

Validación interna del panel GPS™ Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec-qPCR siguiendo la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 para la detección en pequeños rumiantes

Gema Bru¹, Aaron Navarro¹ y Antonio Martínez-Murcia^{1,2*}

¹ Genetic PCR Solutions™, 03206-Elche

²Universidad Miguel Hernández, 03300-Orihuela, Alicante, España.

ammurcia@umh.es

La agalaxia contagiosa afecta a pequeños rumiantes causando, habitualmente, una tríada de síntomas clínicos que comprenden queratoconjuntivitis, poliartritis y mastitis. Además, también puede producir síntomas respiratorios y reproductivos en cabras. La enfermedad es de declaración obligatoria y ha sido incluida en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y el Real Decreto 526/2014. La agalaxia contagiosa presenta una etiología compleja, ya que hasta cuatro especies diferentes pueden estar implicadas en la infección: *Mycoplasma agalactiae*, *M. mycoides* subsp. *capri*, *M. capricolum* subsp. *capricolum*, y *M. putrefaciens*. Hay más de 120 especies reconocidas dentro del género *Mycoplasma*. Su crecimiento lento dificulta la identificación fenotípica, y el diagnóstico serológico tiene la desventaja de una alta heterogeneidad antigénica de sus cepas. Algunas herramientas de tipificación genética desarrolladas recientemente no se usan de forma habitual, ya que requieren mucho trabajo y largos tiempos de respuesta. Por lo tanto, son necesarios métodos de detección/identificación precisos y rápidos para evaluar la epidemiología y el control de brotes. En el presente estudio, el panel Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec-qPCR (GPS™), que incluye pruebas para los cuatro patógenos responsables de la agalaxia contagiosa, se sometió a una validación interna siguiendo las pautas de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 y el estándar francés NF T90-471:2010. El uso del formato MONODOSE (tubos de PCR con reactivos deshidratados, específicos para la diana, y listos para añadir la muestra de DNA) hace de la preparación de las reacciones de PCR una tarea simple y rápida. Los términos de validación incluyeron la especificidad analítica (inclusividad/exclusividad), el análisis de la fase cuantitativa utilizando la calibración mediante curva estándar (10⁶-10 copias de DNA estándar), fiabilidad (repetibilidad/reproducibilidad) y sensibilidad (límites de detección/cuantificación). El ensayo del panel Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec-qPCR superó la validación para un mínimo de 10 repeticiones con estrictos criterios de aceptación. Además de la evaluación de la especificidad *in silico* de los cebadores y sondas, la validación del ensayo diagnóstico se logró mediante el análisis de 191 muestras (134 de leche y 57 de hisopos nasales/auriculares). Se utilizaron dos métodos diferentes para evaluar la sensibilidad y especificidad diagnósticas. La eficacia diagnóstica del ensayo para *Mycoplasma agalactiae* fue del 97,9 %, 99,5 % para *M. mycoides*, y del 100 % para las especies *M. capricolum* y *M. putrefaciens*.

Genetic Analysis Strategies S.L. y el panel GPS™ Mycoplasmas Contagious Agalactia dtec-qPCR están registrados en el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (MAPA) con Nº de autorización R-10046 y 10805-RD respectivamente.