



Informe de validación ID Screen® BLV Competition

ELISA de competición destinado para la detección de anticuerpos contra la proteína de envoltura gp51 del virus de la Leucosis Bovina Enzoótica.

- ♦ Excelente especificidad y sensibilidad
- ♦ Calibrado para detectar el suero estándar internacional E05
- ♦ Test directo y versátil, con incubación corta y nocturna para sueros individuales o mezclas de suero o plasma

Introducción

El virus de la leucosis bovina (BLV), es un retrovirus oncogénico, ampliamente distribuido y endémico en muchos rebaños bovinos. La enfermedad más importante causada por el BLV es la Leucosis Bovina Enzoótica, una forma de linfoma maligno.

La mayoría de vacas infectadas con BLV no muestran signos clínicos. La infección por BLV es de larga duración, la presencia de anticuerpos en los sueros contra BLV indican una infección persistente.

El kit ELISA **ID Screen® BLV Competition**, puede ser empleado como parte de un programa de vigilancia y erradicación de la enfermedad para detectar anticuerpos anti-gP51 en sueros y plasmas bovinos.

El test es rápido y fácil de usar en comparación a otros kits, con solamente una etapa de lavado.

Especificaciones del kit

Código del producto	BLVC
Formato del kit	4 ó 10 placas
Reacciones	384 ó 960
Formato de la placa	Tiras de 12 x 8 pocillos
Método	ELISA de competición
Especies	Bovinos o búfalos
Muestras	Sueros o plasmas (individuales o mezclas de hasta 10 muestras)
Antígeno	Virus purificado de la gp51
Conjugado	Anti-gp51-HRP conjugado (concentrado 10X)
Incubación	Corta o nocturna

Principio del test

Los pocillos son sensibilizados con el antígeno gp51.

Las muestras a analizar y los controles son añadidos a los pocillos. El anticuerpo anti-gP51, si está presente, formará un complejo antígeno-anticuerpo, el cual enmascarará los epítomos de la gp51.

Un conjugado anti- gp51-HRP es agregado después del lavado. Este se fija a los epítomos restantes libres de la gp51, formando un complejo antígeno-conjugado-HRP.

Luego del lavado para eliminar el exceso del conjugado, se incorpora la solución de revelación (TMB).

El resultado de la coloración depende de la cantidad de anticuerpos presente en la muestra a analizar. En ausencia de anticuerpos en las muestras, aparece una coloración azul que se convierte en amarilla luego de añadir la solución de parada. En presencia de anticuerpos en las muestras, no aparece ninguna coloración.

La Microplaca se lee a 450 nm.

Para cada muestra, se calcula el porcentaje de competición (%competición=S/N):

$$DO_{\text{muestra}}/DO_{\text{control negativo}} \times 100.$$

Las muestras que presentan un S/N:

- inferior o igual a 50 % son consideradas positivas.
- superior a 50 % e inferior a 60 % son consideradas dudosas.
- superior o igual a 60 % son consideradas negativas.

Sensibilidad analítica

El kit se calibra utilizando el estándar internacional E05; el cual debe ser encontrado positivo a una dilución 1:100^{(1)*}.

Resultados:

- El E05 es detectado positivo a 1:100 tanto en condición día (incubación corta) como en condición noche (incubación nocturna).

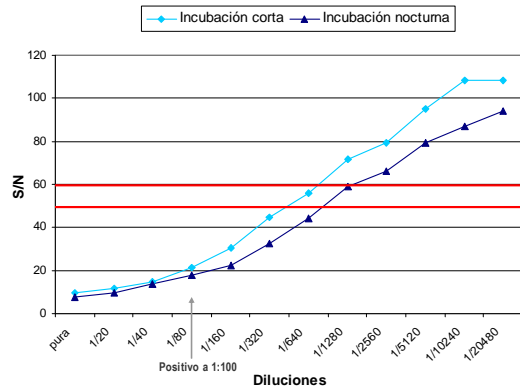


Figura 1: Dilución del estándar E05

*El patrón francés de referencia p63 del laboratorio de referencia ANSES diluido al 1:10 es equivalente al referencial europeo E05 diluido al 1:100.

Sensibilidad

La sensibilidad es verificada mediante el análisis de sueros procedentes de animales infectados, confirmados como positivos o positivos límites en AGID.

Se analizaron 100 sueros individuales y 100 mezclas de suero (10 sueros por cada mezcla). Estas mezclas provienen de sueros individuales diluidos al 1:10 en suero negativo (Figuras 2 y 3).

Resultados:

- Todos los sueros (individuales y mezcla) fueron encontrados positivos.
- La sensibilidad fue del 100% (IC₉₅= 96.3-100%), n=100.

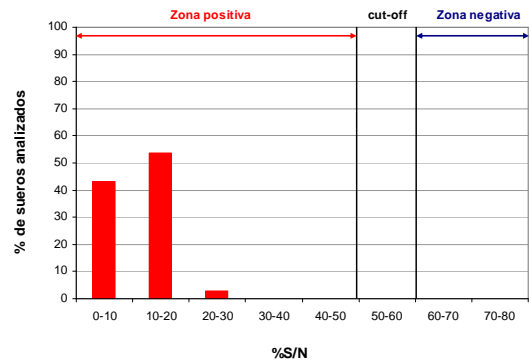


Figura 2: distribución de S/N para sueros individuales positivos, n=100

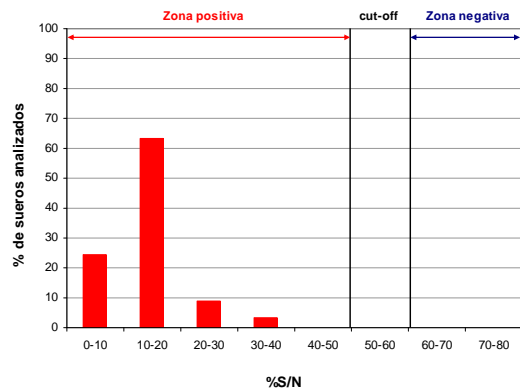


Figura 3: distribución de S/N para mezclas de sueros positivos, n=100

Especificidad

Rebaños indemnes

La especificidad ha sido evaluada mediante el análisis de 1150 sueros originarios de Bretaña y Hérault (Francia) de ganados declarados negativos desde hace más de 3 años mediante análisis serológico. A partir de estos sueros, se realizaron 300 mezclas de 10 sueros cada una y estas también fueron analizadas (Figuras 4 y 5).

Resultados:

- Los 1150 sueros individuales y las 300 mezclas de sueros fueron encontrados negativos.
- La sensibilidad para los sueros individuales fue del 100% ($IC_{95}= 99.67-100\%$) al igual que para la mezcla de sueros que también fue del 100% ($IC_{95}= 98.74-100\%$).

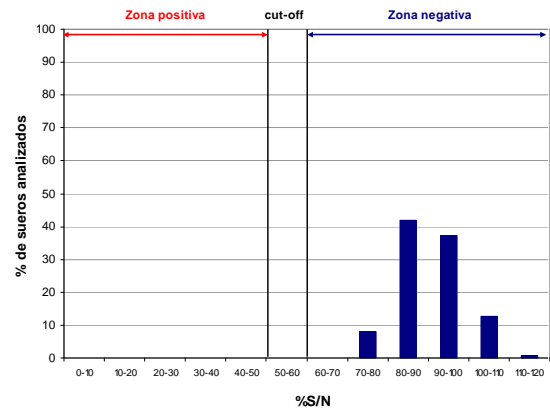


Figura 4: Distribución %S/N para sueros individuales, n=1150

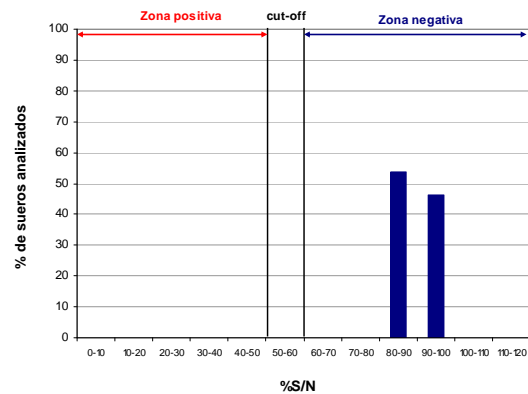


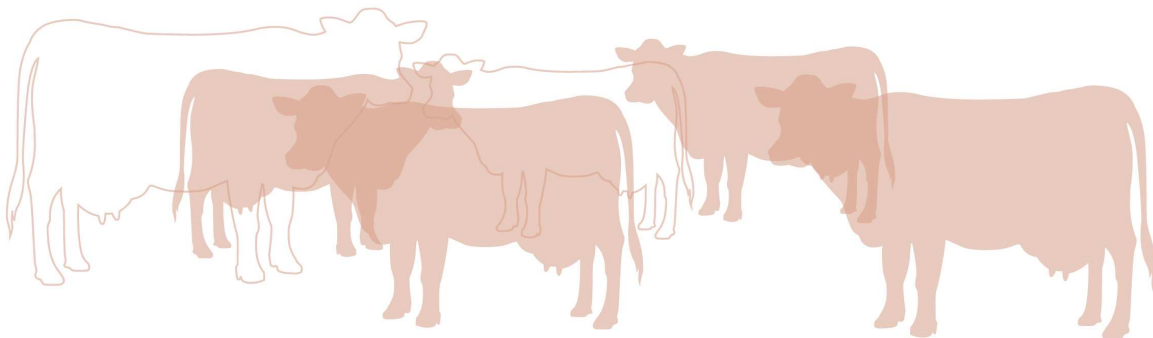
Figura 5: Distribución %S/N para mezcla de sueros, n=300.

Animales vacunados

50 sueros procedentes de vacas vacunadas con "Mucobovin" (Vacuna inactivada BVD Merial) fueron analizados. Dichos sueros han presentado resultados falsos positivos en otros ELISAs comerciales indirectos en BLV.

Resultados:

- Ninguno de los sueros brindaron resultados no específicos con el kit ELISA ID Screen®.



Repetibilidad

La repetibilidad del test ha sido evaluada midiendo el cociente de variación (CV) de 36 repeticiones del control negativo y 60 repeticiones de un suero débilmente positivo en 2 placas.

El CV obtenido para cada suero no debe exceder de 10%.

Los resultados del CV fueron de 3 y 2% para el control negativo y 4 y 3% para el suero débilmente positivo.

Conclusión

El kit ELISA **ID Screen® BLV Competition** demostró una alta especificidad y sensibilidad. Está calibrado con respecto a la Directiva Europea CEE 64/432. Constituye una herramienta fiable para la vigilancia de la infección por BLV. Además, el test es particularmente fácil de utilizar ya que presenta sólo una etapa de lavado y los resultados se obtienen al cabo de 90 minutos.

Bibliografía

- (1) Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) Terrestrial Manual 2012; 2.4.11; Leucose Bovine Enzootique.
- (2) European directive CEE 64/432
- (3) Norma NF U 47-301, Métodos de análisis en salud animal– Expediente de presentación para el control de reactivos biológicos utilizados en el campo de la salud animal, AFNOR, versión Diciembre 2001 (al día de la presentación del documento).
- (4) Norma NF U 47-300, Métodos de análisis en salud animal – Terminología, AFNOR, versión Octubre 2002 (al día de la presentación del documento).
- (5) Norma NF U 47-019, Métodos de análisis en salud animal – Guía de buenas prácticas para la implementación de técnicas ELISA, AFNOR, versión Febrero 2010 (al día de la presentación del documento).

ID.vet
Innovative Diagnostics

167 rue Mehdi Ben Barka,
34070 Montpellier - FRANCE

Phone + 33 (0) 4 67 41 49 33
Fax + 33 (0) 4 67 45 36 95

idvet.info@id-vet.com
www.id-vet.com

