

## **Validación de un ensayo Hibridación de ácidos nucleicos (HAN) para la detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante el empleo de un Kit diagnóstico**

**Dra. Evelyn Lobo PhD<sup>1</sup>, Lic. Yenney Hernández<sup>1</sup>, Lic. Arsenio Betancourt<sup>2</sup> y Dra. Siomara Martínez<sup>1</sup>, PhD.**

<sup>1</sup>Laboratorio de Diagnóstico de Micoplasmas (**MYCOLAB**), Grupo de Biología Molecular Dirección de Microbiología. CENSA.

<sup>2</sup>Laboratorio de Química-Física, Dirección de Control de la Calidad

Contacto: [elobo@censa.edu.cu](mailto:elobo@censa.edu.cu)

### **Resumen**

Partiendo del conocimiento de que un alto por ciento de los cultivos celulares son frecuentemente contaminados con micoplasmas y conociendo la necesidad de contar con métodos validados como parte de los sistemas de calidad para el diagnóstico de estas contaminaciones, se realizó la validación de un ensayo Hibridación de ácidos nucleicos (HAN) para la detección de micoplasmas en cultivo celulares mediante el empleo de un Kit diagnóstico. Para el mismo se trabajaron un total de 573 muestras de cultivos celulares procedentes de diferentes laboratorios del país. Por las características del ensayo se tuvo presente la evaluación de la exactitud (mediante estudio de interferencia), la determinación de la especificidad y sensibilidad (mediante el límite de detección) tanto analítica como diagnóstica del ensayo a validar. Como resultado del estudio de validación del ensayo se demostró que el mismo tiene una sensibilidad de un 97% y un 100% de especificidad, de igual manera se evidenció que no existía interferencia de las soluciones utilizadas durante la realización del ensayo evaluado, lo cual ha permitido dar resultados muchos más confiables y veraces.

**Palabras claves:** validación, método cualitativo, micoplasmas, HAN

### **Summary**

Starting off of the knowledge of which a high percent of the cellular cultures frequently is contaminated with micoplasmas and knowing the necessity to count on methods validated like part of the systems of quality for the diagnosis of these contaminations, the validation of nucleic acid a Habitation test was made for the cellular detection of micoplasmas in culture by means of the use of a Kit diagnosis. A total of 573 samples of cellular cultures coming from different laboratories from the country worked. By the characteristics of the test one remembered the demonstration of the parameters of sensitivity (by means of the detection limit), specificity as much analytical specificity as it diagnoses of the test to validate and the study of interference. As resulting from the work demonstrated to the sensitivity of 97% and specificity of 100% the evaluated test, and don't produce interference of solution. This has allowed giving to results many more reliable and truthful.

**Key works:** validation, qualitative test, mycoplasmas, HAN

## **INTRODUCCIÓN**

La validación de un método no depende de que éste sea cuantitativo o cualitativo, ya que validar consiste en verificar y documentar su validez y por tanto su adecuación a requisitos previamente establecidos (ISO/IEC 17025). Si bien el concepto de validación no depende de estos criterios, en la práctica los parámetros de calidad que caracterizan a los métodos cualitativos son distintos. Así, por ejemplo, han quedado definidos parámetros de calidad como falsos positivos y negativos, sensibilidad, especificidad, límite de detección, límite de corte, etc (Manual OIE, 2005), mientras que en otros se está actualmente trabajando en su definición. Finalmente decir, que la mayoría de los parámetros cualitativos, al ser de naturaleza binaria SI/NO, se expresan en términos probabilísticos [Feldsine, 2000].

Hoy en día son ampliamente utilizados los métodos cualitativos sensoriales, concretamente los *test kit*,, estos son dispositivos comerciales diseñados para una aplicación concreta que contienen todos los reactivos necesarios para la obtención de la respuesta. Actualmente, los métodos para diagnosticar enfermedades específicas de los animales están descritos en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual Terrestre) y en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Acuáticos (Manual Acuático). Estos manuales, sin embargo, no recomiendan kits específicos de diagnóstico (Ruisánchez, 2005).

Partiendo del conocimiento de que un alto por ciento de los cultivos celulares son frecuentemente contaminados con micoplasmas y conociendo la necesidad de contar con métodos validados como parte de los sistemas de calidad para el diagnóstico de estas contaminaciones, la Organización Internacional de Epizootias (OIE), con la asistencia de sus centros colaboradores ha finalizado un procedimiento formal de validación y certificación de kits de diagnóstico, el cual permite armonizar los criterios de validación de estos ensayos (método de prueba) para las enfermedades infecciosas de los animales (<http://www.oie.com/Validation and Certification of Diagnostic Assays Home page>, 2005).

En este artículo se aborda la validación de un ensayo Hibridación de ácidos nucleicos (HAN) para la detección de micoplasmas en cultivo celulares mediante el empleo de un Kit diagnóstico. Teniendo en cuenta que este ensayo pertenece a la categoría de ensayo cualitativo, según la clasificación realizada por la Organización Mundial de la Salud, Capítulo 15, OMS, 2000, se tuvo presente la demostración de la sensibilidad (mediante el límite de detección), especificidad tanto analítica como diagnóstica de ambos parámetros, así como la exactitud del ensayo a validar a través del estudio de interferencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materiales biológicos a emplear en la validación:

TIPO DE ADN	LOTE	FUENTE
<i>ericha coli</i>	050405*	<i>E.coli</i> F41Cepa de colecc
<i>hylococcus aureus</i>	050405*	CEN
<i>ptococcus</i>	050405*	<i>Streptococcus</i> 120202 Cepa de colecc
<i>eurella multocida</i>	050405*	<i>Pasteurella</i> p824 F
<i>idida albicans</i>	050405*	ATCC-3
<i>yorhinis</i>	040988**	NCTC - 17
<i>alivarium</i>	100393**	ATCC -920
<i>rrole</i>	011192**	NCTC - 10
<i>oleplasma laidlawii</i>	021198**	NCTC 10
<i>ermentans</i>	090992**	Cepa de colecc
<i>ominis</i>	090392**	PG 21 Cepa de colecc
<i>ynoviae</i>	011198**	1853-WVU Cepa de colecc
<i>yopneumoniae</i>	270790**	011 (SVCMCC) Cepa de colecc
<i>plasma urealiticum</i>	011193**	582 Cepa de colecc
<i>da H-900</i>	1201205**	vector pVC 12 E.
<i>Megaprime DNA labelling System</i> (PN 1604/5/6/)		Amerst

\* Procedente del Laboratorio de Bacteriología, grupo de Biología Molécula, Dirección de Microbiología

\*\* Procedente de MYCOLAB, grupo de Biología Molecular, Dirección de Microbiología

Las cepa de ***Mycoplasma arginini* NCTC 10129** y ***Acholeplasma laidlawii* NCTC 10116**, fueron utilizadas como controles positivo y negativo respectivamente, según lo recomienda la *Farmacopeia Europea*, acápite 2.6.7 y 2.6.16, 2000

### Determinación de la especificidad analítica y diagnóstica:

La especificidad analítica fue medida enfrentando el DNA purificado del control positivo a DNA de diferentes especies (DNA de diferentes especies de *Mycoplasmas*, DNA de diferentes bacterias y DNA de levadura). La extracción del DNA se realizó a partir de un cultivo con concentración de  $10^9$  UFC/mL de todas las especies empleadas y siguiendo los protocolos descritos para cada especie (Hernández, 2005). Se realizaron cinco repeticiones para la muestra a testar y los controles siguiendo el mismo procedimiento. Posteriormente se compararon los resultados, permitiendo de esta forma comprobar si existían diferencias entre las replicas.

Para la determinación de la especificidad Diagnóstica (**D-SP**) se utilizó el procedimiento regulado por la OIE, Capítulo 1.3. Principios de Validación para Ensayos de Diagnóstico.

### Determinación de la sensibilidad analítica y diagnóstica:

Los estudios de **sensibilidad analítica** se realizaron a partir de diluciones conocidas de cultivos crecidos con *Mycoplasma arginini* (utilizado en todos los casos como control positivo). La concentración inicial fue de  $10^9$  UFC/mL con un pH de 5.2 y D.O de 0.2. Las diluciones a testar del control fueron desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-12}$  UFC/mL. Se realizaron cinco repeticiones para la muestra a testar y los controles siguiendo el mismo procedimiento. Posteriormente se

compararon los resultados, permitiendo de esta forma comprobar si existían diferencias entre las replicas.

Para la determinación de la **sensibilidad diagnóstica (D-SN)** se utilizó el procedimiento regulado por la OIE, Capítulo 1.3. Principios de Validación para Ensayos de Diagnóstico

**Diseño experimental para la determinación de la especificidad y sensibilidad diagnóstica:** Se muestrearon un total de 573 muestras de cultivos celulares procedentes de diferentes laboratorios del país.

**Evaluación de la exactitud:** Se realizó mediante el estudio de interferencia de las diferentes soluciones utilizadas durante el desarrollo de la HAN. En este caso se evaluó el PBS, agua destilada y medio de cultivo utilizado.

**Siembra de las muestras clínicas para la detección de micoplasmas:** La siembra de las muestras se realizó según se describe en el procedimiento normativo operacional PNO-BI-020, 2002. Se sembraron 0.3 mL de cada muestra en medio Hayflick Agar e incubadas a 37°C en jarra con candil para favorecer las condiciones de microaerofilia, además fueron sembradas réplicas en condiciones de anaerobiosis, utilizando como catalizador sobres de ANAEROGEN, procedente de la firma comercial OXOID, USA. Las muestras fueron incubadas por espacio de 15 días para favorecer el crecimiento de los micoplasmas y las lecturas se realizaron cada 48 horas.

**Morfología de las colonias:** Las colonias fueron observadas a las 48 horas de incubación usando un microscopio óptico de luz ordinaria bajo una magnificación de - 35 x. Se siguió como criterio de caracterización la formación de colonias pequeñas, entre 50 a 500 µm de diámetro, con forma de huevo frito, consistente de una región central opaca granular y una zona periférica traslúcida como describe Poveda, 1998. En las muestras donde hubo crecimiento de colonias en forma de *huevo frito*, se les dio pase a medio Hayflick líquido para su posterior identificación. En el medio líquido las muestras se incubaron a 37°C en condiciones de aerobiosis por espacio de 15 días, realizando lecturas diarias para determinar cambios de pH que indicaran crecimiento de micoplasmas en las muestras

Todas las muestras fueron sembradas en Agar sangre para el control bacteriológico

## **DETECCIÓN DE MICOPLASMAS MEDIANTE LA HAN**

### **Procesamiento de las muestras y del filtro**

Se centrifugó 1 mL de cada muestra a 12 000 rpm en centrifuga Eppendorf 5415D durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1mL de PBS. Se aplicaron 200 µL de cada muestra en un filtro de nitrocelulosa (SIGMA 36257) al vacío, mediante el empleo del equipo Manifold. Posteriormente este filtro fue hervido en una solución SSC / SDS durante 5 minutos y puesto a secar por espacio de 20 minutos (Johansson 2000).

#### **2.4.1.2.- Prehibridación e hibridación**

El protocolo señalado a continuación para la realización de esta técnica aparece descrito por Johansson, 1999.

### 2.4.1.3.- Revelado del film

En condiciones de cuarto oscuro, se abrió el casete y se sacó el film de rayos x, colocándose durante 2 minutos en la solución de revelado, pasado este tiempo se lavó con agua y se colocó en la solución de fijación durante 5 minutos, lavando posteriormente el film con agua, dejándolo secar a temperatura ambiente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La utilización de métodos de ensayo adecuados para el diagnóstico permite obtener resultados trazables con un nivel apropiado de incertidumbre; dichos resultados comúnmente son usados como base para la toma de decisiones financieras, regulatorias, etc., relacionadas con el desarrollo y fabricación de productos, así como con la prestación de servicios referidos al diagnóstico y otras actividades de importancia en las economías nacionales, regionales e internacionales (OGA-GEC-016)

Los métodos de ensayo seleccionados, sean éstos normalizados, no normalizados o desarrollados por el laboratorio, deben estar adecuadamente validados y documentados, previo a su uso y si bien es cierto que existe una gran cantidad de artículos que abordan la temática de la validación en ensayos analítico, la mayoría de ellos se refieren a los del tipo cuantitativos, existiendo muy pocos trabajos relacionados con la validación de métodos cualitativos (Edgington y cols., 2000).

En los laboratorios de diagnóstico es cada vez más frecuente la introducción de sistemas de medidas de respuesta rápida que generan respuestas más del tipo cualitativo que cuantitativo, por lo que se hace necesaria la validación de estos procedimientos. Sin embargo debe mencionarse que actualmente no existe una sola fuente o autoridad reconocida a nivel internacional respecto a la validación de métodos de ensayo; por lo anterior, aunque hay avances, aún no existe acuerdo unánime entre las diferentes disciplinas, respecto a la interpretación de algunos términos relacionados con el proceso de validación y a la aplicación de los mismos (Angulo y cols., 2002).

La especificidad analítica definida como la capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras negativas cuando realmente son negativas (Ruisánchez, 2005), o sea determinar específicamente el analito en cuestión (ISO/IEC 17025), es uno de los parámetros a tener en cuenta en los procesos de validación de estos ensayos.

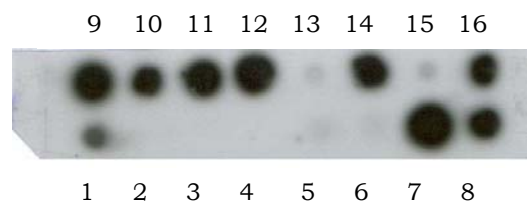


Figura 1. Estudio de especificidad del la HAN. Dot-Blot con diferentes especies. Línea 1: Control positivo, Línea 2: *Staphylococcus spp*; Línea 3: *Streptococcus spp*; Línea 4: *Pasteurella Spp*; Línea 5: *Candida albicans*; Línea 6: *Escherichia coli*; Línea 7: *M. hyorhinis*; Línea 8: *M. fermentans*; Línea 9: *M. salivarium*; Línea 10: *M. orale*; Línea 11: *M. hominis*; Línea 12 *Mycoplasma flocculare*; Línea 13: *Ureaplasma spp*; Línea 14: *M. hyopneumoniae*; Línea 15: *Acholeplasma laidlawii*; Línea 16: *M. synoviae*

Vol. VII, Nº 11, Noviembre/2006 –

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>

En nuestro caso la figura 1 muestra los resultados del estudio de especificidad analítica, utilizando el marcaje mediante el Kit Megaprimes, el mismo demuestra que el procedimiento es específico, pues no se observaron reacciones de positividad frente al DNA de ninguna de las bacterias y levaduras utilizadas, lo que se manifiesta por la no existencia de reacciones cruzadas con estas especies. Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos por Fernandez y cols., 1994 y Johansson, 2000 en estudios de validación de la sonda H-900 utilizada en este caso para el diagnóstico de micoplasmas en muestras clínicas de animales.

Por otra parte las matrices donde existía DNA de especies de micoplasmas demostraron señales de positividad lo que corrobora que el método en estudio es específico para la detección de micoplasmas. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente por Johansson, 1999; Johansson y cols., 2000), los cuales demuestran que la sonda utilizada para la detección de ADN de *Mycoplasmas* tiene una especificidad de un 100 %, esto se explica ya que la misma amplifica una región conservada del RNA 16S de micoplasma.

De los parámetros de calidad propios y característicos del análisis cualitativo podemos destacar aquellos que hacen referencia o están relacionados con niveles de concentración; así podemos distinguir el límite de detección (OMS, 2001; CFR-9, 2000). La situación habitual que nos solemos encontrar es que las normas indican el contenido máximo o mínimo de un determinado analito en una muestra ( ISO/IEC 17025, 2005). De manera general existen criterios sobre este aspecto y hay quienes señalan que la sensibilidad representa la menor concentración detectable o medible. Esto es importante, ya que determina los límites de detección y cuantificación, influyendo en la capacidad de determinar cualitativa y cuantitativamente el analito y diferenciar así los resultados positivos y negativos (Commission Regulation (EC) No C 257, 2002).

Es común que para la determinación de cierto analito en un tipo específico de muestra haya varios métodos y parámetros analíticos disponibles, de orígenes muy variados. La sensibilidad analítica definida como la capacidad o habilidad del sistema de *screening* de detectar muestras positivas cuando realmente son positivas es uno de ellos (Ruisánchez, 2005, British Pharmacopoeia Veterinary, 2000). Si tomamos como referencia la presencia de un contaminante, la legislación fija el contenido máximo, por ejemplo, en el caso de los micoplasmas lo reportado como límite de detección para la HAN es de hasta  $10^{-4}$  UFC/mL (Fernandez y cols., 1994).

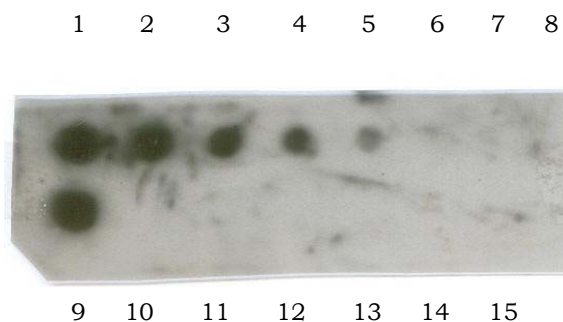


Figura 2: Estudio de sensibilidad mediante límite de detección. Línea 1 y 9: Control positivo; Línea 2: Dilución  $10^{-1}$ UFC/mL; Línea 3: Dilución  $10^{-2}$ UFC/mL; Línea 4: Dilución  $10^{-3}$ UFC/mL; Línea 5: Dilución  $10^{-4}$  UFC/mL; Línea 6: Dilución  $10^{-5}$ UFC/mL; Línea 10 a la 15: no se aplicaron muestras

Vol. VII, Nº 11, Noviembre/2006 -

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111106.html>

Los resultados obtenidos, en nuestro estudio de sensibilidad analítica mediante límite de detección se pueden observar en la figura 2 donde se demuestran que el procedimiento en estudio tiene una sensibilidad de hasta  $10^4$ UFC/mL. Esto esta en concordancia con lo reportado por otros autores que han utilizado este tipo de ensayo (Brown y cols., 2001).

Los estudios de curva de dilución seriada permitieron establecer este límite de detección, coincidiendo nuestros resultados con lo reportado por otros autores en relación al límite de detección de la técnica. En relación a los valores de obtenidos en el estudio de la sensibilidad diagnóstica, el resultado fue de un 98% el cual esta de acuerdo con lo señalado por otros autores (Johansson, 1998, Manual de la OIE, 2000).

Los estudios realizados bajo condiciones de repetibilidad (analista, reactivo) evidenciaron que no existen diferencias entre las condiciones analizadas.

Los estudios de interferencias están encaminados a demostrar la alteración o no de la respuesta a la presencia de otros analitos o sustancias interferentes en la muestra que alteran el resultado final del ensayo (OGA-GEC-016). En tal sentido las figuras 3 y 4 demuestran que las diferentes sustancias utilizadas ya fueran en el tratamiento de las muestras o durante el desarrollo del ensayo no producen alteraciones en el resultado final de la técnica.



Figura 3. Estudio de interferencia de las diferentes soluciones inoculadas con el control positivo; Línea 1: Control positivo; Línea 2: PBS; Línea 3,: agua; Línea 4: control del medio; Línea 5: muestra negativa inoculada con control positivo; línea 6: Dilución  $10^{-4}$  UFC/mL.



Figura 4. Estudio de interferencia de la muestra. Línea 1: Control positivo; Línea 2: PBS; Línea 3,: agua; Línea 4: control del medio; Línea 5: Dilución  $10^{-5}$ UFC/mL; línea 6: Dilución  $10^{-4}$  UFC/mL; Línea 7: Control negativo; Línea 8: Control positivo

Antes de concluir nuestro trabajo nos gustaría compartir algunos criterios en sentido general y es que aún cuando el laboratorio haya realizado la validación, éste tendrá que verificar periódicamente que se cumplan los parámetros de desempeño documentados y obtenidos en el estudio de validación utilizando, por ejemplo, muestras inoculadas o materiales de referencia incorporados a matrices más representativas. También debe tomar en cuenta los resultados obtenidos de las auditorias internas y externas de sus sistemas de gestión de la calidad, dejando registro de estas verificaciones.

## CONCLUSIONES

Se realizó la validación del ensayo de HAN para la detección de micoplasmas en cultivos celulares mediante el empleo de un Kit diagnóstico, determinando los parámetros de exactitud, especificidad y sensibilidad, tanto analítica como diagnóstica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Angulo, A. F.; Kruijff-Krossen, Ingrid. y Brugman, J. (2002): Mycoplasma controls in the frame of the European Pharmacopoeia. National Institute for Public Health and the Environment. Laboratory for control of Biologicals. Mycoplasma Research.
2. British Pharmacopoeia Veterinary. (2000): Test for Absence of Mycoplasmas. Appendix XVI. B (Vet) 3. pp A17- A19
3. Brown, R., Caphart, M. , Faustino, P., Frankewich, R., Gibbs, J., Leutzinger, E., Lunn, G.
4. Code of Federal Regulations (2001): Animals and Animal products. Detection of mycoplasma contamination. 9 CFR. Ch. 1 (1-1-01 Edition) pp 565-566.
5. Commission Regulation (EC) No C 257/2002. Official Journal of the European Community, 1 R-Biopharm Rhone Ltd, 12.2.2002, No. L 041, pp12-15.
6. Edgington, M.; Microsafe B.V. (2000): Validating PCR against the current Ph. Eur. Mycoplasma Test. Pharmeuropa, August, 2000
7. Feldsine, Ptiomal, C. Abeyta and W. Andrews (2002): Journal of AOAC Interna. 85 (5) (2002) 1187. URL: <http://aoac.org/vmeth/MicrobiologyGuidelines112700.htm>
8. Fernandez, C.; Johansson, K. (1994): Obtención y validación de una sonda H-900 para el diagnóstico de micoplasmas en aves y porcinos. Tesis de Master. Suecia-Cuba
9. Hernández, Y.; Lobo, E., (2005): Evaluación de diferentes métodos de extracción de DNA de micoplasmas en muestras de cultivo celulares. Tesis de grado. CENSA- Universidad de La Habana. Facultad de Biología.
10. ISO/IEC 17025 (2005): requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayos y de calibración.
11. Johansson, K. (1999): Oligonucleotide probes complementary to RNA<sub>r</sub> 16S. En: Molecular and Diagnostic procedures in Mycoplasma. Vol. II. 29-47.
12. Johansson, K. (2000): RNAr sequences from *Mollicutes* of genus *Mycoplasma* a compilation based on GenBank. Updated. Preliminary version.
13. Johansson, K. E.; Pettersson, B.; Heldtander, M.; Bolske, B. y Tully, J. G. (2000): Phylogeny of the genus Mycoplasma based on 16S rRNA sequence analysis . Program and Abstracts. 13<sup>th</sup> International Congress of International Organization for Mycoplasma. July 14-19, Acros, Fukuoka, Japan.
14. Ng, L., Rajagopalan, R., Chiu, Y., Sheinin, E. (2001). Analytical Procedures and Method Validation: Highlighs of the FDA´s Draft Guidance. LCGC Vol. 19, No. 1,
15. OGA-GEC-016 (2005): Política de la Oficina Guatemalteca de Acreditación (OGA). Para la Selección y Validación de Métodos de Ensayo. pp 2-30
16. OIE Manual of Standards for diagnostic test and vaccines (2002). Office International Des. Epizooties, 3<sup>rd</sup> de. pp: 512-521. Paris, France. <http://www.oie.com/Validation and Certification of Diagnostic Assays Home page, 2005>.
17. Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2000): General requeriments for the sterility of biological substances. WHO Technical report Series. N0. 373 pp: 70-76.
18. Poveda, J.B. (1998): Biochemical Characteristic in Mycoplasma identification. En: Methods in Molecular Biology. Vol. 104. Mycoplasma Protocols. Miles, R.J. y Nicholas, R.A. (eds). Humana Press. Inc., Totowa, New Jersey. pp: 69-79.



19. Procedimiento Normativo Operacional (PNO-BI-020), (2002) : Determinación de micoplasmas en muestras de animales, cultivos celulares, sueros y productos biofarmacéuticos.
20. Ruisánchez, I.; Esther Trullols y F. Xavier Rius (2005) : Validación de métodos analíticos cualitativos. <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/divcualit3.pdf>
21. World Health Organization (OMS) (2000): General requirements for the sterility of biological substance. WHO Technical report Series. N0. 872 Annex 3 pp. 69-74

Trabajo recibido el 20/09/2006, nº de referencia 110609\_RED VET. Enviado por su autor principal. Publicado en [Revista Electrónica de Veterinaria REDVET®](#), ISSN 1695-7504 el 01/11/06. [Veterinaria.org®](#) - [Comunidad Virtual Veterinaria.org®](#) - Veterinaria Organización S.L.® Se autoriza la difusión y reenvío de esta publicación electrónica en su totalidad o parcialmente, siempre que se cite la fuente, enlace con Veterinaria.org –<http://www.veterinaria.org/> y [REDVET®](#) <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> y se cumplan los requisitos indicados en [Copyright](#) 1996 -2006