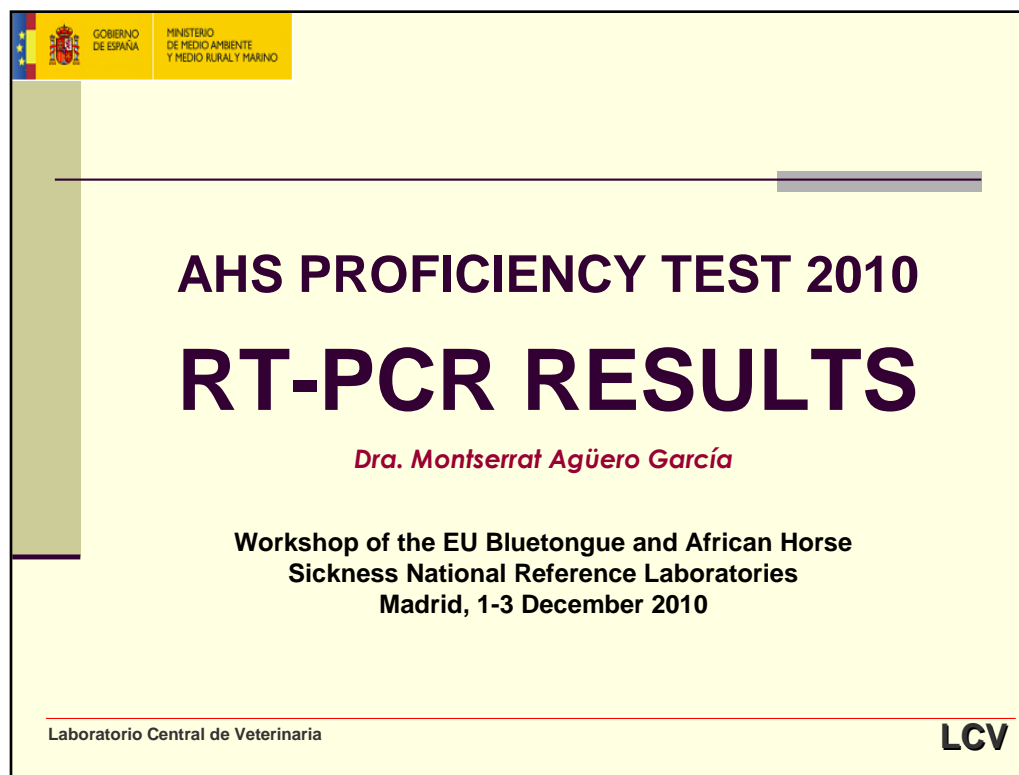
- 2008
- 2009
- 2010





Actividades del LCV como LR-UE para PEA

- ORGANIZACIÓN DE WORKSHOP PARA LOS LNR
 - 2000 (Madrid)
 - 2010 (Madrid)





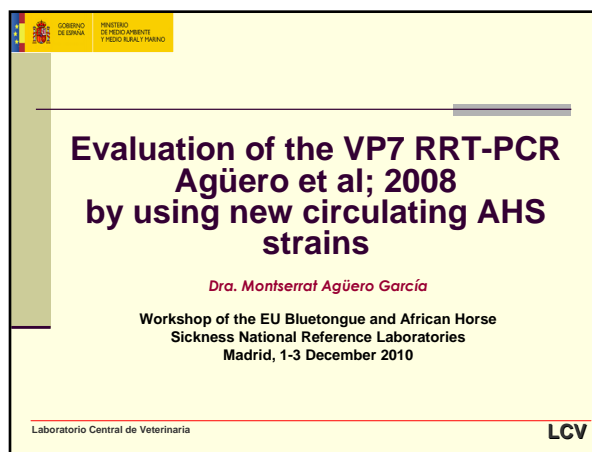
Actividades del LCV como LR-UE para PEA

- DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

J Vet Diagn Invest 20:325–328 (2008)

Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of *African horse sickness virus*

Montserrat Agüero, Concepción Gómez-Tejedor, María Ángeles Cubillo, Consuelo Rubio, Esther Romero, Miguel Angel Jiménez-Clavero¹






Actividades del LCV como LR-UE para PEA

- CARACTERIZACION DE AISLADOS VIRALES

Partial sequencing of VP7 gene of African Horse Sickness Virus serotypes 1-9 reference strains

Annual Meeting of NRLs for African Horse Sickness, Brussels, November 2008

Laboratorio Central Veterinario
Algete (SPAIN)



Sequence of VP7 gene of recent circulating AHSV isolates

Using primers of *Zientara et al; 1994* it was amplified by RT-PCR and sequenced the VP7 gene (Segment 7) of the AHSV isolates

- AHSV-2 Senegal 2007/05
- AHSV-4 Kenya 2007/02
- AHSV-7 Senegal 2007/06
- AHSV-9 Kenya 2006/02

Sequences obtained for each virus (1022-1033 nt in length) include the targeted position of the Agüero et al; 2008 primers/probe

Laboratorio Central de Veterinaria

LCV



Actividades del LCV como LR-UE para PEA

- PREPARACION DE SUEROS DE REFERENCIA

GOBIERNO DE ESPAÑA
MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO

Characterization of sera against the nine AHSV serotypes obtained in Guinea pigs and sheep.

Cristina Tena

LABORATORIO CENTRAL DE VETERINARIA (ALGETE -SPAIN)

**Workshop of the EU Bluetongue and African Horse Sickness
National Reference Laboratories
Madrid, 1-3 December 2010**

Laboratorio Central de Veterinaria

LCV

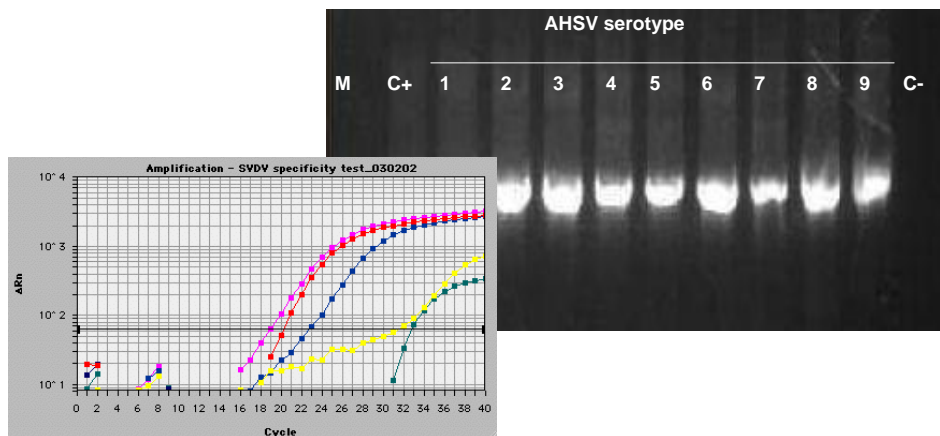
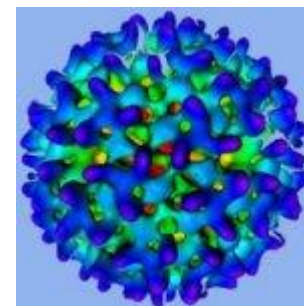


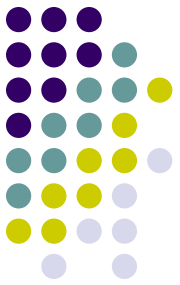
Actividades del LCV como LR-UE para PEA

- ENVIO DE CEPAS Y MATERIALES DE REFERENCIA A LNR y TERCEROS PAÍSES



- ✓ Virus de referencia serotipos 1-9
- ✓ Sueros de Referencia para ELISA
- ✓ Virus inactivados para RT-PCR





REGLAMENTO 882

Artículo 33

Laboratorios nacionales de referencia

1. Los Estados miembros alcanzarán un acuerdo para designar a uno o varios laboratorios nacionales de referencia por cada laboratorio comunitario de referencia indicado en el artículo 32. Un Estado miembro podrá designar un laboratorio situado en otro Estado miembro o en un Estado miembro de la Asociación Europea de Libre Comercio (AELC), y un mismo laboratorio podrá servir de laboratorio nacional de referencia para más de un Estado miembro.



REGLAMENTO 882

FUNCIONES/OBLIGACIONES DE LOS LNR

- **Colaborar con el LR-UE** en su ámbito de competencias
- **Coordinar**, para su área de competencia, las actividades de los **laboratorios oficiales** encargados del análisis de muestras
- **Organizar ensayos comparativos** entre los laboratorios oficiales nacionales y realizar un seguimiento adecuado
- **Difundir** a la autoridad competente y a los laboratorios oficiales nacionales la **información suministrada por el LR-UE**
- Facilitar a la autoridad competente **asistencia científica y técnica** para la puesta en práctica de los planes de control
- Estar **evaluados/acreditados** conforme a normas europeas (ISO 17025)

LEY DE SANIDAD ANIMAL



JEFATURA DEL ESTADO

8510 *LEY 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal.*

JUAN CARLOS I

REY DE ESPAÑA

A todos los que la presente vieren y entendieren.

Actualiza y completa la legislación previa:

Ley de Epizootias de 20 de diciembre de 1952 y en el Reglamento que la desarrolla, aprobado por Decreto de 4 de febrero de 1955



LEY DE SANIDAD ANIMAL

DEFINICION DE LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

17. Laboratorio nacional de referencia: laboratorio designado oficialmente por la Administración General del Estado para una determinada enfermedad de los animales o para un determinado residuo en productos de origen animal, siendo el responsable de la coordinación de las actuaciones necesarias con los laboratorios de todas las Administraciones públicas, con el fin de que los resultados obtenidos en el ámbito de dicha responsabilidad sean homogéneos en todos ellos. Este laboratorio cumplirá, asimismo, el resto de funciones que sean necesarias y que se detallarán en su designación.



LEY DE SANIDAD ANIMAL

CAPÍTULO V

Laboratorios

Artículo 29. *Laboratorios nacionales de referencia.*

DESIGNACION DE LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA

1. La Administración General del Estado designará los laboratorios estatales de referencia, cuyo carácter será necesariamente público, de:

- a) Las enfermedades de los animales de declaración obligatoria.
- b) Los análisis y controles sobre los productos zoonosanitarios, en especial los medicamentos veterinarios, y sobre las sustancias y productos utilizados en la alimentación animal.
- c) Los residuos en animales y en los productos de origen animal de los medicamentos veterinarios y las sustancias y productos utilizadas en la alimentación animal.
- d) Los análisis y controles sobre los productos zoonosanitarios y demás medios utilizados para la prevención, control, lucha y erradicación de las enfermedades de los animales.
- e) Los análisis y controles en materia de sustancias o productos no autorizados.



LEY DE SANIDAD ANIMAL

FUNCIONES GENERALES DE LOS LNR

- **Coordinar** las actuaciones necesarias con los laboratorios oficiales, con el fin de que las **técnicas de laboratorio** sean **homogéneas** en todos ellos.
- **Colaborar con los centros de investigación**, cuando dichos centros investiguen temas relacionados con el LNR.
- **Transferir a los laboratorios oficiales** de CCAA y de la Administración General del Estado la información y las nuevas técnicas que se desarrollen por los LR-UE y de la OIE.
- **Efectuar los análisis** o ensayos que, a efectos periciales o con otros fines, les sean solicitados.



LEY DE SANIDAD ANIMAL

FUNCIONES GENERALES DE LOS LNR (cont.)

- **Confirmar el diagnóstico** de laboratorio en los casos de sospecha, o diagnosticados como sospechosos o positivos por los laboratorios oficiales de las CCAA en enfermedades de declaración obligatoria
- **Homologar los métodos de diagnóstico** de los laboratorios oficiales de CCAA en los programas nacionales de prevención, control, lucha y erradicación de las enfermedades de los animales.
- **Organizar** pruebas comparativas y **ensayos colaborativos** con los laboratorios oficiales de las CCAA.



EL LCV-SA ES LNR PARA:

ENFERMEDAD	NOMBRAMIENTO
Peste Equina Africana	Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 680/1993, de 7 de mayo,
Leucosis Enzoótica Bovina	Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre.
Enfermedades de Peces	Real Decreto 1488/1994, de 1 de julio.
Enfermedades de los crustáceos	Real Decreto 1614/2008, de 3 de octubre.
Enfermedad de Aujeszky	Real Decreto 698/1995, de 28 de abril, que modifica el Real Decreto 245/1995, de 17 de febrero. Real Decreto 636/2006, de 26 de mayo. Decisión 2001/618/CE, de la Comisión de 23 de julio de 2001
Influenza Aviar	Real Decreto 698/1995, de 28 de abril, que modifica el Real Decreto 1025/1993, de 25 de junio. Real Decreto 445/2007, de 3 de abril.
Enfermedad de Newcastle	Real Decreto 698/1995, de 28 de abril, que modifica el Real Decreto 1988/1993, de 12 de noviembre. Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 1988/1993, de 12 de noviembre.
Fiebre Aftosa	Real Decreto 2179/2004, de 12 de noviembre. Directiva del Consejo 2003/85/CE, de 29 de septiembre de 2003
Lengua Azul	Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 1228/2001, de 8 de noviembre.
Peste Porcina clásica	Real Decreto 698/1995, de 28 de abril, que modifica el Real Decreto 2159/1993, de 13 de diciembre. Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 1071/2002, de 18 de octubre.



EL LCV-SA ES LNR PARA (cont.)

ENFERMEDAD	NOMBRAMIENTO
Peste Porcina africana	Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 546/2003, de 9 de mayo.
Enfermedad Vesicular Porcina	Real Decreto 106/2010, de 5 de febrero, que modifica el Real Decreto 650/1994, de 15 de abril.
EET's	Real Decreto 3454/2000, de 22 de diciembre. El Laboratorio Central de Veterinaria de Algete (Madrid) es el Laboratorio Nacional de Referencia para la realización de las pruebas rápidas «post-mortem» de la vigilancia de la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB). Reglamento (CE) No 1974/2005 de la Comisión de 2 de diciembre de 2005 por el que se modifican los anexos X y XI del Reglamento (CE) no 999/2001.
Salmonelosis en animales	Real Decreto 698/1995, de 28 de abril, que modifica el Real Decreto 2491/1994, de 23 de diciembre.
Distintas zoonosis	Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre. Orden APA/1808/2007, de 13 de junio, por la que se modifica el anexo V del Real Decreto 1940/2004, de 27 de septiembre, sobre la vigilancia de las zoonosis y los agentes zoonóticos, establece la referencia para campilobacteriosis y sus agentes causales, listeriosis y sus agentes causales, salmonelosis y sus agentes causales, "Escherichia coli" verotoxigénica, leptospirosis y sus agentes causales, psitacosis y sus agentes causales, vibriosis y sus agentes causales, yersiniosis y sus agentes causales, tularemia y sus agentes causales, borreliosis y sus agentes causales, botulismo y sus agentes causales, calicivirus, virus de la hepatitis A, virus de la gripe, virus transmitidos por artrópodos, y otras zoonosis y agentes zoonóticos víricos o bacterianos, distintos de los indicados en el apartado b), en productos para la alimentación animal y en animales vivos
Varroosis	Real Decreto 608/2006, de 19 de mayo.



DESIGNACIÓN LNR LENGUA AZUL

Artículo decimocuarto. Modificación del Real Decreto 1228/2001, de 8 de noviembre, por el que se establecen medidas específicas de lucha y erradicación de la fiebre catarral ovina o lengua azul.

El contenido del artículo 3 del Real Decreto 1228/2001, de 8 de noviembre, por el que se establecen medidas específicas de lucha y erradicación de la fiebre catarral ovina o lengua azul, se sustituye por el siguiente:

1. Se designa al **Laboratorio Central de Sanidad Animal** del Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino, sito en **Algete, como laboratorio nacional de referencia.**
2. Las Comunidades Autónomas podrán autorizar, en su ámbito territorial, laboratorios de diagnóstico para la fiebre catarral ovina o lengua azul cuyos **diagnósticos positivos serán confirmados por el laboratorio nacional de referencia.**



DESIGNACIÓN LNR LENGUA AZUL (cont.)

3. El **laboratorio nacional de referencia** será responsable de la **coordinación de las normas y los métodos de diagnóstico** establecidos en cada laboratorio de diagnóstico autorizado por la autoridad competente para esta enfermedad, así como de la utilización de los reactivos y las pruebas de las vacunas y tendrá las siguientes funciones:

- a) **Suministrar reactivos** de diagnóstico a los laboratorios de diagnóstico que lo soliciten
- **Controlar la calidad de todos los reactivos de diagnóstico** utilizados.
- **Organización periódica de pruebas comparativas.**
- **Conservación de los agentes** causantes de la enfermedad o tejidos que los contengan que se hayan aislado, de los casos confirmados.
- **Confirmación de los resultados positivos** obtenidos en los laboratorios de diagnóstico.

4. El laboratorio nacional de referencia se mantendrá en **contacto con el laboratorio comunitario de referencia.**



Actividades del LCV como LNR para L.A.

- CONFIRMACION BROTES, AISLAMIENTO Y TIPIFICACION (molecular y serológica)

- 2000
- 2003
- 2004
- 2005
- 2006
- 2007
- 2008
- 2009
- 2010



Spanish 2004 BTV outbreak: Detection, Isolation, Characterization and follow-up

Laboratorio Central de Veterinaria

Spanish 2004 BTV outbreak: Laboratory diagnosis

First Samples received (Cádiz)

1° Bovine sentinels
EDTA-Blood → + RT-PCR
Serum → - ELISA (Ab)

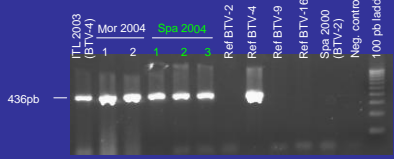
2° BTV suspicious sheep
EDTA-Blood → + RT-PCR
Tissues : lung, lymph node liver, spleen
Serum → + ELISA (Ab)

Spanish 2004 BTV outbreak: Isolation

Ovine EDTA-Blood RT-PCR +
↓
Washed (PBS), lysed (water)
↓
Inoculated in 9-12 days ECE
Incubated 33.5°C 7 days
↓
Homogenated dead un-dead embryos
↓
Inoculation cc aedes albopictus Identification (PCR)
↓
cc BHK21 → cc Vero → Identification (VN, PCR)

Spanish 2004 BTV outbreak: Characterization

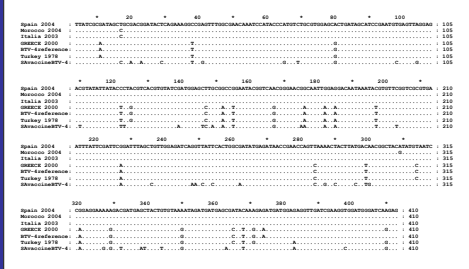
Typing as BTV-4 by RT-PCR of viral segment 2 with BTV-4 specific primers S4-I/ S4-V (Agüero 2004)



Primers designed in VP2 conserved regions considering 3 BTV-4 isolates: SA BTV-4 vaccine, Greece 2000 and Turkey 1978 (sequences kindly provided by P. Mertens I.A.H. Pirbright)

Spanish 2004 BTV outbreak: Characterization

Analysis of 410 nt (1042-1451 of BTV-4 SA vaccine) of Spain 2004 viral segment 2: Confirmation of BTV-4 type



Spanish 2004 BTV outbreak: Follow-up

Development of high throughput RT-PCR methodology for BTV detection in EDTA-blood samples

BioSprint 96 workstation Qiagen → N.A. extraction in 96 well plates using Qiagen BioSprint 96 DNA Blood kit (magnetic beads)

Real-time RT-PCR (Tagman-MGB probe) 96 well format → ABI PRISM 7000 and 7500

137,467 SAMPLES ANALYZED OCT 2004-OCT 2006



Actividades del LCV como LNR para L.A.

- DIAGNÓSTICO POR RRT-PCR 2004-2005

Spanish 2004 BTV outbreak: Follow-up

Development of high throughput RT-PCR methodology for BTV detection in EDTA-blood samples

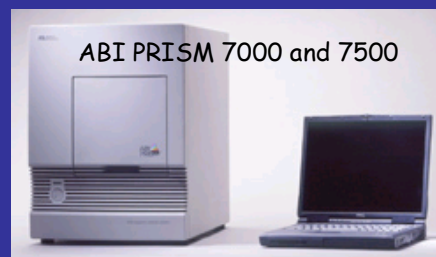


BioSprint 96 workstation Qiagen



N.A. extraction in 96 well plates using *Qiagen BioSprint 96 DNA Blood kit* (magnetic beads)

Real-time RT-PCR (Taqman-MGB probe) 96 well format



ABI PRISM 7000 and 7500

137.467 SAMPLES ANALYZED OCT 2004-OCT 2006



Actividades del LCV como LNR para L.A.

• TRANSFERENCIA DE METODOS A LCCAA

Método empleado en LCV hasta Agosto 2006

■ **RT-PCR en tiempo real** (M.A. Jiménez y cols, 2006) (RRT-PCR Algete) + **automatización de extracción**.

- **Alta sensibilidad** para detección BTV ser 4 campo, ser 4 vacunal, ser 2 vacunal, ser 2 campo.
- **Sistema de alto rendimiento** (capacidad para >1000 muestras/día)

■ **Caracterización del BTV presente en muestras positivas:**

- **RT-PCR en tiempo real específica para BTV-ser4Campo** (España 2004-2006).
- **RT-PCRs en tiempo real específicas para ser4Vacunal y ser2Vacunal** (Vacunas vivas atenuadas ser4 y ser 2 Onderstepoort).
- **RT-PCR convencional primers OIE (BT-A/ BT-B) y secuenciación.**

• 2005 transferencia del método RRT-PCR *Jiménez-Clavero et al 2006*

Nuevos métodos de RRT-PCR para detección de la cepa BTV serotipo 8 circulante en el norte de Europa

3. RRT-PCR desarrollada en colaboración por los LNR de **Bélgica y Francia**. Primers del segmento 5 (NS1)

- **Detecta serotipo 8** circulante en el norte de Europa y del **serotipo 1** circulante en Mediterráneo **con mayor sensibilidad** que RRT-PCR Pirbright y RRT-PCR Holanda.
- **Igual sensibilidad que RRT-PCR Algete** para **serotipo 4** circulante en España
- **Método actualmente empleado para el diagnóstico de BTV en LCV de Algete**

• 2006 transferencia del método *Toussaint et al 2007* (facilitado por los autores a través del LR-UE antes de su publicación)



Actividades del LCV como LNR para L.A.

• ORGANIZACIÓN DE ENSAYOS DE INTERCOMPARACION

- 2006
- 2007
- 2008
- 2009
- 2010

<p>GOBIERNO DE ESPAÑA MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y MEDIO RURAL Y MARINO</p> <p>Reunión laboratorios de sanidad animal. Lengua Azul. Madrid, 8 de marzo de 2011</p> <p>Ensayo interlaboratorial RT-PCR BTv 2010</p>									
	L01		L02		L03		VALOR DE REFERENCIA		INTERPRETACIÓN
MUESTRA	valores de Ct / banda	INTERPRETACIÓN	valores de Ct / banda	INTERPRETACIÓN	valores de Ct / banda	INTERPRETACIÓN	VALOR MEDIO	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	Detección del genoma de BTv
1 - A Sangre bovino BTv+ Ser 1	32,53	POSITIVO	30,2	POSITIVO	25,72	POSITIVO	28,3	0,7	POSITIVO
2 - B Sangre bovino BTv + Ser 1	34,06	POSITIVO	34,6	POSITIVO	27,57	POSITIVO	28,8	2,5	POSITIVO
3 - C Sangre bovino BTv -	sin ct	NEGATIVO	NA	NEGATIVO	No Ct	NEGATIVO	No Ct	-	NEGATIVO
4 - D Sangre ovino BTv + Ser 8	33,88	POSITIVO	32,9	POSITIVO	26,54	POSITIVO	28,7	1,0	POSITIVO
5 - B Sangre bovino BTv+ Ser 1	33,40	POSITIVO	32,5	POSITIVO	27,30	POSITIVO	29,8	1,2	POSITIVO
6 - C Sangre bovino BTv -	sin ct	NEGATIVO	NA	NEGATIVO	No Ct	NEGATIVO	No Ct	-	NEGATIVO
7 - E Sangre ovino BTv -	sin ct	NEGATIVO	NA	NEGATIVO	No Ct	NEGATIVO	No Ct	-	NEGATIVO
8 - D Sangre ovino BTv + Ser 8	35,14	POSITIVO	31,8	POSITIVO	26,39	POSITIVO	30,1	2,5	POSITIVO
10 - B Sangre bovino BTv + Ser 1	34,11	POSITIVO	31,6	POSITIVO	28,12	POSITIVO	31,3	1,5	POSITIVO

Laboratorio Central de Veterinaria



Actividades del LCV como LNR para L.A.

• ORGANIZACIÓN DE REUNIONES ANUALES CON LOS LCCAA

- 2005
- 2006
- 2007
- 2008
- 2009
- 2010



MINISTERIO
DE MEDIO AMBIENTE Y
MEDIO RURAL Y MARINO

Reunión de:

Laboratorios de Sanidad Animal para el diagnóstico de la Lengua azul 2011

Lugar y fecha:

MARM, Madrid
08 de marzo de 2011

INFORME DE LA REUNIÓN

ASISTENTES

- Personal del Laboratorio Nacional de Referencia para la enfermedad de la Lengua Azul:
 - Marta Vigo Martín. Directora Técnica.
 - Monserrat Agüero García. Directora Adjunta
 - Elena San Miguel Ibáñez. Responsable del Departamento de PCR
 - Rubén Villalba Martínez. Responsable del Departamento de Enfermedades Emergentes
 - Paula Diéguez González. Técnico superior del Dpto. de Enfermedades Emergentes
 - M^a José Ruano Ramos. Técnico superior del Dpto. de PCR
 - Esther Romero Álvarez. Técnico del Dpto. de PCR

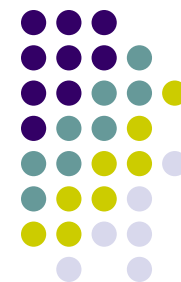


Actividades del LCV como LNR para L.A.

- ASISTENCIA REUNIONES DE LR-UE CON LNR Y TRANSFERENCIA DE LA INFORMACIÓN A LCCAA

- 2005
- 2006
- 2007
- 2008
- 2009
- 2010





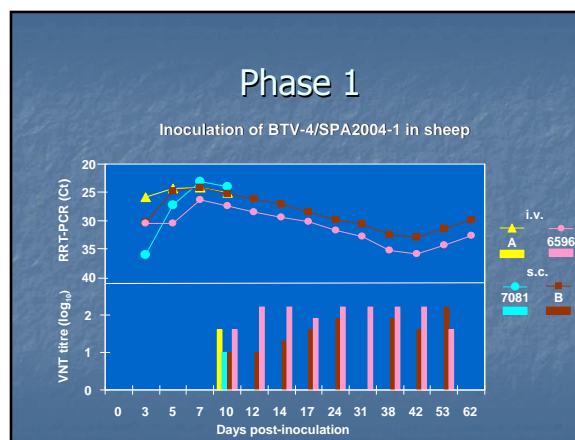
Actividades del LCV como LNR para L.A.

• COLABORACION EN LA EVALUACIÓN DE VACUNAS INACTIVADAS

PROPUESTA ENSAYO VALIDACIÓN

- Posología propia de cada laboratorio productor
 - vacuna 1 dosis 21 d.p.v.
 - vacuna 2 dosis 14 d.p.v.
- Challenge
 - viremia
 - anticuerpos
- Estudio durante 1 mes tras el challenge

Nº DE ANIMALES: 5 + 2 controles vacunados + 2 controles con virus "challenge"



EXPERIMENTOS CON VACUNAS

PRUEBA	EFICACIA	ESPECIE	SEROTIPO	FORMULACION	RESULTADO
F7	1 MES y 4 MESES				
F13	1 MES				
F19	12 MESES				
G6	1 MES				
G9	1 MES				
G11	1 MES				
G12	1 MES				
G14	1 MES				

EXPERIMENTOS CON VACUNAS

PRUEBA	EFICACIA	ESPECIE	SEROTIPO	FORMULACIONES	RESULTADO
F17	3 MESES	OVINO	4	VLA007/006 VLA008 VLA011	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
F24	1 MES	OVINO	4	Bluevac-4	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
F26	6 MESES	OVINO	4	Bluevac-4	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
F27	1 MES	OVINO	4	Bluevac 1-4 07/001 07/002 07/003	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
G4	1 MES	OVINO	1	Bluevac 1 Bluevac 1-4	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
G7	1 MES	OVINO	1	Bluevac 1-4 07/002 07/003	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
F28	12 MESES	OVINO	4	Bluevac 4	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
H5	1 MES	OVINO	8	Bluevac 8 1 dosis 2 dosis	ELIMINACIÓN DE VIREMIA

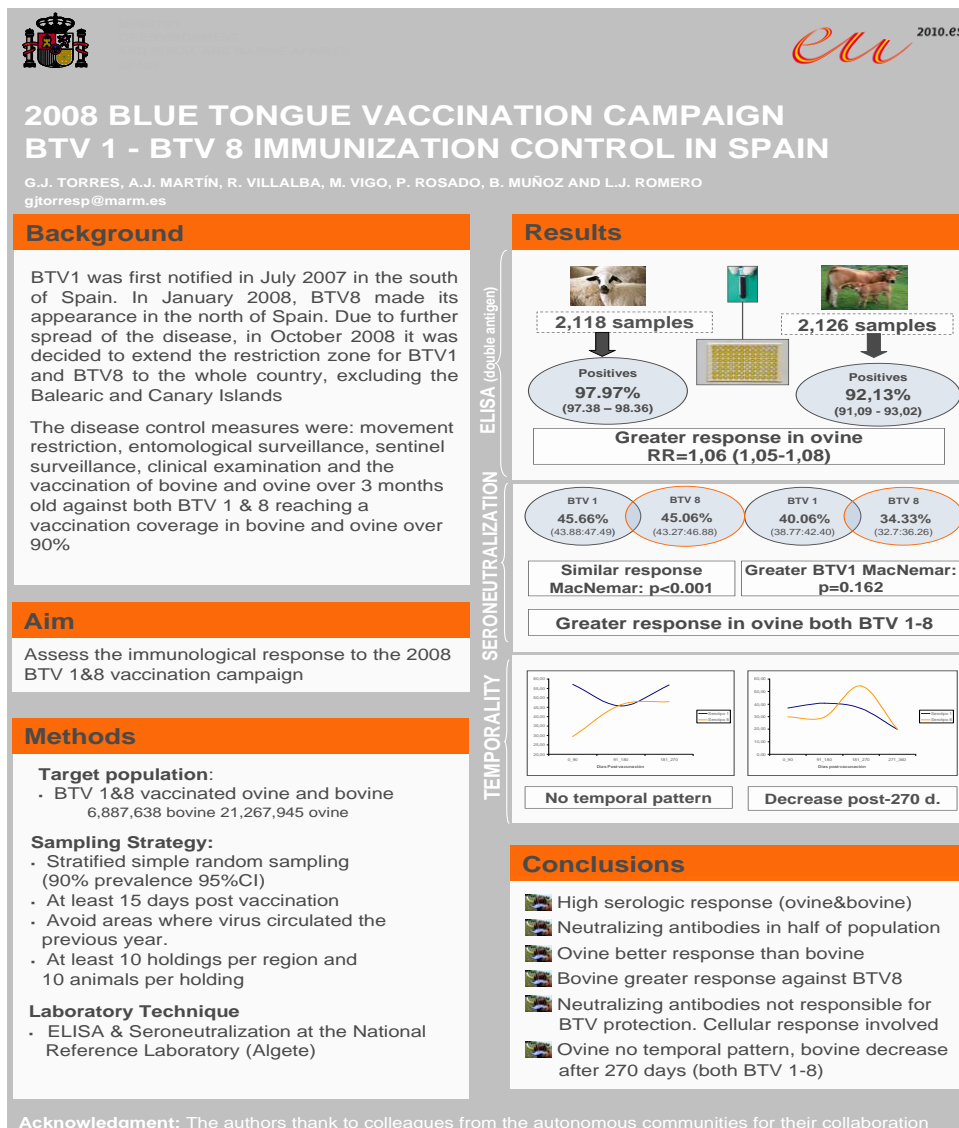
PRUEBA	EFICACIA	ESPECIE	SEROTIPO	FORMULACIONES	RESULTADO
F5	a) 2 MESES b) 4 MESES	OVINO	4	a) A,B,C,D,E,I,J b) S,I,J	ELIMINACIÓN DE VIREMIA a)I,J b)J
F10					
F23					
F25					
G8					
F29					
F30					
F31					
H8					

EXPERIMENTOS CON VACUNAS

PRUEBA	EFICACIA	ESPECIE	SEROTIPO	FORMULACIONES	RESULTADO
F21	1 MES	OVINO	4	K1 K2 K7 K8	ELIMINACIÓN DE VIREMIA (fórmulas K1 y K2)
G5	1 MES	OVINO Y BOVINO	1	2 Fórmulas (Bov) 3 Fórmulas (Ovino)	ELIMINACIÓN DE VIREMIA
H4	1 MES	OVINO Y BOVINO	8	4 Fórmulas (Bov) 4 Fórmulas (Ovino)	ELIMINACIÓN DE VIREMIA (4 Grupos Ov y 1 Grupo Bov)
H7	1 MES	CAPRINO	8	4 Fórmulas	ELIMINACIÓN DE VIREMIA



Actividades del LCV como LNR para L.A.



• ENSAYOS DE EVALUACIÓN DE EFICACIA DE VACUNACIÓN EN CAMPO



**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**

UNIÓN
EUROPEA