

ELISA-LABORATORIA

Onderzoek naar de nauwkeurigheid en herhaalbaarheid van het kwantificeren van antistoffen tegen het AD virus



In Canada is in de periode 2011 t/m 2014 een groot onderzoek uitgevoerd naar de nauwkeurigheid en herhaalbaarheid van ELISA-resultaten bij 5 verschillende laboratoria. De deelnemende ELISA-laboratoria bevonden zich in de VS, Canada, Denemarken, Finland en in Nederland (het CFE-laboratorium). Uit dit onderzoek bleek een grote variatie in nauwkeurigheid, ook afhankelijk van het doel waarvoor de test gebruikt wordt, het opsporen van positieve dieren met als doel het bedrijf AD-vrij te hebben/houden, of het rangschikken van dieren naar hoeveelheid antistoffen met als doel AD beheersbaar te houden op het bedrijf. Ons eigen CFE-laboratorium kwam wat betreft 'beheersbaarheid' als beste uit de bus!



Ing. Louise Boekhorst,
Voorlichting NFE te Nederasselt

Het onderzoek

Om een grote groep nertsen samen te stellen die een afspiegeling geeft van een bedrijf waar al langer selectie plaatsvindt op basis van antistoffen selectie werden voor dit onderzoek in de periode 2010-2013 880 nertsen, zowel teven als reuen met een leeftijd variërend van 6 maanden tot 1,5 jaar, blootgesteld aan het AD-virus. In de periode 2011-2014 werd van deze nertsen tussen 16 en 176 weken na

blootstelling aan het AD-virus bloed afgenomen. Dit bloed werd vervolgens gecentrifugeerd en het verkregen serum en plasma werd bij -80°C opgeslagen tot verder onderzoek. Om de titer (concentratie antistoffen tegen het AD-virus in het bloed) van de individueel verkregen bloedmonsters te bepalen werden al deze bloedmonsters middels 10 tweevoudige verdunningen (1/1-1/1024) verdund en daarna met de Counter-test getest. De titer werd bepaald door de hoogste verdunning die in de Counter-test nog positief of twijfelachtig was. Daarnaast werden bloedmonsters van dezelfde dieren naar de vijf verschillende ELISA-laboratoria gestuurd voor onderzoek op de hoeveelheid antistoffen tegen het AD-virus.

Er is een duidelijk verschil tussen de deelnemende ELISA-laboratoria. Het laboratorium van de Finse vereniging en ons eigen CFE-laboratorium hanteren voor de ELISA-test een methode die gebaseerd is op recombinant VP2 antigeen. Het Deense laboratorium maakt daarentegen gebruik van AMDV-G virus en ook de laboratoria in Canada en de VS gebruiken een systeem dat op de AMDV-G strain gebaseerd is.

Een ander verschil is dat de laboratoria in Denemarken en Finland de ELISA-test in eerste instantie ontwikkeld hebben als vervanger van de Counter-test, dus om te testen of dieren positief of negatief zijn, waarbij het belangrijk is dat de lage waarden erg nauwkeurig bepaald worden. Het CFE-laboratorium heeft de ELISA-test direct vanaf het begin aangepast om de dieren te rangschikken naar hoeveelheid antistoffen in het volledige traject. Het doel daarvan is om de deelnemende bedrijven meer selectieruimte te bieden.

Resultaten en conclusies:

- Het rangschikken van de dieren naar antistoffen titer is niet exact hetzelfde bij de verschillende laboratoria.



die gebruik maken van het recombinant VP2 antigeen zijn voor dit doel meer nauwkeurig dan de ELISA-testen die gebaseerd zijn op het AMDV-G antigeen.

Aanvullende informatie:

Jaarlijks wordt ook een ringtest uitgevoerd voor zowel Counter- als ELISA-laboratoria in de verschillende landen. De deelnemende laboratoria ontvangen dan allemaal dezelfde partij monsters om onderzocht te worden met de Counter- en/of de ELISA-test. De partij van 24 monsters bestaat uit bloedmonsters afkomstig van negatieve bedrijven, recent geïnfecteerde bedrijven en chronisch besmette bedrijven. Ook hier neemt het CFE-laboratorium steeds aan deel en daaruit blijkt de constante, hoge kwaliteit van ons laboratorium. We komen steeds als de beste of één na beste voor beide testmethoden naar voren. Uit de laatste resultaten van de test van eind 2016 blijkt wel dat recent geïnfecteerde dieren soms wat moeilijker te vinden zijn, zowel in de Counter- als de ELISA-test, maar dat geldt voor alle laboratoria.

Daarnaast volgen wij op Edelveen nauwgezet de worpprestaties en berekenen we de resultaten naar ELISA-waarde van de teven en de reuen. Reeds jaren is duidelijk dat ELISA-waarde 4 in ons laboratorium ongeveer het omslagpunt vormt, vooral voor de jonge teven. Voor oude teven kan de grens ook iets hoger gelegd worden. Als de ELISA-waarde te hoog is, wordt het aantal levend geboren pups lager, het gustompercentage hoger en



neemt de uitval toe. De invloed van de reu lijkt hierbij groter dan gedacht. Als ELISA-waarde van de reu wordt aangehouden, de gemiddelde ELISA-waarden van de reuen die een teef gepaard hebben. Mogelijk bieden de resultaten van het sperma-onderzoek, dat dit jaar tijdens de paartijd is uitgevoerd op Edelveen, hier extra informatie over.

(de informatie in dit artikel is onder andere gebaseerd op het artikel "Accuracy of enzyme-linked immunosorbent assays for quantification of antibodies against Aleutian mink disease virus" A.H. Farid, P.P. Rupasinghe gepubliceerd in 'Journal of Virological Methods' 2016, pag. 144-151)

- De ELISA-systemen in Nederland (CFE) en Finland rangschikken de nertsen meer nauwkeurig en consequent naar antistoffen titer dan de andere drie laboratoria. De correlatiecoëfficiënten in de onderzoeksperiode waren 0.831 voor het CFE-laboratorium en 0.809 voor het Finse laboratorium, waar deze voor Denemarken, VS en Canada resp. maar 0.629, 0.582 en 0.426 waren.
- Bij individuele dieren met erg hoge titer was de tendens dat ze een lagere ELISA-waarde hadden dan de gemiddelde waarde (waar de piek van de ELISA-resultaten zat) en dat was vooral bij de laboratoria uit de VS en Canada.
- De ELISA-systemen, speciaal die gebaseerd op AMDV-G antigeen (Denemarken, Canada en VS) vereisen meer verfijning om hun nauwkeurigheid en consequentheid bij het rangschikken te verbeteren.
- De resultaten van het laboratorium in Denemarken toonden een erg hoge gevoeligheid voor het bepalen van het omslagpunt voor positief/negatief, waar het systeem voor ontwikkeld is, d.w.z. het vinden van AD-vrije dieren maar waren niet erg nauwkeurig voor het rangschikken van de nertsen naar antistoffen titer.

De resultaten doen veronderstellen dat de soort antigeen, die gebruikt wordt voor de bepaling van de hoeveelheid antistoffen tegen het AD-virus, mogelijk een van de factoren is die de nauwkeurigheid van de test bepaalt. ELISA-testen

