



Estudio de validación de Kits de ELISA-I para el diagnóstico de *Mycoplasma* en aves

Subdepartamento de Sanidad Animal

1. Introducción

El año 2009 se dio inicio al Programa de Control de *Mycoplasma sp.* en abuelas broilers y reproductores de pollo y pavo, incluyendo *M. gallisepticum* (MG), *M. Synoviae* (MS) y *M. meleagridis* (MM), para efectos de producir aves libres de estos agentes y favorecer, en lo posible, la exportación de genética. Estos agentes favorecen la aparición de cuadros respiratorios y articulares que requiere sean controlados por el sector productor.

Los dos laboratorios que realizan la prueba de ELISA para detección de estos agentes con validez oficial fueron Autorizados por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y desarrollan el diagnóstico de acuerdo al Instructivo Técnico para Detección de Anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis* Mediante Técnica de ELISA-I¹.

El Instructivo menciona sólo un Kit o su equivalente técnicamente validado por la OIE u organismo internacionalmente reconocido para detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma* para realizar el análisis, sin embargo, y dado el avance tecnológico en el diagnóstico y el desarrollo de alternativas diagnósticas, se ha hecho necesario evaluar nuevos Kits que puedan ser usados en el programa luego de una validación técnica de diagnóstico.

2. Objetivo del estudio

Validar el rendimiento técnico respecto a Sensibilidad diagnóstica, Especificidad diagnóstica y determinación de punto de corte² de diferentes Kits de ELISA para diagnóstico de *M. gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis* para ser incluidos dentro de los Kits que pueden ser utilizados en el Programa de Control de *Mycoplasma sp.* a partir de muestras de suero de *Gallus gallus* y pavos.

1

<<http://www.sag.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hDiJdo6idDh%2B&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivold=1704>>

² Definiciones: <<<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/>>>

Servicio Agrícola y Ganadero. División Protección Pecuaria. Av. Presidente Bulnes 140, 7° piso, Santiago -Chile

Teléfono: (02) 56 3451401 - 3451402

www.sag.cl





3. Material y método

3.1. Kits diagnósticos

Los Kits a utilizar serán aquellos aportados por los laboratorios interesados en validar sus productos ELISA para ser usados en el Programa de Control de *Mycoplasma sp.* en pavos y *Gallus gallus*. Los kits a evaluar deberán estar capacitados para detectar la presencia de anticuerpos contra estos agentes ya sea en *Gallus gallus*, pavos o en ambas especies. Para cada tipo de diagnóstico deberá entregarse la cantidad de Kits necesario para realizar el estudio. Los laboratorios interesados deberán entregar la siguiente información de cada producto a evaluar:

- Laboratorio productor (Nombre y Dirección)
- Producto (descripción)
- Nombre Comercial
- Hoja de control de calidad
- Contenido del reactivo de ELISA (Caja)
- Proceso general de manufacturación y condiciones de almacenaje:
 - Microplacas: Principios, antígeno, producción industrial de microplacas y otros componentes del kit.
- Validaciones realizadas de sensibilidad (analítica y diagnóstica), especificidad (analítica y diagnóstica), reproducibilidad y repetibilidad para cada especie.
- Licencias en países cuando corresponda.

3.2. Muestras de suero

Se utilizarán 188 muestras positivas y 188 muestras negativas de MG y MS a evaluar por cada kit, para cada especie según corresponda, que se incluya en la validación previamente confirmados por la Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA). En el caso en que el kit pueda ser usado en ambas especies, las muestras serán igualmente 188 positivas y 188 negativas. En el caso de MM se utilizarán 24 muestras positivas y 188 muestras negativas.

Las muestras positivas y negativas serán las siguientes:

M. sinoviae: Las muestras negativas de *Gallus gallus* y pavos provendrán de planteles confirmados como negativos. Las muestras positivas de *Gallus gallus* provendrán de planteles positivos al agente mientras que las muestras positivas de pavos provendrán de sueros de referencia.

M. galisepticum: Las muestras negativas de *Gallus gallus* y pavos provendrán de planteles confirmados como negativos. Las muestras positivas de *Gallus gallus* provendrán de planteles positivos al agente mientras que las muestras positivas de pavos provendrán de sueros de referencia.





M. meleagridis: Las muestras negativas de pavos provendrán de planteles confirmados como negativos. Las muestras positivas provendrán de sueros de referencia con diluciones conocidas.

3.3. Procedimiento de la técnica

El procedimiento de cada técnica a utilizar será el recomendado por cada fabricante,

3.4. Método de referencia

El método diagnóstico de referencia para la prueba de validación será la Inhibición de la Hemoaglutinación.

3.5. Laboratorios

Podrán participar todos los laboratorios importadores de Kits para diagnóstico de *Mycoplasma* sp. mediante ELISA, los cuales deberán aportar los Kits necesarios para realizar la prueba de validación.

La prueba de validación será realizada en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, el cual se encuentra Autorizado por el SAG para realizar la prueba de ELISA.

La prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación será realizada en el Subdepartamento de Laboratorio y Estación Cuarentenaria Pecuaria del Servicio Agrícola y Ganadero (Laboratorio SAG).

3.6. Diseño del estudio

Se realizará la validación mediante la evaluación individual de cada Kits, para cada especie, de cada laboratorio y para cada *Mycoplasma* en relación a un panel de sueros con diagnóstico conocido. La prueba de referencia se realizará en formato ciego.

Los Kits usados en la validación serán enviados al Laboratorio SAG en donde serán codificados previo a su envío al Laboratorio de la Universidad de Chile. La misma situación ocurrirá con las muestras positivas y negativas tanto de origen poblacional como los sueros de referencia.

En el laboratorio universitario, los reactivos serán analizados en el mismo equipo, por el mismo equipo de analistas, según los instructivos de cada Kits, siendo sus resultados informados al SAG.

El análisis de las muestras mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación se realizará de acuerdo al método descrito en el Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las vacunas





para los Animales Terrestres, Séptima Edición, 2012, de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE)³.

3.7. Análisis estadístico

Para establecer la concordancia entre pruebas se utilizarán la Prueba de Kappa (Martin y col., 1987), interpretándose de acuerdo a la escala de referencia propuesta por Landis y Koch (1977) y Curvas y Análisis ROC. La sensibilidad y especificidad serán analizadas según el punto de corte recomendado y optimizado. El análisis de las pruebas se realizará en los programas computacionales Win Episcope 2.0 y STATA 11. Todos los análisis serán hechos con un nivel de confianza del 95%.

4. Resultados

Los resultados serán enviados desde el laboratorio de la Universidad de Chile a los responsables del estudio en el Laboratorio SAG y del Subdepartamento de Sanidad Animal del SAG.

Los responsables, en conjunto con los responsables del laboratorio de la Universidad de Chile, realizarán un informe final con los resultados obtenidos que será entregado a la Dirección del Laboratorio SAG.

5. Responsables

El responsable final del estudio será el Subdepartamento de Sanidad Animal. Los responsables técnicos serán un profesional del Laboratorio SAG y un profesional del Laboratorio de Patología Aviar.

6. Propiedad de los resultados

Para todos los efectos, los resultados serán de propiedad del SAG.

7. Publicaciones

Los resultados del estudio podrán ser publicados en formato de tesis de pre grado de la carrera de Medicina Veterinaria con participación de profesionales del SAG y manteniendo aspectos de confidencialidad respecto de los laboratorios y Kits diagnósticos utilizados.

³ <<http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/>>

Servicio Agrícola y Ganadero. División Protección Pecuaria. Av. Presidente Bulnes 140, 7° piso, Santiago -Chile
Teléfono: (02) 56 3451401 - 3451402

www.sag.cl





8. Cronograma

El cronograma de desarrollo del estudio será el siguiente:

Fecha	Actividad
Febrero – Marzo	Llamado a laboratorios
Marzo - Abril	Elaboración del panel de sueros
Mayo	Ejecución de los análisis
Mayo - Junio	Evaluación resultados e informe final

9. Bibliografía

Landis, J. R., G. G. Koch. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33: 159-174.

Martin, S. W., A. H. Meek, P. Willerb. 1987. *Veterinary Epidemiology*, Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. Pp. 343.

