



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO DE VALIDACIÓN OFICIAL DE *KITS* DE  
ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO, PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE *Mycoplasma gallicepticum*, *Mycoplasma synoviae* Y *Mycoplasma  
meleagridis* EN AVES.**

**Constanza del Pilar Díaz Lorenzo**

Memoria para optar al Título Profesional de  
Médico Veterinario

Departamento de Patología Animal

SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO  
MINISTERIO AGRICULTURA CHILE

PROFESOR GUÍA: DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE

SANTIAGO, CHILE

2015



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO DE VALIDACIÓN OFICIAL DE KITS DE  
ENZIMOINMUNOENSAYO INDIRECTO, PARA EL DIAGNÓSTICO  
DE *Mycoplasma gallicepticum*, *Mycoplasma synoviae* Y *Mycoplasma  
meleagridis* EN AVES.**

**Constanza del Pilar Díaz Lorenzo**

Memoria para optar al Título Profesional de

Médico Veterinario

Departamento de Patología Animal

Nota Final: .....

FIRMA

Profesor Guía: Dr. Héctor Hidalgo

.....

Profesor Corrector: Dr. Ulises Vergara

.....

Profesor Corrector: Dra. Lisette Lapierre

.....

SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO

MINISTERIO AGRICULTURA CHILE

PROFESOR GUÍA: DR. HÉCTOR HIDALGO OLATE

SANTIAGO, CHILE

2015

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

En primer lugar, agradezco a mis padres por su apoyo en todas las etapas de mi vida, Jorge y Gloria, a quienes les debo mi formación y la constancia para poder llevar a buen término este proceso. Por su orientación al momento de escoger ésta profesión, por su paciencia y entrega. A mis hermanos Cristóbal y José Pablo, con quienes he podido desarrollar al mismo tiempo éstas etapas.

A mi profesor guía Dr. Héctor Hidalgo, quién me orientó en ésta última etapa para convertirme en una profesional y mis correctores Dr. Ulises Vergara y Dra. Lisette Lapierre que forman parte de la misma.

También agradezco haber tenido la oportunidad de conocer personas incondicionales a los que hoy llamo amigos, mis compañeros de tesis, que día a día permitían que este proceso fuese mucho más ameno.

Finalmente, al personal de laboratorio, que con amabilidad siempre estuvieron dispuestos a ayudarme.

# INDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>A. ETIOLOGÍA.....</b>	<b>4</b>
1. Clasificación de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	4
2. Caracterización de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	4
3. Especies aviarias afectadas por <i>Mycoplasma spp.</i> .....	5
<b>B. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE LA MICOPLASMOSIS AVIAR .....</b>	<b>5</b>
1. <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .....	5
2. <i>Mycoplasma synoviae</i> .....	6
3. <i>Mycoplasma meleagridis</i> .....	6
<b>C. VÍAS DE TRANSMISIÓN .....</b>	<b>6</b>
1. Transmisión vía vertical.....	6
2. Transmisión vía horizontal .....	7
<b>D. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA .....</b>	<b>7</b>
1. Métodos que aíslan o identifican al agente .....	7
1.1. Cultivo del agente de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	7
1.2. Reacción en cadena de la polimerasa para detección de <i>Mycoplasma spp.</i> .....	7
2. Métodos que demuestran una respuesta serológica contra el agente.....	8
2.1. Descripción de la prueba de seroaglutinación rápida (SAR).....	8
2.2. Descripción y fundamentos de la prueba de enzoinmunoensayo (ELISA). .....	9
2.3 Indicadores de eficiencia ELISA.....	9
2.4. Descripción de la prueba Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA) .....	12

<b>E. MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL</b> .....	<b>13</b>
1. Mantener aves libres de micoplasmosis aviar.....	13
2. Evitar la transmisión horizontal de la micoplasmosis aviar.....	13
3. Medicación.....	13
4. Vacunación.....	14
<b>F. PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL EN CHILE</b> .....	<b>14</b>
<b>G. PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL A NIVEL INTERNACIONAL</b> .....	<b>16</b>
1. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en Argentina.....	16
2. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en Brasil.....	16
3. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en la Unión Europea.....	17
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>19</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
Sueros de Referencia.....	20
Kits diagnósticos.....	21
Componentes básicos de un <i>Kit</i> de ELISA-I contra Micoplasmosis aviar.....	21
Procedimiento estándar para la realización de un test de ELISA-I contra micoplasmosis aviar.....	21
Interpretación de los resultado de un test de ELISA indirecto contra Micoplasmosis aviar.....	22
Diferencias entre los <i>kits</i> utilizados:.....	23
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>24</b>
Definición punto de corte y curvas ROC.....	24
Definición matemática de sensibilidad y especificidad.....	24
Explicación técnica de los resultados.....	25

Tabla 1 Resultados de validación diagnóstica de los <i>kit</i> de Elisa-I.....	26
Tabla 2 Valor punto corte optimizado... ..	27
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>28</b>
1. En relación a los sueros de referencia .....	28
2. En relación a los resultados .....	29
3. En relación a la sensibilidad y especificidad esperada .....	30
4. Otros aspectos a considerar en futuras evaluaciones.....	30
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>33</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>38</b>
1. Hoja de Trabajo.....	38
2. Explicación curva ROC .....	39
Gráfico 1 Representación curva ROC perfecta.....	39
Gráfico 2 Representación curva ROC inválida.....	39

## RESUMEN

La micoplasmosis aviar es una infección que afecta la salud y productividad de las aves comerciales. Las pruebas serológicas de enzimoimmunoensayo, son útiles para el monitoreo de micoplasmosis, puesto que son capaces de identificar y cuantificar anticuerpos en los sueros de un grupo de individuos en poco tiempo. La evaluación y validación de *kits* comerciales antes de utilizarlos como métodos diagnósticos de control, es necesaria para estandarizar cualquier proceso de monitoreo serológico, ya que garantiza la efectividad de las pruebas. Por ello, el Servicio Agrícola y Ganadero del Ministerio de Agricultura solicitó el estudio de validación de *kits* de enzimoimmunoensayo indirecto para la detección de micoplasmosis en aves comerciales. En esta memoria de título se documenta parte de este estudio oficial. El objetivo fue ampliar la variedad diagnóstica, puesto que en la actualidad, solo la marca IDEXX está autorizada y forma parte del Programa Oficial de Control de micoplasmosis aviar. Se evaluó la efectividad de seis *kits* comerciales a través de la sensibilidad y la especificidad, utilizando sueros de referencia, de acuerdo al patógeno a identificar (MG, MS o MM). De acuerdo a los resultados obtenidos, en su mayoría los *kits* obtienen valores de sensibilidad y especificidad aceptables a excepción de uno. Este estudio puede servir de modelo para que a futuro, se realicen más estudios de validación de otros *kits* de diagnóstico serológico, para ampliar las alternativas diagnósticas, o en su defecto reducir las alternativas, eliminando aquellas que no resulten ser aptas para el control de infecciones en animales de producción chilena.

Palabras Claves: Enzimoimmunoensayo, micoplasmosis, sensibilidad, especificidad

## **ABSTRACT**

Avian mycoplasmosis is an infection that affects the health and productivity of commercial poultry. The Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) is a serological test that is useful for monitoring mycoplasmosis, as they are able to identify and quantify antibodies in the sera of a group of individuals in a short time. The evaluation and validation of commercial kits before using them as diagnostic methods of control, it is needed to standardize any serological monitoring process as it ensures the effectiveness of the tests. Therefore, the Agriculture and Livestock Service of the Ministry of Agriculture requested a validation study ELISA indirect for detecting mycoplasma in commercial poultry. This study is part of this official assay. The goal was to expand the diagnostic range, since today, only IDEXX brand is authorize to be used in part of the avian mycoplasmosis Official Control Program. The effectiveness of six commercial kits was evaluated by sensitivity and specificity, using reference sera according to the pathogens to be identified (MG, MS and MM). According to the results, the kits showed acceptable sensitivity and specificity, except one. This study can serve as a model in case of further studies for validation of other serological diagnostic kits to expand the diagnostic alternatives, or otherwise reduce them, eliminating those that are not suitable for the control of infections in chilean animal production.

**Keywords:** Enzyme-linked immunosorbent assay, mycoplasmosis, sensitivity, specificity



## INTRODUCCIÓN

*Mycoplasmas spp.* es el término utilizado para nombrar a un grupo de bacterias que taxonómicamente pertenecen a la clase *Mollicutes*, orden I *Mycoplasmatales*, y familia *Mycoplasmataceae*.

Los *Mycoplasmas spp.* afectan a varias especies. Dentro de los animales de producción los más susceptibles son aves, porcinos y bovinos.

*Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) afectan la salud y productividad de la especie *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*. Por otra parte, *Mycoplasma meleagridis* (MM) solo afecta a *Meleagris gallopavo*. En consecuencia, los *Mycoplasmas* perjudican al comercio internacional, donde se exigen productos cárneos originados de aves libres de micoplasmosis (OIE, 2013).

La micoplasmosis aviar es una infección de gran impacto a nivel de salud animal, ya que además de generar alteraciones principalmente de tipo respiratoria, produce alteraciones en la producción de huevos fértiles, en el consumo de alimento, disminución en la conversión alimenticia, entre otros. Ocasionando a su vez, un gran impacto en términos económicos.

Estos patógenos se transmiten por vía vertical (transovárica); esta es una característica de gran relevancia, puesto que las aves infectadas quedan como portadoras contagiando a aves jóvenes susceptibles, manteniendo de esa manera la infección circulando en los galpones y diseminándola por vía horizontal. La transmisión de tipo horizontal se produce por aves infectadas con o sin signos clínicos de forma directa o indirecta. Se ha demostrado que la contaminación de galpones vecinos a través de aerosoles es posible en distancias de hasta dos kilómetros (Ley, 2008).

El año 2009 se inició el Programa de Control Oficial de MG, MS y MM, el cual apunta a la vigilancia en abuelas broiler y reproductores/as de pollo y pavo, con el fin de producir aves libres de estos agentes y favorecer la exportación genética. Este programa utiliza como método diagnóstico la prueba de enzimoimmunoensayo indirecto (ELISA-I). El objetivo de este análisis es obtener un muestreo de sueros de especies *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo* provenientes de plantales adscritos al Programa de Plantales Avícolas bajo

Certificación Oficial (PABCO) y de los planteles comerciales de aves que se incorporen al Programa de Control Oficial de *Mycoplasma spp*, este programa de control solo considera a los *kits* de ELISA de la marca IDEXX, como validados y certificados de acuerdo al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Estos corresponden al *kit* IDEXX MG<sup>®</sup>, *kit* IDEXX MS<sup>®</sup> y *kit* IDEXX MM<sup>®</sup>. La prueba se lleva a cabo según lo señalado en el “Instructivo técnico oficial para detección de anticuerpos frente a *Mycoplasma*, mediante la técnica de ELISA-I” <sup>(1)</sup>, donde se especifica lo recientemente mencionado, además de todos los requisitos necesarios para poder realizar adecuadamente la prueba de ELISA en un laboratorio acreditado por el SAG (SAG, 2014a).

La técnica de ELISA, es un método serológico que permite detectar anticuerpos contra un patógeno determinado en sueros de aves, en este caso *Mycoplasma*. Cada *kit* detecta una especie de *Mycoplasma* en particular. Las pruebas de ELISA poseen una alta especificidad y alta sensibilidad, y además son capaces de detectar anticuerpos contra un determinado agente en varios individuos a la vez y en poco tiempo, siendo útil para la realización constante de monitoreos serológicos.

El Laboratorio de Patología Aviar (LPA), perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, está acreditado y autorizado por el SAG para realizar la prueba de ELISA- I con validez oficial para el diagnóstico de MG, MS y MM (SAG, 2009a).

El estudio de validación oficial de *kits* de ELISA para detección serológica de micoplasmosis aviar solicitado por el SAG, tiene por objeto ampliar las alternativas diagnósticas para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma* aviar a través de la prueba de ELISA. Es importante realizar la validación de kits comerciales que detectan

---

(1) Código IT-LAB-23-v01. SAG, 2009

anticuerpos contra *Mycoplasma aviar* para estandarizar el sistema de monitoreo que se realiza hoy en día. Además cada kits comercial ha sido certificado por su fabricante a través de un proceso interno de validación, los cuales fueron presentados al momento de seleccionar las marcas que participarían de este estudio.

El SAG, por lo tanto, designó al LPA para que realice la evaluación de otros *kits* comerciales que puedan ser utilizados en el programa oficial. De ésta forma, la presente memoria de título, representa parte de este estudio de validación oficial (SAG, 2014a).

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## A. ETIOLOGÍA

### 1. Clasificación de *Mycoplasma spp*

*Mycoplasma spp* es el término utilizado para nombrar a un grupo de organismos procarióticos incluidos en la clase *Mollicutes* [*mollis* (suave) y *cutes* (piel)]. Éste considera a todas aquellas bacterias que carecen de una pared celular y que tienen la capacidad de sintetizar peptidoglicanos. A pesar de la falta de una pared celular, *Mycoplasma spp.* y sus parientes han sido clasificados en el filo *Firmicutes*, que consta de baja guanina + citosina. Esta clasificación se basa en el análisis del gen 16S ARN ribosomal (Razin *et al.*, 1998).

Los miembros de *Mollicutes*, están organizados en cuatro órdenes: *Mycoplasmatales*, *Acholeplasmatales*, *Anaeroplasmatales* y *Entomoplasmatales*. *Mycoplasma spp.* pertenece al orden I *Mycoplasmatales*. Ésta contiene una sola familia, *Mycoplasmataceae*, con dos géneros: *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Este último se diferencia de *Mycoplasma* porque tiene la capacidad de generar hidrólisis de la urea (Brown *et al.*, 2007).

### 2. Caracterización de *Mycoplasma spp*

Las células de *Mycoplasma* tienen un contenido de ADN de guanina + citosina de 23% a 40%. Poseen un genoma cuyo tamaño está entre 580-1.350 kilo pares de bases. Tienen un crecimiento óptimo a 37°C. Carecen de pared celular, es decir, están delimitadas solo por una membrana plasmática. Debido a esta última característica, son resistentes a los antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular, y son más propensos a la inactivación por factores ambientales. Adoptan formas cocoides o cocobacilares, aunque se han observado formas de varillas delgadas, filamentosas y de anillo. Los micoplasmas requieren esteroides para la estabilidad de su membrana plasmática, lo cual es inusual en las bacterias. Los esteroides los adquieren del entorno por lo general, como colesterol a partir de los animales que parasita. En general, los *Mycoplasmas* colonizan las superficies de las mucosas y la mayoría de las especies son extracelulares, aunque *Mycoplasma*

*gallisepticum* posee la habilidad de penetrar eritrocitos (intracelular) (Razin *et al.*, 1984; Winner *et al.*, 2000).

La morfología de sus colonias es del tipo “huevo frito”, son pequeñas (0,1-1,0 mm), lisas, circulares y algo planas con una elevación central más densa (Kleven, 1998).

### **3. Especies aviares afectadas por *Mycoplasma spp***

La micoplasmosis aviar es causada por varios *Mycoplasmas* patógenos. Los organismos conocidos como patógenos de las aves comerciales son MG, MS y MM. MG y MS, son los más importantes, ya que se encuentran en la lista de denuncia obligatoria de la OIE, por lo tanto, su notificación en caso de ser detectados en un plantel, debe ser inmediata (Kleven, 1998; OIE, 2013).

Las especies avícolas más afectadas son los pollos, pavos, faisanes y perdices. Éstos probablemente pueden ser infectados por *Mycoplasma gallisepticum* en cualquier edad, aunque el ave joven o estresado parece estar más propensos a desarrollar signos clínicos. *Mycoplasma gallisepticum* se ha aislado de infecciones naturales de patos y gansos en contacto con pollos infectados, también de codornices, pavos reales, palomas mensajeras y un loro del Amazonas. *Mycoplasma gallisepticum*, además, se ha aislado de gorriones de árbol en Japón, el gorrion común en la India y cuervos en Escocia (Murakami *et al.*, 2002; Bencina *et al.*, 2003).

## **B. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y PATOLÓGICAS DE MICOPLASMOSIS AVIAR**

Los *Mycoplasmas*, en general, producen alteraciones en el aparato respiratorio. Los signos clínicos que producen las distintas especies de *Mycoplasma* aviar pueden ser muy similares (Kleven, 1998; Nascimento *et al.*, 2005; Feberwee *et al.*, 2009).

### **1. *Mycoplasma gallisepticum***

Sus signos clínicos más característicos son estertores respiratorios, tos, secreción nasal y conjuntivitis. Con frecuencia en pavos se genera sinusitis infraorbitaria. Las

manifestaciones clínicas son por lo general, con un desarrollo lento y la infección o la enfermedad pueden tener un curso largo. La sintomatología puede complicarse, producto de una infección adicional con bronquitis infecciosa, la enfermedad de Newcastle o *Escherichia coli*; a esto se le reconoce como "Enfermedad de los sacos de aire" y se describe como una severa aerosaculitis (Mohammed *et al.*, 1987; Levisohn *et al.*, 1995).

## **2. *Mycoplasma synoviae***

Produce signos clínicos similares a *Mycoplasma gallisepticum*. Además de lesiones en los sacos de aire cuando se combina con la enfermedad de Newcastle, con el virus de la bronquitis infecciosa (IB), o con *Escherichia coli*. En ocasiones, puede presentarse una enfermedad sistémica de carácter agudo similar a la "Enfermedad infecciosa crónica de los pollos y pavos", que afecta principalmente a las membranas sinoviales de las articulaciones y vainas de los tendones, generando un síndrome exudativo como tendovaginitis o bursitis (Ewing *et al.*, 1998).

## **3. *Mycoplasma meleagridis***

Patógeno específico de los pavos. La lesión primaria es aerosaculitis en la progenie. Otras manifestaciones incluyen disminución de la capacidad de eclosión, anormalidades esqueléticas y disminución del crecimiento. En pavos adultos la infección es raramente de carácter respiratorio, afectando principalmente senos y tráquea. Lo común es que se presente como una infección venérea, afectando el oviducto, útero y vagina principalmente (Cherms *et al.*, 1967; Béjaoui *et al.*, 2011).

# **C. VÍAS DE TRANSMISIÓN**

## **1. Transmisión vía vertical**

La transmisión por vía vertical (in ovo, transovárica), se produce directamente en los huevos por parte de aves reproductoras infectadas. Posterior a la infección, las aves pasan a ser portadoras, y sí éstas son reproductoras, transmiten la infección de la misma forma a su progenie (Ley, 2008).

## **2. Transmisión vía horizontal**

La transmisión horizontal ocurre por medio de aves infectadas con o sin signos clínicos, que transfieren el agente a los ejemplares susceptibles de forma directa o indirecta. Se ha demostrado que la contaminación entre galpones vecinos a través de aerosoles es posible en distancias de hasta dos kilómetros (McMartin *et al.*, 1987; Ley, 2008).

### **D. MÉTODOS DE EVALUACIÓN DIAGNÓSTICA**

El uso de métodos diagnósticos, ya sea de identificación directa del agente o de identificación de la respuesta serológica contra el agente, son trascendentales para comprobar la presencia de micoplasmosis aviar. Algunas de las pruebas más destacadas son:

#### **1. Métodos que aíslan o identifican al agente**

Esta categoría reúne al cultivo del agente y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR):

##### **1.1. Cultivo del agente de *Mycoplasma spp***

Se toman muestras de aves vivas, de cadáveres recientes o de cadáveres de aves que fueron congelados inmediatamente. En aves vivas, se pueden tomar frotis de la hendidura coanal, la orofaringe, el esófago, la tráquea, los ojos, entre otros. En el caso de las aves muertas, se pueden tomar muestras de las fosas nasales, seno infraorbital, tráquea o sacos aéreos. Los exudados se pueden aspirar de los senos infraorbitales y de las articulaciones.

Los medios para *Mycoplasmas* descritos por Frey o por Bradbury, contienen generalmente proteínas hidrolizadas y una base de infusión de carne suplementada con un suero o una fracción sérica, factores de extracto de levaduras, glucosa e inhibidores bacterianos y de hongos (acetato de talio y penicilina). La temperatura óptima de crecimiento de *Mycoplasma* es de 37° y sus colonias se desarrollan en un período de 3 a 10 días (Freundt, 1983; Zain *et al.*, 1996).

##### **1.2. PCR para la detección de *Mycoplasma spp***

En cada tubo de PCR se disponen 45 µl de la mezcla de reacción (incluye cebadores entre otros componentes). Los tubos se llevan luego a otra área limpia donde se añade la muestra

de ADN apropiada (5 µl a cada tubo). Se deben usar controles negativos y positivos en cada serie. Los tubos se colocan luego en un termociclador para los siguientes ciclos: 40 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 60 segundos y 1 ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos. Los productos de la PCR se detectan en la electroforesis convencional en gel de agarosa, incorporando marcadores adecuados de tamaño, y examinándolos con luz ultravioleta. La visualización de los productos de la PCR debe realizarse en un área del laboratorio distinta, separada de donde se llevan a cabo los otros pasos del procedimiento (Kempf, 1998).

## **2. Métodos que demuestran una respuesta serológica contra el agente**

Los métodos serológicos son pruebas diagnósticas que sirven para identificar y cuantificar anticuerpos específicos en los sueros de los individuos y permiten estimar la respuesta inmune de las aves, en caso de protecciones vacunales o aparición de brotes en un amplio número de individuos. Para la detección de micoplasmosis aviar, las pruebas serológicas más utilizadas son Seroaglutinación rápida (SAR), ELISA e Inhibición de la hemoaglutinación (IHA). Inicialmente, en Chile, se realizaba monitoreo masivo con la prueba SAR, ésta formó parte del programa de Control Oficial de la micoplasmosis aviar dentro del país. En la actualidad, la prueba serológica de monitoreo primario es ELISA. Y finalmente, se encuentra la prueba IHA que se utiliza como prueba confirmatoria a los resultados positivos de SAR y ELISA (SAG, 2009a; OIE, 2013).

### **2.1. Descripción de la prueba de SAR**

Esta prueba consiste en depositar antígenos comerciales para que reaccionen con un suero aviar, y se genere una reacción de aglutinación. Se deposita el suero sobre una baldosa limpia blanca o en una placa de cristal, a continuación se ubica un volumen de antígeno MG o MS coloreado. La aglutinación se advierte por la floculación del antígeno en dos minutos. Se incluyen en la prueba los controles positivos y negativos conocidos (OIE, 2013).



## 2.2. Descripción y fundamentos de la prueba de ELISA

### 2.2.1. Tipos de técnicas que se utilizan en la prueba de ELISA

- a) La técnica de ELISA indirecto, consiste en utilizar microplacas recubiertas con un antígeno de células enteras de MG, MS o MM. A estas microplacas se les adiciona un suero aviar que contiene anticuerpos contra el *Mycoplasma* a detectar. Además se utiliza un conjugado, que es un anticuerpo anti IgG de pollo o pavo unido a una enzima marcadora. La reacción se valora en función de la adición posterior de un sustrato de la enzima (sustancia química que permitiría la reacción de color). La aparición de color, como resultado de la interacción enzima/ sustrato, indicaría que la muestra o suero aviar es positiva (OIE, 2013).
- b) La técnica ELISA de bloqueo, utiliza microplacas recubiertas con un antígeno de células enteras de MG, MS o MM al cual se le adiciona un suero aviar que contiene anticuerpos contra el *Mycoplasma* a detectar. Si los anticuerpos están presentes en la muestra de suero, se unirán a los antígenos bacterianos y si no hay presencia de anticuerpos en la muestra, los sitios de unión antígeno/anticuerpo seguirán siendo libres. Luego se añade un conjugado que se unirá a los sitios libres del antígeno. La reacción se valora en función de la magnitud del bloqueo que ocurre cuando se añade el conjugado. Posterior a este se utiliza un sustrato de la enzima que permitirá la reacción de color al unirse al conjugado. Por lo tanto, la ausencia de color determinará la seropositividad de la muestra (Czifra *et al.*, 1993).
- c) La técnica de ELISA directo, se utiliza para la detección de antígenos de *Mycoplasma*, ya sea para identificar MG, MS o MM, según corresponda. Se utiliza una muestra que contenga el antígeno a detectar (generalmente obtenido en forma directa a través de secreciones por medio de una tórula). Luego, se añade anticuerpos conjugados con una enzima contra *Mycoplasmosis spp.* para formar un complejo antígeno-anticuerpo. Posteriormente, se adiciona un sustrato que generará la reacción de color según la cantidad de antígenos presentes. La aparición de color indicaría la positividad de la reacción (BIOSS INC, 2009; OIE, 2013).

### **2.2.2. Enzimas marcadoras del conjugado más comunes para la prueba de ELISA**

Para realizar las técnicas de ELISA se utilizan distintas enzimas marcadoras (proteínas que catalizan reacciones químicas), que acompañan al anticuerpo conjugado. Estas enzimas deben cumplir con los siguientes requisitos: estabilidad a temperaturas típicas de ensayo (25°C y 37°C), su vida útil debe ser superior a seis meses cuando se almacenan a 4°C, debe tener la capacidad de ser conjugado con un anticuerpo, no debe estar afectada por componentes biológicos del ensayo e idealmente deben ser solubles, puesto que serán diluidas con otras sustancias. Las enzimas más utilizadas son peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa (Gibbs, 2006).

- a) Peroxidasa de rábano: Es una molécula pequeña, se puede conjugar con un anticuerpo en una proporción 4:1, es económica y estable. Se debe usar con peróxido de hidrógeno lo que aumenta su valor. Entre sus desventajas se encuentran que es incompatible con algunos conservantes como azida de sodio (que disminuye la contaminación bacteriana), metales en agua y endógenos. Para evitar estas desventajas se utilizan tampones estériles sin conservantes con reactivos de agua tipo II o se realiza un tratamiento con peróxido de hidrógeno (si es que hay especímenes sospechosos) (Gibbs, 2006).
- b) Fosfatasa alcalina: Su tamaño es el doble de la peroxidasa de rábano, su valor también es mayor y es más estable. Dentro de sus desventajas, está la inactivación por el uso de agentes quelantes, pH ácido (<4,5) o fosfatos inorgánicos. Por lo tanto, como diluyente no deben usarse soluciones salinas tamponadas, ni fosfatos de ensayo estándar (Gibbs, 2006).
- c)  $\beta$ -galactosidasa: Es la enzima menos utilizada de las tres principales enzimas para ELISA. Esta enzima es bastante grande; sus cuatro subunidades combinadas tienen un peso molecular mayor a 300.000 mol. Su tamaño es la razón más probable por la

cual es menos utilizada. Además, se inhibe al reaccionar con el anticuerpo en la prueba de ELISA (Gibbs, 2006).

Para los ensayos colorimétricos, tanto la fosfatasa alcalina como la peroxidasa de rábano son enzimas adecuadas. Ambas enzimas tienen una amplia gama de sustratos que producen resultados cualitativos y cuantitativos eficientes (Gibbs, 2006).

### **2.2.3. Sustratos más comunes para la prueba de ELISA**

Cada enzima utiliza un sustrato específico para su detección colorimétrica. El sustrato es una sustancia química que genera una reacción de color, ésta se mide de acuerdo a la densidad óptica a través de un espectrofotómetro. Para poder medir distintos valores de densidad óptica se utilizan filtros de longitud de onda diferente (Gibbs, 2006).

a) Para peroxidasa de rábano: Los sustratos más comunes de tipo solubles son: Tetrametilbencidina (TMB), que tiene función dual (actúa como sustrato insoluble y soluble), 2,2 azino di 3 etil-benzotiazolina sulfonato (ABTS), y O fenilendiamina (OPD) (Gibbs, 2006).

1) TMB es un sustrato altamente sensible. Este sustrato al reaccionar con la enzima generan un producto de color azul. Este color se evalúa a través de un espectrofotómetro, que utiliza un filtro que mide una longitud de onda de 650 nanómetros (Gibbs, 2006).

El mismo producto obtenido por la reacción de una enzima con el sustrato TMB en algunos *kits* de ELISA, forma a partir de un proceso de acidificación un color amarillo, el cual utiliza un espectrofotómetro con un filtro que mide una longitud de onda de 450 nanómetros (Gibbs, 2006).

2) ABTS se considera un sustrato para todo uso. Aunque es menos sensible que TMB u OPD, tiene un rango de trabajo más amplio. El producto de reacción para ABTS es un compuesto azul-verde, este utiliza un espectrofotómetro con un filtro que mide una longitud de onda de 510 nanómetros (Gibbs, 2006).

- 3) OPD es ligeramente menos sensible que TMB. Su producto de reacción es de color amarillo y puede ser leído a través de un espectrofotómetro que mide una longitud de onda de 490 nanómetros (Gibbs, 2006).
- b) Para la fosfatasa alcalina: El substrato más utilizado que produce una reacción soluble es p-nitro-fenilfosfato (p-NPP). Este produce una reacción de color amarillo, que es leída a través de un espectrofotómetro que utiliza un filtro que mide una longitud de onda de 405-410 nanómetros (Gibbs, 2006).

### **2.3. Indicadores de eficiencia para la prueba de ELISA**

La prueba de ELISA posee alta sensibilidad y especificidad diagnóstica, razón principal para utilizarla como prueba de monitoreo para la detección de micoplasmosis. Se debe determinar cuántas muestras de referencia se han probado para lograr estimaciones estadísticamente significativas de sensibilidad y especificidad diagnóstica, con un error aceptable. La definición de estos conceptos es la siguiente (Crowther, 2009; OIE, 2013):

- Sensibilidad diagnóstica: Proporción de casos positivos esperados con respecto a los casos positivos observados. Los casos reaccionantes que por el *test* son detectados como seronegativos, serán considerados como falsos negativos (Crowther, 2009).
- Especificidad diagnóstica: Proporción de casos negativos esperados con respecto a los negativos observados. Los casos no reaccionantes que por el *test* son detectados como seropositivos, serán considerados como falsos positivos (Crowther, 2009).

### **2.4. Descripción de la prueba de IHA**

Las cepas de *Mycoplasma*, son capaces de hemoaglutinar los hematíes aviares (RBC). Esto permite que se utilice la prueba de IHA para identificar anticuerpos presentes en un suero que contrarresten a las bacterias aglutinantes, a través del bloqueo de los sitios de unión entre bacterias y glóbulos rojos. El objetivo de la prueba es utilizar un suero problema que presente anticuerpos específicos que causen inhibición de la hemoaglutinación causada por las cepas de micoplasmosis aviar. En cada prueba se incluye un suero control positivo y

otro negativo. Se necesita una fila de ocho pocillos para cada suero analizado (Allan *et al.*, 1974).

## **E. MÉTODOS DE PREVENCIÓN Y CONTROL**

El objetivo del control de la micoplasmosis aviar puede estar relacionado con los siguientes enfoques (Kleven, 2008):

### **1. Mantener aves libres de micoplasmosis aviar**

Mantener un estatus de aves libres de *Mycoplasmas* entre los reproductores y su progenie, es decir, mantener aves reproductoras seronegativas a *Mycoplasma* aviar para evitar la transmisión del agente. Esto se puede realizar a través de la prueba de ELISA, RSA entre otros. Se utiliza un suero aviar, y a través de estas pruebas se detectará la existencia o no de anticuerpos en las aves (Kleven, 2008).

### **2. Evitar la transmisión horizontal de micoplasmosis aviar**

El uso del sistema de manejo “Todos dentro, todos fuera”, consiste en realizar el egreso e ingreso de todas las aves pertenecientes a un mismo sector, al mismo tiempo; de esta manera se evita la transmisión horizontal del agente, ya que permite el traslado de las aves a granjas libres de micoplasmosis aviar. Los aspectos necesarios de este programa consisten en mantener buena bioseguridad, y un sistema efectivo de seguimiento y análisis de laboratorio (Kleven, 2008; SAG, 2009).

### **3. Medicación**

La medicación puede ser muy útil para prevenir los signos clínicos y las lesiones, pero no puede utilizarse para eliminar la infección de un lote y no es una solución satisfactoria a largo plazo. Aunque el tratamiento de la micoplasmosis aviar a través de antibióticos, pretende mejorar los síntomas clínicos de la enfermedad, se debe tener en cuenta que no se considera posible la eliminación total de los *Mycoplasmas* en el organismo, pues son muy resistentes a algunos antibióticos (Kleven, 1998; Kleven, 2008).

*Mycoplasma* tiene sensibilidad in vitro e in vivo a varios antimicrobianos incluyendo macrólidos, tetraciclinas, fluoroquinolonas y otros. Por otra parte, es resistente a la penicilina u otros antibióticos que actúan mediante la inhibición de la biosíntesis de la pared celular. Además, puede desarrollar resistencia y demostrar resistencia cruzada a antibióticos de uso común (Li *et al*, 2010; Cerda, 2011).

#### **4. Vacunación**

La vacunación por su parte, puede ser una solución útil a largo plazo en situaciones donde no es posible mantener los lotes de aves libres de *Mycoplasma*, especialmente en granjas de producción comercial de huevos que tienen múltiples edades. A nivel mundial se han empleado diversos métodos de vacunación. Desde los primeros tiempos de la vacunación, se han utilizado bacterinas y también se utilizan vacunas vivas (Hildebrand *el at.*, 1983; Kleven, 2008).

#### **F. PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL EN CHILE**

En Chile, se utiliza un Programa de Control Oficial que permite reducir el riesgo de infección y diseminación de micoplasmosis en la avicultura comercial, ya sea por transmisión vertical u horizontal. La aplicación del Programa de Control Oficial es obligatoria para los planteles productores de carne de pollo y pavo adscritos al Programa de Planteles Avícolas Bajo Certificación Oficial (PABCO), el cual está inserto dentro del Sistema de Inspección Integral Oficial (SIIO) y es voluntario para las empresas productoras de aves, incluyendo empresas de producción de carne de ave y pollitas de reposición (SAG, 2009b).

Este programa de control incluye, procedimientos de vigilancia de las aves reproductoras y su progenie determinados mediante un diseño de muestreo, colectas de muestras por Médicos Veterinarios Oficiales o Acreditados y procesamiento de las muestras en un Laboratorio Oficial o Acreditado mediante la técnica de ELISA que determinará la seropositividad o seronegatividad de las muestras (SAG, 2009b).

El Laboratorio Oficial o Acreditado, considera como lote de aves sospechoso de estar infectado de MG y/o MS, cuando registra 1 o 2 reaccionantes en una muestra de 60 aves y

para MM cuando registra a lo menos 2 reaccionantes en una muestra de 92 aves. Además, considera como lote probablemente infectado por MG y/o MS cuando se presenta un total de 3 o más resultados reaccionantes en una muestra de 60 aves y para MM 3 o más resultados reaccionantes en una muestra de 92 aves (SAG, 2009b).

La confirmación de cada uno de los lotes (sospechoso y probablemente infectado), se realiza a través de la prueba de IHA, en el Laboratorio del SAG, cuya comunicación de los resultados se realiza a la Autoridad Sanitaria en Salud Animal, empresas, universidades, asociaciones gremiales de productores y calificadores de la certificación de exportación. La unidad epidemiológica en la cual se alojen las aves sospechosas de estar infectadas por micoplasmosis, quedará excluida del proceso de certificación de exportación de huevos fértiles o aves de un día mientras se realiza la prueba de IHA. Además, el lote de aves deberá ser sometido a un nuevo muestreo de 98 aves en el caso de MG y MS, y 150 en el caso de MM, quince días después de realizado el muestreo. Junto al muestreo anterior, el Médico Veterinario Oficial o Acreditado, deberá colectar del mismo lote 10 aves enfermas o decaídas o en su defecto clínicamente sanas, con el fin de intentar realizar el aislamiento bacteriológico o la detección del genoma del agente (SAG, 2009b).

Finalmente, se considera un lote de aves como confirmado a una infección por MG, MS y/o MM mediante la obtención de un aislado bacteriológico o como resultado positivo a una secuencia genética que demuestre similitud a la del agente, determinada mediante una prueba molecular. En estos casos, se excluye el lote de aves para efectos de certificación de la exportación de huevos fértiles y aves de un día y para la comercialización de estos productos así como de las aves positivas a otras empresas avícolas. A su vez, las aves de un día, provenientes de un lote de abuelas y/o reproductoras confirmado como positivo, que se hayan despachado a otras unidades de la empresa o a otras empresas con posterioridad al muestreo que dio origen al resultado positivo, deberán ser chequeadas serológicamente para asegurar que no hubo transmisión vertical. Al lote de abuelas y/o reproductoras se le aplica una cuarentena predial oficial, permitiendo la salida solamente de huevos fértiles con destino a la planta de incubación de la empresa afectada y se recomendará la eliminación del lote de aves (SAG, 2009b).

## **G. PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL A NIVEL INTERNACIONAL**

### **1. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en Argentina**

El objetivo del Plan de Control de micoplasmosis aviar en Argentina es mantener a las aves reproductoras abuelos y padres libres de micoplasmosis producidas por MG y MS (SENASA, 2004).

El programa consiste en realizar muestreos a pollitos nacidos en la misma fecha, provenientes de un mismo núcleo, plantel o lote, y a reproductores en periodo de recría (abuelos y padres). Estas muestras son recepcionadas por laboratorios reconocidos para realizar los análisis en apoyo al Plan Nacional de Sanidad Avícola (PNSA) (SENASA, 2004).

En estos laboratorios se realizan las pruebas de serología para MG y MS, donde se analizan 100 muestras de suero para cada uno de los casos (SAR y excepcionalmente IHA). Al establecerse resultados positivos para SAR, se efectúa confirmación a través de IHA. Si el resultado sigue siendo positivo se lleva a cabo el cultivo o PCR (SENASA, 2004).

Si la bacteria es detectada finalmente, se eliminan las aves pertenecientes a ese lote, además de ejercer cuarentena para evitar futuros contagios. Las aves eliminadas son reemplazadas por aves libres de la enfermedad, que deben ser tratados como tales desde el primer día de vida. Cuando el plantel ya posee aves libres de micoplasmosis, el esfuerzo de saneamiento debe estar concentrado en la constancia de implementación de medidas de bioseguridad (SENASA, 2004).

### **2. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en Brasil**

El programa de Control de micoplasmosis aviar Oficial de Brasil, tiene como objetivo mantener aves reproductoras libres de MG y MS en el caso de gallinas y pollos; y MG, MS y MM, en el caso de los pavos (MAPA, 2001).

Este utiliza como método diagnóstico la serología a través de SAR, ELISA e IHA. Para aves reproductoras de 12 semanas, el uso de SAR incluye al menos 300 muestras para MG y 100 para MS seleccionadas aleatoriamente y es complementada a través de IHA o



ELISA. Al ser positivas a estas últimas pruebas, se realiza un cultivo y/o PCR en un laboratorio acreditado u oficial (MAPA, 2001).

Para aves de corral que se encuentran al comienzo de la producción (con un 5% de la postura óptima) se realiza SAR en 150 muestras para MG y 100 muestras para MS en el género gallina. Además, se realiza en pavos SAR en 150 muestras para MG y MM y 100 para MS. Como método de confirmación en caso de obtener sueros positivos se utiliza IHA o ELISA, si la muestra sigue siendo positiva, se realiza cultivo para su confirmación y / o PCR en un laboratorio acreditado u oficial (MAPA, 2001).

Para establecimientos de controles permanentes (control periódico cada tres meses), se realiza SAR en 150 muestras de suero aleatoriamente para MG, MS y MM. Para confirmar aquellas muestras positivas se utiliza ELISA e IHA; si estas son reactivas a estos exámenes, se realiza cultivo o PCR en un laboratorio acreditado u oficial (MAPA, 2001).

En caso de una alta mortalidad en un plantel avícola, éste debe enviar material de 30 cadáveres de las aves a un laboratorio estatal o acreditado para aislamiento o PCR (MAPA, 2001).

Si los resultados del cultivo o del PCR son positivos a la presencia de la bacteria, se realiza eliminación del lote completo y además se debe establecer cuarentena y generar una constante vigilancia en el sector afectado (MAPA, 2001).

### **3. Programa de Control Oficial de micoplasmosis aviar en la Unión Europea**

El Programa de Control Oficial tiene por objeto mantener aves libres de micoplasmosis, para ello se determina la existencia de la infección mediante análisis serológicos, bacteriológicos o moleculares validados (Dalli, 2011).

Los análisis para la detección de MG o MM, se realizan a partir de un muestreo representativo que permita un control continuo de la infección durante los períodos de cría y de puesta (Dalli, 2011).

En caso que existan muestras reaccionantes mediante la prueba de ELISA, el lote se considerará sospechoso y deberán aplicar medidas de cuarentena. Si el lote, luego de dos

controles con resultados negativos, separados por un intervalo de al menos 60 días resulta no reaccionante, puede restaurarse la producción (Dalli, 2011).

En el caso de granjas que contengan varias unidades de producción independientes, la autoridad veterinaria competente podrá establecer excepciones a estas medidas en lo que se refiere a las unidades de producción sanas de una granja infectada; siempre y cuando el veterinario habilitado haya confirmado que la estructura de estas unidades de producción, su importancia y las operaciones que en las mismas se realizan son de tal naturaleza que, desde el punto de vista del alojamiento, del mantenimiento y de la alimentación, tales unidades de producción son completamente independientes, de modo que no es posible que la enfermedad se propague de una unidad de producción a otra (Dalli, 2011).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la eficiencia diagnóstica de diferentes *kits* de enzimoimmunoensayo indirecto para el diagnóstico de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* o *Mycoplasma meleagridis* para ser utilizados en el Programa de Control Oficial de *Mycoplasma spp.* del SAG, a partir de muestras de sueros provenientes de aves de especies comerciales *Gallus gallus* y *Meleagris gallopavo*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer la sensibilidad diagnóstica de cada *kit* comercial de enzimoimmunoensayo indirecto, para la detección de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* o *Mycoplasma meleagridis*, según corresponda.
2. Determinar la especificidad diagnóstica de cada *kit* comercial de enzimoimmunoensayo indirecto, para la detección de *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* o *Mycoplasma meleagridis*, según corresponda.
3. Validar los *kits* que participen en el estudio perteneciente al Servicio Agrícola y Ganadero, para su uso en el Programa de Control Oficial de *Mycoplasma spp.* en especies aviares comerciales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sueros de Referencia

Los diferentes *kits* son evaluados frente a:

- a) Sueros de referencia para MG de especie gallina (*Gallus gallus*) asociadas a la infección, provenientes de la zona central de Chile, confirmados a través de IHA por la Unidad de Bacteriología Pecuaria, perteneciente al Departamento de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Agrícola y Pecuaria del SAG, Lo Aguirre: 188 sueros reaccionantes y 188 sueros no reaccionantes.
- b) Sueros de referencia para MS de especie gallina (*Gallus gallus*) asociadas a la infección, provenientes de la zona central de Chile, confirmados a través de IHA por la Unidad de Bacteriología Pecuaria, perteneciente al Departamento de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Agrícola y Pecuaria del SAG, Lo Aguirre: 190 sueros reaccionantes y 186 sueros no reaccionantes.
- c) Sueros de referencia para MM de pavo, 18 sueros reaccionantes provenientes del National Veterinary Service Laboratories (NVSL), United States Department of Agriculture (USDA), Estados Unidos, y 194 sueros no reaccionantes, provenientes de pavos sanos de la zona central de Chile, confirmados a través de IHA por la Unidad de Bacteriología Pecuaria, perteneciente al Departamento de Laboratorios y Estación Cuarentenaria Agrícola y Pecuaria del SAG, Lo Aguirre.

El número de sueros de referencia por categorías, para efectuar la presente validación de *kits*, fue determinado por el SAG, a partir de un estudio estadístico previo, perteneciente a la unidad epidemiológica pecuaria de dicha institución. Éste se basa en el capítulo 1.1.4 “Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas”, perteneciente al manual de la OIE sobre animales terrestres, 2013. El proceso experimental fue realizado en el Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

### **Kits diagnósticos**

Los *kits* diagnósticos utilizados son 6, éstos están capacitados para detectar la presencia de anticuerpos contra MG, MS o MM según corresponda, ya sea en especie *Gallus gallus*, *Meleagris gallopavo* o en ambas especies, mediante la prueba de ELISA-I. Para realizar la prueba de ELISA-I, se utilizarán los siguientes *kits*: Biochek MG<sup>®</sup>, Biochek MS<sup>®</sup>, Biochek MM<sup>®</sup>, Idexx MG/MS<sup>®</sup>, Idvet MG<sup>®</sup> e Idvet MS<sup>®</sup>.

### **Componentes básicos de un *Kit* de ELISA-I contra Micoplasmosis aviar**

- Placas tapizadas con antígeno MG, MS o MM.
- Un frasco de suero control positivo, con anticuerpos anti MG, MS o MM, según corresponda en cada *kis*.
- Un frasco de suero control negativo para MG, MS o MM, según corresponda en cada *kit*.
- Un frasco anticuerpo anti-especie, conjugado con enzimas de peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina.
- Un frasco de diluyente de la muestra.
- Un frasco de diluyente del conjugado (en algunos casos).
- Un frasco de solución substrato TMB (tetrametilbencidina) o PNPP (p-nitrofenilfosfato) con dietanolamina. Sustancia química que desarrolla color por la unión enzima / anticuerpo.
- Un frasco de solución de frenado. Sustancia química que detiene la reacción de color del substrato, por efecto de un cambio de pH.
- Un frasco de solución de lavado, de agua desionizada o destilada con solución detergente, según lo determine el fabricante.

### **Procedimiento estándar para la realización de un *test* de ELISA-I para micoplasmosis aviar**

Antes de iniciar el procedimiento, se deben colocar todos los reactivos a temperatura ambiente ( $21^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ). Luego, ordenar la placa (o placas) tapizadas con antígeno y anotar la posición de las muestras en una hoja de trabajo (Anexo 1). A continuación, se debe diluir la muestra con el diluyente (en general la dilución es  $1\mu$ :  $500\mu$ , en algunos *kits* existen

diferencias descritas posteriormente). Enseguida, agregar 100µl de control negativo no diluido en los pocillos A1 y B1, 100µl de control positivo no diluido en los pocillos C1 y D1 y 100µl de muestra diluida en los pocillos siguientes a partir de E1. Incubar durante 30 minutos y enseguida lavar cada pocillo de tres a cinco veces con la solución de lavado. A continuación, añadir 100µl de conjugado en cada pocillo e incubar durante 30 minutos y volver a lavar cada pocillo 3 o 5 veces con la solución de lavado. Consecutivamente, adicionar 100µl de la solución de substrato en cada pocillo, y esperar 15 minutos para que ocurra la reacción. Finalmente, adicionar 100µl de la solución de frenado en cada pocillo para detener la reacción y calibrar los filtros del espectrofotómetro, para medir y anotar la densidad óptica determinada por el fabricante.

El espectrofotómetro utilizado es modelo TECAN, SUNRISE, cuyo lector cuenta con diferentes filtros de absorbancia (A): 405 nanómetros (nm), 450 nm, 492 nm y 650 nm. El Lavador de Placas es modelo TECAN, HIDROFLEX. La calibración y verificación de cada equipo se realiza semestralmente, según lo recomendado por la marca, siguiendo las indicaciones del “Instructivo Técnico Oficial para Detección de Anticuerpos frente a *Mycoplasma*, mediante la técnica de ELISA-I”, perteneciente al SAG.

### **Interpretación de los resultado de un *test* de ELISA indirecto para micoplasmosis aviar**

Las muestras de suero que tienen cocientes muestra/control positivo (S/P) <sup>(2)</sup> inferiores o iguales a 0,50 se consideran no reaccionantes. Las muestras con cocientes S/P superiores a 0,50 son consideradas reaccionantes e indican que ha habido inmunización u otro tipo de exposición a MG, MS o MM.

---

(2) Coef S/P:  $\frac{\bar{X} \text{ Do Muestra} - \bar{X} \text{ Do control negativo}}{\bar{X} \text{ Do control positivo} - \bar{X} \text{ Do control negativo}}$  . Instructivo para detección de MG por ELISA-I IDEXX, 2014

### **Diferencias entre los *kits* utilizados**

Los materiales y procedimientos utilizados en cada prueba de ELISA-I, presentan algunas diferencias, determinadas por el fabricante de cada *kit* comercial. A pesar de ello, la técnica es la misma.

#### ***KIT* BIOCHEK MG<sup>®</sup>, BIOCHEK MS<sup>®</sup>, Y BIOCHEK MM<sup>®</sup>**

Sus diferencias, con respecto a los otros *kits* comerciales son las siguientes:

- a) En el caso de MM, la dilución inicial es 1µl de muestra en 100µl de diluyente.
- b) La lectura, se realiza a través de un espectrofotómetro que posee un filtro de absorbancia de 405 nm.
- c) En la lectura, para que el ensayo sea válido, la absorbancia promedio del control negativo debe estar por debajo de 0,3 y la diferencia entre el control medio negativo y el control medio positivo debería ser superior a 0,15.

#### ***KIT* IDEXX MG/MS<sup>®</sup>**

Sus diferencias, con respecto a los otros *kits* comerciales son las siguientes:

- a) La lectura, se realiza a través de un espectrofotómetro que posee un filtro de absorbancia de 650 nm.
- b) En la lectura, para que el ensayo sea válido, la diferencia entre la absorbancia promedio del control positivo y del control negativo debe ser mayor que 0,075 y la absorbancia media del control negativo debe ser menor o igual que 0,15.

#### ***KIT* IDVET MG<sup>®</sup> E IDVET MS<sup>®</sup>**

Sus diferencias, con respecto a los otros *kits* comerciales son las siguientes:

- a) La lectura, se realiza a través de un espectrofotómetro que posee un filtro de absorbancia de 450 nanómetros.
- b) En la lectura, para que el ensayo sea válido, debe responder a una densidad óptica de los controles positivos superior a 0,350 y el cociente entre el promedio de los controles positivos y el promedio de controles negativos debe ser superior a 3.

## **RESULTADOS**

Para efectos de los resultados, esta memoria de título solo considera una parte del “Estudio de evaluación oficial de *kits* de ELISA para detección de micoplasmosis aviar”. Para efectos de comparación de los resultados se utilizó patrones estadísticos, como la sensibilidad diagnóstica y especificidad diagnóstica para cada *kit* analizado.

### **Definición punto de corte y curvas ROC**

En cualquier estimador estadístico de una variable con parámetros ajustables, existen para su análisis curvas de sensibilidad y especificidad diagnósticas, o curvas ROC (del inglés, *Receiver Operating Characteristic*). En ellas se representa la sensibilidad de la técnica diagnóstica frente al valor que se obtiene al restarle la especificidad a la unidad (1-especificidad). El área bajo la curva obtenida oscila entre un valor de 0,5 (no discrimina entre una muestra reaccionante y un falso positivo) y 1 (test diagnóstico perfecto). De acuerdo a esto, se pueden ajustar los valores de especificidad y sensibilidad hasta un punto de corte deseado. Este punto de corte representa el límite donde serán considerados los valores reaccionantes y no reaccionantes del test. No existe un valor de punto de corte ideal (Deride, 2010).

### **Definición matemática de sensibilidad y especificidad**

En términos matemáticos, la sensibilidad y la especificidad diagnóstica se definen de la siguiente forma:

#### **Sensibilidad**

$$S = [E+ / O+]$$

Donde, E+ corresponde a los números de positivos esperados, y O+ a los números de positivos observados. Los valores positivos esperados corresponden a aquellos que son confirmados como reaccionantes por otra prueba, generalmente de mayor sensibilidad en este caso corresponde a IHA, para ELISA. Los valores de muestras reaccionantes observados se obtienen a partir de la sumatoria de reaccionantes esperados y falsos negativos (Deride, 2010).



## **Especificidad**

$$\text{Esp} = [E- / O-]$$

Donde, E- corresponde a los números de no reaccionantes esperados, y O- a los números de no reaccionantes observados. Los valores no reaccionantes esperados corresponden a aquellos que son confirmados como no reaccionantes por otra prueba generalmente de mayor especificidad, en este caso corresponde a IHA, para ELISA. Los valores de muestras no reaccionantes observados se obtienen a partir de la sumatoria de no reaccionantes esperados y falsos positivos (Deride, 2010).

## **Explicación técnica de los resultados**

La sensibilidad y especificidad se analizaron según el punto de corte recomendado y optimizado para cada *kit* comercial. El análisis de las pruebas se realizó en los programas computacionales Win Episcopy 2.0 y STATA 11, en la unidad de Epidemiología Pecuaria del SAG (SAG, 2013)

Los criterios para efectos del análisis, en detección de MG y MS, determinan que el diseño de muestreo considera una prevalencia esperada de 5%, un 95% de nivel de confianza y valores de sensibilidad y especificidad perfectas para la prueba de ELISA. Por su parte, para efectos del análisis, en detección de MM, se determina que el diseño de muestreo considera una prevalencia esperada de 5%, un 95% de nivel de confianza y valores de sensibilidad de 96,6% y especificidad de 99,8% para la prueba de ELISA (SAG, 2009b).

**Tabla 1. Resultados de validación diagnóstica de los *kit* de ELISA-I, según variable estadística de sensibilidad y especificidad diagnóstica, en base a sueros de referencia obtenidos a partir de la prueba de IHA.**

Kit	Sueros totales 376			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 1	Resultados IHA	188			
	Resultados ELISA	187	189			
Kit 2	Sueros totales 376			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 2	Resultados IHA	190			
	Resultados ELISA	175	201			
Kit 3	Sueros totales 212			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 3	Resultados IHA	18			
	Resultados ELISA	90	122			
Kit 4	Sueros totales 376			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 4	Resultados IHA	188			
	Resultados ELISA	185	191			
Kit 5	Sueros totales 375			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 5	Resultados IHA	190			
	Resultados ELISA	165	210			
Kit 6	Sueros totales 376			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 6	Resultados IHA	188			
	Resultados ELISA	178	198			
Kit 7	Sueros totales 375			Sensibilidad	Especificidad	Curvas ROC
		Reaccionantes	No reaccionantes			
	Kit 7	Resultados IHA	190			
	Resultados ELISA	165	210			

\*A cada *kit* comercial se le asigna un número de identificación. Los resultados finales y nombres comerciales de las marcas de cada *kits* utilizado, pertenece al SAG.

SAG, 2014a.

**Tabla 2. Puntos de corte optimizado para cada *kit* comercial, con el fin de obtener la mejor sensibilidad y especificidad en la prueba diagnóstica de ELISA-I**

<b>KIT COMERCIAL</b>	<b>PUNTO DE CORTE OPTIMIZADO</b>
<b><i>Kit</i> n° 1 MG</b>	0,27
<b><i>Kit</i> n° 2 MS</b>	0,238
<b><i>Kit</i> n° 3 MM</b>	4,63
<b><i>Kit</i> n° 4 MG</b>	0,528
<b><i>Kit</i> n° 5 MS</b>	0,217
<b><i>Kit</i> n° 6 MG</b>	0,483
<b><i>Kit</i> n° 7 MS</b>	0,225

SAG, 2014a.

En cuanto al punto de corte, éste fue optimizado a través de las curvas ROC (Anexo 2), para cada *kit* comercial, con el fin de obtener el mejor porcentaje de especificidad y sensibilidad, de esta forma disminuyen los falsos negativos y falsos positivos de cada prueba (SAG, 2014b).

De los resultados obtenidos, se observa lo siguiente:

Ninguna prueba de monitoreo serológico es 100% efectiva, dado que no alcanzan el 100% de especificidad o 100% de sensibilidad.

Se observa, además que dentro de los *kits* utilizados para la detección *Mycoplasma gallisepticum*, el *kit* 1 obtuvo un nivel de sensibilidad de 97, 895% y especificidad de 99, 462%, obteniendo el mejor desempeño diagnóstico en comparación con los otros *kits* analizados.

Por su parte, dentro de los *kits* utilizados para la detección de *Mycoplasma Synoviae* el *kit* 2, obtuvo un nivel de sensibilidad de 89,894% y especificidad de 96,809% obteniendo el mejor desempeño diagnóstico en comparación con los otros *kits* analizados.

Finalmente, el *kit* 3 para la detección de *Mycoplasma meleagridis*, fue el único que obtuvo valores de especificidad bajos de 62,371%.

## DISCUSIÓN

El objetivo del presente estudio fue realizar la evaluación y acreditación de distintos *kits* comerciales de ELISA, para la detección de *Mycoplasma* aviar [*Mycoplasma gallisepticum* (MG), *Mycoplasma synoviae* (MS) o *Mycoplasma meleagridis* (MM)], según corresponda. Este estudio fue formulado por el SAG, con el fin de aumentar la variabilidad diagnóstica, por lo tanto, el número de sueros de referencia analizados y las marcas de *kits* de ELISA utilizadas para participar en el estudio, fueron determinados y proporcionados por esta institución.

De acuerdo a este objetivo, hay ciertos factores que pueden afectar la realización de un ensayo y por lo tanto influir en su validez, dado que son importantes para establecer la acreditación y validación final de los *kits* comerciales. Estos aspectos son principalmente obtenidos a partir del capítulo 1.1.4 “Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas”, perteneciente al manual de la OIE sobre animales terrestres, 2013. Este manual, se centra principalmente en los métodos de detección de anticuerpos en sueros mediante la utilización de la prueba de ELISA:

### **1. En relación a los sueros de referencia**

Cada suero de referencia analizado posee diferencias en cuanto a la composición y concentración de anticuerpos, de acuerdo a Jacobson (1998) se debe a factores naturales (como la edad, el sexo, raza, estado nutritivo, respuesta inmunológica) o a factores adquiridos (como la inmunidad pasiva o activa) que son propios del hospedador. Por otra parte, también existen factores externos como el deterioro o contaminación de la muestra. Estas diferencias, pueden o no afectar los resultados, para ello lo importante es estandarizar las muestras y determinar con anterioridad el estado “reaccionante o no reaccionante,” que posean a través de otra prueba confirmatoria, en este estudio se utilizó la prueba de IHA, puesto que posee mayor especificidad que la prueba de ELISA.

## 2. En relación a los resultados

Los resultados en una técnica de ELISA varían de acuerdo a la sensibilidad y especificidad de la prueba. Los métodos empleados para seleccionar las muestras son importantes para la determinación de estas dos estimaciones, dado que las variaciones de especificidad y sensibilidad publicadas en más de un estudio de validación, varían de acuerdo a las diferencias en las referencias poblacionales y las estrategias de muestreo que se han utilizado (Greiner *et al.*, 2000).

Otros factores importantes que pueden interferir en los resultados, son la variación técnica de características de la prueba, el valor del punto de corte para la interpretación, y el manejo de los resultados intermedios o no interpretables (Greiner *et al.*, 2000).

Debido a estas diferentes fuentes de variación que existen en los resultados al aplicar una prueba de diagnóstico serológico, es importante validar los *kits* comerciales en forma oficial, a través de un protocolo estandarizado y en un laboratorio acreditado. Por ello, en este estudio se determinan como causas de alteraciones en los resultados las siguientes:

Entre las distintas marcas, a pesar que la técnica utilizada es la misma, cada *kit* comercial utiliza reactivos diferentes para llevar a cabo la prueba. La lectura de acuerdo al tipo de reactivo utilizado también es diferente, ésto de acuerdo a los filtros necesarios para visualizar la densidad óptica de cada substrato seleccionado por la marca comercial. Ambos aspectos generarían diferencias en los resultados finales.

La determinación de un punto de corte, de acuerdo a Greiner y Boéhning (1994) depende de cada elaborador del *kit* comercial, y para efectos de análisis éste puede ser modificado, por lo tanto, no hay un punto de corte determinado. Éste se obtiene con objeto de optimizar y obtener la mejor sensibilidad y especificidad diagnóstica de cada *kit* comercial, debido a ésto, el punto de corte recomendado por el fabricante es diferente al optimizado por la Unidad de Epidemiología del SAG. A modo de ejemplo, en este estudio, se observa que tanto el *kit* n°5, como el *kit* n° 7 presentan la misma cantidad de sueros reaccionantes (165) como de no reaccionantes (210), pero lo que varía es el punto de corte optimizado para cada uno: para el *kit* n° 5 el punto de corte es 0,217, y para el *kit* n° 7 es 0,225, lo que generaría distintos valores de sensibilidad y especificidad.

En algunos *kits* se indican resultados “no reaccionantes”, “reaccionantes” y “sospechosos”. En cuanto a éste último, los instructivos indican que decisión tomar, generalmente se sugiere volver a muestrear. La aparición de resultados “sospechosos”, en el presente estudio, es poco significativa (no más de 2 a 5 casos aislados), por ende, no alteraría el resultado final del estudio de validación.

### **3. En relación a la sensibilidad y especificidad esperada**

De acuerdo al “Análisis estadístico para la validación”, se esperan una especificidad y sensibilidad perfectas para MG y MS, y para MM se esperan, valores de sensibilidad de 96,6% y especificidad de 99,8%. Estos valores no fueron alcanzados por ningún *kit* comercial. Según Greiner y Gardner (2000) las verdaderas diferencias de precisión de la prueba entre los estudios no son directamente observables, porque los estudios no están libres de alteraciones cruzadas o errores aleatorios y sistemáticos.

A pesar de ello, las diferencias biológicas con respecto a la sensibilidad, de acuerdo a Greiner y Garden (2000) están relacionadas principalmente con la etapa de infección o estado inmune del huésped y además con la fase o gravedad de la infección. Por otra parte, las variaciones de especificidad, son producidas principalmente por reacciones cruzadas en sueros similares, generando falsos positivos o por la aparición de anticuerpos que permanecen posterior a una infección.

Brenner y Gefeller (1997) por su parte asumieron que la distribución de los resultados de la prueba en relación al valor del punto de corte, la sensibilidad y la especificidad están relacionados también con la prevalencia. En otras palabras, la distribución de los factores biológicos relacionados con la infección (fase y la gravedad de enfermedad) es diferente para poblaciones de baja y alta prevalencia.

### **4. Otros aspectos a considerar en futuras evaluaciones**

Los aspectos recién mencionados se relacionan básicamente con el sistema de evaluación que realizó el SAG para este estudio. A modo de observación se sugieren otras variables a considerar para realizar un sistema de validación y evaluación más exacto:

- a) Considerar en una futura evaluación, la participación de la marca IDEXX, con sus *kits* MG, MS y MM. De esta forma se podría verificar su eficiencia diagnóstica y poner a prueba su efectividad comparada con las otras marcas comerciales.
- b) Realizar futuras validaciones en base a la capacidad del *kit* para reconocer el patógeno específico indicado por el fabricante. De esta forma se evitarían las reacciones cruzadas que alteran la especificidad.

## **CONCLUSIONES**

El “Estudio oficial de validación de *kits* de ELISA-I” para la detección de micoplasmosis aviar en Chile, permitió la validación de otros *kits* comerciales que utilizan la técnica de ELISA-I, para ser incluidos en el Programa de Control Oficial del SAG, de acuerdo a parámetros estadísticos establecidos por esta identidad. Contribuyendo así, a la salud animal de nuestro país y aumentando la variabilidad diagnóstica serológica.



## BIBLIOGRAFÍA

- **ALLAN, W.; GOUGH, R.** 1974. A standard haemagglutination test for Newcastle disease. . A comparison of macro and micro methods. *Vet. Rec.* 95:120–123.
- **BENCINA, D.; MRZEL, I.; ROJS, O.; BIDOVEC, A.; DOVC, A.** 2003. Characterisation of *Mycoplasma gallisepticum* strains involved in respiratory disease in pheasants and peafowl. *Vet. Rec.* 152:230–234.
- **BROWN, D.; WHITCOMB, R.; BRADBURY, J.** 2007. Revised minimal standards for description of new species of the class *Mollicutes* (division Tenericutes). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:2703–2719.
- **BÉJAOU, A.; LANDOULSI, A.; AISSA, H.; MLIK, B.; AMOUNA, F.; EJLASSI, A.; MARDASSI, B.** 2011. Isolation of *Mycoplasma meleagridis* from chickens. *Avian. Dis.* 55:8–12.
- **BIOSS INC.** 2009. Direct Elisa Protocol. [en línea] <[https://bioosusa.com/store/skin/frontend/default/grayscale\\_green/images/bioss\\_direct\\_elisa\\_protocol.pdf](https://bioosusa.com/store/skin/frontend/default/grayscale_green/images/bioss_direct_elisa_protocol.pdf)>. [consulta: 15-04-2015].
- **BRENNER, H.; GEFELLER, O.** 1997. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. *Stat. Med.* 16:981-991.
- **CERDA, R.** 2011. Control de *Mycoplasmas* mediante el uso de Antibióticos. [en línea] <<http://www.engormix.com/MA-avicultura/sanidad/articulos/micoplasmosis-aviar-t3649/165-p0.htm>> [consulta: 15-04-2015].
- **CHERMS, F.; FREY, M.** 1967. *Mycoplasma meleagridis* and fertility in turkey breeder hens. *Avian. Dis.* 11:268–274.
- **CROWTHER, J.** 2009. *Elisa Guidebook*. 2ª Edición. Editorial Humana Press. Pp 296-287.
- **CZIFRA, G.; SUNDQUIST, B.; TUBOLY, T.; STIPKOVITS, L.** 1993. Evaluation of a monoclonal blocking enzymelinked immunosorbent assay for the detection of *Mycoplasma gallisepticum*-specific antibodies. *Avian. Dis.* 37:680–688.

- **DALLI, J.** 2011. Programa de control sanitario de las enfermedades. [en línea] <<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32011D0214>> [consulta:06-04-2015].
- **DERIDE, J.** 2010. Curvas de ROC y regresión lineal. Santiago, Chile. U. Chile. Fac. Cs. Químicas y Farmacéuticas. Depto. De Estadística. Pp 54.
- **EWING, M.; COOKSON, K.; PHILLIPS, R.; TURNER, K.; KLEVEN, S.** 1998. Experimental infection and transmissibility of *Mycoplasma synoviae* with delayed serologic response in chickens. Avian. Dis. 42:230–238.
- **FEBERWEE, A.; MORROW, C.; GHORASHI, S.; NOORMOHAMMADI, A.; LANDMAN, W.** 2009. Effect of a Live *Mycoplasma synoviae* Vaccine on the Production of Eggshell Apex Abnormalities Induced by a *M. synoviae* Infection Preceded by an Infection with Infectious bronchitis virus D1466. Avian. Pathol. 5:333-340.
- **FREUNDT, E.** 1983. Culture media for classic mycoplasmas. in: The *Mycoplasmas* 1:127–135.
- **GIBBS, J.** 2006. Selecting the Detection System Colorimetric, Fluorescent, Luminescent Methods. In: ELISA Technical Bulletin. 5:1-12.
- **GREINER, M.; BOÈHNING, D.** 1994. Notes about determining the cut-off value in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)-reply. Prev. Vet. Med. 20:307-310.
- **GREINER, M.; GARDNER, I.** 2000. Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests. Prev. Vet. Med. 45:3–22
- **HILDEBRAND, D.; PAGE, D.; BERG, J.** 1983. *Mycoplasma gallisepticum* laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. Avian. Dis. 27:792–802.
- **JACOBSON, R.** 1998. Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz. 17:469–486.

- **KEMPF, I.** 1998. DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian. Pathol.* 27:7–14.
- **KLEVEN, S.** 1998. *Mycoplasmas* in the Etiology of Multifactorial Respiratory Disease. *Poultry. Sci.* 77:1146-114.
- **KLEVEN, S.** 2008. Control of Avian *Mycoplasma* Infections in Commercial Poultry. *Avian. Dis.* 52:367-374.
- **LEVISOHN, S.; ROSENGARTEN, R.; YOGEV, D.** 1995. In vivo variation of *Mycoplasma gallisepticum* antigen expression in experimentally infected chickens. *Vet. Microbiol.* 45:219–231.
- **LEY, D.** 2008. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. **In:** Diseases of Poultry. 12<sup>a</sup> Edición. Blackwell Publishing Professional. Pp 807-834.
- **LI, B.; SHEN, J.; CAO, X.; WANG, Y.; DAI, L.; HUANG, S.; WU, C.** 2010. Mutations in 23S rRNA gene associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 308:144–149.
- **MCMARTIN, D.; KHAN, M.; FARVER, T.; CHRISTIE, G.** 1987. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in chickens. *Avian. Dis.* 31:814-819.
- **MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO.** 2001. [en línea]<<http://www.idaf.es.gov.br/Download/Legislacao/DDSIA%20%20INSTRU%20C3%87%C%20NORMATIVA%20N%C2%BA%2044%20-%20Mycoplasma.pdf>> [consulta: 06-05-2015].
- **MOHAMMED, H., CARPENTER, T., YAMAMOTO, R.** 1987. Economic impact of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks. *Avian. Dis.* 31:477–482.
- **MURAKAMI, S.; MIYAMA, M.; OGAWA, A.; SHIMADA, J.; NAKANE, T.** 2002. Occurrence of conjunctivitis, sinusitis and upper region tracheitis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*), possibly caused by *Mycoplasma gallisepticum* accompanied by *Cryptosporidium sp.* infection. *Avian. Pathol.* 31:363–370.

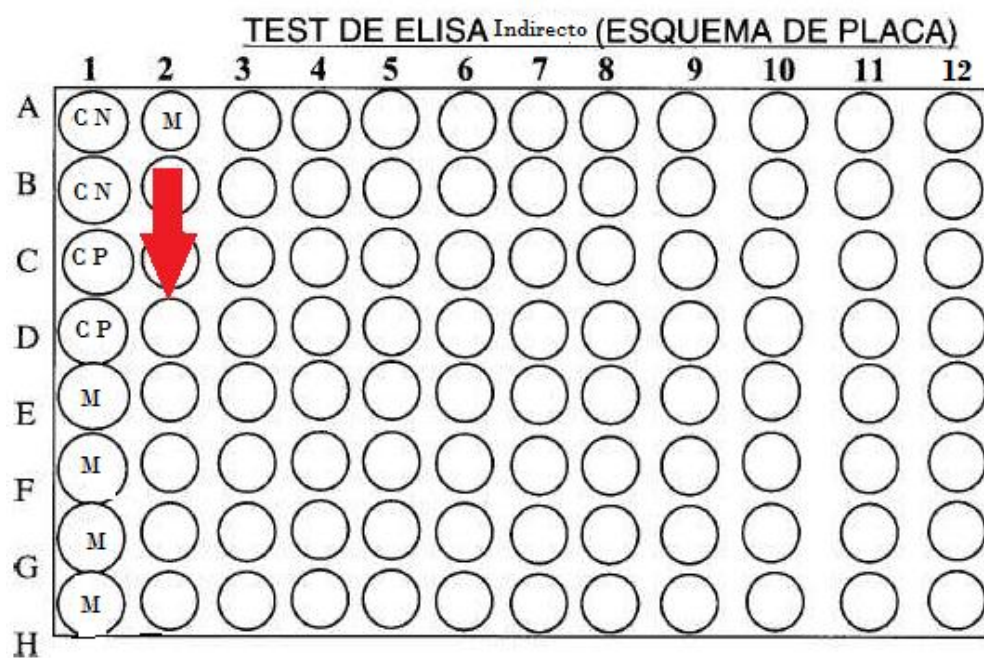
- **NASCIMENTO, E.; PEREIRA, V.; NASCIMENTO, M.; BARRETO, M.** 2005. Avian Mycoplasmosis Update. *Bra. Sci. Avi.* 7:1-9.
- **OIE. ORGANIZACIÓN INTERNACIONAL DE EPIZOTIAS.** 2013. Micoplasmosis aviar (*Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*). Manual de pruebas diagnósticas y de las vacunas para los animales terrestres. Pp 526-542. (2.3.5).
- **RAZIN, S; FREUNST, D.** 1984. Molecular biology and genetics of *Mycoplasmas* (Mollicutes). *Microbiol. Rev.* 49(4):419–455.
- **RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y.** 1998. Molecular biology and pathogenicity of *Mycoplasmas*. 62:1094-1156pp.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2009a. Instructivo Técnico para Detección de Anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis* Mediante Técnica de ELISA-I. (1). Código IT-LAB-23-v01. Pp 1-11.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO.** 2009b. Programa de control *Mycoplasma Sp.* en planteles comerciales de aves. Pp 1-32.
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2013. Programas voluntarios de control y certificación. [en línea] <<http://www.sag.cl/ambitos-de-accion/programas-voluntarios-de-control-y-certificacion>> [consulta: 15-04-2014].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2014a. Estudio de Validación de *Kits* de Elisa para el diagnóstico de *Mycoplasma* en Aves. [en línea] <[http://www.sag.cl/antecedentes\\_estudio\\_validación\\_mycoplasma\\_aviar](http://www.sag.cl/antecedentes_estudio_validación_mycoplasma_aviar)> [consulta: 06-10-2014].
- **SAG. SERVICIO AGRÍCOLA GANADERO.** 2014b. Instructivo Técnico para Detección de Anticuerpos frente a *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae* y *Mycoplasma meleagridis* Mediante Técnica de ELISA. Código: DGFCGPPT010. Pp 1-10.
- **SENASA. SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA.** 2004. Programa de control de las micoplasmosis y

salmonelosis de las aves. [en línea]  
<<http://www.senasa.gov.ar/Archivos/File/File2829-manual-opertivo.pdf>> [consulta:  
06-04-2015].

- **WINNER, F.; ROSENGARTEN, R.; CITTI, C.** 2000. In vitro cell invasión of *Mycoplasma galiisepticum*. Infect. Immun. 68:4238-4244.
- **ZAIN, M.; BRADBURY, J.** 1996. Optimising the conditions for the isolation of *Mycoplasma gallisepticum* collected on applicator swabs. Vet. Microbiol. 49:45-57.

# ANEXO

## 1. Hoja de Trabajo



CN: Control Negativo

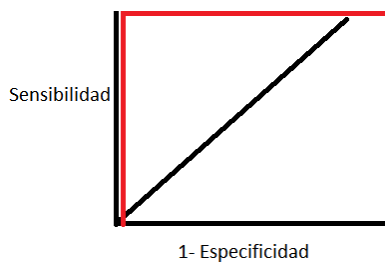
CP: Control Positivo

M: Muestra

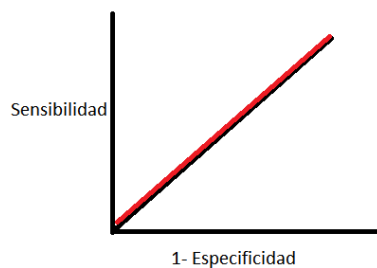
## 2. Explicación curva ROC

Cada uno de estos gráficos representa una curva ROC en particular, donde el eje “x” corresponde a 1- Especificidad, es decir, falsos positivos, mientras que el eje “y” corresponde a la sensibilidad. La curva ROC se construye a partir de cada uno de los puntos de corte observados en una prueba diagnóstica, en este caso de enzimoimmunoensayo indirecto, y permite de esta manera determinar cuál de estos puntos de corte permite los mejores resultados de sensibilidad y especificidad.

En el gráfico número 3 se presenta un área bajo la curva (ABC) = 1, es decir, el valor de sensibilidad es 100% y los falsos positivos es igual a 0%, por lo tanto, se refiere a un test diagnóstico perfecto. Por otra parte, el gráfico número 4 presenta un ABC = 0,5, es decir, el valor de sensibilidad es 100% y los falsos positivos es igual a 100%, por lo tanto, se describe como un test que no distingue entre reaccionantes y no reaccionantes.



**Gráfico 1. Representación de la Curva ROC perfecta para una prueba diagnóstica, donde el área bajo la curva equivale a uno, reconociendo exactamente a los reaccionantes y no reaccionantes de la prueba**



**Gráfico 2. Representación de la Curva ROC inválida para una prueba diagnóstica, donde el área bajo la curva equivale a 0,5, no reconociendo a los reaccionantes y no reaccionantes de la prueba**