

 <p>SAG Ministerio de Agricultura</p> <p>Gobierno de Chile</p>	<p>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM</i>, <i>MYCOPLASMA SYNOVIAE</i> Y <i>MYCOPLASMA MELEAGRIDIS</i>, MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA</p>	<p>Código: D-GF-CGP-PT-015 Versión:02</p>
--	--	---

Instructivo técnico para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis*, mediante técnica de ELISA.

Tabla de Contenidos

Contenido	Página
1. Objetivos y alcance	3
2. Referencias y documentos relacionados	3
3. Definiciones y abreviaturas	3
4. Requisitos	4
4.1 Requisitos de personal	4
4.2 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos	5
4.2.1 Equipos, instrumentos y materiales	5
4.2.2 Reactivos	5
4.3 Requisitos específicos	6
4.4 Medios de verificación de requisitos	6
5. Análisis/Ensayo	7
5.1 Captación y envío de la muestra	7
5.2 Recepción y manejo de la muestra	7
5.3 Metodología	7
5.4 Expresión de los resultados	7
5.5 Envío de muestras reaccionantes	8
6. Registro y envío de resultados	8
7. Supervisión a los laboratorios autorizados	8
8. Medidas por incumplimiento	9
9. Formulario de identificación del personal de laboratorio	10

INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A *MYCOPLASMA* *GALLISEPTICUM*, *MYCOPLASMA SYNOVIAE* Y *MYCOPLASMA MELEAGRIDIS*, MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA

Código: D-GF-CGP-PT-015
Versión:02

1. Objetivos y alcance.

El objetivo de este instructivo es dar a conocer los requisitos específicos para la autorización de laboratorios por parte del SAG, para ejecutar el análisis/ensayo mediante técnica de **ELISA**, para la detección de anticuerpos frente a ***Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis***.

El señalado análisis se aplica en muestras de sueros de pollos y pavos provenientes de Planteles suscritos al programa de planteles de aves de corral bajo certificación oficial (PABCO) y los planteles comerciales de aves que se incorporen al programa de control de *Mycoplasma sp.* en planteles comerciales de aves.

Del mismo modo, en este documento se estipulan las condiciones y directrices técnicas que deben cumplir los laboratorios que obtengan la autorización.

2. Referencias y documentos relacionados.

- Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 2008. Capítulos 1.1.2 y 2.3.5.
- Programa de control de *Mycoplasma sp.* en planteles comerciales de aves, versión vigente.
- Reglamento específico para la autorización de laboratorios análisis/ensayo, versión vigente.
- Manual de bioseguridad en el laboratorio, Organización Mundial de la Salud, OMS (2005).

3. Definiciones y abreviaturas.

ELISA	Enzyme-Linked inmunosorbent assay
MVL	Médico veterinario laboratorio
NBS 1	Laboratorio con nivel bioseguridad 1 (NBS 1)
TL	Técnico de laboratorio
Protocolo Oficial	Documento emitido por el médico veterinario oficial del SAG o médico veterinario autorizado: "Protocolo de toma de muestras del proyecto nacional de vigilancia epidemiológica en aves y resultados de laboratorio".
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero
IHA	Inhibición de la hemoaglutinación
Laboratorio Oficial	Laboratorio perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero
OIE	Organización internacional de salud animal
MVO	Médico veterinario oficial del SAG

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A MYCOPLASMA GALLISEPTICUM, MYCOPLASMA SYNOVIAE Y MYCOPLASMA MELEAGRIDIS, MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA	Código: D-GF-CGP-PT-015 Versión:02
--	--	---------------------------------------

MVA	Médico veterinario autorizado
Ms	<i>Mycoplasma synoviae</i>
Mg	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>
Mm	<i>Mycoplasma meleagridis</i>

4. Requisitos.

4.1 Requisitos del personal.

a) Responsable técnico:

Según lo dispuesto en el número 4.2 del reglamento específico para la autorización de laboratorios análisis/ensayo, el laboratorio debe contar con un responsable técnico, quien será la contraparte del SAG, en temas técnicos asociados a su actividad como laboratorio autorizado. Este responsable técnico para efectos de la autorización para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis* mediante técnica de ELISA, debe cumplir con los siguientes requerimientos:

- Poseer título profesional otorgado por una entidad reconocida por el Estado, correspondiente a una carrera del área Biológica o Química. En caso de título obtenido en el extranjero, éste debe estar revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Experiencia laboral en el área de laboratorio de al menos dos (2) años, dentro de los cuales al menos 6 meses deben ser en técnicas de ELISA (comprobable).
- Haber recibido capacitación en la técnica ELISA indirecto, comprobable mediante certificado correspondiente. Demostrar competencia en la ejecución de la metodología a autorizar.
- Estar calificado y capacitado en el uso de procedimientos, instructivos, manuales y otros documentos del alcance de la autorización.
- El responsable técnico debe tener un subrogante, el que debe cumplir con los mismos requisitos indicados anteriormente.

b) Analista:

El laboratorio deberá contar con analistas en número adecuado de acuerdo a la cantidad de análisis a realizar, quienes deben cumplir el siguiente perfil:

- Poseer un título profesional o técnico, de una carrera correspondiente al área biológica, química, agropecuaria o de los alimentos, impartida por una entidad de enseñanza superior reconocida por el Estado o, en caso de título extranjero, revalidado según procedimiento establecido por el Ministerio de Educación.
- Haber recibido capacitación en la técnica ELISA indirecto, comprobable mediante certificado correspondiente.
- Tener experiencia laboral, de al menos seis (6) meses comprobable, en técnicas de ELISA.

**INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS FRENTE A *MYCOPLASMA
GALLISEPTICUM, MYCOPLASMA SYNOVIAE
Y MYCOPLASMA MELEAGRIDIS,*
MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA**

Código: D-GF-CGP-PT-015
Versión:02

4.2 Requisitos infraestructura equipos materiales y reactivos.

El laboratorio debe poseer infraestructura adecuada a un nivel Bioseguridad 1, de acuerdo al Manual de Bioseguridad en el laboratorio, recomendado por la Organización Mundial de Salud, OMS (2005) y utilizar en todo momento Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL).

4.2.1 Equipos, instrumentos y materiales.

- Tubos para dilución.
- Micropipeta monocanal ajustable 10-100 µl.
- Micropipeta monocanal ajustable 1-10 µl.
- Micropipeta multicanal de 8 y 12 canales (50 a 300 µl).
- Las micropipetas deben tener su respectivo certificado de calibración, la que se hará una vez al año.
- Puntas para micropipetas desechables.
- Reloj control.
- Refrigerador (4-8°C).
- Termómetro para refrigerador (contrastado con termómetro patrón).
- Lector ELISA (con filtro de lectura según corresponda) (debe tener una verificación anual).
- Lavador de placas (opcional) (debe tener una verificación anual).
- Sistema de calefacción o enfriamiento para mantener temperatura ambiental entre 18-25 °C.
- Termómetro para medir temperatura ambiental (contrastado con termómetro patrón).

4.2.2 Reactivos.

Se suman al kit ya autorizado de IDEXX Laboratories, la utilización de los siguientes kits diagnósticos, para ser usados en el programa de vigilancia nacional:

Laboratorios	Kits diagnósticos autorizados
IDEXX ®	IDEXX MS IDEXX MG IDEXX MG/MS IDEXX MM
Biochek ®	Biochek MS Biochek MG
IdVet ®	Idvet MS Idvet MG
Svanova ®	Svanova MG

Cabe hacer presente, que previa incorporación de los kit señalados, el Servicio realizó un estudio de validación en el año 2013, que contó con la participación de 4 laboratorios de proveedores de

	INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM, MYCOPLASMA SYNOVIAE Y MYCOPLASMA MELEAGRIDIS,</i> MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA	Código: D-GF-CGP-PT-015 Versión:02
--	---	---------------------------------------

kits ELISA comerciales. Por otra parte, la realización de la técnica se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile, el que se encuentra autorizado por el SAG para realizar este test.

4.3 Requisitos específicos

El laboratorio debe contar con los siguientes documentos:

- Instructivo manejo de muestras involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivo preparación y esterilización de material de vidrio.
- Instructivo eliminación y descontaminación de residuos y materiales
- Instructivo aseo y limpieza de laboratorios.
- Instructivo de verificación de equipos.
- Instructivo control material de lavado.
- Instructivo control de calidad interno.
- Lista maestra de equipos e instrumentos de medición involucrados en el alcance de la autorización.
- Instructivos de uso de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.
- Programa de mantención/verificación/calibración de los equipos involucrados en el alcance de la autorización.

4.4 Medios de verificación de requisitos.

El laboratorio postulante debe adjuntar a la solicitud de autorización, además de los antecedentes establecidos en el numeral 6.1 del reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, los documentos que a continuación se detallan y que dan cuenta del cumplimiento de los requisitos establecidos por el SAG en este capítulo:

- Croquis del laboratorio, identificando uso de áreas y ubicación de equipos.
- Lista de registros técnicos relacionados con el alcance de autorización.
- Lista de equipos críticos, indicando nombre, marca, modelo, fecha de puesta en servicio, capacidad cuando corresponda, y que incluya la mantención y calibración de estos.
- Lista de materiales, reactivos y kits.
- Formulario de identificación del personal del laboratorio vinculado al análisis.
- Certificado de título de los/las analistas identificados, en original o fotocopia legalizada.
- Documentos que acrediten la capacitación tanto del/la responsable técnico como de los/las analistas en la técnica de ELISA correspondiente.
- Instructivos específicos, señalados en el numeral 4.3 de este Instructivo.

Sin perjuicio de lo anterior, el cumplimiento de los requisitos descritos tanto en el reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, como en este instructivo, serán confirmados por el Servicio en la visita de verificación, a través de los medios que considere idóneos para tal efecto.

Con este fin, el SAG podrá someter al responsable técnico y a uno o más analistas identificados por el postulante, a una evaluación teórica y/o práctica.

5. Análisis/Ensayo

5.1 Captación y envío de la muestra.

Las muestras enviadas a un laboratorio autorizado para la detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis* mediante técnica de ELISA, será responsabilidad de un médico veterinario autorizado o de un médico veterinario oficial del SAG. En todos los casos, la muestra siempre debe ir acompañada del protocolo oficial de toma de muestras del proyecto nacional de vigilancia en aves, el cual debe estar completo y consignar todos los datos que en dicho protocolo se solicitan.

5.2 Recepción y manejo de la muestra.

El laboratorio autorizado debe anotar todas las muestras ingresadas en un libro de registro de muestras, destinado exclusivamente a las muestras de ELISA. En este caso **no se utilizarán contramuestras**.

Las muestras de suero o sangre no deben ser congeladas, pero deben ser mantenidas en refrigeración entre 4° y 8° C hasta su análisis. El analista determinará la aptitud de las muestras, las cuales no deben presentar contaminación ni hemólisis. En relación al envase, no debe haber tubos rotos, extravasación de sueros y deben estar claramente identificadas.

5.3 Metodología.

Las muestras deben ser analizadas, siguiendo las instrucciones del protocolo interno de cada kit comercial que usará el laboratorio autorizado.

Todos los reactivos y muestras deben ser mantenidos a temperatura ambiente (18-25° C), por 30 minutos antes de ser usados. Luego agitarse con inversión y con un movimiento circular.

5.4 Expresión de los resultados.

Utilizando los valores obtenidos de cada kit, el punto de corte o Cut-off se ha optimizado para tener la mejor sensibilidad y especificidad diagnóstica. Por lo que los valores S/P son los siguientes:

Kit	Punto de corte Valor S/P
MS IDEXX	0,5
MG IDEXX	0,5
MM IDEXX	0,5
MS/MG IDEXX Combinado	0,5
MS Biochek	0,2
MG Biochek	0,2
MS IdVet	0,2
MG IdVet	0,4
MG SVANOVA (ELISA competencia)	20%I

 <p>SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile</p>	<p>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM, MYCOPLASMA SYNOVIAE Y MYCOPLASMA MELEAGRIDIS,</i> MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA</p>	<p>Código: D-GF-CGP-PT-015 Versión:02</p>
--	--	---

Por lo tanto la lectura de las muestras (reaccionante o no reaccionante) será según estos puntos de corte, según el kit que se ha utilizado.

Las muestras que sean reaccionantes en su primer análisis deben ser repetidas, usando el mismo kit diagnóstico, el mismo protocolo y el mismo punto de corte anterior. A su vez, si se ha usado un kit de *Mycoplasma* combinado Ms/Mg, las muestras reaccionantes al primer análisis, deben repetirse con un kit específico para cada *Mycoplasma*.

5.5 Envío de muestras reaccionantes.

Todas las muestras de suero que resulten reaccionantes a la prueba de ELISA a alguno de los *Mycoplasma*, deben ser enviadas al laboratorio oficial SAG "Lo Aguirre" para su confirmación, mediante la técnica de IHA (Inhibición de la hemoaglutinación). Estas muestras deben ir junto al protocolo oficial del SAG y una copia del reporte de la lectura del ELISA (según el software del equipo utilizado). Dichas muestras deben enviarse debidamente identificadas, con la respectiva cadena de frío y no más allá de tres días después de obtenido el resultado.

6. Registro y envío de resultados.

Los resultados deben ser registrados en el protocolo oficial de toma de muestras del proyecto nacional de vigilancia en aves, el cual debe ser firmado por el responsable técnico del laboratorio.

Los resultados serán comunicados al MVA de la empresa, MVO del sector en el cual se tomaron las muestras y Nivel Central SAG mediante el envío de una copia del protocolo, un fax o un correo electrónico, adjuntando el resultado en el formato digital correspondiente al programa Adobe Acrobat Professional® o por cualquier otro medio que sea instruido por la División de Protección Pecuaria.

El responsable técnico del laboratorio autorizado, debe enviar los resultados en el protocolo oficial de toma de muestras del proyecto nacional de vigilancia en aves, al MVO y este último, despachará cada una de las copias de acuerdo a lo señalado en el programa de control de *Mycoplasma sp.* en plantales comerciales de aves.

Cabe señalar que el laboratorio autorizado debe mantener una copia de los resultados para sus registros.

El laboratorio autorizado debe enviar mensualmente, a la oficina sectorial del SAG, un resumen de los diagnósticos realizados durante el mes, con copia al Subdepartamento Laboratorios Pecuarios del Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias del SAG.

El laboratorio oficial SAG enviará los resultados de los análisis confirmatorios, al laboratorio autorizado. Este último a su vez, enviará este informe al MVO del sector SAG correspondiente al lugar de la obtención de la muestra y al Encargado del Programa de Vigilancia en Aves del Subdepartamento de Sanidad animal de la División de Protección Pecuaria, en un plazo no superior a las 48 horas de recibido los resultados.

7. Supervisión a los laboratorios autorizados.

Como señala el reglamento específico para la autorización de laboratorios de análisis/ensayo, todo laboratorio autorizado será supervisado por el SAG, a través de la realización de supervisiones al laboratorio, al menos una visita al año, y de pruebas de capacidad (pruebas de aptitud u otras) en

 <p>SAG Ministerio de Agricultura Gobierno de Chile</p>	<p>INSTRUCTIVO TÉCNICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS FRENTE A <i>MYCOPLASMA GALLISEPTICUM, MYCOPLASMA SYNOVIAE Y MYCOPLASMA MELEAGRIDIS,</i> MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA</p>	<p>Código: D-GF-CGP-PT-015 Versión:02</p>
--	--	---

cualquier momento, para verificar que continúan cumpliendo con las normas de rendimiento, y en general con todas las condiciones que permitieron su autorización.

El laboratorio autorizado, deberá enviar cada 3 meses al laboratorio oficial SAG, 20 muestras de sueros negativos que hayan sido procesados, para ser analizados por el laboratorio oficial SAG. En el caso de no obtener una buena concordancia en los resultados, se programará una visita de supervisión para verificar la conducción del test ELISA.

Una vez realizada la visita de supervisión, se generará un informe, el que indicará las no conformidades y observaciones encontradas, las que deben ser respondidas por el laboratorio autorizado en los plazos estipulados en dicho informe. En el caso que se necesite verificar la implementación de una acción correctiva, se podrá programar una nueva visita de supervisión.

8. Medidas por incumplimiento.

Si producto de las acciones de supervisión, el Departamento de Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias detecta faltas en el desempeño del laboratorio autorizado, que pongan en riesgo el resultado del Programa Oficial asociado a su autorización, el SAG, de conformidad con lo dispuesto en la cláusula sexta del correspondiente convenio de autorización, podrá instruir al laboratorio autorizado mediante una carta suscrita por el/la Jefe/a del Departamento Laboratorios y Estaciones Cuarentenarias o un Jefe/a de Oficina o un Director/a Regional, el cese inmediato de las prestaciones de servicios ejecutados dentro del alcance de su autorización hasta que se implementen todas las acciones correctivas solicitadas .

El Servicio tiene la facultad de aplicar medidas a los laboratorios autorizados que no cumplan con lo establecido en el reglamento específico de autorización y el presente instructivo, así como en el respectivo convenio de autorización, de acuerdo a las estipulaciones de este último.

El Servicio podrá, por resolución, aplicar las siguientes medidas en caso de incumplimiento por parte de los autorizados: a) suspensión de la autorización; y b) revocación de la autorización.

Las medidas señaladas se aplicarán a nivel nacional, y sin perjuicio de las sanciones que contemplan las leyes vigentes o garantías de fiel cumplimiento que el Servicio eventualmente puede exigir en los convenios de autorización.

Las suspensiones de la autorización durarán, al menos, el tiempo que requiera el laboratorio autorizado para implementar las medidas correctivas y su posterior verificación por parte del Servicio.

En caso de revocación, el autorizado afecto a tal medida, quedará inhabilitado para postular nuevamente a esta autorización, por el plazo de dos (2) años contado desde la fecha en que quede ejecutada la resolución que establece esta medida.



**FORMULARIO DE IDENTIFICACIÓN DEL
PERSONAL DE LABORATORIO
VINCULADO AL ANÁLISIS**

Código: F-GF-CGP-PT-082
Versión:02

Nombre Completo	N° Cédula de Identidad	Firma	Funciones que desempeña

Firma del Postulante o su Representante Legal

Fecha.....