

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL
BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA
EN LAS ISLAS CANARIAS**

M^a SORAYA DÉNIZ SUÁREZ

Las Palmas de Gran Canaria, 1996

43/1995-96

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
UNIDAD DE TERCER CICLO Y POSTGRADO

Reunido el día de la fecha, el Tribunal nombrado por el Excmo. Sr. Rector Magfco. de esta Universidad, el/a aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el/a Doctorando/a las objeciones formuladas por los señores miembros del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE
Las Palmas de Gran Canaria a 10 de junio de 1996.

El/a Presidente/a: Dr. D. Luis León Vizcaino,

El/a Secretario/a: Dr. D. José Manuel Molina Caballero,

El/a Vocal: Dr. D. Antonio Fernández Rodríguez,

El/a Vocal: Dr. D. Alberto Montoya Alonso,

El/a Vocal: Dr. D. Karl-Erik Johansson,

La Doctoranda: Dña. M^a Soraya Déniz Suárez,

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION ANIMAL,
BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**ESTUDIO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA
EN LAS ISLAS CANARIAS**

M^º SORAYA DÉNIZ SUÁREZ
Las Palmas de Gran Canaria, 1996

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA ANIMAL, PRODUCCION ANIMAL,
BROMATOLOGIA Y TECNOLOGIA DE LOS ALIMENTOS**

**ESTUDIO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA
EN LAS ISLAS CANARIAS**

*Tesis Doctoral presentada por la
Licenciada en Veterinaria
Dña. M^a Soraya Déniz Suárez,
para optar al título de Doctora.*

EL DIRECTOR

EL CODIRECTOR

LA DOCTORANDA

Las Palmas de G.C., 1996

Fernando Real Valcárcel, profesor titular de "Enfermedades Infecciosas, Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria" del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMA

Que Dña Mª Soraya Déniz Suárez, licenciada en veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado ESTUDIO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA EN LAS ISLAS CANARIAS, el cual considero reúne las condiciones exigidas por la legislación y normativas vigentes para optar al Título de Doctora en Veterinaria.

Las Palmas de G. C., a 29 de Marzo de 1996.

Fdo: Fernando Real Valcárcel

José Bismarck Poveda Guerrero, profesor titular de "Enfermedades Infecciosas, Epidemiología, Medicina Preventiva y Policía Sanitaria" del Departamento de Patología Animal, Producción Animal, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas de Gran Canaria.

INFORMA

Que Dña M^a Soraya Déniz Suárez, licenciada en veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado ESTUDIO DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA CAPRINA EN LAS ISLAS CANARIAS, el cual considero reúne las condiciones exigidas por la legislación y normativas vigentes para optar al Título de Doctora en Veterinaria.

Las Palmas de G. C., a 29 de Marzo de 1996.

Fdo: Jose Bismarck Poveda Guerrero

***A mis padres, Pedro Miguel y Francisca,
porque gracias a ellos llegué hasta aquí
y siempre les estaré profundamente agradecida.***

***A Estrella, Angel e Iris,
por haberme animado en todo momento,
y por su inestimable ayuda.***

***A Pablo, por confiar en mi y no dejar en
ningún momento que perdiera las fuerzas.***

Índice

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1.-CONSIDERACIONES GENERALES	5
2.1.1.- Concepto e historia de la enfermedad	5
2.1.2.- Distribución geográfica	7
2.2.- ETIOLOGÍA DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA	12
2.2.1.- Taxonomía	12
2.2.2.- Morfología y caracteres tintoriales	13
2.2.3.- Necesidades y caracteres de cultivo	13
2.2.3.1.- Condiciones generales	13
2.2.3.2.- Medios de cultivo	14
2.2.3.3.- Factores que inciden en el crecimiento	15
2.2.4.- Resistencia a los agentes físico-químicos	16
2.2.5.- Métodos de identificación	16
2.2.5.1.- Bioquímicos y enzimáticos	16
2.2.5.2.- Serológicos	24
2.2.6.- Estructura antigénica	30
2.2.6.1.- Antígenos	30
2.2.7.- Ultraestructura	31
2.3.- LA ENFERMEDAD	32
2.3.1.- Clínica	32
2.3.2.- Lesiones	35
2.3.2.1.- Macroscópicas	35
2.3.2.2.- Microscópicas	37
2.4.- DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD	38
2.4.1.- Clínico	38
2.4.2.- Anatomopatológico	39
2.4.3.- Laboratorial	39
2.4.3.1.- Microbiológico	39
2.4.3.1.1.- Toma de muestras	39

2.4.3.1.2.- Métodos de aislamientos	40
2.4.3.2.- Seroimmunológico	40
2.4.3.3.- Biopatología clínica	43
MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1.- OBJETIVOS	46
3.2.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO	47
3.3.- AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS	48
3.4.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE MICOPLASMAS AISLADAS	48
3.4.1.- Clonaje	48
3.4.2.- Pruebas bioquímicas	49
3.4.2.1.- Sensibilidad a la digitonina	49
3.4.2.2.- Hidrólisis de la urea	50
3.4.2.3.- Fermentación de la glucosa	50
3.4.2.4.- Hidrólisis de la arginina	51
3.4.2.5.- Actividad fosfatasa	51
3.4.2.6.- Producción de películas y cristales	52
3.4.2.7.- Reducción del trifeníl tetrazolium	52
3.4.3.- Identificación serológica	52
3.4.3.1.- Prueba de Inhibición del Crecimiento	53
3.4.3.2.- Prueba de Inhibición del Metabolismo	54
3.4.4.- Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56
3.5.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON UNA CEPA AUTÓCTONA DE <i>M. AGALACTIAE</i>	58
3.5.1.- Animales objeto de estudio	58
3.5.2.- Inoculación experimental	59
3.5.3.- Estudio anatomopatológico de los animales de la experiencia	60
3.5.3.1.- Estudio macroscópico lesional	60
3.5.3.2.- Estudio histológico	61
3.5.4.- Análisis microbiológico de las muestras	62

3.5.5.- Técnicas de E.L.I.S.A. empleadas	61
3.5.5.1.- Técnica de E.L.I.S.A. Indirecto con antígeno lavado y sonicado	61
3.5.5.1.1.- Elaboración del antígeno	62
3.5.5.1.2.- Estandarización de la prueba	63
3.5.5.1.3.- Técnica	64
3.5.5.2.- Técnica de E.L.I.S.A. Indirecto con el preparado comercial del Doctor Bommeliang	65
3.5.5.2.1. Reactivos	65
3.5.5.2.2. Técnica	65
3.5.6.- Técnica de Hemaglutinación Indirecta (I.H.A.)	67
3.5.6.1.- Elaboración del antígeno	67
3.5.6.2.- Inactivación de los sueros problema	68
3.5.6.3.- Preadсорción de los sueros con eritrocitos de oveja	69
3.5.6.4.- Técnica	69
3.5.7.- Análisis de biopatología clínica	70
3.6.- ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA	72
3.7.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO	74
3.7.1.- Medio de cultivo Hayflick modificado	74
3.7.1.1.- Medio líquido	74
3.7.1.2.- Medio sólido	75
3.7.2.- Medio de cultivo SP4	76
3.7.2.1.- Medio líquido	76
3.7.2.2.- Medio sólido	77
3.7.3.- Medio para la hidrólisis de la urea	77
3.7.4.- Medio para la fermentación de la glucosa	77
3.7.5.- Medio para la hidrólisis de la arginina	78
3.7.6.- Soluciones utilizadas en la técnica ELISA	78
3.7.6.1.- Buffer unidor	78

3.7.6.2.- Buffer lavador	79
3.7.6.3.- Buffer citrato-fosfato	79
3.7.6.4.- Solución de parada	79
3.7.7.- Soluciones utilizadas en el Hemaglutinación Indirecta	79
3.7.7.1. PBG	79
RESULTADOS	80
4.1.- FOCOS DE AGALAXIA CAPRINA ESTUDIADOS	81
4.1.1.- Estudio clínico	81
4.1.2.- Resultados microbiológicos	81
4.1.3.- Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	81
4.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON <i>M. AGALACTIAE</i> EN UN LOTE DE SEIS CABRAS	82
4.2.1.- Evolución clínica	82
4.2.2.- Datos biopatológicos	82
4.2.3.- Resultados microbiológicos	84
4.2.4.- Resultados anatomopatológicos	85
4.2.5.- Respuesta humoral	86
4.2.5.1.- Método IHA	86
4.2.5.2.- Método ELISA con antígeno elaborado según THIRKELL Y COLS (1990)	87
4.2.5.2.1.- Con <i>M. agalactiae</i>	87
4.2.5.2.2.- Con <i>M. capricolum subsp. capricolum</i>	88
4.2.5.2.3.- Con <i>M. mycoides subsp .mycoides(LC)</i>	88
4.2.5.3.- Método ELISA del Doctor Bommeliang	89
4.3.- PREVALENCIA DE LA INFECCIÓN POR <i>M. AGALACTIAE</i> EN GANADO CAPRINO DE GRAN CANARIA, LANZAROTE Y EL HIERRO	90
TABLAS Y FIGURAS	92
DISCUSIÓN	139

6.1.- ASPECTOS CLÍNICOS, BIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS	140
6.2.- EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS EMPLEADOS	146
6.3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR <i>M. AGALACTIAE</i> Y <i>M. MYCOIDES. SUBSP. MYCOIDES (LC)</i>	148
CONCLUSIONES	152
RESUMEN	154
SUMMARY	156
AGRADECIMIENTOS	158
BIBLIOGRAFÍA	160

Introducción

Las infecciones por micoplasmas en el ganado caprino, causan importantes pérdidas económicas en muchos países del continente Africano, Asiático y Europeo, originando tanto infecciones inaparentes, como enfermedades primarias y secundarias de gran trascendencia. Entre las micoplasmosis mayores o primarias, destacan el Síndrome de Agalaxia Contagiosa y la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina. El primero de ellos, es reconocido por las autoridades sanitarias como endémico en muchos países del área mediterránea, en tanto que el segundo, es una importante causa de mortalidad en por lo menos 30 países de Africa y Asia.

A pesar de que las afecciones que causan estos microorganismos han sido observadas en numerosos países, la mayor parte de la información disponible, solamente hace referencia a la descripción de brotes clínicos puntuales, siendo escasos, los estudios epidemiológicos que permitan conocer con exactitud, el verdadero alcance de estas infecciones.

Durante la 62^a Asamblea General de la Oficina Internacional de Epizootías (OIE), celebrada en París del 16 al 20 de Mayo de 1994, se analizó el impacto socioeconómico de las infecciones por micoplasmas en el ganado bovino, ovino y caprino, considerando éste muy importante a nivel mundial. En particular se consideró que enfermedades como la Pleuroneumonía Contagiosa Bovina, Pleuroneumonía Contagiosa Caprina y el Síndrome de Agalaxia Contagiosa de los pequeños rumiantes, debían estudiarse con especial interés, y controlarse de una manera eficaz mediante sistemas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica apropiados.

Igualmente, la OIE recomendó priorizar la investigación sobre las

micoplasmosis en el ganado bovino, ovino y caprino con el fin de desarrollar métodos de diagnóstico nuevos, eficaces y accesibles (Resolución OIE nº XI, 1994).

Nuestro estudio se inició en el año 1992, después de la aparición de un brote grave de Agalaxia Contagiosa Caprina en el municipio de Teror, en la isla de Gran Canaria. Este episodio se desarrolló con una alta morbilidad y mortalidad, destacando signos de mastitis agudas, muertes neonatales y de hembras en gestación así como queratoconjuntivitis. Después del correspondiente procesamiento de las muestras remitidas a nuestro Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, se logró aislar e identificar a *M. agalactiae* como responsable del mencionado brote.

A partir de este hallazgo, seguimos con atención todas las muestras de ganado caprino que llegaron a nuestro laboratorio de diagnóstico, con el fin de conocer el alcance de este síndrome en nuestra Comunidad. No obstante, además del estudio microbiológico, se hacía imperiosa la necesidad de incorporar técnicas de diagnóstico serológico.

Para el diagnóstico serológico de la Agalaxia Contagiosa, se ha empleado tradicionalmente la reacción de Fijación del Complemento, la cual fue analizada en su rendimiento por LeGoff y Perreau en 1984 en el diagnóstico de la Agalaxia Contagiosa en la especie caprina en infecciones por *M. agalactiae*, *M. capricolum subsp. capricolum* y *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*, obteniéndose buenos resultados en cuanto a la diferenciación entre rebaños libres y afectados, aunque con ciertos problemas en cuanto a sensibilidad y especificidad.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del diagnóstico serológico, se desarrolló posteriormente la técnica ELISA indirecto, que proporciona una mayor sensibilidad que la reacción de Fijación del Complemento, señalándose su principal interés como herramienta epidemiológica, dada su versatilidad. Sin olvidar la técnica de Hemaglutinación Indirecta, la cual ha facilitado muy buenos resultados

en cuanto a sensibilidad y especificidad, aunque su puesta a punto, y la cantidad de antígeno que emplea, son sus mayores inconvenientes a la hora de ser empleada para conocer la seroprevalencia de las micoplasmosis en una región o país.

Sobre estos datos, y con la finalidad de mejorar el conocimiento sobre la persistencia de la infección por micoplasmas en el ganado caprino de las Islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro, se establecieron los objetivos de la presente tesis doctoral:

1.- Aislamiento e identificación de los micoplasmas implicados en el Síndrome de Agalaxia Contagiosa.

2.- Comparación de la utilidad de diferentes técnicas de diagnóstico serológico como son la Hemaglutinación Indirecta, ELISA indirecto según Thirkell y cols., 1990, y ELISA indirecto del Dr. Bommeliang.

3.- Estudio de la seroprevalencia de las infecciones por *M. agalactiae* y *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* en las islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro.

Revisión Bibliográfica

2.1.- CONSIDERACIONES GENERALES.

2.1.1.- Concepto e historia de la enfermedad.

Es una enfermedad infecto-contagiosa, propia del ganado ovino y caprino, caracterizada por síntomas mamarios, oculares y articulares, producida por diferentes especies del Género *Mycoplasma*. En el ganado ovino el agente etiológico principal es *M. agalactiae*, mientras que en el ganado caprino hay una pluralidad de agentes etiológicos: *M. agalactiae*, *M. capricolum subsp. capricolum*, *M. mycoides subsp. mycoides LC*, *M. putrefaciens*, *M. mycoides subsp. capri* (CONTRERAS y cols., 1993).

La agalaxia contagiosa es una más entre las muchas enfermedades infecto-contagiosas de nuestra cabaña, que es conocida en nuestro país desde hace más de cuatrocientos años. Ya en 1574 nuestro "Honrado Concejo de la Mesta" en el cuaderno XII se ocupa de esta enfermedad junto con la viruela y el sanguinuelo (Carbunco bacteridiano), denominándola "gota", en atención, sin duda, a la sintomatología artrítica. Los pastores de la época la denominaban gota ubrera o sequera y gota rastrera, según sean la mama o las articulaciones donde tengan lugar las localizaciones principales. En 1789, nuestro compatriota JUAN ANTONIO MONTES, en su tratado de "Enfermedades de los ganados", estudia esta enfermedad con la designación de "falta de lactancia".

La primera descripción clínica la realiza METAXA en Italia, en 1816, con la denominación de *Stornarella*, que significa "sequedad". En 1854, ZANNGER la identifica en el ganado caprino en Suiza. En 1871, BRUSASCO, en Italia, comprueba la contagiosidad y emplea por primera vez el nombre de Agalaxia Contagiosa. Por otra parte, MARRA, en 1891, reprodujo experimentalmente la enfermedad, y CELLI y DE BLASI, en 1906, comprobaron que el agente causal atravesaba los poros de ciertas bujías de porcelana (filtros de Berkefeld y Silbersmith) y, en consecuencia, lo catalogaron como un virus.

BRIDÉ y DONATIEN, en 1923, logran cultivar el agente etiológico en medios de cultivo propios de bacterias, en caldo adicionado de 15 % de suero y 2 % de lactosa. Emplearon filtrados de muestras procedentes de animales enfermos. El agente causal era, por lo tanto, filtrable como los virus, pero cultivable en medios líquidos como las bacterias, pudiendo reproducir la enfermedad en la oveja en dos de sus formas, mamaria y artrítica, y al mismo tiempo comprobaron la semejanza del agente descubierto con el de la Pleuroneumonía de los bóvidos.

El término *Mycoplasma* lo introduce **NOVAK** en 1929. *Myc* hace alusión a *Myc*: hongo, y *plasma*: forma o modelo. Por la similitud que observó este autor con los hongos.

WROBLEWSKI, en 1931, señala su complicado ciclo de desarrollo: a partir de una forma de espora se pasa a la de micelio con una red de anillos conidiales con exosporas y, finalmente, a la formación de espermatocistos y filamentos miceliarios anulares, que justifican el nombre dado por este autor al agente etiológico, *Anulomyces agalactiae*, y que caracterizaron la condición micótica de este agente y otros similares. **LEDINGHAMS**, en 1933, confirmó tales resultados, incluyendo a este agente y al de la Pleuroneumonía bovina entre los actinomicetos (hongos). A la misma conclusión llegaron otros autores.

Con tales fundamentos, el agente productor de la Agalaxia contagiosa se consideró unas veces como un hongo y otras como una bacteria, amén de virus. **TURNER**, en 1935, propuso instituir para este nuevo microorganismo una nueva designación, la de *Borrelomyces agalactiae*. También **SABIN**, en 1941, lo considera un hongo y lo llama *Capromyces agalactiae*. Más tarde se pensó en incluir el agente etiológico de la agalaxia contagiosa, junto con el de la Pleuroneumonía bovina y otros, en el grupo PPLO (Pleuro-pneumoniae like organisms: organismos semejantes al agente productor de la Pleuroneumonía).

2.1.2.- Distribución geográfica.

La agalaxia contagiosa es una enfermedad de distribución mundial, que afecta a ganado ovino y caprino. Está presente en todos los países del área mediterránea, y se extiende por oriente próximo (Israel, Siria), Irán, hasta Pakistán y la India, alcanzando el problema una magnitud máxima en los rebaños para la producción de leche. En otros países, como Australia y Estados Unidos, no se reconoce su existencia como entidad clínica, al menos en su forma clásica. Sin embargo *M. agalactiae* y los otros agentes etiológicos del síndrome, han sido aislados en diferentes procesos del ganado ovino y caprino (DAMASSA, 1983a; DAMASSA y cols., 1983b y HAZELL y cols., 1985).

A pesar de que ha sido observada en numerosos países (COTTEW, 1985 y JONES, 1983), la información de la que se dispone hace referencia a la descripción de formas clínicas particulares, o a la demostración de otros micoplasmas diferentes de *M. agalactiae* en la etiología de dicho síndrome (COTTEW, 1985; PERREAU, 1977; PERREAU, 1979a; PERREAU y cols, 1979b y TALAVERA, 1981), siendo escasos los estudios epidemiológicos que reflejen con exactitud el verdadero alcance de la infección (PEREZ y cols., 1992).

La situación de las micoplasmosis de los pequeños rumiantes en general, y de la agalaxia contagiosa en particular, fue considerada enzoótica por los responsables sanitarios de la mayoría de los países del área mediterránea (JONES, 1987).

En Portugal fue diagnosticada en 1958, y a partir de dos focos identificados en 1978, se considera diseminada por todo el país (ATALAIA y cols., 1981 y REGALLA, 1987).

En Francia se reconocen dos áreas enzoóticas de Agalaxia Contagiosa: en el sur, en el Departamento de Pirineos Atlánticos, fronterizo con las Comunidades

Autónomas del País Vasco, Navarra y Aragón, en donde desde hace más de 100 años se tienen noticias de la enfermedad de ovinos (LEBRET, 1989; PERREAU y cols., 1975; PERREAU, 1977; PERREAU, 1979c y TORIO, 1967) y en la zona central (Alta-Savoia) afectando fundamentalmente a ganado caprino (MIEGE, 1978).

En Italia fue descrita por primera vez por METAXA, y es considerada una de las diez enfermedades infecciosas más importantes del ganado ovino. En la actualidad se extiende principalmente por la región central y sur de la península, y de forma especialmente grave por las islas, en las que el número de brotes ha ido en aumento en los últimos años (MONTAGNA y cols., 1987, 1988, 1989).

En Grecia, a pesar de ser considerada una enfermedad de gran importancia tanto en ovino como en caprino, existen pocos datos sobre su prevalencia y distribución geográfica. Un proceso muy grave producido por micoplasmas, conocido como la enfermedad de los edemas de las cabras de Esparta, fue descrito en 1935 y aparece esporádicamente en este país (SARRIS y cols., 1987 y SIMOS, 1987).

En la antigua Yugoslavia, a pesar de considerarla erradicada en la II Guerra Mundial, y ser descrita tan sólo de forma esporádica en los últimos años (BUTOZAN y cols., 1961, cit. por MARCO y cols., 1993), existe el riesgo de un aumento de casos ante el incremento observado de la población caprina (JONES, 1987).

En Alemania, la falta de información es notable, considerándose libre de *M. agalactiae*, resaltando tan sólo un brote de mamitis y pleuroneumonía caprina en el sur del país por *M. mycoides subsp. mycoides LC* (KIRCHHOFF y cols., 1987).

Los Países Bajos y Dinamarca son considerados libres de Agalaxia Contagiosa, aunque en el caso de los Países Bajos está establecido el control

laboratorial de los animales importados (JONES, 1987).

En Israel se conocían tradicionalmente áreas enzoóticas de *M. agalactiae* y a partir de los 70, *M. mycoides subsp. mycoides LC* fue aislado de varios brotes. En la actualidad, se reconoce la presencia de los dos microorganismos, pero su aparición se restringe a casos esporádicos, no habiéndose producido brotes epizooticos en estos últimos años (RAPOPORT y cols., 1984).

En Turquía, la enfermedad está ampliamente extendida (ARISOY y cols., 1974, cit. por MARCO y cols., 1993), y en Irán se describe la importancia de los focos por *M. agalactiae* (BORY y cols., 1962, cit. por MARCO y cols., 1993).

Marruecos, es el único país del Magreb en el que hay descripciones de esta afección, señalándose a *M. capricolum subsp. capricolum* como responsable de procesos específicos del ganado ovino (TAOUDI y cols., 1987). En otros países africanos, se ha puesto de relieve la implicación de *M. agalactiae* en focos caprinos de Agalaxia Contagiosa (DOUTRE, 1981 y EL HASSAN y cols., 1986).

En América Latina, no parece haberse detectado *M. agalactiae*, aunque sí los otros miembros del síndrome tanto en caprino (NASCIMIENTO y cols., 1986), como en otras especies de pequeños rumiantes: alpaca, llama y vicuña (HUNG y cols., 1991).

En España la información existente sobre la prevalencia de la enfermedad es amplia y responde a varios estudios. TALAVERA y GONZER (1983) efectuaron la identificación de cepas pertenecientes a procesos de agalaxia en ganado ovino y caprino diagnosticados hasta 1980, obteniendo como resultados que *M. agalactiae* resultó ser el principal agente implicado en los brotes de Agalaxia Contagiosa, sin descartar a las otras especies (*M. mycoides subsp. mycoides LC*, y una escasa participación de *M. capricolum subsp. capricolum*) (TALAVERA y cols., 1981). En los dos años posteriores, detectaron un importante incremento de los casos caprinos

por *M. mycoides subsp. mycoides LC* y además un brote de esta última especie en el ganado ovino, que constituye un caso inusual en la bibliografía. Estos mismos autores certifican la posibilidad de infecciones mixtas por dos de las especies del síndrome (TALAVERA y cols., 1983).

GARRIDO y LEÓN, (1982), estudian entre los años 1979 y 1982 etiológica y epidemiológicamente 12 focos ovinos y 43 caprinos, concluyendo que todas las cepas ovinas correspondían a *M. agalactiae* (GARRIDO y cols, 1982), y con respecto a las de origen caprino, los resultados fueron similares a los descritos por otros autores. Posteriormente GARRIDO y cols., 1987 resumen la situación de la agalaxia contagiosa en España llegando a la conclusión de la extensión de esta afección por la práctica totalidad del territorio, a excepción de las islas Canarias y Baleares. Además, debido a la alta densidad de ganado caprino en el sur de España, se enfatiza en el carácter enzoótico en este área. Destacando asimismo, la mayor severidad de los casos producidos por *M. mycoides subsp. mycoides LC*, que inducen a un mayor envío de muestras al laboratorio. Finalmente consideran a *M. capricolum subsp. capricolum* como agente esporádico de este síndrome en cabras.

En el servicio de Investigación y Mejora Agraria (SIMA) de Derio, se han identificado brotes atribuidos en su totalidad a *M. agalactiae*, en la mayoría de Comunidades Autónomas productoras de ovino y caprino (MARCO, 1988 y 1990). Sin embargo, en la comunidad autónoma vasca no se han registrado casos desde 1989 (PEREZ y cols., 1992).

Por otra parte, los estudios epidemiológicos y de control de mamitis subclínicas han posibilitado la detección de portadores subclínicos de micoplasmas en ganado caprino (CONTRERAS y cols., 1992). No obstante, en la raza ovina Lacha, en concordancia con la ausencia de casos clínicos en los últimos años, no se ha aislado ninguna especie de estos microorganismos (PEREZ y cols., 1992).

En cuanto a las observaciones clínicas más destacables en los últimos años,

FERNANDEZ y cols. 1989 atribuyeron a *M. agalactiae* un brote de queratoconjuntivitis que afectó al 20% del colectivo, asociado a una afección articular en el 5% de los animales; curiosamente en este brote no se observó ningún caso de mamitis. Además, junto a las descripciones clínicas, **VILLALBA y cols., 1992**, **PEREZ y cols., 1990** y **LEÓN y cols., 1993** aportaron los resultados de diferentes ensayos de vacunación frente a *M. mycoides subsp. mycoides LC* y *M. agalactiae*, respectivamente. Sobre otras micoplasmosis con sintomatología próxima a la Agalaxia Contagiosa, **LEON y cols., 1988 y 1993**, diagnosticaron en el ganado caprino distintos procesos causados por micoplasmas, entre los que destacan mamitis y artritis por *M. putrefaciens*, y queratoconjuntivitis por *M. conjunctivae*.

Finalmente, y en referencia a las Comunidades Autónomas consideradas hasta hace poco libres de Agalaxia Contagiosa, últimamente se ha descrito en la Comunidad Canaria la enfermedad por *M. agalactiae* (**DÉNIZ y cols., 1993** y **REAL y cols., 1993**), por *M. mycoides subsp. mycoides LC* (**RODRÍGUEZ y cols., 1993** y **VILLALBA y cols., 1992**) y por *M. putrefaciens* (**RODRÍGUEZ y cols., 1993 y 1994**), lo que supone la reconsideración de dicha Comunidad como zona exenta de esta enfermedad, teniendo en cuenta además que **REAL** en 1982 había diagnosticado en cabras de la isla de Tenerife, mediante reacción de fijación del complemento, la infección por *M. agalactiae*. Del mismo modo, aunque en el Archipiélago Balear no se ha confirmado microbiológicamente, hay evidencias clínicas de la enfermedad, resaltando la vacunación sistemática que se emplea como medida preventiva habitual para evitar el riesgo de la aparición de brotes por la entrada de ganado caprino procedente de zonas infectadas de la Península (**MARCO y cols., 1993**).

2.2.- ETIOLOGIA.

2.2.1.- Taxonomía.

En la 9ª edición del "*BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology*" , se describe la División IV *TENERICUTES* (RAZIN y FREUNDT, 1983). En esta división se encuadra la Clase I *MOLLICUTES* (EDWARD y FREUNDT, 1967), con el Orden I *MYCOPLASMATALES* (FREUNDT, 1955) que incluye las Familias *MYCOPLASMATACEAE* (con los Géneros *MYCOPLASMA* y *UREAPLASMA*) y *SPIROPLASMATACEAE* (con el Género *SPIROPLASMA*). Además se describe el Orden II *ACHOLEPLASMATALES*, con la Familia *ACHOLEPLASMATACEAE* y el Género *ACHOLEPLASMA*.

Según la última propuesta realizada por TULLY y cols. en 1993 y aceptada por el subcomité de taxonomía de la Clase Mollicutes, la clasificación de estos microorganismos queda establecida de la siguiente manera:

División IV *TENERICUTES*

Clase I *MOLLICUTES*

Orden I *MYCOPLASMATALES*

Familia *MYCOPLASMATACEAE*

Género *MYCOPLASMA*

Género *UREAPLASMA*

Orden II *ENTOMOPLASMATALES*

Familia I *ENTOMOPLASMATACEAE*

Género *ENTOMOPLASMA*

Género *MESOPLASMA*

Familia II *SPIROPLASMATACEAE*

Género *SPIROPLASMA*

Orden III *ACHOLEPLASMATALES*

Familia I *ACHOLEPLASMATACEAE*

Género *ACHOLEPLASMA*

Orden IV ANAEROPLASMATALES

Familia ANAEROPLASMATACEAE

Género ANAEROPLASMA

Género ASTEROLEPLASMA

2.2.2.- Morfología y caracteres tintoriales.

Los miembros de la Clase *Mollicutes* son procariotas de pequeño tamaño, microscópicamente visibles y desprovistos de pared celular, siendo incapaces de sintetizar péptidoglucano (TOPLEY y cols., 1990), por lo que son microorganismos muy pleomórficos con formas esféricas, cocoideas, filamentosas o filamentosas-helicoidales. Pueden atravesar filtros entre 220 y 450 nm, aunque las formas visibles más pequeñas tienen aproximadamente 300 nm. No poseen flagelos ni microvellosidades pero algunos de ellos son móviles. Son Gram negativos y se tiñen mal con otros colorantes.

2.2.3.- Necesidades y caracteres de cultivo.

2.2.3.1.- Condiciones generales.

Estos microorganismos son capaces de multiplicarse en medios artificiales de cierta complejidad, necesitando cultivos enriquecidos con colesterol (lo que se consigue mediante la adición de sueros de diferentes especies animales), y precursores de ácidos nucleicos. La mayoría son anaerobios facultativos, aunque algunos son anaerobios estrictos. Cuando se cultivan en medio líquido, crecen produciendo un ligero enturbiamiento imperceptible, siendo en los medios sólidos, donde se aprecian características culturales evidentes. Así, las colonias que aparecen en los mismos, son pequeñas, de 0,1 a 1 mm de diámetro, tendiendo a crecer y penetrar bajo el medio, con la característica apariencia de "huevo frito",

en la mayoría de las especies, cuando se cultivan en condiciones normales (CONTRERAS y cols., 1993 y MARCO y cols., 1993).

2.2.3.2.- Medios de cultivo.

La formulación de los diferentes medios de cultivo, varía según el investigador, particularmente con respecto al tipo de suero empleado como suplemento (oveja, caballo y fetal de ternero son los más populares), caldo base (ej: Bacto PPLO (Difco), Mycoplasma Broth Base (Pfizer y BBL), Infusión corazón, Infusión cerebro-corazón), agar (agarosa, Agar Noble, agar Purificado, Ion agar) e inhibidores bacterianos y fúngicos. Comúnmente se utiliza el acetato de Talio como inhibidor bacteriano (1/2000-1/10000) y nistatina (500 unidades/ml), cualquiera de los dos es empleado junto con penicilina (250-1000 unidades/ml) o ampicilina (0.1-1 mg/ml), los cuales pueden ser suplementados con colimicina (100 ug/ml) o polimixina B (500 UI/ml). Como alternativa puede utilizarse una combinación de meticilina y bacitracina (0.15 mg/ml de cada uno). En algunos de los medios también se añade extracto fresco de levadura.

El suero es generalmente inactivado antes de su uso, mediante calentamiento a 56°C durante 30 minutos para eliminar componentes inhibitorios no específicos.

El pH suele ajustarse normalmente entre 7.6-7.8 con NaOH 1 M.

Ejemplos de estos medios son: El medio VFG (MACOWAN, 1976 a) que lleva además de los componentes típicos: glucosa, glicerol, suero de cabra y rojo fenol como indicador; WJB y WJA que incluye en su fórmula: bacto-triptona, bacto-pectona, DNA de timo de ternero, NADH, rojo fenol y Medio 199 sin NaHCO₃ con glutamina; Medio AC (IEMVT, 1985) al que se agrega: NAD, Lactoalbúmina hidrolisada y solución balanceada de sales; Medio TPM (IEMVT, 1985) que incorpora: glucosa, Na₂PO₄, ClNa y vitaminas de Eagles; Medio de Friis modificado (FREUNDT, 1983) que incluye solución balanceada de Hanks,

lactoalbúmina hidrolisada, rojo fenol y glucosa; Medio OB/OA modificado (FOGGIE y cols., 1976) que incluye: Medio 199 sin NaHCO₃ y rojo fenol; Medio de Hayflick modificado (STALHEIM, 1976) que incluye: DNA de timo de ternero y 2,3,5-Trifenil-tetrazolium.

También hay caldos de cultivo para favorecer e identificar micoplasmas que hidrolizan la arginina a los que se agrega una solución de L-arginina hidrociorídrica, como al medio modificado de Friis, los medios OB y WJB y el medio de Hayflick modificado (LEFEVRE, 1987).

El medio carne-hígado utilizado por MACOWAN y MINETTE (1976) para cultivar los microorganismos del biotipo F38, denominado "viande foi goat" (VFG), es una adaptación del medio carne-hígado descrito por AL-AUBAIDI y FABRICANT, 1968 e incluye, entre otros elementos, un medio líquido a base de tejido caprino y de suero de cabra. Este medio plantea algunos inconvenientes a los laboratorios de diagnóstico que disponen de recursos limitados, tanto por las necesidades de adicionar carne-hígado de cabra, como por la obtención de suero de cabra exento de anticuerpos específicos frente a los micoplasmas (JONES, 1989).

2.2.3.3.- Factores que inciden en el crecimiento.

Por su condición de anaerobios facultativos, se pueden incubar aeróbicamente, sin embargo, el empleo de una atmósfera enriquecida en CO₂ (5-10 %) facilita su aislamiento. Además, tienen necesidad de un ambiente húmedo, para evitar la deshidratación de las placas. La temperatura óptima para su crecimiento se sitúa entre 36 y 37°C.

2.2.4.- Resistencia a los agentes físico-químicos.

Resisten a la penicilina y a la lisozima, y en general, a todos los antibióticos cuyo mecanismo de acción actúe inhibiendo la síntesis de la pared celular. Por otra parte, son sensibles a la lisis por choque osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos fijadores del complemento (TOPLEY y cols., 1990, PICALET, 1991).

2.2.5.- Métodos de identificación.

2.2.5.1.- Bioquímicos y enzimáticos.

Debido a la simplicidad metabólica de estas bacterias, es relativamente pequeño el número de técnicas disponibles, para detectar sus actividades enzimáticas específicas, y sus requerimientos nutritivos. No por ello, dejan de ser un pilar importante para su diferenciación básica, a nivel de Familia y de Género, y en muchos casos imprescindibles en la tipificación de especie y subespecie.

Podemos decir que los requerimientos en esteroides, la hidrólisis de la urea (que define a los miembros del género *Ureaplasma*), la capacidad de fermentación de azúcares y la hidrólisis de la arginina, en aquellas especies que utilizan la vía arginina-dihidrolasa son los métodos usuales para la identificación (TULLY, 1993).

Existen también otras pruebas de un valor limitado, pero recomendadas igualmente por el Subcomité de Taxonomía de la Clase *MOLLICUTES* (1979), entre las que sobresalen las siguientes: la actividad fosfatasa, reducción del tetrazolium, estudio de la actividad proteolítica (coagulación de la caseína, de la gelatina, licuación del suero sanguíneo coagulado), y las acciones lipolíticas, traducidas por la liberación de ácidos grasos y la acumulación de sus sales en películas y cristales. Todas ellas, complementadas con las citadas anteriormente, ayudan en gran

manera, a la identificación final de las especies y subespecies.

2.2.5.1.1.- Requerimiento de esteroides.

La necesidad de esteroides puede determinarse mediante un procedimiento simple, como puede ser el comprobar que la especie aislada crezca en un medio exento de suero. Este sistema puede ser bastante interesante, si se descarta la posibilidad de la existencia de micoplasmas con necesidades mínimas de colesterol, ya que en los inóculos, procedentes del medio líquido, existe siempre la presencia del mismo, (TULLY, 1983). No obstante, como pruebas serias, empleadas corrientemente para evaluar estas necesidades, deben mencionarse los métodos indirectos, en los que se miden la inhibición de crecimiento por la acción de la digitonina, y un procedimiento directo cuantitativo, basado en las respuestas de crecimiento a los esteroides.

En cuanto a los primeros, destaca la propuesta por FREUNT y cols., en 1973, que consiste esencialmente en depositar en la superficie de placas de medio sólido, una pequeña cantidad de un cultivo líquido del organismo a investigar y, a continuación, poner unos discos de papel de filtro impregnados con una solución alcohólica de digitonina al 1,5 %. Después de la incubación, se observa la sensibilidad a esta sustancia por la aparición de zonas donde no hay crecimiento situadas alrededor del disco. De esta manera, podemos comprobar que los *Mycoplasmas* que necesitan esteroides, los incorporan más intensamente en sus membranas que los *Acholeplasmas*, que no los requieren, siendo por este hecho, mucho más sensibles a la lisis en presencia de digitonina, ya que al formarse complejos específicos con el colesterol incorporado a sus estructuras, se produce la desorganización de sus membranas, (ROTTEN y RAZIN, 1972).

En todos los casos, se considera esta prueba como positiva cuando las cepas examinadas presentan halos de inhibición de 5 a 15 mm. La mayoría de los

Acholeplasmas, dan resultados negativos a esta prueba, creciendo alrededor del disco, aunque algunas cepas pueden mostrar halos de inhibición de 1 a 3 mm, sobre todo, cuando se cultivan en medios exentos de suero o suplementados con 1% de fracción sérica bovina, donde pueden alcanzar los 2 a 7 mm. Estos inconvenientes, se resuelven realizando la prueba en un medio sólido enriquecido con un 20% de suero de caballo (TULLY, 1983).

El método directo, de tipo cuantitativo, introducido por RAZIN y TULLY en 1970, cit. por TULLY (1983), consiste básicamente en disponer de ocho frascos con 100 ml. de medio de cultivo líquido cada uno. Tres de ellos están exentos de suero, mientras que cuatro contienen cantidades sucesivamente superiores de colesterol, siendo el último frasco el único que contiene suero y sirve como control. Cuando se inocula el microorganismo problema y se hace evidente el crecimiento, se procede a su centrifugación, cuantificándose finalmente, las proteínas de los sedimentos celulares, (TULLY, 1983).

2.2.5.1.2.- Hidrólisis de la urea.

Consiste en la observación de la alcalinización de un medio de cultivo suplementado con urea al 1%. Esta técnica, que además es bastante sencilla, tiene el inconveniente de que *Mycoplasma spp* que hidrolizan la arginina, y que no poseen actividad ureásica, pueden provocar la alcalinización al metabolizar dicho aminoácido presente, en pequeñas cantidades, en los medios convencionales. Es por esta razón, por lo que es recomendable usar métodos más específicos para detectar dicha actividad, (RAZIN, 1983).

Así, SHEPARD y HOWARD (1970), desarrollaron una técnica que detecta la actividad ureásica en colonias, basada en la formación de dióxido de manganeso a partir de cloruro de manganeso, en presencia del amoníaco liberado durante la hidrólisis de la urea. Este compuesto, insoluble en agua, precipita en, o alrededor

de las colonias, produciendo una coloración marrón. Más recientemente, el **Subcomité de Taxonomía de la Clase Mollicutes (1979)**, recomienda la utilización de cultivos líquidos, mediante el seguimiento de la desaparición en los mismos, de la urea marcada con carbono 14, **(MASOVER Y COLS., 1972)**.

2.2.5.1.3.- Fermentación de azúcares.

En base a su metabolismo hidrocarbonado, los *Mollicutes* se pueden dividir en fermentativos y no fermentativos, de acuerdo a su habilidad para metabolizar azúcares, y más específicamente la glucosa. Es por ello que, la comprobación del metabolismo de la misma es una prueba obligatoria en la caracterización de estos microorganismos **(RAZIN Y CIRILLO, 1983)**.

Estos métodos consisten, bien en la demostración del descenso del pH en el medio, o más directamente midiendo la glucosa utilizada, detectando la producción de productos derivados del metabolismo, con la reacción de la glucosa-oxidasa o comprobando la presencia de hexoquinasa, como enzima básico de la glicolisis.

La determinación del metabolismo de la glucosa, basado en el descenso del pH del medio, fue puesta a punto por **ALUOTTO y cols., en 1970**. Consiste en adicionar al cultivo líquido, glucosa al 1% y un indicador que suele ser rojo fenol al 0.005%, ajustándose el pH a 7.6. De esta manera, un descenso en el pH de 0.5 unidades, comparado con un tubo testigo, constituye una reacción positiva. Sin embargo, debemos de indicar que la adición a estos medios de suero de caballo y extracto de levadura (que es lo usual) puede dar lugar, sobre todo cuando el microorganismo en estudio tiene un crecimiento lento, a descensos del pH no debidos a la fermentación, y esto lleva a la lectura de falsos positivos. Esto puede subsanarse utilizando medios sin extracto de levadura, con 1% de fracción sérica bovina, en sustitución de suero de caballo **(RAZIN y CIRILLO, 1983)**. También es aconsejable preparar el medio base con arginina descarboxilasa, para eliminar

pequeñas trazas de este aminoácido que puedan interferir en la interpretación de esta prueba (FREUNDT y cols., 1979).

Otra forma posible para detectar la fermentación de la glucosa, es mediante la determinación de metabolitos ácidos, que se van produciendo en el curso de la reacción, entre los que podemos citar: ácido láctico, pirúvico y acético (TOURTELLOTE y JACOBS, 1960), cuya presencia puede demostrarse modernamente utilizando glucosa radioactiva para, posteriormente, identificar los citados ácidos marcados mediante una columna de intercambio iónico tratada con cloruro de litio (CIRILLO Y RAZIN, 1973). En caso negativo toda la radioactividad se encontrará en la fracción de glucosa no utilizada.

EDWARD y MOORE en 1973, desarrollaron el método de determinación de la desaparición de la glucosa por la reacción de la glucosa-oxidasa. Esta técnica, se basa en la oxidación de este azúcar por el enzima glucosa-oxidasa, lo que trae consigo la formación de ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno, el cual por medio de la peroxidasa libera radicales reactivos (O_2 , O_2 , OH .) que reaccionan con un compuesto cromógeno (la ortofenilendiamina), generando uno coloreado, fácilmente detectable por espectrofotometría (HUGGET y NIXON, 1957). Se comienza por realizar esta determinación en un medio de cultivo glucosado y sin inocular para, posteriormente ensayarla en el mismo tipo de substrato inoculado con el microorganismo problema, teniendo en cuenta que es necesaria una gran suspensión celular de al menos 10^9 UFC/ml (Unidades formadoras de colonias). Después de incubar a $37^\circ C$ durante 48 horas, se somete también a lectura espectrofotométrica, considerándose la prueba como positiva, si existe una diferencia apreciable entre los niveles de glucosa (diferencia de absorbancia) en ambas pruebas.

CIRILLO y RAZIN en 1973, introdujeron la técnica de la determinación de la actividad hexoquinasa, basada en que los organismos fermentativos al poseer este enzima fosforilan la glucosa. Se parte de una suspensión celular de concentración

conocida, que después de desintegrarla por criolización, se le adiciona glucosa marcada con carbono 14. Una vez incubada y centrifugada, se transfiere el sobrenadante a una columna de intercambio iónico, que absorberá la glucosa fosforilada. Finalmente se desprende de la columna con cloruro de litio y se cuantifica mediante contador de centelleo.

2.2.5.1.4.- Hidrólisis de la arginina.

Las especies del Género *Mycoplasma* que no fermentan la glucosa, y algunas fermentativas, hidrolizan la arginina mediante la acción de tres enzimas: la arginina-deiminasa, la ornitina-transcarbamilasa y la carbamato-quinasa (BARILE, 1983).

Como método sencillo y práctico para comprobar esta acción hidrolítica, se puede realizar el proceder de SCHIMKE y cols., 1966, basado en la detección del amoníaco, al alcalinizarse el medio de cultivo. Debemos hacer notar que esta prueba, tiene en ocasiones, la dificultad de que algunos tubos inoculados pueden mostrar un incremento de pH debido a efectos inespecíficos (BARILE, 1983), que se minimizan usando concentraciones muy bajas de suero de caballo, o reemplazando el mismo por la fracción sérica bovina, ya que de esta forma, evitamos el efecto tampón excesivo que generan grandes cantidades de suero.

Sin embargo, como procedimiento preferido y recomendado para investigar la hidrólisis de la arginina, destaca la determinación de la actividad arginina-deiminasa, basada en la formación de citrulina, empleando un medio de cultivo líquido, con pH 6.5, suplementado con arginina. La formación de la misma, origina un color amarillo-naranja que se mide por espectrofotometría, a una absorbancia máxima de 490 nm, siguiendo la metódica de ARCHIBALD, 1944, modificada posteriormente por RATNER en 1955, cit. por POVEDA en 1988.

El sistema enzimático comentado, descubierto en los estreptococos por HILLS, 1940, y estudiado también en algunas otras bacterias (COHEN y BROWN, 1960), se introduce prácticamente en la caracterización de los *Mollicutes* con las investigaciones de SMITH, 1955 en micoplasmas uretrales del hombre. Posteriormente, destacan los estudios de SCHIMKE y BARILE, 1963; BARILE y SCHIMKE, 1963; BARILE y cols., 1966, que llegan a categorizar las especies del Género *Mycoplasma* como arginina positivos y negativos, clasificación esta que en la actualidad tiene una importante vigencia (BARILE, 1983).

2.2.5.1.5.- Actividad fosfatasa.

La actividad fosfatasa se demuestra por procedimientos relativamente simples, en aproximadamente una tercera parte de las especies establecidas del Género *Mycoplasma*. Esta actividad, conjuntamente a las otras pruebas bioquímicas, son utilizadas en la investigación preliminar de estos microorganismos, con el gran valor práctico, que supone reducir el número de pruebas serológicas necesarias para establecer su identidad. Por el contrario, esta prueba no tiene valor práctico en la investigación de *Acholeplasma spp.*, exceptuando a *A. laidlawii* que posee esta propiedad de manera muy limitada (WILLIAMS y WITTER, 1971). En *Ureaplasma spp.* carece totalmente de importancia, puesto que todas las cepas examinadas son positivas a esta prueba (BLACK, 1973).

Su investigación, según la metódica de ALUOTTO y cols., 1970, está basada en que el difosfato de fenolftaleína, agregado al medio de cultivo sólido, al reaccionar con la fosfatasa producida por el microorganismo cultivado, es hidrolizado, y esto hace que se libere fenolftaleína que va a ser detectada fácilmente, por la aparición de un color rojo violeta en presencia de álcalis después de 7 días de incubación (FREUNDT y cols., 1979). Es aconsejable al realizar esta técnica, con el fin de evitar falsos positivos y/o dudosos, calentar durante una hora

a 60°C el suero de caballo y el extracto de levadura, para inactivar la posible actividad fosfatasa de estos sustratos, (BRADBURY, 1983).

2.2.5.1.6.- Reducción del tetrazolium.

La habilidad de reducir al 2,3,5,-trifenil-tetrazolium, dando una coloración rojiza al medio, es una característica de numerosas especies del Género *Mycoplasma*, y de un gran valor en la identificación presuntiva de *M. pneumoniae* en los procesos clínicos humanos, ayudando también en la identificación al elegir los antisueros que deben ser utilizados en la tipificación serológica de los mismos.

Esta actividad reductora puede investigarse siguiendo la técnica de ERNO y STIPKOVITS, 1973, agregando al medio líquido el 2,3,5-trifenil-tetrazolium a una concentración del 0.2%. Después de inocular dos tubos con el organismo objeto de estudio e incubar en aerobiosis y en anaerobiosis durante dos semanas como máximo, se considera la reacción como positiva, cuando aparece en ambos casos, o en uno solo un precipitado rojizo. Desde luego, puede mostrarnos variabilidad en los resultados obtenidos, ya que suele presentarse a la hora de interpretarla diferencias significativas debidas a la mayor o menor densidad de crecimiento (SENERFIT, 1983).

Con gran ventaja sobre la metódica anterior, es posible desarrollar la técnica en medios sólidos, según demostraron WOOD y SMITH en 1972, ya que es más rápido y, además, no va a intervenir la densidad de crecimiento, ni la cantidad de inóculo, apareciendo el color característico, que va a virar de un rosa inicial hasta un rojo púrpura después de tres a cuatro horas de incubación.

2.2.5.1.7.-Producción de películas y cristales.

Durante el crecimiento de algunos micoplasmas en medio sólido, se desarrolla una película característica en la superficie del mismo, así como cristales alrededor de la colonia. Estas reacciones van a ser detectables durante un estado tardío de crecimiento. La película que aparece va a estar formada por colesterol y fosfolípidos y los cristales se atribuyen al depósito de sales de calcio y magnesio procedentes de los ácidos grasos que son liberados por la actividad lipolítica de estos microorganismos, dependiendo la intensidad de ambas reacciones del organismo en cuestión y de la composición del medio de cultivo (FREUNDT, 1983).

Este fenómeno fue descrito por primera vez por EDWARD en 1950, empleando un medio que contenía un 20% de suero de caballo, observación que corroborarían más tarde FABRICANT y FREUNDT en 1967, que obtuvieron también un gran número de reacciones positivas en medios enriquecidos con suero de cerdo y emulsión de yema de huevo al 10%.

Tenemos también la posibilidad de detectar esta actividad, si trabajamos con medios que contengan suero de caballo y emulsión de yema de huevo, apareciendo unas zonas de clarificación adyacentes al área de crecimiento de las colonias. Este fenómeno es muchas veces transitorio y puede o no estar asociado con la producción de películas y cristales (FREUNDT, 1983). Hemos de señalar que este fenómeno carece de valor diagnóstico significativo, pero es interesante conocer que algunos micoplasmas no producen las citadas reacciones bajo las condiciones de prueba.

2.2.5.2.- SEROLÓGICOS.

Por los comentarios anteriores, podemos deducir que las características bioquímicas de los organismos de la Clase *Mollicutes* son bastante discretas, y en

consecuencia esas pruebas van a tener un valor muy limitado para poderlos aplicar en su identificación y clasificación.

Es por ello que la identificación serológica ha empezado a cobrar importancia y ser predominante, hasta el punto de que muchos progresos logrados recientemente en micoplasmología se deben al desarrollo de una interesante variedad de estas técnicas (TULLY, 1983).

Los antígenos de los micoplasmas- de naturaleza proteica, lipídica o polisacárida- se localizan en la membrana celular (los más importantes), y en el citoplasma, teniendo en cuenta que la diferenciación entre ambos puede ofrecer dificultades debido a que los segundos suelen estar contaminados con componentes de la membrana (TULLY, 1983).

En principio, la caracterización de los mismos se realizaba mediante las pruebas de aglutinación, fijación del complemento e inmunodifusión en medios gelificados, pero sus problemas de mantenimiento y estabilidad (sobre todo en las suspensiones) y por otra parte los fenómenos de comunidad antigénica, obligaron a detectarlos mediante técnicas más modernas. No obstante, las dos últimas reacciones citadas anteriormente, pueden tener un gran valor para determinar la frecuencia de antígenos de grupo con la finalidad de establecer criterios taxonómicos, y al mismo tiempo, como ocurre con la fijación del complemento, un sumo interés en el diagnóstico de algunas micoplasmosis, como las infecciones por *M. pneumoniae* en el hombre, o la perineumonía bovina por *M. mycoides subsp. mycoides* y caprina por *M. mycoides subsp. capri* (TULLY, 1983).

Actualmente las pruebas serológicas más interesantes y específicas, orientadas a la determinación de antígenos de membrana en estos microorganismos son la de inhibición del crecimiento, inhibición del metabolismo y los métodos de inmunofluorescencia, tanto directos como indirectos, que naturalmente pueden variar en sensibilidad, especificidad y en su facilidad de montaje. Todas ellas,

proporcionan unos procedimientos rápidamente realizables en la identificación de los micoplasmas bajo una variedad de condiciones, (TULLY, 1983).

2.2.5.2.1.- Inhibición del crecimiento.

NICOL y EDWARD, en 1953 y EDWARD y FITZGERALD, en 1954 fueron los primeros autores en observar que el crecimiento de los micoplasmas se inhibía por la actuación de antisueros. También, en 1956, HUIJMANS-EVERS y RUYS, 1956 publicaron un método para inhibir el crecimiento de micoplasmas genitales en medio sólido, con el empleo de discos de papel de filtro impregnados con el suero anti específico. Estas técnicas fueron posteriormente perfeccionadas por CLYDE, 1964.

Todas estas investigaciones demostraron que la inhibición era específica, simple y económica, y que podía ser muy útil como método básico para la identificación serológica a nivel de especie.

El método está fundamentado en la preparación de antisueros específicos mediante la inoculación al conejo de suspensiones de micoplasmas conocidos, para luego enfrentarlos en un medio inoculado con los aislamientos problema. Después del periodo habitual de incubación, la ausencia de crecimiento, en presencia de alguno de los antisueros identificaba al microorganismo en cuestión.

Generalmente la inhibición se realiza sobre medio sólido, observándose microscópicamente las características de las colonias (grados de inhibición). Pueden también utilizarse medios líquidos, pero ofrecen la obligatoriedad de realizar subcultivos en medio sólido para poder demostrar la inhibición (CLYDE, 1983).

Existen algunas influencias que hacen variar los resultados de esta técnica. Sin embargo, para tener mayor seguridad deben utilizarse antisueros con títulos

altos, siendo esencial que sean monoespecíficos. Por otra parte, hay que tener algunas consideraciones con respecto al animal donante del antisuero. Así en la identificación de micoplasmas que infectan al hombre, el antisuero debe ser preparado en un número variable de animales, que se evaluarán antes de la inmunización para demostrar la ausencia de anticuerpos frente a estos microorganismos (CLYDE, 1983).

En todos los casos, y siguiendo las orientaciones del Grupo de trabajo de la FAO/OMS programa sobre Micoplasmatología Comparada (1976), cit. por POVEDA, 1988, el suero debe ser probado por este método con la cepa tipo, cuantificándose su halo de inhibición, ya que el tamaño de la zona inhibida, es directamente proporcional al título en anticuerpos, y por consecuencia, un suero con un título en anticuerpos bajo, puede dar lugar a interpretaciones negativas. Los posibles efectos inhibitorios del antisuero, totalmente estables, se deben a las Ig G, y en menor proporción a las Ig M e Ig A, no requiriendo la reacción la activación del complemento, (CLYDE, 1983).

A la hora de la lectura e interpretación de estos fenómenos, debe tenerse en cuenta que los efectos de inhibición, no consisten siempre en una zona perfectamente definida alrededor del disco, puesto que las variaciones de las cepas, el título del inóculo y la calidad del antisuero pueden dar lugar a resultados difíciles de evaluar. En efecto, en algunas ocasiones, aunque se detecta una zona real de inhibición de crecimiento, pueden observarse cierto número de colonias cercanas al disco, requiriéndose en estos casos, un juicio acertado para decidir si el resultado es definitivo o el procedimiento debe ser repetido. Desde luego, una zona de clarificación debe considerarse positiva cuando se trabaja con sueros monoespecíficos, considerándose como negativas aquellas zonas de inhibición iguales o inferiores a 1.5 mm (CLYDE, 1983).

2.2.5.2.2.- Inhibición del metabolismo.

La inhibición del metabolismo es esencialmente una técnica de inhibición de crecimiento realizada en medio líquido, (PURCELL y cols, 1966; SENTERFIT y JENSEN, 1966; TAYLOR-ROBINSON y cols., 1966; GRUPO DE TRABAJO DE LA WHO/FAO PROGRAMA SOBRE MICOPLASMOLOGIA COMPARADA, 1975).

Esta prueba es útil para estudios diagnósticos y epidemiológicos, así como para la clasificación y caracterización de micoplasmas.

Consiste, en que estos microorganismos se multiplican en un medio líquido que contiene un sustrato metabólico específico que, dependiendo de la especie en estudio puede estar representado por el 2,3,5,-trifenil-tetrazolium al 0.05%, glucosa al 0.1%, l-arginina hidroclicídrica al 0.5% y urea al 0.1%, (TAYLOR-ROBINSON, 1983). Al variar los subproductos metabólicos el pH del medio, evidenciable por un cambio de color mediante la adición de un adecuado indicador (rojo fenol al 0.002%) se demuestra el crecimiento del organismo, que deberá inhibirse con la adición de antisuero específico, detectable al no alterarse el pH del mismo.

Es esencial tener en cuenta en este tipo de pruebas, las especiales características metabólicas de algunas especies de micoplasmas, que influyen en las interpretaciones de los resultados finales. Por ejemplo: a) organismos que utilizando la glucosa como sustrato de prueba, pueden metabolizar pequeños restos de arginina necesariamente presentes en los medios convencionales (en este supuesto es conveniente cambiar de sustrato). b) algunos micoplasmas requieren la incorporación de suplementos especiales para que tenga lugar su multiplicación, como ocurre con *M. synoviae* que necesita la presencia de cisteína y NAD. c) especies como *M. bovis genitalium*, que no metabolizan la glucosa ni tampoco la arginina, requiriendo un sustrato base de 2,3,5,-trifenil-tetrazolium (ERNO, 1972),

al que se le puede agregar tioglicolato al 0,1% para mejorar sus condiciones de anaerobiosis, (TAYLOR-ROBINSON, 1983).

2.2.5.2.3.- Inmunofluorescencia.

Los procedimientos de inmunofluorescencia en la identificación de micoplasmas, fueron introducidos por DELGIUDICE y cols., en 1967, siendo una de sus principales aplicaciones la tipificación serológica de estos microorganismos obtenidos directamente en un primer aislamiento, con la ventaja que supone la detección y diferenciación de colonias en una muestra donde pueden estar presentes especies diferentes.

De ello se deduce, que estos métodos tienen la siguientes ventajas: a) excluyen la necesidad de utilizar cultivos puros, un requerimiento básico, como ya hemos comentado, mediante la técnica de inhibición de crecimiento, b) la relativa facilidad con que un número de micoplasmas puede ser identificado secuencialmente en la muestra a investigar, c) la seguridad de detectar microorganismos que están presentes minoritariamente en la misma y d) aseguran la pureza de los cultivos en procesamiento mediante clonajes sucesivos (GARDELLA y cols., 1983).

Estas técnicas, directas o indirectas, se basan en el marcaje de las inmunoglobulinas específicas presentes en los antisueros con un fluorocromo del tipo de isotiocianato de fluoresceína. La metódica de marcaje o de conjugación suele ser complicada puesto que exige no solo el fraccionamiento proteico mediante sales neutras (HERBERT y cols., 1972, cit. por POVEDA, 1988) u otros sistemas para la extracción de los anticuerpos del suero, sino también una posterior diálisis y la conjugación propiamente dicha con el fluorocromo en cuestión.

En los procedimientos directos, se adiciona sobre bloques de agar que

contienen las colonias en estudio, una pequeña cantidad del inmunosuero marcado. Posteriormente se incuban durante unos 30 minutos, en atmósfera húmeda, a la temperatura ambiente y se realizan varios lavados de 10 minutos de duración cada uno con tampón PBS, pH 7,2. Se depositan en portaobjetos que han de ser observados con el microscopio de epifluorescencia, utilizando un objetivo débil para la localización de colonias, y posteriormente se estudian éstas bajo inmersión con objetivo apocromático de 40X (FREUNDT y cols., 1979).

En los indirectos, la metodología suele ser muy semejante a la anterior pero disponiendo de un tercer elemento representado por un suero antiglobulinas de especie conjugado con el fluorocromo. Se considera este sistema más sensible y específico que los métodos directos, (ROSENDAL y BLACK, 1972).

2.2.6.- Estructura antigénica.

2.2.6.1.- Antígenos.

Los micoplasmas tienen una gran riqueza en antígenos de diferente naturaleza, tanto de superficie (que se hallan localizados en la membrana celular y van a ser los más importantes de cara a la respuesta inmune del hospedador) como internos (citoplasmáticos) (KENNY, 1979 y SMITH, 1971). Esta característica permite la identificación *in vitro* de los aislados, ya de forma inmediata mediante técnicas de epifluorescencia o mediante inhibición específica del crecimiento (incubando en presencia de un antisuero).

Sin embargo, esta riqueza antigénica no se corresponde con una elevada inmunogenicidad ya que de forma general se asume una escasa capacidad inmunógena de todas las especies de micoplasmas.

2.2.7.- Ultraestructura.

Los micoplasmas son los microorganismos más pequeños capaces de replicarse en medios de cultivo exentos de células, y poseen sólo aquellos orgánulos y rutas metabólicas indispensables para su crecimiento y replicación. Así su estructura se reduce a:

- * membrana plasmática
- * molécula bicatenaria circular de DNA (nucleoide) (5×10^8 - 1×10^9 daltons.
- * ribosomas.

La membrana plasmática presenta un perfil trilaminar y está compuesta por 2/3 de proteínas y 1/3 de lípidos. En su mayoría encontraremos fosfolípidos y glucolípidos, que junto a las proteínas constituyen los determinantes antigénicos más importantes. Al no tener pared, es necesario para ellos vivir en un entorno de elevada presión osmótica para permitir la isotonía del micoplasma con respecto al medio interior (KENNY, 1979 y RAZIN, 1979).

El ADN tiene un contenido de las bases guanina y citosina muy pequeña (23-30 moles%), por lo que la información genética está muy reducida y en consecuencia también lo está su capacidad metabólica. De ahí su modo de vida como parásito o saprofito (RAPOPORT y cols., 1993 y STANBRIDGE y cols., 1979).

Los ribosomas tienen en su ARN una mayor cantidad del par de bases guanina y citosina, pero siempre menor que la de cualquier otra bacteria (SWANEPOEL y cols.,1977).

En algunos micoplasmas se ha observado un orgánulo polar en forma de huso o ampolla, construido alrededor de un bastoncillo estriado. Se desconoce su papel, pero podría ser utilizado como un mecanismo de virulencia para el ataque

de la célula huésped, y quizás intervenga en la motilidad de algunas especies (BREDT, 1979 y RAZIN, 1978).

2.3.- LA ENFERMEDAD.

2.3.1.- Clínica.

La Agalaxia contagiosa producida por *M. agalactiae* en la cabra y oveja es el proceso más habitual. En nuestro país supone el 100% de las formas de agalaxia ovina y el 90 % de las caprinas (GARRIDO y cols, 1982 y 1987).

Esta infección puede cursar de forma aguda, subaguda, crónica o inaparente, siendo las formas subaguda y crónica las más frecuentes (GARRIDO y cols, 1982 Y MONTAGNA, 1989) y su importancia radica más en la alta morbilidad (del 30 al 95 %) (BENNETH y cols, 1980, cit. por LEBRET, 1989; LAMBERT, 1987 y MIEGE, 1978) que en la mortalidad (prácticamente nula) (COTTEW, 1985 y MONTAGNA y cols, 1989), aunque ésta va a depender del estadio fisiológico, habiéndose señalado tasas más elevadas, del orden del 15 % en hembras caprinas en lactación (MIEGE, 1978). La aparición de la sintomatología aguda en la hembra adulta frecuentemente coincide con el inicio de la lactación (GARRIDO Y COLS., 1982; PERREAU, 1979; REGALLA, 1987 Y ZAVAGLI, 1951).

La aparición de una sintomatología general, que a menudo pasa inadvertida, precede varios días a la localización de los síntomas y es consecuencia de la septicemia (micoplasmemia). El animal sufre una debilidad generalizada y se instaura una hipertermia más o menos marcada y de breve duración (LAMBERT, 1987; WATSON y cols., 1968, cit. por LEBRET, 1989 y ZAVAGLI, 1951), pero que volverá a aparecer coincidiendo con la fase de localización mamaria, por lo que se puede hablar de una "hipertermia bifásica" (LEBRET, 1989). Posteriormente

aparece un brusco descenso de la producción láctea (suele ser el primer síntoma detectado por el ganadero), dramático en los casos agudos. En todos los casos se detectan leucocitos y micoplasmas en la secreción láctea (DAMASA y cols., 1992; LAMBERT, 1987 y LEBRET, 1989). Esta secreción a veces tiene un aspecto normal, y en función del aumento de leucocitos va a ir adquiriendo un aspecto más o menos amarillento. A menudo se torna serosa, o viscosa y purulenta con trombos lácteos que pueden obstruir el conducto del pezón (ATALAIA y cols., 1986; GONÇALVES, 1984; LAMBERT, 1987; LEBRET, 1989 y PERREAU, 1979). Durante un mismo brote, el aspecto de la secreción láctea puede variar individualmente (RAPAPORT Y cols., 1993). La ubre se transforma, bajo los efectos de una inflamación caliente y dolorosa, en la mayoría de las ocasiones de carácter bilateral, con una patente tumefacción del ganglio retromamario. Esta situación evoluciona a una atrofia del tejido glandular con la consiguiente agalaxia. A la palpación, puede detectarse en esta última fase la presencia de nódulos duros (ATALAIA y cols., 1986; LAMBERT, 1987; LEBRET, 1989 y PRASAD y cols., 1985). Estos nódulos también pueden aparecer en el caso de mamitis estafilocócicas, si bien normalmente estas últimas suelen ser unilaterales. Las hembras pueden permanecer durante los años siguientes con las glándulas lesionadas y por lo tanto improductivas (LEBRET, 1989). Suele resultar llamativo, en un primer brote, la rápida difusión de la mamitis entre las hembras en producción, en contraste con la mayoría de las mamitis de origen bacteriano (RAPAPORT y cols., 1993).

En los focos crónicos, los síntomas son difíciles de observar y las mamitis evolucionan a subagudas, siendo a veces la atrofia mamaria el primer signo de la enfermedad (GONÇALVES, 1984), aunque este síntoma no es más que un indicador de una mamitis clínica anterior o subclínica, que más probablemente puede obedecer a infecciones estafilocócicas. En el caso de los micoplasmas la bilateralidad de la atrofia y la afectación de varios animales simultáneamente serían signos más específicos que apuntarían hacia su implicación.

Con posterioridad aparecerán, cuando lo hacen, el resto de síntomas típicos

(articulares y oculares) que constituyen la tríada sintomática de la Agalaxia Contagiosa (ATALAIA y cols., 1986; GONÇAVES, 1984; PERREAU, 1979 y REGALLA, 1987).

La localización articular, puede radicar en una sola articulación (artritis) o en varias simultáneamente (poliartritis). Aunque en el transcurso de la enfermedad se extiende prácticamente a todas las superficies articulares, son las articulaciones de las extremidades las más comunmente afectadas, y entre ellas, la carpiana y la tarsiana, que por otra parte son las más fácilmente explorables.

La manifestación clínica puede variar desde una simple rigidez del miembro (anquilosis), a una cojera patente, que a veces puede incluso impedir al animal mantenerse en la estación. La exploración clínica nos permitirá detectar una tumefacción periarticular, dolorosa. Los síntomas articulares, no son tan frecuentes como los mamarios, pero siempre son observables en el seno del rebaño, y pueden tener una especial importancia en colectivos sometidos a pastoreo, cuyos individuos afectados con una anquilosis terminal, evolucionan hacia un estado de caquexia. Otra veces, y en función de diversos factores (severidad de la artritis, estado general, alimentación, etc.), la sintomatología puede revertir (ATALAIA y cols., 1986; LAMBERT, 1987; LEBRET, 1989; MONTAGNA y cols., 1989 y PERREAU, 1979).

Las lesiones oculares son de menor frecuencia de presentación. Se inicia con conjuntivitis (congestión, lagrimeo y fotofobia), seguida por vascularización de la córnea, focos inflamatorios y queratitis parenquimatosa. Pueden afectarse uno o los dos ojos y la evolución depende del grado de afección. Aunque la mayoría de los afectados se recuperan lentamente (en un mes aproximadamente), los casos más graves evolucionan a panoftalmia y ceguera (CONTRERAS y cols., 1993).

ZAVAGLI ilustró en 1951 seis fases de la evolución de las lesiones oculares: el estadio 1 corresponde a una ligera congestión de la conjuntiva parpebral y de la

córnea; en el 2 y 3 aparece una progresiva infiltración vascular; en el 4 se observa una transformación purulenta, que en el 5 aumenta considerablemente y toma una coloración amarillenta; y finalmente en el último estadio se produce una perforación del globo ocular y salida de los humores. Estas lesiones son particularmente graves en cabritos lactantes (FERNANDEZ y cols., 1989; LAMBERT, 1987; LEBRET, 1989; MONTAGNA y cols., 1989; PERREAU, 1979 y ZAVAGLI, 1951). La ulceración de la córnea, o el vaciado purulento del globo ocular no son debidos solamente a la acción exclusiva del micoplasma, sino a una posterior complicación con gérmenes de salida (PERREAU, 1979).

Además de todo lo escrito, procesos abortivos pueden tener lugar al final de la gestación (DOUTRE, 1981; GARRIDO y cols., 1982; GONÇALVES, 1984 y LAMBERT, 1987), coincidiendo con la micoplasmemia, sin que exista un especial tropismo hacia el feto. Además han sido descritos casos de vulvovaginitis granulosa caprina asociados a la infección por *M. agalactiae* (OJO y cols., 1992 y SIMOS, 1987).

Los corderos o cabritos lactantes, que ingieren leche infectada, manifiestan los cuadros más graves, pudiendo fallecer de forma sobreaguda con una clínica septicémica y meningítica, o permanecer en decúbito hasta la muerte a causa de un grave cuadro de poliartritis, diarreas, bronconeumonías y pleuritis fibrinosas (COTTEW y cols., 1965; ERDAG, 1973; HANKO y cols., 1955; LAMBERT, 1987; PERREAU, 1979; PICALET y cols., 1983; SRIVASTAVA y cols., 1992 y TALAVERA y cols., 1983).

2.3.2.- Lesiones.

2.3.2.1.- Macroscópicas.

Las ubres aparecen tumefactas y de consistencia incrementada. En el

parénquima mamario, las lesiones consisten en una mamitis purulenta aguda y/o subaguda, con un color blanco-grisáceo y frágil, con tendencia a desmenuzarse al manipularlo. También se observa, una dilatación quística de los conductos galactóforos, con una secreción láctea de rápida coagulación y suero lácteo de aspecto turbio (ERDAG, 1973).

Las manifestaciones oculares, nos muestran la córnea blanquecina y ligeramente engrosada. Existe hiperemia difusa que está más marcada en su unión con la esclerótica y con la conjuntiva bulbar (ERDAG, 1973).

Las articulaciones más afectadas son las de los miembros, principalmente las carpianas, con una inflamación articular y periarticular. La membrana sinovial, aparece engrosada, al desarrollarse en ella una sinovitis fibrinopurulenta. Simultáneamente, se observa un aumento de la cantidad de líquido sinovial, con aspecto turbio-sanguinolento por las hemorragias derivadas de las lesiones vasculares en la articulación (ROSENDAL, 1979; BAR-MOSHE, 1981; DAMASSA, 1983b; EAST, 1983; RUHNKE, 1983 y HAZELL, 1985).

En el aparato respiratorio, las lesiones suelen estar localizadas preferentemente en los lóbulos apicales y medios. Estos, presentan áreas de hepatización o consolidación, propias de una bronconeumonía. No en todos los casos afecta a la pleura, por lo que las adherencias a la pared costal y al diafragma son inconstantes. También se describe con frecuencia, un aumento de la cantidad de líquido turbio en la cavidad torácica. Las lesiones debido a la micoplasmemia suelen localizarse en distintos órganos, causando poliserositis y hemorragias petequiales, miocarditis, hepatomegalia, hipertrofia ganglionar, esplenomegalia y focos de necrosis en algunos órganos. (BARBER, 1970; MACOWAN, 1976; BÖLSKE, 1982; SANGUINETTI, 1982; DAMASSA, 1983b y 1992; EAST, 1983 y ROSENDAL, 1983).

2.3.2.2.- Microscópicas.

En el tejido mamario, se distinguen dos tipos o fases de lesiones mamarias, unas agudas y otras subagudas. En la fase aguda, se describe una **mamitis intersticial linfocitaria**, con formación de infiltrados inflamatorios en torno a los acinis y conductos galactóforos, que suelen aparecer obstruidos. No se observa una notoria afección del parénquima . En las formas subagudas, los infiltrados inflamatorios intersticiales son más acusados y se acompañan de fibrosis, determinando una atrofia del parénquima mamario y de los conductos. Existe también en este caso, degeneración de las paredes vasculares y fibrosis circundante (EDGAR, 1973).

Las lesiones observadas en ojos, varían desde una **queratitis parenquimatosa crónica**, con infiltrados linfocitarios en la túnica propia, a una **queratitis ulcerativa**, con infiltrados de polimorfonucleares neutrófilos (EDGAR, 1973).

En articulaciones, se observa lesiones **fibrinopurulentas** en vainas y bolsas sinoviales tendinosas con edema y hemorragias musculares. En articulaciones menos afectadas, se puede apreciar una ligera hiperplasia sinovial con formación de papilas hipertróficas, con fibrosis y presencia de infiltrados linfoplasmocitarios en el tejido conectivo conectivo, inmediatamente subyacente a las mismas (GONZALEZ, 1994).

En los ganglios linfáticos, se observa inflamación catarral de senos marginal, intermedios y central, que aparecen repletos de células linfoides. También es apreciable una hiperplasia de folículos linfoides corticales (EDGAR, 1973).

El bazo aparece con una hiperplasia de folículos linfoides. En el riñón se aprecia una tubulonefrosis, y formación de quistes hialinos en los conductos urinarios. El hígado aparece con una moderada degeneración grasa centrolobulillar (ERDAGT, 1973).

En el pulmón, las lesiones se caracterizan por una neumonía intersticial con peribronquitis, y dilatación de los septos interlobulillares. También han sido descritos casos de neumonía fibrinosa y bronconeumonía catarropurulenta con una marcada congestión septal (DAMASSA, 1983b y ROSENDAL, 1983).

2.4.- DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD.

2.4.1.- Diagnóstico clínico.

Cuando la enfermedad se declara por primera vez en un rebaño, los signos clínicos correspondientes a la tríada clásica: mamitis, artritis y queratitis son fácilmente reconocibles (no tienen que coincidir los síntomas en el mismo animal sino que serán vistos en el grupo). Sin embargo, en aquellos con antecedentes, la sintomatología se va a dar mucho más atenuada, pudiéndose observar únicamente infecciones esporádicas, en especial mamitis e hipoagalaxia. Las infecciones articulares y oculares suelen observarse con una menor frecuencia, por lo que sin una buena anamnesis el diagnóstico puede ser erróneo (GONÇALVES, 1984; REAL y cols., 1994 y MARCO, 1988).

Un síntoma agudo observado aisladamente no es patognomónico. Por regla general, es un diagnóstico que se debe hacer en base a un colectivo y no a un individuo; una hipótesis de micoplasmosis no puede presumirse a partir de síntomas incluidos en un síndrome donde la característica contagiosidad e infectividad son evidente. Ello es relativamente fácil en la agalaxia contagiosa, cuando las tres localizaciones (artritis, queratitis y mamitis) están asociadas, pero la triada puede estar incompleta; este es el caso particularmente, cuando un tratamiento más o menos ortodoxo es instituido precozmente a partir de los primeros casos de mamitis. Las artritis no aparecerán o evolucionarán de forma diferente en el tiempo, y no se verá jamás queratitis (PERREAU, 1984).

2.4.2.- Anatomopatológico.

Como en el caso de la clínica, nada es patognomónico en el diagnóstico anatomopatológico. Tendremos que centrarnos en las lesiones mamarias, el alcance del sistema linfático y de diversas serosas (pleura, pericardio, las sinovias tendinosas y articulares, peritoneo). Se considera como una regla constante, una inflamación de tipo hemorrágica y fibrosa; los micoplasmas no son microorganismos piógenos (PERREAU, 1979).

2.4.3.- Laboratorial.

2.4.3.1.- Microbiológico.

2.4.3.1.1.- Toma de muestras.

En el animal vivo, se pueden emplear tomas de sangre y leche, así como muestras extraídas por escobillonado nasal y auricular (JONES, 1989).

Las muestras por excelencia en la necropsia, son las lesiones pulmonares, en particular aquellas, que se sitúan en la periferia de las zonas de densificación, así como el líquido pleural. Las otras tomas, especialmente los escobillonados bronquiales, los ganglios linfáticos bronquiales y mediastínicos, el epitelio traqueal, el tejido amigdaliano, la sangre y las vísceras, también pueden contener micoplasmas, sobre todo en caso de infección por las subespecies de *M. mycoides* (JONES, 1989).

Si el examen microbiológico no va a poder realizarse inmediatamente, las muestras pueden conservarse a -20 °C durante varios meses, sin que la viabilidad de los micoplasmas se vea comprometida (JONES, 1989).

2.4.3.1.2.- Métodos de aislamiento.

Los escobillonados se inoculan en suspensión en 2-3 ml de medio de cultivo. Es preferible cortar las muestras tisulares con tijeras, y agitar enérgicamente, o pulverizarlas en el medio (para ello se puede usar el Stomacher 80, A.J. Seward, Londres), a razón de 1 g de tejido por 9 ml de medio (JONES, 1989).

En términos generales, se sigue un protocolo consistente en efectuar una inoculación simultánea en medio sólido y líquido para micoplasmas. En muestras procedentes de animales afectados clínicamente, es frecuente obtener un primer aislamiento en un periodo entre 48 y 96 horas. No obstante, se recomienda examinar los cultivos cada 24 horas para detectar cepas de crecimiento rápido. Si en 7-10 días no se aprecia crecimiento alguno, observando las placas al microscopio, las muestras se consideran negativas (MARCO Y COLS., 1994).

Los medios FVG, WJ, AC y TPM son adecuados para el aislamiento y el cultivo de *M. capricolum subsp. capripneumoniae* (F38), del *M. mycoides subsp. mycoides*, *M. capricolum subsp. capricolum*, *M. mycoides subsp. capri*. El medio Friis modificado o el medio OB/OA son adecuados para el *M. ovipneumoniae* y el medio Hayflick modificado (con tetrazolio como indicador) para el *M. agalactiae* (JONES, 1989).

2.4.3.2.- Seroimmunológico.

En el diagnóstico serológico de la Agalaxia Contagiosa se ha empleado tradicionalmente la técnica de Fijación del Complemento propuesta por CECCARELLI y cols., (1950), cit. por MARCO y cols., 1994. Con la finalidad de estudiar los mejores rendimientos de la técnica PERREAU y cols. en 1976 obtuvieron los mejores resultados tras la sonicación de los micoplasmas o mediante la lisis alcalina de los mismos. Además establecieron en 1/40 el límite entre

animales positivos y negativos.

Posteriormente, PERREAU, 1979 y LE GOFF y PERREAU, 1984 analizaron el rendimiento de la Fijación del Complemento, en el diagnóstico de la Agalaxia Contagiosa en la especie caprina, en infecciones por *M. agalactiae*, *M. capricolum subsp. capricolum* y *M. mycoides subsp. mycoides* L.C., obteniendo resultados aceptables, en la afección de rebaños afectados o libres, aunque la técnica resultó ser poco sensible y específica, dando resultados poco fiables en algunos rebaños.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del diagnóstico serológico, se desarrolló el método ELISA. Esta prueba fue aplicada por primera vez en micoplasmología veterinaria para el diagnóstico de la neumonía enzoótica de las ovejas producida por *M. ovipneumoniae* (BRUGGMANN y cols., 1977). Ha sido empleada para muchas más micoplasmosis animales, sobre todo para la infección por *M. pulmonis* de ratones de laboratorio (HOROWITZ y cols., 1978) y Pleuroneumonía Contagiosa Bovina (ONOVIRAN y cols., 1979). La prueba depende de la adherencia de proteínas a superficies de plástico. Ya han sido descritas muchas formas de realizar esta prueba; la mayoría usan ahora placas de microtitulación. El método ELISA es extremadamente sensible y pueden hacerse un alto número de pruebas a la vez en las placas de microtitulación. Sus detractores hablan de la enorme inversión en aparatos que necesita la prueba, que los resultados son obtenidos en uno a tres días, que la prueba no es muy específica y puede llegar a ser caprichosa y de poca confianza (LEFEVRE y cols., 1987).

La sensibilidad de la técnica ELISA es mayor que la de la Fijación del Complemento. En cuanto a la especificidad de la técnica, LEVISOHN Y COLS., (1991) en ganado caprino, sugieren la adopción de ciertos cálculos aritméticos para compensar la existencia de posibles reacciones inespecíficas frente a otros micoplasmas, y emplear los antígenos de las tres especies implicadas en la Agalaxia Contagiosa caprina.

Otra técnica utilizada es la prueba de la Hemaglutinación Indirecta (IHA). Puede llevarse a cabo con eritrocitos frescos o con eritrocitos fijados con glutaraldehído. La sensibilidad con eritrocitos frescos, es muy superior a la de los tratados con glutaraldehído pero, el antígeno es muy inestable. Los eritrocitos tratados con glutaraldehído hacen que la técnica sea más empleada como prueba de diagnóstico, ya que el antígeno puede conservar su actividad hasta un año a 5°C (LEFEVRE y COLS., 1987). CHIMA y COLS. en 1982 utilizaron para la técnica, los eritrocitos tratados y llegaron a la conclusión, de que dicho tratamiento, reducen las reacciones cruzadas ya que estos van a fijar los antígenos proteicos más específicos, mientras que los eritrocitos frescos, detectan anticuerpos contra las fracciones polisacáridas de todos los micoplasmas del grupo *mycoides*.

POUMARAT y cols. 1989 utilizaron esta técnica en un foco experimental de perineumonía contagiosa bovina y comprobaron precozmente las infecciones agudas, pero llegaron a la conclusión de que es insuficiente en fases crónicas y últimas de enfermedad.

La técnica ELISA reveló ser superior en cuanto a sensibilidad y especificidad con respecto al IHA según SORENSEN y cols., 1992 a la hora de evaluar la respuesta inmune en cerdos con infección por *M. hyopneumoniae*.

Recientemente, también se ha estudiado el diagnóstico por detección de ácidos nucleicos. Dentro de estos métodos tenemos la hibridación y la amplificación en cadena por la polimerasa (MARCO y cols., 1994).

La hibridación, se basa en la desnaturalización y posterior renaturalización de la cadena de ácidos nucleicos, introduciendo durante la reacción, sondas que se unen de forma específica a ciertas secuencias. Las sondas son secuencias de bases que pueden estar marcadas radioactivamente (P^{32}) o mediante marcadores no radioactivos como biotina, digoxigenina, sulfonación o compuestos fluorescentes. Para el revelado de la hibridación, se expone la muestra a una película sensible,

(si la sonda fue marcada con radioactividad) o procesada para la visualización colorimétrica de los resultados (para marcadores no radioactivos) (JABLONSKI, 1989 y RODRÍGUEZ y cols., 1993).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es un proceso por el cual, partiendo de una secuencia específica de ADN, es posible obtener múltiples copias, pudiéndose incrementar de 10^5 a 10^6 veces la secuencia inicial, siendo el ADN detectable. Consta de tres etapas, en las que se combinan tiempo y temperatura, que se repetirán cíclicamente 30 a 40 veces, hasta obtener la amplificación deseada (MARCO y cols., 1993).

A partir de la secuenciación del ARNr 16S micoplásmico, se han realizado estudios filogenéticos sistemáticos, que han revelado la presencia de regiones altamente conservadas, y de otras de secuencia variable, tanto a nivel de género como de especie (KEMPF y cols., 1992 y VAN KUPPEVELD y cols., 1992).

2.4.3.3.- Biopatología clínica.

En una infección experimental con *M. mycoides subsp. mycoides* realizada por ROSENDAL en 1981, fueron notorios los cambios producidos en los factores de coagulación. El fibrinógeno aumentó después de la inoculación, bajaron las plaquetas, hubo una prolongación del tiempo de protombina, y un ligero incremento del tiempo parcial de tromboplastina.

También se observaron cambios en la serie blanca, con leucopenia y granulocitopenia (ROSENDAL, 1981). WESONGA en 1991 en una infección experimental con *M. capricolum subsp. capripneumoniae* (F-38) detectó también leucopenia y una leucocitosis, con desviación a la izquierda, sin notar cambios en la serie roja. ALAFIATAYO y cols., 1990 y EAST y cols., 1983, encuentran leucocitosis y neutrofilia con desviación a la izda. en animales inoculados

experimentalmente con *M. mycoides subsp. capri* y *M. mycoides subsp. mycoides*, respectivamente. GUTIERREZ, 1995 realizó una infección experimental en cabritos con *M. mycoides subsp. capri* y *M. mycoides subsp. mycoides*, conjuntamente, y observó linfopenia y neutrofilia; NAYAK y BHOWMIK, 1988, encontró leucopenia, neutrofilia y un incremento de las proteínas totales del suero, en cabritos inoculados con *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*; RANHNAN y SINGH, 1990, en una infección experimental con *M. mycoides subsp. capri*, observaron que se producía una bajada en la hemoglobina y leucocitos y un incremento en los neutrófilos. ROSENDAL en 1983, describe leucopenia y neutropenia en animales inoculados experimentalmente con *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*. GUHA y VERMA en 1987b, en una inoculación experimental en cabritos entre 2 y 4 meses de edad con *M. agalactiae* encontró neutrofilia. Otros autores no encuentran cambios en el estudio hematológico de los animales inoculados experimentalmente como OJO en 1976.

Otros autores, han estudiado los cambios bioquímicos y electrolíticos que se producen en la leche de animales infectados experimentalmente con *Mycoplasmas spp.*. En estos estudios, habían observado que las proteínas totales, el colesterol total, los fosfolípidos totales y los ácidos grasos libres, sufrían un incremento, a medida que progresaba la enfermedad, mientras que había una bajada de los lípidos totales y el contenido de glicéridos (MISRI y cols., 1988). Con respecto a los minerales y electrólitos, se produce una bajada en el contenido de sodio, potasio, calcio y magnesio, mientras que hay un incremento del hierro y el cobre. Sin embargo, no observaron cambios en el contenido de cobalto, zinc ó manganeso.

Material y Métodos

3.1.- OBJETIVOS.

Nuestra investigación la hemos basado en la consecución de varios objetivos:

El primero de nuestros objetivos de trabajo, fue llegar a identificar los micoplasmas causantes del síndrome de Agalaxia Contagiosa en nuestras islas, para lo cual, se cultivaron todas las muestras de leche mamítica de origen caprino remitidas a nuestro laboratorio, así como otras muestras de animales enfermos o muertos con una presunta relación con esta enfermedad.

También se procedió al estudio microbiológico de todos los animales enfermos y muertos, sospechosos de padecer este síndrome que fueron remitidos a nuestro servicio de diagnóstico.

Con la finalidad de conocer la evolución de la inmunidad en cabras infectadas por *M. agalactiae*, realizamos el seguimiento de la misma en seis animales procedentes de un colectivo de la Agrupación Caprina Canaria con antecedentes de contacto con este microorganismo, animales que fueron sometidos a una infección experimental. La respuesta inmune de los animales se midió por varios métodos, para conocer su eficiencia en detectar la infección. Los métodos utilizados fueron:

*** Técnica de ELISA indirecto con el antígeno de *M. agalactiae* lavado y sonicado. Para la realización de esta prueba, hemos seguido las directrices de THIRKELL y cols., en 1990.**

*** Técnica de ELISA indirecto con un preparado comercial de *M. agalactiae* de Niza.**

*** Técnica de Hemaglutinación Indirecta (I.H.A.). Para cuya realización hemos seguido las recomendaciones de CHO y cols., en 1975.**

Paralela y periódicamente a estas seis cabras, se les realizó un estudio microbiológico, biopatológico y anatomopatológico, este último al finalizar la experiencia.

Finalmente, pretendimos conocer la seroprevalencia de la enfermedad en las islas. Para ello, estudiamos muestras procedentes de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro. Los sueros fueron obtenidos en un muestreo estratificado, para el caso de Gran Canaria y el Hierro, y prácticamente de todos los rebaños existentes en Lanzarote.

3.2.- ESTUDIO MICROBIOLÓGICO.

Se procedió a estudiar todas las muestras de leche mamáticas de origen caprino, remitidas al servicio de diagnóstico de Enfermedades Infecciosas, de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas, entre los años 1991 a 1995.

En todos los casos, estas muestras se obtuvieron con las máximas condiciones de asepsia, en recipientes estériles, y conservadas en refrigeración hasta su procesamiento.

De igual manera, se realizó un estudio microbiológico de todos los animales enfermos y muertos sospechosos de padecer el síndrome de Agalaxia Contagiosa, que fueron remitidos a nuestro Servicio de Diagnóstico entre esos mismos años.

Los datos clínicos correspondientes a cada uno de los casos estudiados se anotaron en el libro de registro.

3.3.- AISLAMIENTO DE MICOPLASMAS

Para el aislamiento se utilizó el medio de Hayflick modificado (JONES, 1989), con modificación realizada por REAL, 1992 (comunicación personal) 3.8.1., y el medio SP-4, siguiendo la fórmula de WHITCOMB (1983) con modificaciones realizada por POVEDA (comunicación personal) 3.8.2.

Para cada muestra de leche, se emplearon tres tubos con cinco ml de medio de cultivo líquido, según el sistema recomendado por JONES en 1989. En el primer tubo se agrega 1 ml de leche problema, a continuación se homogeniza bien, y se traslada sucesivamente 1 ml al segundo y tercer tubo.

En algunos casos, también se remitieron para su estudio animales enfermos y muertos sospechosos de padecer este síndrome. De los primeros, se obtuvo mediante hisopos estériles muestras de fosas nasales, conjuntiva y conducto auditivo externo. En tanto que de los segundos, después de realizarse la necropsia correspondiente, se tomaron muestras con hisopos estériles previa incisión aséptica de traquea, pulmón, hígado, bazo y articulaciones.

Las muestras así obtenidas, fueron inoculadas en los medios líquidos para micoplasmas, incubadas a 37°C durante 3-7 días, y posteriormente sembradas en medio sólido, añadiendo 200 µl de cada cultivo líquido. La incubación de las placas de medio sólido, se realizó a 37°C en cámara húmeda, examinándose diariamente al microscopio a 400 aumentos durante al menos 15 días, antes de considerarlas negativas.

3.4.- IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE MICOPLASMAS AISLADAS.

3.4.1.- Clonaje.

El clonaje de las colonias de cada aislamiento, se realizó según la técnica estándar descrita por el Subcomité de Taxonomía de la Clase *Mollicutes*(1979), mediante el uso de pipetas Pasteur estériles, tomando cada colonia en cuestión y sembrándolas en un tubo de medio líquido de cultivo para micoplasmas, incubando a 37 ° C. durante 3 a 4 días. Estos subcultivos, fueron resembrados en medio sólido, e incubados en atmósfera húmeda durante 3 a 4 días. Este proceso fue repetido dos veces más para garantizar la pureza del cultivo.

Durante el proceso de clonaje, se observó diariamente la morfología de las colonias de cada muestra, y en el caso de apreciar dos o más tipos diferentes, se procedió a su dilución en solución salina al 0.85 % y posterior resiembra en medio sólido con el fin de separar lo más posible las colonias, y asegurarnos la toma y clonaje de los diferentes tipos.

Una vez clonadas, se procedió a su conservación en congelación a -80°C, siguiendo el procedimiento de LEACH, 1983, consistente en guardar en viales estériles, bloques de agar con colonias jóvenes, de 2-3 días de incubación.

3.4.2.- Pruebas bioquímicas.

El estudio del perfil bioquímico de todos los aislamientos, se realizó según las técnicas descritas por ALUOTTO y cols.,1970 y recomendadas por el Subcomité de Taxonomía de la Clase *Mollicutes* (1979).

3.5.2.1.- Sensibilidad a la digitonina.

Para la determinación indirecta de las necesidades de colesterol de todos los aislamientos, empleamos el método descrito por FREUNDT y cols., 1973.

Para ello, se preparó previamente una solución etanólica de digitonina, agregando 75 mg de esta sustancia a 5 ml de etanol del 95%, calentando suavemente en baño María hasta su total dilución. Seguidamente, se procedió a impregnar discos estériles de 6 mm de diámetro con 0.020 ml de esta solución, los cuales fueron secados a 37°C en atmósfera húmeda durante 3-7 días.

La sensibilidad a la digitonina se manifestó como una zona de inhibición de crecimiento (5-20 mm) alrededor del disco. De esta forma, diferenciamos los microorganismos pertenecientes al Orden *Mycoplasmatales* (sensibles a la digitonina) de los *Acholeplasmatales* (resistentes a la digitonina).

3.4.2.2.- Hidrólisis de la urea.

Se ha determinado la hidrólisis de la urea mediante el método de ALUOTTO y cols., 1970.

La prueba se realizó añadiendo un ml de un cultivo fresco de la cepa a investigar en un tubo de medio líquido para la hidrólisis de la urea (3.10.2.), agregando en superficie parafina líquida estéril. Después de incubar a 37°C, las lecturas se efectuaron diariamente durante una semana. En los casos positivos se apreció un cambio de color en el medio, de naranja a rojo cereza.

3.4.2.3.- Fermentación de la glucosa.

Se ha empleado en la determinación del metabolismo de la glucosa, el método de ALUOTTO y cols., 1970.

La prueba se realizó añadiendo un ml del cultivo fresco a investigar, en un tubo de medio preparado para la fermentación de la glucosa (3.8.), agregando en

superficie parafina líquida estéril. Se incubó a 37 °C. Las lecturas se efectuaron durante una semana, diariamente. En los casos positivos, se apreció un cambio de color del medio de rojo a naranja, mientras que en los negativos, no hubo cambio de coloración.

3.4.2.4.- Hidrólisis de la arginina.

Hemos empleado igualmente para la realización de esta prueba, el método de ALUOTTO y cols., 1970.

La prueba se realizó añadiendo un ml de un cultivo fresco de la cepa a investigar, en un tubo de medio para la hidrólisis de la arginina, agregando parafina líquida estéril en la superficie. Después de incubar a 37 °C, las lecturas se efectuaron diariamente, durante una semana. El medio cuyo color inicial es naranja, en los casos positivos viró a rojo cereza, mientras que en los negativos no hubo cambio de color.

3.4.2.5.- Actividad fosfatasa.

La investigación de la actividad fosfatasa, la detectamos por el método propuesto por ALUOTTO y cols., 1970, tomando como base el medio sólido de Hayflick, libre de antibióticos y acetato de talio al cual se le agregó difosfato de fenoltaleína al 1% .

Una vez preparadas las placas, se inocularon con cultivos frescos de las cepas a investigar, incubando a 37°C durante siete días en atmósfera húmeda. Transcurrida la incubación, se procedió a depositar unas gotas de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 5M.

En los casos positivos, después de transcurridos 30 segundos, apareció en las

cercanías de las colonias, un color rojo violeta, no observándose ningún cambio en los negativos.

3.4.2.6.- Producción de películas y cristales.

Para la realización de esta prueba, hemos utilizado medio sólido de Hayflick modificado, al cual en lugar de suero de ternera, se le agregó suero de caballo al 20 %.

El mencionado medio se inoculó con 0.3 ml de un cultivo fresco de la cepa a investigar, incubándose a 37°C en atmósfera húmeda.

Las placas, fueron observadas diariamente durante quince días, con el microscopio a 400 aumentos. En los casos positivos, se detectó la precipitación de cristales en los alrededores de las colonias.

3.4.2.7.- Reducción del trifenil tetrazolium.

La investigación de la reducción del 2,3,5 trifenil tetrazolium, se realizó en el medio Hayflick líquido, con una concentración del 0.04% de esta sustancia.

Para cada cepa a investigar, se utilizaron dos tubos. En ambos, se agregó un ml de la cepa a estudiar, crecida en un caldo de cultivo sin trifenil tetrazolium. A uno de los tubos se le añade parafina líquida estéril para conseguir un ambiente anaerobio. Después de incubar ambos tubos a 37°C durante dos semanas se apreció la positividad como un precipitado rojizo.

3.4.3.- Identificación serológica.

En base a los resultados que se obtuvo de las pruebas bioquímicas comentadas anteriormente, se procedió al estudio serológico de todas las cepas aisladas en nuestro trabajo.

De esta manera, se simplificó la identificación de las mismas, ya que nos orientó sobre las posibilidades de tipificación de las especies.

3.4.3.1.- Prueba de Inhibición del Crecimiento.

Se realizó la técnica de inhibición del crecimiento, según la modificación descrita por CLYDE en 1964 .

Para la realización de la prueba, se emplearon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, impregnados con 0.025 ml de cada uno de los antisueros, elaborados en conejos frente a las siguientes cepas de referencia:

- * *M. agalactiae* (PG2)
- * *M. arginini* (G230)
- * *M. capricolum subsp. capricolum* (California kid)
- * *M. conjunctivae* (HRC581)
- * *M.m. mycoides LC* (Y-goat)
- * *M.m. mycoides SC* (P61)
- * *M.m. capri* (P63)
- * *M. putrefaciens* (KS1)
- * *M. capricolum subs. capripneumoniae* (F38)
- * *Acholeplasma axanthum* (H86N)
- * *A. granularum* (BTS-39)
- * *A. laidlawii* (P68)
- * *A. oculi* (19L)

Todos estos antisueros, fueron elaborados y probados previamente por POVEDA y cols., 1989, exceptuando el antisuero contra *M capricolum subsp. capripneumoniae* (F38) que fue cedido por el Dr. R.H. LEACH (Public Health

Laboratory Service, Central Public Health Laboratory, London)

La técnica seguida para la realización de la prueba fue la siguiente:

1°.- Disponer de placas de medio sólido (Si estaban en refrigeración a 4°C se procedió a su secado incubándolas a 37°C durante 30 minutos.

2°.- Se prepararon diluciones de los cultivos problema, en solución salina al 0.85% a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .

3°.- Se realizó el inóculo, en placas de medio sólido de todas las diluciones, esperando a temperatura ambiente hasta su total absorción por el medio.

4°.- A continuación, se depositó sobre la superficie de las placas, los referidos discos, impregnados con diferentes antisueros, dejando entre ellos una separación de al menos 2 cm.

5°.- Posteriormente, se incubó estas placas a 37°C durante 24-96 horas en atmósfera húmeda.

Una vez terminada la incubación, se efectuó la lectura mediante visualización al microscopio a 400 aumentos. En la mayoría de los casos, se consideraron positivas las zonas de inhibición de crecimiento, perfectamente definidas, de al menos 2 mm de diámetro. No obstante, debemos indicar que en algunas lecturas, se observaron zonas de clarificación del crecimiento bastante manifiestas, que fueron consideradas positivas siguiendo las recomendaciones de CLYDE, 1983.

3.4.3.2.- Prueba de Inhibición del Metabolismo.

Esta prueba se realizó según la técnica descrita por TAYLOR-ROBINSON en 1983. Se llevó a cabo en placas de microtitulación, y dependiendo de los

resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas, utilizamos medio base con diferentes substratos (Generalmente el substrato empleado era la glucosa, pero para los micoplasmas no fermentativos se utilizó trifenil tetrazolium . El procedimiento fue el siguiente:

1.- En cada pocillo de la fila A a la H del 2 al 11, con la micropipeta se depositó 0.025 ml de medio.

2.- En los primeros pocillos del A1 al D1, se agregó 0.05 ml de suero positivo, y en los pocillos E1 a H1 0.05 ml de suero negativo (testigo).

3.- A continuación, se realizaron las diluciones correspondientes, desde el pocillo 1 hasta el pocillo 10.

4.- Se adicionó con la micropipeta en la serie A, 0.025 ml del antígeno sin diluir.

En la serie B: 0.025 ml del antígeno diluido al 10^1 .

En la serie C: 0.025 ml del antígeno diluido al 10^2 .

En la serie D: 0.025 ml del antígeno diluido al 10^3 .

Igualmente se hace con los pocillos del E al H.

5.- Se agregó con la micropipeta 0.15 ml de medio.

6.- Finalmente, se procedió a cerrar la placa de microtitulación con su tapa correspondiente.

7.- La incubación se llevó a cabo a 37°C en atmósfera húmeda durante 24-48 horas, observando el cambio de color.

8.- Los pocillos n° 11 de la serie de la A a la H, son los testigos de antígeno (Deben contener 0.025 ml de medio, 0.025 ml de antígeno a la dilución debida, y x 0.15 ml de medio).

9.- El pocillo A12 es el testigo positivo de suero, y contiene 0.025 ml de medio, 0.025 ml de suero 1/4 y 0.15 ml de medio.

10.- El pocillo H12 es el testigo negativo del suero, y contiene 0.025 ml de medio, 0.025 ml de suero 1/4 y 0.15 ml de medio.

El medio con glucosa tiene un color rojo, que vira a amarillo, en caso de que el micoplasma utilice este substrato, y al revés para el trifenil tetrazolium (de amarillo que es su color original, pasa a rojo una vez ha sido utilizado). Si hay correspondencia antígeno-anticuerpo, se produce la lisis del microorganismo, este no utilizará el substrato y no habrá cambio de color.

3.4.4.- Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para la confirmación de la cepa L9, aislada por primera vez en 1992, de un brote clínico de Agalaxia Contagiosa, en el municipio de Teror (Gran Canaria), se procedió a su identificación, por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta reacción, fue llevada a cabo en la SVA (Upsala, Suecia), basándonos en la técnica descrita por YLEANA y cols., en 1995 modificada por JOHANSSON (comunicación personal) .

La secuencia del ARNr 16S de *M. agalactiae*, ha sido publicada por WEISBURG y cols., 1989, y fue obtenida del GenBank (c/o IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA) mediante el nº de acceso M24290.

Los oligonucleótidos, fueron sintetizados en un sintetizador de ADN, modelo 391 de Applied Biosystems (Foster City, California, USA). La secuencia de los primeros se describen en la Tabla nº 1.

3.4.6.1.- Técnica.

*** Se centrifugó a 12000 x g 1 ml de un cultivo fresco de la cepa a investigar, posteriormente, el sedimento se resuspendió en 100 μ l de agua bidestilada estéril, sometiéndolo a ebullición durante 5 minutos. Finalizado este período, se depositó inmediatamente en un baño de hielo.**

*** Se hace la 1ª mezcla (M) de:**

- agua bidestilada: 41.4 μ l/tubo**
- PCR tampón (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA): 5 μ l/tubo**
- nucleótidos (dNTPs 1.25mM/cu)(Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA):4 μ l/tubo**
- MgCl₂ (25 mM)(Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA): 3 μ l/tubo**
- los dos primeros: 0.5 μ l(1.0 μ M)/cu/tubo**

*** Se realiza la mezcla en la que va la Taq (Perkin Elmer, Roche Molecular Systems, Inc, Branchburg, New Jersey, USA) sin añadir el enzima (Sólo el agua: 1.6 μ l/tubo y el PCR tampón: 0.2 μ l/tubo).**

*** Se preparan las muestras disueltas en agua (45 μ l de agua y 5 μ l de muestra)**

*** Se deposita la mezcla M en endorf y se le añaden dos gotas de aceite mineral.**

*** Se añaden las muestras: 5 μ l/tubo**

*** Se introduce en el aparato durante 4 minutos para un calentamiento. Mientras se añade el enzima a la dilución de la misma (0.2 μ l/tubo)**

* Se añade la dilución de enzima.

* Se colocan de nuevo los tubos en el aparato y empiezan los ciclos. Las condiciones usadas para la amplificación *in vitro* de los fragmentos del ARNr 16S de *M. agalactiae* pueden verse en la Tabla nº 2.

Los productos obtenidos, fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %, y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Una mezcla de BglI y HinfI adheridas a DNA pBr328 de Boehringer Mannheim Biochemica (Mannheim, FRG) fue utilizado como marcador de tamaño molecular.

3.5.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON UNA CEPA AUTÓCTONA DE *M. AGALACTIAE*.

3.5.1.- Animales objeto de estudio.

Se seleccionaron seis hembras en lactación de la Agrupación Caprina Canaria, de alrededor de cuatro años de edad y aproximadamente 30 kg de peso, procedentes de una granja en régimen extensivo, del municipio de Ingenio (Gran Canaria).

Estos animales fueron sometidos a observación, no apreciándose ningún síntoma de enfermedad. Con la finalidad de descartar su papel como portadores se les extrajo muestras de fosas nasales, conjuntiva, leche y sangre, las cuales se cultivaron en medios específicos para micoplasmas, no observándose ningún crecimiento después del periodo de incubación rutinario.

Asimismo, se realizó el estudio serológico de estos animales con la técnica ELISA indirecto siguiendo el protocolo de THIRKELL y cols., (1990), empleando para ello antígeno de *M. agalactiae* (cepa L9), *M. mycoides subsp. mycoides* (LC)

(cepa Y-goat) y *M. capricolum subsp. capricolum* (cepa California kid) como se describe en el apartado 3.5.5.1..

Ante los resultados negativos obtenidos con esta técnica, se procedió a su inoculación experimental.

3.5.2.- Inoculación experimental.

Los seis animales fueron distribuidos en tres lotes de dos animales cada uno, a los que, según el lote, se les inoculó por diferentes vías (1º lote, vía intratraqueal, 2º lote, vía intramamaria y 3º lote, vía oral), y con diferentes dosis de *M. agalactiae* (L9). En los dos primeros lotes (un animal fue inoculado con 10⁵ ufc y otro con 10⁸ ufc). En el último lote, se utilizó una sola dosis para los dos animales (10¹⁰ ufc). Los inóculos se obtuvieron de la siguiente forma: Se realizó un cultivo en 25 ml de medio de Hayflick modificado líquido. A continuación se incubó a 37° C durante dos días. Pasado dicho período se hizo una dilución en solución salina estéril al 0.9 % (0.002 ml de cultivo en 9.998 ml de solución salina). De esta dilución, se sembró en medio sólido, 0.2 ml en atmósfera húmeda durante dos días. Una vez crecido el microorganismo se realizó el conteo de las colonias e inferimos la concentración aproximada de micoplasmas en el medio de cultivo líquido. Este último fue lavado tres veces en solución salina estéril y diluido finalmente en ella, para obtener la concentración adecuada. Las dosis y vías de inoculación pueden verse en la Tabla nº 3.

Los seis animales, fueron mantenidos en alojamientos individuales durante toda la experiencia. Estos habitáculos estaban protegidos del exterior, mediante redes mosquiteras, y fueron objeto en todo momento de rigurosas medidas de desinfección, en la entrada o salida de objetos y/o personas para evitar el contagio entre ellos y la diseminación del agente a otras áreas. Recibieron alimentación y agua *ad libitum*. Así mismo, dos veces por semana, se les midió la temperatura

corporal, hasta el momento del sacrificio y quincenalmente se obtuvieron muestras de sangre, mucosa nasal, mucosa conjuntival y secreción láctea para su análisis microbiológico. Los parámetros analizados fueron:

a) Determinaciones hemáticas y bioquímica sérica: recuento de glóbulos rojos, valor hematocrito, hemoglobina, recuento de leucocitos, recuento diferencial de leucocitos, proteínas totales, urea, LDH, AST, ALT, fosfatasa alcalina, creatinina, calcio y potasio.

b) Microbiológicos: siembras en medio Hayflick modificado y SP4 de las muestras obtenidas quincenalmente. Las muestras que se tomaron fueron: sangre, mucosa nasal, mucosa conjuntival y secreción láctea.

La eutanasia de los animales se realizó a los 137 días postinoculación, mediante una tranquilización previa con Xilacina (Rompun, laboratorios Bayer) a dosis de 0.1 ml/10 kg. intramuscular, para luego aplicar tiopental sódico (Pentothal sódico 1 g, laboratorio Abbott) vía intravenosa en la yugular, en dosis necesaria para la paralización de las funciones vitales.

Una vez eutanasiados los animales se les practicó una necropsia reglada y completa.

3.5.3.- Estudio anatomopatológico de los animales de la experiencia.

3.5.3.1.- Estudio macroscópico lesional.

Durante la necropsia reglada, fueron observados detenidamente todos los órganos, tejidos y aparatos, buscando posibles lesiones.

3.5.2.2.- Estudio histológico.

Para el estudio estructural, se tomaron muestras de 1 cc de tamaño, que fueron fijadas en formaldehído al 10 %, de los siguientes órganos: hígado, pulmón, bazo, ganglios linfáticos, riñón y tejido mamario.

Las muestras fijadas en formaldehído al 10%, se incluyen en parafina, y se efectuaron cortes en secciones de 2-3 μm de grosor. Dichos cortes, se recogieron en un baño termostático, y se fijaron al portaobjetos en estufa a 60° C.

Para su tinción, se empleó el método rutinario de hematoxilina-eosina.

3.5.4.- Análisis microbiológico de las muestras.

Una vez finalizada la experiencia y durante la necropsia, se obtuvo muestras de pulmón, hígado, riñón, bazo y tejido mamario. Dichas muestras se trasladaron al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas, y fueron procesadas para su siembra, en medios de cultivo para micoplasmas (Hayflick modificado y SP4). Las pautas seguidas fueron las mismas que se describen en el apartado 3.4.

3.5.5.- Técnicas de E.L.I.S.A. empleadas.

3.5.5.1.- Técnica de E.L.I.S.A. indirecto con antígeno lavado y sonicado.

Se siguieron para la realización de esta prueba, las directrices señaladas por THIRKELL y cols., en 1990.

El trabajo se realizó con tres antígenos distintos:

- a) Antígeno de *M. agalactiae* (cepa L9, aislada de un brote de agalaxia contagiosa en Gran Canaria).**
- b) Antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides L.C* (cepa Y-goat).**
- c) Antígeno de *M. capricolum subsp. capricolum* (cepa California kid).**

3.5.5.1.1- Elaboración del antígeno.

Se realizó un cultivo de cada micoplasma, en 5 ml de medio de Hayflick modificado (Ver apartado 3.8.). Una vez crecidos, se inocularon respectivamente, en 100 ml de medio líquido, y posteriormente en 1000 ml de este medio.

Finalizado el período de incubación habitual, los cultivos fueron centrifugados a 25000 x g durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente, se lavaron tres veces en PBS (Véase apartado 3.10), y se resuspendieron en este mismo tampón.

A continuación, se determinó la concentración de proteínas mediante el método de Biuret, empleando el kit T-PRO (Medical Analysis Systems; Inc, USA), el cual consta de un reactivo de proteínas totales (PT) y un patrón estandar de proteínas, cuya concentración es de 6 g/dl.

El protocolo fue el siguiente:

1. A 1 ml de reactivo de PT se le añadió 0.02 ml de la muestra a investigar. De la misma manera, se agregó 0.02 ml del estandar proteico a 1 ml del reactivo PT. Se homogenizó bien, y se incubó durante 15 minutos a 37 °C.

2. Una vez transcurrido este período, se midió la absorvancia mediante espectrofotometría. Previamente, el espectrofotómetro fue fijado a cero con un

blanco (1 ml del reactivo PT y 0,02 ml de agua bidestilada).

3. La concentración proteica, se calculó conociendo el factor F, después de medir la absorbancia del estandar.

$F = \text{Concentración del estándar} / \text{Absorbancia del estándar}$.

4. Finalmente, la concentración proteica de la muestra se obtuvo multiplicando el factor F por la absorbancia de la muestra.

5. Una vez conocida la concentración proteica de cada antígeno sonicado, se diluyó en PBS, hasta obtener una concentración equivalente a 2 mg de proteína por ml.

Las suspensiones así obtenidas, fueron tratadas con ultrasonidos, empleando un sonicador Vibra Cell™ (Sonics Materials, USA), durante cuatro ciclos de 10 segundos cada uno (4 x 10 segundos) en un baño de hielo.

3.5.5.1.2.- Estandarización de la prueba.

Con el objeto de determinar las condiciones en las que el método ELISA proporciona los mejores resultados, al comienzo de la experiencia, se realizó una prueba con diferentes diluciones del antígeno, suero e inmunocóncugado.

Así, ensayamos varias concentraciones de antígeno, oscilantes entre 1/100 a 1/2000 (concretamente 1/100, 1/250, 1/500, 1/1000 y 1/2000), y de cóncugado ensayando diferentes diluciones que iban de 1/500 a 1/12000 (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/4000, 1/8000 y 1/12000).

Con respecto al tiempo de parada de la reacción, optamos por parar a los 15 minutos en lugar de los 30, que nos indicaba la técnica, ya que, debido seguramente a que la temperatura de nuestro laboratorio excede los 20 °C

(indicados en el protocolo) las densidades ópticas obtenidas, se elevaban mucho transcurrido ese tiempo.

3.5.5.1.3.- Técnica.

* Cada pocillo de una placa de fondo plano, fue cubierto durante toda la noche a 4 °C con 200 μ l de una dilución en buffer unidor (véase apartado 3.10.) de la suspensión de antígeno tratado con ultrasonidos diluido al 1/1000 , para el ELISA con antígeno de *M. agalactiae* y *M. capricolum* y al 1/500 para el ELISA con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides L.C.*.

* A continuación, se lavó tres veces con buffer lavador (véase apartado 3.8.).

* La hilera A de cada placa se utilizó como "hilera blanco".

* Las uniones inespecíficas, fueron bloqueadas con 200 μ l. de buffer lavador conteniendo un 1% de albúmina de suero bovino, durante una hora a 37°C.

* Posteriormente cada placa se lavó con buffer lavador tres veces.

* Una vez efectuado el lavado, se añadió 150 μ l. de suero problema y se incubó durante 3 horas a 37°C.

* Finalizada la incubación, se lavó cada placa tres veces con buffer lavador.

* Más tarde se añadió a cada pocillo 200 μ l. de una dilución al 1/3000 , para el ELISA de *M. agalactiae* y de 1/5000 para el ELISA con *M. capricolum subsp. capricolum* y *M mycoides subsp. mycoides L.C.*, de conjugado de peroxidasa anti-Ig G de cabra con buffer lavador con un 1% de albúmina de suero bovino. Se incubó durante una hora y media a 37°C.

* A continuación, se lavó tres veces con buffer lavador y una vez con buffer citrato fosfato (ver apartado 3.10).

* Después, se añadió a cada pocillo 150 μ l de una solución preparada con 40 mg. de difenil-diamina en 50 ml de buffer citrato-fosfato, conteniendo 50 μ l. de H₂O₂ y se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos en oscuridad.

* Finalmente, se efectuó la lectura a 492 nm en un lector de ELISA modelo EIA 400 FW (Whittaker Bioproducts).

3.5.5.2.- Técnica de E.L.I.S.A. indirecto con el kit de *M. agalactiae* del Dr. Bommeliang.

3.5.5.2.1. Reactivos.

Los pocillos de las filas impares, están antigenados con un control que en este método ELISA, es *M. mycoides subsp. mycoides* L.C. y los de las filas pares, con el antígeno de *M. agalactiae*.

Junto a los reactivos que incluye el kit comercial para el desarrollo de la técnica, hemos utilizado un grupo de sueros de referencia (positivo débil y negativo).

3.5.5.2.2. Técnica.

1.- Se prepararon diluciones de los sueros problemas, y los sueros control positivo y negativo al 1:100, empleando el diluyente del kit.

2.- Se añadió 0.2 ml de las muestras diluidas y controles, en los pocillos de las microplacas.

3.- Más tarde, se cubrió cada microplaca, y se incubó en atmósfera húmeda, a temperatura ambiente (20-30°C) durante 90 minutos.

4.- A continuación, cada placa fue vaciada, y se le añadió solución de lavado, evitando la formación de burbujas de aire.

5.- El paso anterior se repitió, dejando la solución de lavado durante 3 minutos.

6.- Finalmente cada placa fue vaciada vigorosamente.

7.- Se preparó una dilución del conjugado al 1:200.

8.- Añadimos 0.2 ml de la dilución anterior, en cada pocillo de la microplaca.

9.- Cubrimos la microplaca, e incubamos a temperatura ambiente, durante 90 minutos en atmósfera húmeda.

10.- Las placas fueron lavadas, siguiendo los pasos descritos anteriormente (4, 5, 6).

11.- Se agregó a cada pocillo, 0.2 ml de cromógeno a temperatura ambiente

12.- Se protegió cada microplaca, incubando a temperatura ambiente entre 10-30 minutos. Seguidamente se efectuó la lectura, cuando la absorbancia del control positivo se situó entre 0.200 a 0.500 O.D. En nuestro laboratorio, normalmente detenemos la reacción a los 7 minutos.

13.- Una vez realizado el paso anterior, se añadió a cada pocillo 0.05 ml de la solución de parada.

3.5.6.- Técnica de Hemaglutinación Indirecta (I.H.A.).

Para la realización de esta técnica, hemos seguido las recomendaciones de CHO y cols en 1975.

3.5.6.1.- Elaboración del antígeno.

Se empleó como antígeno, eritrocitos de oveja fijados con glutaraldehído, y sensibilizados con *M. agalactiae* (Cepa L9).

La preparación de este antígeno, lleva consigo tres pasos bien diferenciados:

1º Cultivo de *M. agalactiae*.

2º Preparación de los eritrocitos de oveja fijados con glutaraldehído.

3º Sensibilización de los eritrocitos de oveja fijados con glutaraldehído.

Para la realización del primer apartado, preparamos un cultivo en un litro de la cepa L9 de *M. agalactiae*, en el medio modificado de Hayflick, incubando a 37°C y en agitación continua durante tres días.

A continuación, el cultivo fue centrifugado a 14.000 x g durante una hora a 5°C. El precipitado, fue posteriormente lavado dos veces con solución salina al 0.85 %, y resuspendido finalmente en solución salina estéril hasta una concentración proteínica de 10 mg/ml. determinada por Ref LabTM BRAND, System Pack Liquid Reagent, T-PRO (Medical Analysis Systems, Inc. Lote nº 179311). Una vez obtenida la concentración adecuada, se le añadió como conservante azida sódica, a una concentración final de 0.01 %, y se almacenó a 5 °C hasta su posterior utilización.

Para la realización del segundo apartado, tomamos 10 ml de sangre desfibrinada de oveja (código SR51 de Oxoid) y la centrifugamos a 3000 rpm durante 10 minutos. El sedimento fue lavado cuatro veces con Buffer fosfato-glucosa (PBG). Una vez finalizados los lavados, los eritrocitos se resuspendieron al 20 % en PBG y se mezcló con un volumen igual de glutaraldehído al 0.2 % en PBG incubando al baño María a 37 °C durante 15 minutos. Posteriormente, estos eritrocitos fijados, fueron lavados cinco veces con solución salina estéril al 0.85 %, y resuspendidos al 10 % de esta solución, conteniendo un 0.1% de azida sódica, y almacenados a 5°C hasta su posterior utilización.

El tercer punto, consiste en la sensibilización de los eritrocitos de oveja fijados con glutaraldehído. Para ello, tomamos los eritrocitos preparados en el punto anterior, y se lavan dos veces con PBS y se dejan al final a una concentración total al 20 % en PBS. Más tarde, se adicionó 2 ml de la cepa L9, con una concentración proteica de 10 mg/ml, a 5 ml de la suspensión de eritrocitos fijados.

Se agregó como conservante azida sódica, a una concentración final del 0.1 %. La solución se mezcló suavemente, incubándose a 37°C durante 16-18 horas, con agitación ocasional. Transcurrido dicho período se centrifugó y lavó en PBS tres veces a 450 x g durante 10 minutos. Los glóbulos rojos fueron resuspendidas al 20 % de concentración en PBS con un 50 % de glicerina y almacenados a 5° C hasta su utilización.

3.5.6.2.- Inactivación de sueros problemas.

Los sueros objeto de estudio, fueron calentados al baño María durante 30 minutos a 56°C.

3.5.6.3.- Preadсорción de los sueros con eritrocitos de oveja.

Esta fase, se realizó agregando en viales 1 ml de sangre de oveja, que luego se centrifugó a 10.000 x g. durante 15 minutos. El sobrenadante fue retirado, y se le añadió 1 ml de suero problema, incubándose a 25° C durante 1 hora con agitación leve. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g. durante 15 minutos, y el sobrenadante, almacenado en viales ependorff a -20° C de forma alicuota para su posterior utilización.

3.5.6.4.- Técnica.

Para la realización de la técnica de hemaglutinación indirecta se siguieron los siguientes pasos:

* En las microplacas de dilución, se efectuaron diluciones dobles seriadas del suero problema, comenzando con una dilución al 1:20 hasta 1:32000, preparadas en 50 μ l de PBS con un 1 % de suero de conejo normal inactivado.

* Los eritrocitos de oveja, fijados con glutaraldehído, y sensibilizados con micoplasmas preservados en un 50 % de glicerina (Se encuentran al 20 % en PBS), se lavaron tres veces en PBS y se resuspendieron finalmente al 2 % de concentración en PBS. Estos eritrocitos sensibilizados constituyeron el antígeno.

* Se añadió 25 μ l de antígeno a cada pocillo

* Se incorporó como controles suero caprino negativo, positivo, así como un control de antígeno.

* El contenido de los pocillos, se mezcló completamente moviendo suavemente la placa.

*** La lectura de la prueba, se efectuó después de dos horas de incubación a temperatura ambiente.**

3.5.7.- Análisis de biopatología clínica.

Cada 15 días, se realizó la toma de muestras mediante punción en la vena yugular, utilizando tubos estériles (Venoject, Terumo). De esta forma, se extrajeron 10 ml de sangre, que fue dividida de la siguiente manera:

- 2,5 ml se depositó en tubos de poliestireno con EDTA tripotásico . Con estas muestras realizamos el estudio de los parámetros hemáticos.

- 7,5 ml se dejaron en el tubo inicial para la obtención de suero. Una vez separadas las fases, se extrajo el coágulo, y el suero se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 10 minutos. El suero así obtenido, se repartió en partes alícuotas, y congeló a -80°C hasta el momento de su utilización, en la determinación de la bioquímica sérica.

3.5.7.1.-Determinaciones hemáticas.

3.5.7.1.1.- Recuento de eritrocitos, hemoglobina, hematocrito y leucocitos.

Para estos recuentos, se empleó el contador hematológico semiautomático Sysmex Microcellcounter F-800.

Un módulo de este aparato, toma un volumen de sangre, que el mismo diluye y nos informa de forma automática de los resultados.

3.5.7.1.2.- Recuento diferencial de leucocitos.

Este recuento, empezó a realizarse el día 45 postinoculación, por causas ajenas a nuestra voluntad.

El recuento diferencial de leucocitos, se llevó a cabo sobre extensiones de sangre, utilizando el método de tinción Panóptico rápido, que emplea tres soluciones preparadas comercialmente:

- solución 1: solución metilica de triaril metano.
- Solución 2: solución tamponada de xanteno.
- solución 3: solución tamponada de tiazina.

Una vez seco el frotis sanguíneo, se introduce durante 8 segundos en cada una de las soluciones consecutivamente, se lava con agua abundante y queda listo para su examen.

Los resultados se expresan en porcentajes.

3.5.7.2.- BIOQUÍMICA SÉRICA.

Las determinaciones séricas, se realizaron utilizando el sistema automático Kodak Ektachem DT Systems, que consta de tres módulos:

- Módulo DT60 Analysers
- Módulo DTSC Modules
- DTE Modules

Dependiendo de la prueba, y siguiendo las instrucciones que indican que módulo usar para cada parámetro, realizamos las diferentes pruebas.

Los reactivos de las pruebas, vienen impregnados en placas cuadradas de

1 x 1 cm. que se introducen en los módulos. Se agregó el suero problema, cuando el aparato lo requirió y entre 3-5 minutos presentó el resultado.

Las pruebas efectuadas fueron las siguientes: Alanino aminotrasferasa (ALT), Aspartato aminotrasferasa (AST), fosfatasa alcalina, calcio, potasio, creatinina, urea, Lactato deshidrogenasa (LDH) y proteínas totales.

3.6.- ESTUDIO DE LA SEROPREVALENCIA DE LA AGALAXIA CONTAGIOSA.

Se ha empleado la técnica de ELISA indirecto con el kit comercial del Dr. Bommeliang (apartado 3.5.5.2), para estimar la prevalencia de Agalaxia Contagiosa por *M. agalactiae* y *M. mycoides subsp. mycoides*, en las islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro. Se utilizó esta técnica por tener una buena sensibilidad y por su comodidad y rapidez para procesar un gran número de muestras.

Para ello, se realizó un muestreo probabilístico, en el que la selección de la muestra se obtuvo mediante un proceso aleatorio, el cual permite que dentro de cada grupo, cada animal tenga la misma probabilidad de ser seleccionado.

La isla de Gran Canaria consta de un total de 21 municipios (Agaete, Aqüimes, Artenara, Arucas, Firgas, Gáldar, Ingenio, Mogán, Moya, Las Palmas de Gran Canaria, San Bartolomé de Tirajana, San Nicolas de Tolentino, Santa Brígida, Santa Lucía de Tirajana, Santa María de Guía, Tejeda, Telde, Teror, Valsequillo de Gran Canaria, Valleseco y Vega de San Mateo); Lanzarote con sólo 7 municipios (Arrecife, Haría San Bartolomé, Teguisse, Tías, Tinajo y Yaiza) y el Hierro de 2 municipios (Valverde y Frontera).

Se seleccionó un tipo de muestreo aleatorio estratificado, en el que el primer

estrato, quedó representado por las islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro. Un segundo estrato, estuvo constituido por n animales extraídos de forma aleatoria, de cada una de las islas mencionadas, en el que se intentó que todos los municipios con censo caprino no exiguo estuvieran representados y escogidos igualmente de forma aleatoria, con independencia del sistema de explotación o las características climáticas de cada area. Para las islas de Gran Canaria y Lanzarote se partió de la base del censo de ganado caprino existente en el año 1991 (LOPEZ y cols., 1992). En Gran Canaria, se seleccionaron 56 explotaciones localizadas preferentemente en zonas costeras de la isla. El total de animales analizados fue 1214, que representan una población de estudio de 12.388 animales. En la isla de Lanzarote, se seleccionaron 64 explotaciones, casi el total de explotaciones de la isla, resultando analizados 562 animales, que representan una población de estudio de 7.014. Dichas explotaciones, fueron seleccionadas al azar dentro de cada Término Municipal. En el Hierro, se seleccionaron 12 explotaciones, de los que se analizaron 66 animales.

Las muestras se recogieron durante 1991-1992 en las islas de Gran Canaria y Lanzarote, y durante 1995 en la isla del Hierro

El tamaño de la muestra, se obtuvo siguiendo las indicaciones de CANNON y ROE, 1982 (cit THRUSFIELD, 1990). Escogimos para nuestro estudio, un nivel de confianza del 95% y una precisión del 5%, con una estimación supuesta de prevalencia esperada del 50%, aunque realmente este valor es muy superior a la prevalencia realmente esperada, pero al no existir datos previos a nuestro estudio, estuvimos obligados a trabajar con una muestra grande. De esta forma, nuestra muestra debía de tener como mínimo 384 animales.

El número de animales escogidos al azar en cada explotación, se obtuvo aplicando la "Tabla Internacional de Muestreo" (American-British-Canadian), nivel normal, teniendo en cuenta que este sistema, nos permite seleccionar un tamaño de muestra muy superior al que necesitamos.

La prevalencia (P) fue calculada según THRUSFIELD (1990), la cual mide la cantidad de infección presente en una población conocida, durante un período de tiempo determinado, sin distinguir los casos nuevos de los antiguos. Es una proporción, que representa la probabilidad, de que un animal tenga una infección específica en un momento dado.

n° de animales que presentan la infección
en un período de tiempo concreto

$$P = \frac{\text{-----}}{\text{-----}}$$

n° de individuos en riesgo de la población
en ese mismo período de tiempo

3.7.- SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

3.7.1.- Medio de cultivo Hayflick modificado.

3.7.1.1.- Medio líquido.

* Parte esterilizable en autoclave

Bacto PPLO Broth sin cristal violeta (Difco)	2.1 g
Agua bidestilada	70.0 ml
Ajustar el pH a 7.6-7.8	

* Componentes filtrados por membrana de 0.22 µm de poro

Suero de ternero recién nacido (inactivado)	20.0 ml
Extracto fresco de levadura	10.0 ml
ADN (0.2% p/v)	1.0 ml
Ampicilina (100 mg/ml)	0.25 ml
Acetato de talio (10% p/v)	0.25 ml
Cloruro de 2-3-5- trifenil tetrazolium (2% p/v)	1.0 ml

Ajustar el pH a 7.6-7.8 con NaOH (1 M).

Mezclar asépticamente las dos fases, y distribuirlo a razón de 5 ml en tubos de tapón de rosca estériles y refrigerar a 4° C hasta su uso.

3.7.1.2.- Medio sólido.

* Parte esterilizable en autoclave

Bacto PPLO Agar sin violeta cristal (Difco)	3.4 g
Agua desmineralizada	70.0 ml

* Componentes filtrados por membrana de 0.22 μ m de poro

Suero de ternero recién nacido (inactivado)	20.0 ml
Extracto de levadura fresca	10.0 ml
ADN (0.2 % p/v)	1.0 ml
Ampicilina (100 mg/ml)	0.25 ml
Acetato de talio (10% p/v)	0.25 ml
Cloruro de 2-3-5- trifenil tetrazolium (2% p/v)	1.0 ml

Ajustar el pH a 7.6-7.8 con NaOH (1 M).

Mezclar asépticamente las dos fases, y distribuirlo en placas de Petri estériles de un solo uso, a razón de 5 ml por placa, y almacenar hasta su uso a 4°C.

Para micoplasmas que hidrolizan la arginina, utilizamos como base el medio Hayflick líquido o sólido, al cual le incorporamos, en una proporción del 5 p. 100, una solución stock de clorhidrato de L-arginina (al 20 % p/v en agua bidestilada) (concentración final del clorhidrato de L-arginina: 1 % p/v).

Ajustar a pH= 6.5-6.7 con HCl (1 M).

3.7.2.- Medio de cultivo SP4 .

3.7.2.1.- Medio líquido.

* Parte esterilizable en autoclave.

Bacto PPLO broth (DIFCO)	4.20 g
Bacto peptona (DIFCO)	6.40 g
Bacto triptona (DIFCO)	12.00 g
Agua bidestilada	535.00 ml

Ajustar a pH= 7.8 con NaOH

* Componentes filtrados por membrana de 0.22 μ m de poro .

C.M.R.L. (10 x) con glutamina (SIGMA)	60.00 ml
Extracto fresco de levadura (25% p/v)	42.00 ml
Yeast Extract (DIFCO) (5g/250 ml)	120.00 ml
Penicilina (solución de 100.000 UI/ml)	6.00 ml
Rojo fenol (solución 0.1%)	24.00 ml
Agua bidestilada	212.00 ml
Suero de caballo inactivado a 56°C 30 minutos	251.00 ml

Ajustar a pH= 7.2

Mezclar asépticamente las dos fases, y distribuirlo a razón de 5 ml, en tubos de tapón de rosca estériles y refrigerar a 4° C hasta su uso.

3.7.2.2.- Medio sólido.

Para la elaboración del medio sólido SP-4, se agregó 11.4 g. de agar N° 1

de OXOID a la primera fase, las dos fases se mantuvieron en baño María a 45°C y se mezclaron asépticamente, distribuyéndose a continuación en placas de Petri estériles de un solo uso.

3.7.3.- Medio para la hidrólisis de la urea.

* Parte esterilizable en autoclave:	
Caldo infusión de corazón (DIFCO)	1.85 g
Agua bidestilada	74 ml
Rojo fenol al 0.5 %	1 ml
* Componentes filtrados por membrana de 0.22 µm.	
Suero de caballo inactivado	10 ml
Extracto de levadura	5 ml
Urea al 10%	10 ml

Ajustar el pH a 7

Las dos fases se mezclan asépticamente, y se distribuyen en tubos de rosca en volúmenes de 5 ml.

3.7.4.- Medio para la fermentación de la glucosa.

Parte esterilizable en autoclave:	
Caldo infusión de corazón (DIFCO)	1.85 g
Agua bidestilada	74 ml
Rojo fenol al 0.5 %	1 ml
* Componentes filtrados por membrana de 0.22 µm.	
Suero de caballo inactivado	10 ml
Extracto de levadura	5 ml

Glucosa (solución al 10 %) 10 ml

Ajustar el pH= a 7,6

Las dos fases se mezclan asépticamente, y se distribuyen en tubos de rosca en volúmenes de 5 ml.

3.7.5.- Medio para la hidrólisis de la arginina.

* Parte esterilizable en autoclave:

Caldo infusión de corazón	1.85 g
Agua bidestilada	74 ml
Rojo fenol al 0.5 %	1 ml

* Componentes filtrados por membrana de 0.22 μ m.

Suero de caballo inactivado	10 ml
Extracto de levadura	5 ml
Arginina al 10%	10 ml

Ajustar el pH= a 7

Las dos fases se mezclan asépticamente, y se distribuyen en tubos de rosca en volúmenes de 5 ml.

3.7.6.- Soluciones utilizadas en el ELISA.

3.7.6.1.- Buffer unidor.

* Na ₂ CO ₃	1.59 g
* NaHCO ₃	2.93 g
* Agua bidestilada	1000 ml

Ajustar a p=9.6

3.7.6.2.- Buffer lavador.

* PBS (Tabletas de laboratorios Oxoid)	1000 ml
* Twen 20 (MERCK)	10 ml

3.7.6.3.- Buffer citrato-fosfato.

* Acido cítrico	5.25 g
* Na ₂ HPO ₄	7.09 g
* Agua bidestilada	1000 ml
Ajustar a p=5	

3.7.6.4.- Solución de parada.

* H ₂ SO ₄	133 ml
* Agua bidestilada	867 ml

3.7.7.- Soluciones utilizadas en la IHA.

3.7.7.1. PBG.

* NaPO ₄ (Disodio fosfato)	1.61 g
* K ₂ PO ₄ (Monopotasio fosfato)	0.48 g
* Glucosa	5.4 g
* Agua bidestilada	200 ml
Ajustar a p= 7.2	

Resultados

4.1.- FOCOS DE AGALAXIA CAPRINA ESTUDIADOS.

4.1.1.- Estudio clínico.

En la Tabla nº 4, se expresan los resultados de los focos de Agalaxia Contagiosa caprina estudiados desde el año 1992 a 1995. Los principales síntomas observados en el estudio clínico correspondieron a mamitis y poliartritis, aunque también se presentaron mortalidad perinatal, neumonías y muertes de hembras en gestación. Además, en la explotación nº XII se evidenciaron algunos casos de conjuntivitis.

4.1.2.- Resultados microbiológicos.

De los 29 aislamientos obtenidos (Tabla nº 5), 6 correspondieron a *M. agalactiae* (21.4%), 17 a *M. mycoides subsp. mycoides* (LC) (57.1%), 3 a *M. capricolum subsp. capricolum* (7.1%), 1 a *M. mycoides subsp. capri* (3.5%), 1 a *M. putrefaciens* (3.5%) y 1 a una cepa intermedia entre *M. mycoides subsp. mycoides* y *M. mycoides subsp. capri* (3.5%).

En dos explotaciones, fueron aislados a la vez, dos tipos de micoplasmas produciendo el cuadro clínico (Explotación nºVII y nºXIII). En una de ellas, actuaron conjuntamente *M. mycoides subsp. mycoides* y *M. capricolum subsp. capricolum* (en la nºVII) y en la otra *M. mycoides subsp. mycoides* y *M. agalactiae* (en la nºXIII).

4.1.3.- Resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

La prueba que se le realizó a la cepa de *M. agalactiae* (L9), nos dio como resultado, que realmente se trataba de esta especie de micoplasma, reaccionando

con los primeros sintetizados a partir de la secuencia del ARNr 16S de *M. agalactiae*.

4.2.- INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *M. AGALACTIAE* EN UN LOTE DE SEIS CABRAS.

4.2.1.- Evolución clínica.

De los tres lotes de cabras, sólo presentaron síntomas de mastitis los animales del lote dos (intramamario).

La cabra 4, del lote dos, presentó síntomas de mastitis el día 6 postinoculación, y la cabra 3 del lote dos, presentó síntomas de mastitis el día 8 postinoculación. En ambas, la leche tenía aspecto seroso amarillento con grumos. Ninguna de las cabras, presentó a lo largo de la experiencia, signos de artritis o queratoconjuntivitis, como se describen en los brotes naturales de la enfermedad.

En la cabra 4, la leche pasó a tener apariencia normal hacia el día 115 de la experiencia.

4.2.2.- Datos biopatológicos.

La temperatura de los animales, permaneció estable durante toda la experiencia entre los límites de la normalidad. Los parámetros de bioquímica sanguínea (Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina, calcio, potasio, creatinina, urea, Lactato deshidrogenasa (LDH) y proteínas totales) tampoco sufrieron alteración alguna, lo mismo que la analítica realizada de la serie roja sanguínea, y más concretamente: glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito.

Sin embargo, hemos encontrado unas variaciones muy significativas en los valores analíticos relacionados con las células de la serie blanca hemática.

Glóbulos blancos:

Los valores de los glóbulos blancos, se pueden apreciar en la Tabla nº6, Figura nº1.

El lote 1, se mantuvo dentro de los valores normales hasta el día 105, donde se produjo un ascenso fuera de este margen.

El lote dos, se mantuvo siempre dentro de los valores de normalidad, aunque en la gráfica se aprecian dos elevaciones puntuales, que se corresponden la primera con el día 15 y la otra con el día 120 de la experiencia.

El lote 3, presenta un ascenso que sobrepasa de los valores normales, el día 15 postinoculación, para luego descender, y mantenerse dentro de la normalidad, hasta el día 105, donde se produce otra elevación que, con un pequeño descenso, recupera el valor anterior hacia el día 135.

Al menos aparentemente, podemos reflejar la existencia de dos elevaciones ostensibles en el recuento de leucocitos en las cabras infectadas experimentalmente con *M. agalactiae* (cepa L9), la primera aproximadamente a los 15 días postinoculación, y la segunda, aproximadamente a los 105 días.

Linfocitos:

En todos los lotes, (Tabla nº7, Figura nº 2) podemos observar una marcada linfopenia, que se mantuvo durante toda la experiencia, sin que nos sea posible conocer los valores iniciales, por las razones anteriormente expuestas en el material y métodos.

Aunque la curva que describen los animales de la experiencia, es sinusoidal, no se aprecian variaciones significativas, entre los valores de cada lote.

Neutrófilos:

En la Tabla nº8 y Figura nº3, se observa una marcada neutrofilia, en todos los lotes, que sólo se normaliza, en el lote 1 el día 105 postinoculación, para elevarse nuevamente, y mantenerse así, hasta el final de la experiencia.

También en este caso, parecen describir los animales de todos los lotes, una curva sinusoidal, pero esta vez en sentido decreciente. Los animales, tienden a normalizar el número de neutrófilos en sangre, en el transcurso de la experiencia de inoculación.

Eosinófilos:

Tal como se aprecia en la Tabla nº9, Figura nº4, la curva de eosinófilos fue muy normal para cada lote.

Monocitos:

A partir del día 75, se empieza a producir una monocitosis en los tres lotes que persiste hasta el final esta experiencia.

Como se aprecia en la Tabla nº10, Figura nº5, los tres lotes dibujan una campana de Gauss, que presenta los valores más elevados en el lote 1, con su cifra más alta coincidiendo con el día 105 postinoculación. El lote que presentó los valores más bajos, fue el tercero, mientras el lote 2, se comportó de una forma intermedia entre los lotes anteriores.

4.2.3.- Resultados microbiológicos.

Sólo se reaisló *M. agalactiae* (L9) de las dos cabras del lote 2. Estos

aislamientos se lograron a partir del día 15 postinoculación, hasta el final de la experiencia , y solamente a partir de muestras de leche. En ningún caso, se obtuvo reaislamiento de este microorganismo, a partir de muestras de sangre, secreción nasal u ocular, en los animales objeto de estudio.

4.2.4.- Resultados anatomopatológicos.

En la cabra n°1 (lote inoculado transtraquealmente), macroscópicamente, sólo se pudo observar adherencias pleurales. Microscópicamente, la mama no presentaba cambios histológicos. Únicamente abundantes cuerpos calcificados de Sammona. También se observó traqueitis crónica, neumonía verminosa y linfadenitis eosinofílica.

En la cabra n°2 (lote inoculado transtraquealmente), macroscópicamente, sólo se observó adherencias pleurales y pericárdicas. Microscópicamente, en la mama se observó un moderado infiltrado lifocitario intersticial, con carácter difuso no nodular. El resto de los órganos, no presentó ninguna alteración.

La cabra n°3 (lote intramamario), macroscópicamente, mostró en el tejido mamario, un contenido de color amarillento-marrón, de consistencia densa. Microscópicamente, la mama presentaba una mamitis crónica intersticial linfocitaria (no nodular), con infiltrado periductal linfocitario no nodular. También, se observó *Sarcocystis* en corazón y linfadenitis eosinofílica.

La cabra n°4 (lote intramamario), macroscópicamente evidenció nódulos en pulmón. En la observación microscópica de la mama, no se apreciaron cambios histológicos significativos. También se observó en este animal, una hepatitis granulomatosa eosinofílica.

La cabra n°5 (lote oral), macroscópicamente, presentó un 80% de afección pulmonar con áreas necróticas, implicando tanto al parénquima pulmonar como

a la pleura. Microscópicamente, la mama no presentaba ninguna alteración, aunque mostró hiperplasia colangiolar y fibrosis pericolangiolar hepática, *Sarcocystis* en corazón, bronconeumonía fibrinonecrótica (grave), neumonía granulomatosa parasitaria y linfadenitis eosinofílica.

Después de la obtención de estos datos, se procedió a eliminar este animal de los resultados de la experiencia, al considerar que los valores investigados, podrían presentar amplias variaciones por causa distintas a la inducida por la infección experimental.

La cabra nº 6, macroscópicamente presentó el lóbulo apical pulmonar derecho con consistencia aumentada, y microscópicamente la mama no evidenció cambios histológicos significativos, pero en pulmón se observó una bronconeumonía catarro-purulenta en lóbulo apical.

4.2.5.- Respuesta humoral.

4.2.5.1.- Método de Hemaglutinación Indirecta (IHA).

Con este método, hemos considerado a los animales positivos cuando presentaron títulos iguales o superior a 1/160, dudosos con valores iguales a 1/80 y negativos con valores iguales o menores a 1/40, siguiendo las recomendaciones de CHO y cols., (1975).

Los tres lotes de cabras (Tabla nº11, Figuras nº6, 7 y 8), seroconvirtieron a positivos desde el día 15 postinoculación, manteniéndose en esta condición hasta el final de la experiencia en todos los animales, salvo en tres ocasiones puntuales, en que algunos mostraron valores de 1/80 (dudosos), es el caso del animal nº 2 (lote 1), el día 15 postinoculación, y el animal nº 6 (lote 3) en las extracciones de los días

4.2.5.2.- Método de ELISA indirecto con antígenos elaborados según THIRKELL y cols.(1990).

En esta técnica, hemos utilizado como índice de positividad, el doble del valor de la densidad óptica del suero de un animal comprobado libre de patógenos específicos (SPF), que nos fue remitido por el Dr.JONES (Moredun Research Institute de Edimburgo). La densidad óptica de este suero de referencia fue de 0.169 para *M. agalactiae*, 0.176 para *M. capricolum subsp. capricolum*, y 0.346 para *M. mycoides subsp. mycoides LC*.

Con este método, se comprobó que las dos cabras de cada lote, desarrollaron una respuesta humoral semejante, frente a cada uno de los antígenos empleados en el ELISA indirecto.

4.2.5.2.1.- Con antígeno de *M. agalactiae*.

Como podemos ver en la Tabla nº12, Figuras nº9, las cabras del lote uno, permanecieron negativas durante toda la experiencia, exceptuando la cabra dos que seroconvirtió a positiva el día 30 postinoculación, para luego descender los valores hasta el final.

La cabra 2 de este lote, también muestra una pequeñísima elevación el día 30, para luego descender y mantenerse con valores próximos a 0.2 de densidad óptica hasta el día 135.

En el lote dos, se produjo una seroconversión de las dos cabras sobre el día 15 postinoculación, que describe una campana incluyendo el día 30, donde los valores siguen en la positividad aunque inferiores al día 15 y luego descendieren

para seroconvertir a negativas hacia el día 45. A partir de ahí, permanecen seronegativas hasta el final de la experiencia.

En la Figura n°10 podemos ver que, aunque dentro de valores negativos hay una pequeña elevación en ambas cabras que en la 3 representa una meseta que va desde el día 90 al 105, mientras que para la cabra 4 es una elevación puntual el día 105.

En el último lote, el tres, también se produjo un meseta de seroconversión a positiva en la cabra 6, que va desde el día 15 al 30 postinoculación, a partir de ahí pasa a seroconvertir a negativa y se mantiene así hasta el final.

En la Figura n°11, podemos observar un fenómeno parecido al del lote 2, donde aun estando seronegativas hay una meseta de elevación en la cabra 6, que incluye el día 90 y 105 , y una elevación puntual en la 1 el día 105.

4.2.5.2.2.- Con antígeno de *M. capricolum subsp. capricolum*.

No hubo ningún tipo de reacción, permaneciendo todos los animales negativos durante toda la experiencia. Como se observa en la Tabla n°13, Figuras n°12, 13 y 14, los valores obtenidos durante toda la experiencia, están rondando los valores del suero de referencia libre de patógenos específicos (SPF).

4.2.5.2.3.- Con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides LC*

Al igual que con el anterior, los animales permanecieron negativos (Tabla n°14, Figura n°15, 16 y 17) durante toda la experiencia y los valores obtenidos rondaron los valores del suero testigo negativo (SPF).

4.2.5.3.- Método ELISA indirecto del Doctor Bommeliang.

Curiosamente, los animales de cada lote han descrito curvas muy similares de sus niveles de IgG específicas. Las cabras del lote dos, fueron las primeras en seroconvertir como positivas y con los valores más altos (Tabla n°15, Figura n°19) permaneciendo en ese estado durante más tiempo. El lote que presentó una respuesta más corta, fue el inoculado por vía oral.

Hemos utilizado como índice de positividad, los valores próximos al suero positivo de referencia que incorpora el kit comercial. Este evidenció una densidad óptica de 0.500, por lo que se consideró positivo a partir de 0.400 para el antígeno de *M. agalactiae*.

La cabra 1 (lote 1), se mantuvo seronegativa durante toda la experiencia, exceptuando un pico de seropositividad el día 60 y otro el día 90 postinoculación. La cabra dos de este mismo lote, seroconvirtió a positiva el día 15 postinoculación, hasta el día 135. (Tabla n°15 y Figura n°18).

El lote dos, seroconvierte a positivo el día 15 postinoculación, manteniéndose en este estado hasta el final de la experiencia. Como se observa en la Tabla n°15, Figura n°19, las dos cabras de este lote, ofrecieron en las sucesivas mediciones una curva de IgG muy similar.

En el lote 3, la cabra seis seroconvierte a positiva a partir del día 15 postinoculación, y únicamente el día 60 seroconvierte a negativa, para luego volver a ser seropositiva hasta el final de la experiencia (Tabla n°15 y Figura n°20).

Si atendemos a los resultados, (Tabla n°16 y Figuras n°6 al 20) este método ha sido capaz de detectar menos animales infectados, que la técnica de hemaglutinación indirecta, aunque muchos más que la técnica ELISA según THIRKELL y cols., (1990).

4.3.- PREVALENCIA DE LA INFECCION POR *M. AGALACTIAE* EN GANADO CAPRINO DE GRAN CANARIA, LANZAROTE EL HIERRO.

4.3.1.- Prevalencia en la Isla de Gran Canaria.

En la isla de Gran Canaria, se muestrearon los siguientes municipios: Las Palmas, Telde, Ingenio, Sta. Lucia de Tirajana, San Bartolomé de Tirajana, Agaete, Gáldar, Santa María de Guía, Teror y Santa Brígida.

En total se analizaron 56 explotaciones, localizadas preferentemente, en las zonas costeras de la isla. El número de animales que se analizaron fue 1214, resultando 36 explotaciones positivas, (Tabla nº17) con 107 animales seropositivos a *M. agalactiae*, y 19 explotaciones positivas a *M. m. subsp. mycoides LC*, que engloban 28 animales seropositivos.

Las densidades ópticas oscilaron entre 0.400 y 0.750 para *M. agalactiae*, y entre 0.340 y 0.500 para *M. m. subsp. mycoides LC*.

Se obtuvo una prevalencia del 8.8 % para *M. agalactiae* y de 2.3 % para *M. m. subsp. mycoides LC* en esta isla, como puede apreciarse en las Tablas nº18 y 20, respectivamente.

4.3.2.- Seroprevalencia en la Isla de Lanzarote.

Se muestrearon los municipios de Yaiza, Tías, San Bartolomé, Arrecife, Teguiise y Tinajo.

Se tomaron muestras de sangre de 562 cabras, procedentes de 64 explotaciones. Resultaron seropositivas a la técnica ELISA, con antígeno de *M. agalactiae*, 26 explotaciones (Con un total de 40 animales positivos) y, 8

explotaciones positivas empleando antígeno de *M. m. subsp. mycoides LC* (Con un total de 8 animales positivos), como puede apreciarse en las Tablas nº22 y 24, respectivamente.

La prevalencia resultante es de 7.1 % para *M. agalactiae*, y de 1.4 % para *M. m. subsp. mycoides LC*, como se puede apreciar en las Tablas nº22 y 24, respectivamente.

4.3.3.- Seroprevalencia en la Isla del Hierro.

Se muestrearon los dos municipios de la isla (Frontera y Valverde).

Fueron estudiadas 66 cabras, procedentes de 12 explotaciones. Como se observa en las Tablas nº26 y 28, respectivamente, obtuvimos 11 explotaciones positivas a la infección por *M. agalactiae* (con un total de 36 animales positivos), y 8 explotaciones positivas a *M. m. subsp. mycoides LC* (con un total de 29 animales positivos), las densidades ópticas obtenidas oscilaron de 0.400 a 0.567 para la técnica utilizando antígeno de *M. agalactiae* y entre 0.340 y 0.504 para *M. m. subsp. mycoides LC*. La prevalencia para la infección por *M. agalactiae* se situó en 54.5 % y para *M. m. subsp. mycoides LC* fue de un 43.9 %.

Tablas y Figuras

Tabla n° 1.- Primers de PCR utilizados para la detección de *M. agalactiae*.

Especie	Secuencia
<i>M. agalactiae</i>	Maga 2F 5' GAAGAAAAAG TAGCGTAGGA AATGAC 3'
	Maga 2B 5' TGGGAGGAAG GTAGGGACGA CG 3'

Tabla n° 2.- Codiciones usadas para amplificación in vitro de los fragmentos del 16S rRNA de *M. agalactiae*.

PASOS DEL PCR	M. AGALACTIAE
Calor al principio (antes de añadir la polimerasa)	94 °C durante 1 minuto
Desnaturalización	94 °C durante 45 segundos
Alineación	60 °C durante 1 minuto
Extensión	72 °C durante 2 minutos
Ciclos	30

Tabla nº 3.- Dosis y vías de inoculación de *M. agalactiae*(L9) en las cabras de la experiencia.

LOTE	CABRA Nº	VIA DE INOCULACION	DOSIS INOCULADA
1	1	* intratraqueal	10 ⁸ ufc
	2	* intratraqueal	10 ⁸ ufc
2	3	* intramamaria	10 ⁸ ufc
	4	* intramamaria	10 ⁸ ufc
3	5	* oral	10 ¹⁰ ufc
	6	* oral	10 ¹⁰ ufc

Tabla nº 4.- Focos de Agalaxia Contagiosa estudiados en cada explotación anualmente.

EXPLOTACION Nº	MUNICIPIO cepa (origen)	AÑO	SISTEMA DE EXPLOTACION	Nº DE ANIMALES/ ANIMALES ANALIZADOS	SINTOMAS
I	Teror L9/92 (leche) R6 (riñón)	92	Semiextensiva	140/9	* mamitis agudas * agalaxia * neumonías * mortalidad de hembras gestantes
II	64/92 (hígado)	92	Semiextensiva	7/1	* neumonías * mortalidad perinatal
III	78/92 (articulación)	92	Semiextensiva	7/1	* poliartritis * neumonía
IV	Telde 80X ₃ /92 (leche)	92	Semiextensiva	500/3	* mamitis crónicas
V	La Aldea 93/92 (leche)	92	Semiextensiva	800/1	* mamitis crónicas * abortos
VI	La Aldea 151/92 (articulación)	92	Intensivo	1200/1	* poliartritis
VII	Tafira 87I (leche) cg y cp 7/93 (leche) 596II (leche) 193I (leche)	92/93	Semiextensiva	500/4	* mamitis crónicas * abortos
VIII	Aruca 83/93 95/93 (articulación)	93	Semiextensivo	50/3	* poliartritis * mortalidad perinatal

IX	Fuerteventura a 98/93 (leche)	93		/1	* mamitis
X	La Aldea 136/93 (leche)	93	Semiextensiva	100/2	* mamitis
I	Teror 152/93 (leche)	93	Semiextensiva	60/10	* mamitis * agalaxia * abortos
XI	Tenoya 153/93 (leche)	93	Semiextensiva	50/3	* mamitis crónicas * agalaxia * mortalidad perinatal
XII	San Mateo 266/94 (articulación)	94	Semiextensiva	180/1	* neumonías * poliartritis * conjuntivitis * abortos
XIII	Telde 1/95 (leche) 10/95 (articulación) 24/95 (pulmón) 25/95 (pulmón) 77/95 (pulmón) 105/95 (fosa nasal y conducto auditivo externo)	95	Semiextensiva	200/14	* mamitis crónicas * neumonías * poliartritis * mortalidad perinatal * mortalidad de hembras gestantes
VI	La Aldea 83/95 (hígado y bazo)	95	Intensivo	1200/1	
XIV	Los Giles 87/95 (articulación y ganglios)	95	Semiextensiva	/1	* poliartritis

XV	Valverde (El Hierro) 97/95 (placenta)	95	Semiextensiva	100/6	<ul style="list-style-type: none"> * mamitis * poliartritis * abortos * mortalidad perinatal * mortalidad de hembras gestantes
XVI	Galdar 130/95 (articulación)	95	Semiextensiva	75/1	<ul style="list-style-type: none"> * mamitis * poliartritis * mortalidad perinatal

Tabla nº 5.- Perfil bioquímico e identificación serológica de los micoplasmas aislados.

cepa-expl. n°	sensibilidad digitonina	reducción tetrazolium ac/an (*)	ferment. glucosa	hidrólisis arginina	hidrólisis urea	actividad fosfatasa	producción de películas y cristales	Inhibición del crecimiento	Inhibición del metabolismo
19/92 R6-I	+	+/+	-	-	-	+	+	M. agalactiae	M. agalactiae
64/92-II	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subsp. mycoides LC
78/92-III	+	+/+	+	+	-	+	-	M. capricolum subsp. capricolum	M. capricolum subsp. capricolum
80X ₉ /92-IV	+	+/+	+	-	-	-	-	A. laidlawii	M.m.subsp. mycoides LC
93/92-V	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC M.m.subsp. capri	M.m.subsp. capri
151/92-VI	+	+/+	+	-	-	+	+	M. putrefaciens	M. putrefaciens

87I c.p.- VII	+	+/+	+	+	-	+	-	M.m.subsp. capri M. capricolum subsp. capricolum	M. capricolu m subsp. capricolu m
87I c.g.- VII	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
7/93- VII	+	+/+	+	-	-	+	-	M.m.subsp. capri M. capricolum subsp. capricolum	M. capricolu m subsp. capricolu m
5964I- VII	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
193I- VII	+	+/+	+	-	-	-	-	-	Intermedia entre M.m.subs p. mycoides LC y M.m.subs p. capri
83/93 95/93- VIII	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
98/93- IX	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
136/ 93-X	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC

152/ 93-I	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
153/ 93-XI	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
266/ 94- XII	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
24/95 25/95 77/95- XIII	+	+/+	-	-	-	+	+	M. agalactiae	M. agalactiae
1/95 10/95 105/ 95- XIII	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
83/95- VI	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
87/95- XIV	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC
97/95- XV	+	+/+	-	-	-	+	+	M. agalactiae	M. agalactiae
130/ 95- XVI	+	+/+	+	-	-	-	-	M.m.subsp. mycoides LC	M.m.subs p. mycoides LC

* aerobiosis/ anaerobiosis

Tabla n° 6.- Glóbulos blancos totales en los animales de la experiencia.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N° 1	CABRA N° 2	CABRA N° 3	CABRA N° 4	CABRA N° 6
DÍA 0	5.1	7.2	11	5.5	9.8
DÍA 15	13.8	6	11.7	7.6	16.2
DÍA 30	13.8	6	11.7	7.6	11.5
DÍA 45					
DÍA 60					
DÍA 75	12.4	8.7	11.4	9.7	7.4
DÍA 90	9.6	8.1	11	8.9	11.2
DÍA 105	27	10.5	9.7	8.6	12.4
DÍA 120	10.3	7.2	12.2	8.9	14.1
DÍA 135	8.7	9.2	8.3	8.5	12.3

* Valor normal = $4-13 \times 10^9/\mu\text{l}$

Tabla n° 7.- Proporción de linfocitos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N°1	CABRA N°2	CABRA N°3	CABRA N°4	CABRA N°6
DÍA 45	9	12	18	30	15
DÍA 60	12	23	27	32	20
DÍA 75	20	41	20	40	37
DÍA 90	28	41	24	35	32
DÍA 105	37	26	27	32	30
DÍA 120	23	37	24	33	29
DÍA 135	34	42	30	40	26

Valor normal = 50-70 %

Tabla n° 8.- Proporción de neutrófilos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N°1	CABRA N°2	CABRA N°3	CABRA N°4	CABRA N°6
DÍA 45	91	88	82	70	82
DÍA 60	88	70	68	68	78
DÍA 75	79	59	75	60	63
DÍA 90	68	55	62	58	68
DÍA 105	60	42	65	63	65
DÍA 120	65	53	60	63	63
DÍA 135	60	47	60	51	61

* Valores normales= 30-45 %

Tabla n° 9.- Porcentaje de eosinófilos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N°1	CABRA N°2	CABRA N°3	CABRA N°4	CABRA N°6
DÍA 45	0	0	0	0	0
DÍA 60	0	7	5	0	2
DÍA 75	1	0	5	0	0
DÍA 90	1	1	3	2	0
DÍA 105	0	2	0	0	0
DÍA 120	0	2	2	0	1
DÍA 135	0	1	0	0	3

* Valores normales= 0-8 %

Tabla n°10.- Proporción de monocitos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N°1	CABRA N°2	CABRA N°3	CABRA N°4	CABRA N°6
DÍA 45	0	0	0	0	0
DÍA 60	0	0	0	0	0
DÍA 75	0	0	0	0	0
DÍA 90	3	20	11	5	0
DÍA 105	3	30	8	5	5
DÍA 120	12	8	14	4	7
DÍA 135	6	10	10	9	10

* Valores normales = 0-4 %

Tabla nº 11.- Resultados de la técnica de la Hemaglutinación Indirecta.

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA Nº1	CABRA Nº2	CABRA Nº3	CABRA Nº4	CABRA Nº6
DÍA 15	1/160	1/80	1/1280	1/640	1/320
DÍA 30	1/160	1/160	1/1280	1280	1/160
DÍA 45	1/160	1/640	1/1280	1/640	1/160
DÍA 60	1/320	1/320	1/1280	1/640	1/160
DÍA 75	1/160	1/160	1/1280	1/1280	1/80
DÍA 90	1/160	1/320	1/1280	1/1280	1/160
DÍA 105	1/160	1/160	1/1280	1/640	1/80
DÍA 120	1/160	1/160	1/640	1/640	1/160
DÍA 135	1/160	1/320	1/1280	1/640	1/160

* Resultado positivo 1/160

* Dudoso = 1/80

* Negativo 1/40

Tabla nº 12.- Resultados de la técnica ELISA según THIRKELL y cols.,(1990) con antígeno de *M. agalactiae* (d.o.).

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA Nº1	CABRA Nº2	CABRA Nº3	CABRA Nº4	CABRA Nº6
DÍA 15	0.317	0.306	0.678	0.631	0.390
DÍA 30	0.331	0.369	0.554	0.513	0.374
DÍA 45	0.224	0.245	0.312	0.272	0.203
DÍA 60	0.249	0.251	0.293	0.241	0.223
DÍA 75	0.210	0.232	0.257	0.239	0.214
DÍA 90	0.224	0.285	0.308	0.267	0.274
DÍA 105	0.234	0.242	0.302	0.295	0.279
DÍA 120	0.221	0.264	0.258	0.261	0.254
DÍA 135	0.225	0.250	0.250	0.268	0.260

* Valor positivo 0.338

TESTIGO POSITIVO	0.576	TESTIGO NEGATIVO	0.169
------------------	-------	------------------	-------

Tabla nº 13.- Resultados de la técnica ELISA según THIRKELL y cols., (1990) con antígeno de *M. capricolum* (d.o.).

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA N°1	CABRA N°2	CABRA N°3	CABRA N°4	CABRA N°6
DÍA 15	0.140	0.166	0.219	0.219	0.166
DÍA 30	0.143	0.147	0.167	0.165	0.130
DÍA 45	0.165	0.146	0.163	0.159	0.145
DÍA 60	0.140	0.138	0.160	0.141	0.148
DÍA 75	0.139	0.139	0.124	0.156	0.149
DÍA 90	0.130	0.134	0.122	0.141	0.153
DÍA 105	0.133	0.135	0.151	0.146	0.156
DÍA 120	0.138	0.155	0.161	0.161	0.145
DÍA 135	0.146	0.189	0.163	0.180	0.213

* Valor positivo 0.352

TESTIGO POSITIVO	0.691	TESTIGO NEGATIVO	0.176
------------------	-------	------------------	-------

Tabla nº 14.- Resultados de la técnica ELISA según THIRKELL y cols., (1990) con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* (d.o.).

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA Nº1	CABRA Nº2	CABRA Nº3	CABRA Nº4	CABRA Nº6
DÍA 15	0.437	0.273	0.353	0.445	0.371
DÍA 30	0.370	0.262	0.351	0.362	0.328
DÍA 45	0.400	0.239	0.292	0.296	0.230
DÍA 60	0.380	0.260	0.338	0.286	0.228
DÍA 75	0.333	0.244	0.187	0.313	0.240
DÍA 90	0.294	0.227	0.305	0.296	0.221
DÍA 105	0.288	0.207	0.306	0.332	0.263
DÍA 120	0.302	0.251	0.320	0.310	0.227
DÍA 135	0.298	0.289	0.374	0.353	0.314

* Valor positivo 0.692

TESTIGO POSITIVO	0.861	TESTIGO NEGATIVO	0.346
------------------	-------	------------------	-------

Tabla nº 15.- Resultados de la técnica ELISA del Dr. Bommeliang (d.o.).

DÍA DE LA EXPERIENCIA	ANIMALES DE LA EXPERIENCIA				
	CABRA Nº1	CABRA Nº2	CABRA Nº3	CABRA Nº4	CABRA Nº6
DÍA 15	0.299	0.446	0.743	0.506	0.581
DÍA 30	0.295	0.503	0.667	0.489	0.523
DÍA 45	0.294	0.458	0.755	0.604	0.543
DÍA 60	0.489	0.506	0.884	0.540	0.382
DÍA 75	0.385	0.701	0.974	0.605	0.476
DÍA 90	0.408	0.549	0.870	0.613	0.466
DÍA 105	0.355	0.500	0.833	0.606	0.471
DÍA 120	0.375	0.544	0.727	0.478	0.517
DÍA 135	0.334	0.405	0.734	0.513	0.480

* Valor positivo 0.400

TESTIGO POSITIVO	0.500	TESTIGO NEGATIVO	0.170
------------------	-------	------------------	-------

Tabla n° 16.- Animales seropositivos detectados según la técnica utilizada.

Día de la experiencia	IHA según Cho	ELISA según Thirkell	ELISA del Dr. Bommeliang
15	4	3	4
30	5	4	4
45	5	0	4
60	5	0	4
75	4	0	4
90	5	0	5
105	4	0	4
120	5	0	4
135	5	0	4

TOTAL	42	7	37
--------------	-----------	----------	-----------

Tabla nº17.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. agalactiae* en la Isla de Gran Canaria.

Nº de explotación	Municipio	Nº total de animales	Nº de animales muestreados	Animales positivos	% de positividad
1	Santa Lucía	800	35	7	20%
2	Las Palmas	500	25	6	24%
3	La Aldea	500	30	8	26.7%
4	Santa Lucía	300	23	5	21.7%
5	Teror	140	32	5	15.6%
6	Agacte	140	13	2	15.4%
7	Agacte	39	5	1	20%
8	Agacte	19	5		
9	Agacte	20	3		
10	Agacte	28	5	2	40%
11	Agacte	74	10		
12	Agacte	100	10	2	20%
13	Agacte	65	5	2	40%
14	Agacte	50	6	2	33.3%
15	Galdar	12	3		
16	Galdar	24	5		
17	Galdar	85	9	2	22.2%
18	Galdar	24	3		
19	Galdar	40	4	1	25%
20	Galdar	104	9		
21	Telde	250	18	3	16.7%

22	Telde	160	11	1	9.1%
23	Telde	88	9		
24	Telde	69	7		
25	Telde	104	9	1	11.1%
26	Telde	13	4		
27	Telde	111	12	1	8.3%
28	La Aldea	1300	65	1	1.5%
29	Telde	30	5		
30	Santa Lucía	300	19	1	5.3%
31	Telde	19	4		
32	Telde	20	5	1	20%
33	Las Palmas	150	13	1	7.7%
34	Telde	190	17		
35	Telde	300	14	2	14.3%
36	Telde	500	33	1	3%
37	Ingenio	300	17	2	11.8%
38	Santa Lucía	250	18		
39	San Bartolomé de Tirajana	300	20	6	30%
40	San Bartolomé de Tirajana	500	6		
41	San Bartolomé de Tirajana	250	17	2	11.8%
42	San Bartolomé de Tirajana	1300	17	3	17.6%
43	San Bartolomé de Tirajana	200	16	1	6.2%
44	La Aldea	793	175	11	6.3%
45	Telde	50	7	1	14.3%
46	Guia	50	6		
47	La Aldea	280	16	5	31.2%
48	San Bartolomé de Tirajana	25	4	2	50%
49	San Bartolomé de Tirajana	50	16	3	18.7%
50	Galdar	57	5		

51	Agacete	140	13		
52	San Bartolomé de Tirajana	250	17	5	29.4%
53	San Bartolomé de Tirajana	110	11	1	9.1%
54	San Bartolomé de Tirajana	150	12	4	33.3%
55	La Aldea	100	18		
56	La Aldea	100	10	3	30%

Tabla nº18.- Seroprevalencia de *M. agalactiae* en la Isla de Gran Canaria.

MUNICIPIO	Nº DE EXPLOTACIONES ANALI/POSI	Nº DE ANIMALES ANAL/POSI	% DE ANIMALES POSITIVOS
Las Palmas	2/2	38/7	18.4%
Telde	17/8	155/11	7.1%
Ingenio	1/1	17/2	11.7%
Sta. Lucía	4/3	95/13	13.6%
San Bartolomé	10/9	136/27	19.8%
La Aldea	6/5	314/28	8.9%
Agacete	10/6	75/11	14.7%
Galdar	7/2	346/3	0.9%
Guía	1/0	1/0	0_%
Teror	1/1	32/5	15.6%
TOTAL	56/36	1214/107	8.8%

Tabla n°19.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. mycoides subesp. mycoides LC* en la Isla de Gran Canaria.

N° de explotación	Municipio	N° total de animales	N° de animales muestreados	Animales positivos	% de positividad
1	Santa Lucía	800	35	1	2.8%
2	Las Palmas	500	25		
3	La Aldea	500	30		
4	Santa Lucía	300	23	2	8.7%
5	Teror	140	32	1	3.1%
6	Agacete	140	13	3	23.1%
7	Agacete	39	5	1	20%
8	Agacete	19	5		
9	Agacete	20	3		
10	Agacete	28	5		
11	Agacete	74	10	2	20%
12	Agacete	100	10		
13	Agacete	65	5		
14	Agacete	50	6		
15	Galdar	12	3		
16	Galdar	24	5		
17	Galdar	85	9		
18	Galdar	24	3		
19	Galdar	40	4		
20	Galdar	104	9	2	22.2%
21	Telde	250	18	1	5.5%
22	Telde	160	11	2	18.2%
23	Telde	88	9		
24	Telde	69	7		

25	Telde	104	9		
26	Telde	13	4		
27	Telde	111	12		
28	La Aldea	1300	65	1	1.5%
29	Telde	30	5		
30	Santa Lucía	300	19		
31	Telde	19	4		
32	Telde	20	5		
33	Las Palmas	150	13		
34	Telde	190	17		
35	Telde	300	14		
36	Telde	500	33		
37	Ingenio	300	17		
38	Santa Lucía	250	18	1	5.5%
39	San Bartolomé de Tirajana	300	20		
40	San Bartolomé de Tirajana	500	6		
41	San Bartolomé de Tirajana	250	17		
42	San Bartolomé de Tirajana	1300	17	1	5.9%
43	San Bartolomé de Tirajana	200	16	1	6.2%
44	La Aldea	793	175	3	1.7%
45	Telde	50	7	1	14.3%
46	Guia	50	6		
47	La Aldea	280	16	1	6.2%
48	San Bartolomé de Tirajana	25	4		
49	San Bartolomé de Tirajana	250	16	1	6.2%
50	Galdar	57	5		
51	Agate	140	13		
52	San Bartolomé de Tirajana	250	17	2	11.8%
53	San Bartolomé de Tirajana	110	11		

54	San Bartolomé de Tirajana	150	12		
55	La Aldea	100	18		
56	La Aldea	100	10	1	10%

Tabla n°20.- Seroprevalencia de la infección por *M. mycoides subsp. mycoides LC* en la Isla de Gran Canaria.

MUNICIPIO	N° DE EXPLOTACIONES ANALI/POSI	N° DE ANIMALES ANAL/POSI	% DE ANIMALES POSITIVOS
Las Palmas	2/0	38/0	0%
Telde	17/3	155/4	2.6%
Ingenio	1/0	17/0	0%
Sta. Lucía	4/3	95/4	4.2%
San Bartolomé	10/4	136/5	3.7%
La Aldea	6/4	314/6	1.9%
Agate	10/3	75/6	8%
Galdar	7/1	346/2	0.6%
Guía	1/0	1/0	0%
Teror	1/1	32/1	3.1%
TOTAL	56/19	1214/28	2.3%

Tabla nº21.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. agalactiae* en la isla de Lanzarote.

Municipio	Nº de explotación	nº de animales muestreados	nº de animales positivos	% de positividad
Yaiza	1	5	1	20%
	2	5	1	20%
	3	9	2	22.2%
	4	23	1	4.3%
	5	9	1	11.1%
	6	7	2	28.6%
	7	3	1	33.3%
	8	2	1	50%
	9	3		
	10	5		
	11	24	3	12.5%
	12	10	1	10%
Tías	1	7		
	2	5		
	3	3		
	4	5		
Arrecife	1	9		
	2	14		
	3	5		
	4	2		
	5	5		
	6	44		
	7	2		

San Bartolomé	1	7	2	28.6%
	2	11		
	3	8		
Tinajo	1	3		
	2	5	1	20%
	3	2		
	4	3		
	5	2		
	6	3		
	7	2		
	8	8	1	12.5%
	9	7	1	14.3%
	10	5		
	11	4	1	25%
	12	2		
	13	2	1	50%
	14	2		
	15	4		
	16	11	1	9.1%
	17	3		
	18	3	1	33.3%
	19	7		
	20	3	1	33.3%
Teguisse	1	86	8	
	2	15	1	6.7%
	3	8		
	4	4		
	5	22		
	6	12	1	8.3%

7	6		
8	5		
9	12	2	16.7%
10	23		
11	2		
12	2		
13	7	2	28.6%
14	3		
15	3		
16	25	1	4%
17	11	1	9.1%
18	7		

Tabla nº22.- Seroprevalencia de *M. agalactiae* en la Isla de Lanzarote.

MUNICIPIO	Nº DE EXPLOTACIONES ANAL/POSIT	Nº DE ANIMALES ANAL/POSIT	% ANIMALES POSITIVOS
YAIZA	12/10	104/14	13.5%
TIAS	4/0	20/0	0
ARRECIFE	7/0	81/0	0
SAN BARTOLOME	3/1	26/2	7.7%
TINAJO	20/8	78/8	10.2%
TEGUISE	18/7	256/16	6.2%
TOTAL	64/26	562/40	7.1%

Tabla n°23.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. mycoides subesp. mycoides LC* en la Isla de Lanzarote.

Municipio	N° de explotación	n° de animales muestreados	n° de animales positivos	% de positividad
Yaiza	1	5	1	20%
	2	5		
	3	9		
	4	23		
	5	9		
	6	7		
	7	3		
	8	2		
	9	3		
	10	5		
	11	24	1	4.2%
	12	10	1	10%
Tías	1	7		
	2	5		
	3	3		
	4	5		
Arrecife	1	9		
	2	14		
	3	5		
	4	2		
	5	5		
	6	44		
	7	2		

San Bartolomé	1	7		
	2	11		
	3	8	1	12.5%
Tinajo	1	3		
	2	5		
	3	2		
	4	3		
	5	2		
	6	3		
	7	2		
	8	8		
	9	7		
	10	5		
	11	4		
	12	2		
	13	2		
	14	2		
	15	4		
	16	11	1	9.1%
	17	3		
	18	3	1	33.3%
	19	7		
	20	3		
Teguise	1	86	1	1.2%
	2	15		
	3	8		
	4	4		
	5	22	1	4.5%
	6	12		

7	6		
8	5		
9	12		
10	23		
11	2		
12	2		
13	7		
14	3		
15	3		
16	25		
17	11		
18	7		

Tabla n°24.- Seroprevalencia de *M. mycoides subsp. mycoides* LC en la Isla de Lanzarote.

MUNICIPIO	N° DE EXPLOTACIONES ANAL/POSIT	N° DE ANIMALES ANAL/POSIT	% ANIMALES POSITIVOS
YAIZA	12/3	104/3	2.9%
TIAS	4/0	20/0	0
ARRECIFE	7/0	81/0	0
SAN BARTOLOME	3/1	26/1	3.8%
TINAJO	20/2	78/2	2.6%
TEGUISE	18/2	256/2	0.8%
TOTAL	64/8	562/8	1.4%

Tabla n°25.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. agalactiae* en la Isla del Hierro.

Municipio	N° de explotación	n° de animales muestreados	n° de animales positivos	% de positividad
Valverde	1	3	3	100%
	2	9	7	77.8%
	3	4	0	
	4	4	3	75%
	5	7	2	28.6%
	6	7	6	85.7%
Frontera	1	10	4	40%
	2	5	4	80%
	3	5	3	60%
	4	5	2	40%
	5	4	1	25%
	6	3	1	33.3%

Tabla n°26.- Seroprevalencia de *M. agalactiae* en la Isla del Hierro.

MUNICIPIO	N° DE EXPLOTACIONES ANAL/POSIT	N° DE ANIMALES ANAL/POSIT	% ANIMALES POSITIVOS
VALVERDE	6/5	34/21	61.7%
FRONTERA	6/6	32/15	46.8%
TOTAL	12/11	66/36	54.5%

Tabla n°27.- Resultados serológicos por explotaciones frente a la infección por *M. mycoides subesp. mycoides LC* en la Isla del Hierro.

Municipio	Nº de explotación	nº de animales muestreados	nº de animales positivos	% de positividad
Valverde	1	3	2	66.7%
	2	9	2	22.2%
	3	4	4	100%
	4	4	4	100%
	5	7	0	
	6	7	0	
Frontera	1	10	1	10%
	2	5	2	40%
	3	5	2	40%
	4	5	2	40%
	5	4	0	
	6	3	0	

© Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Biblioteca Digital. 2004

Tabla n°28.- Seroprevalencia de *M. mycoides subsp. mycoides LC* en la Isla del Hierro

MUNICIPIO	Nº DE EXPLOTACIONES ANAL/POSIT	Nº DE ANIMALES ANAL/POSIT	% ANIMALES POSITIVOS
VALVERDE	6/4	34/12	35.2%
FRONTERA	6/4	32/7	21.8%
TOTAL	12/8	66/29	43.9%

Figura n°1 Glóbulos blancos totales en los animales de la experiencia.

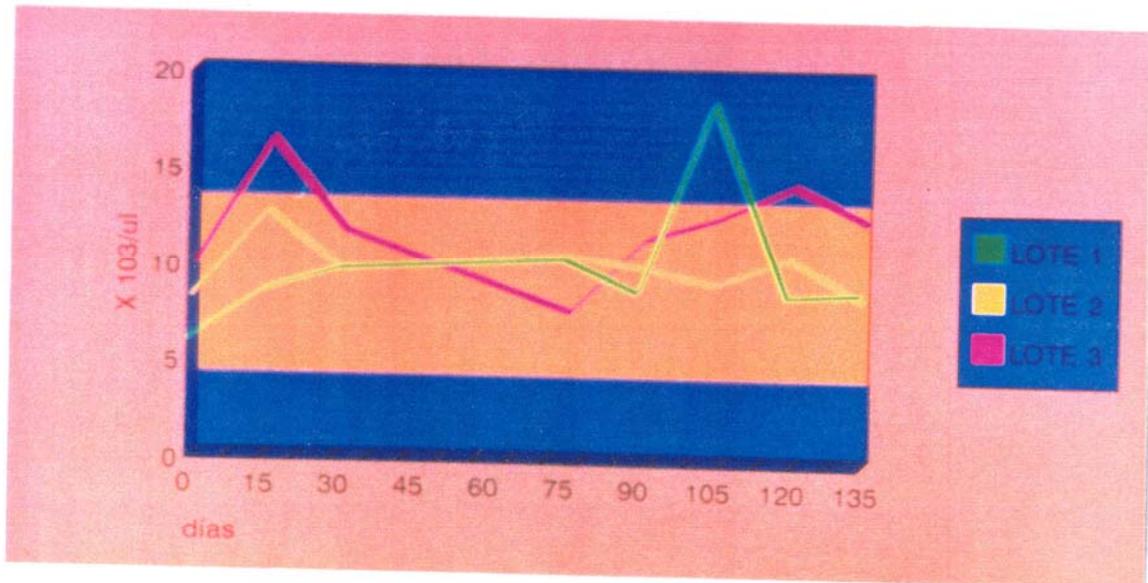


Figura n°2 Proporción de linfocitos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

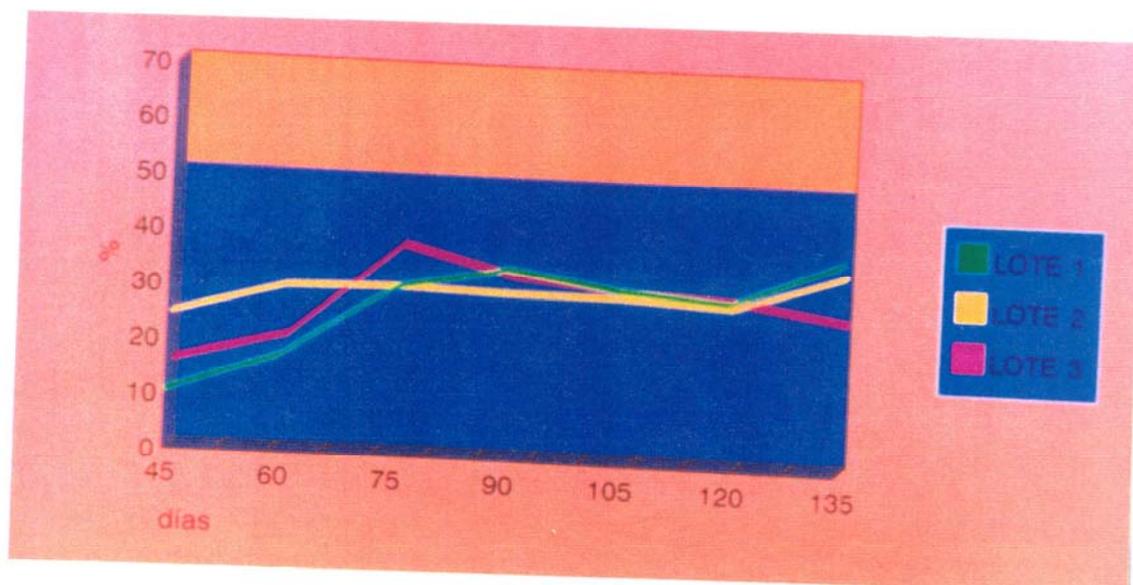


Figura n°3 Proporción de neutrófilos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

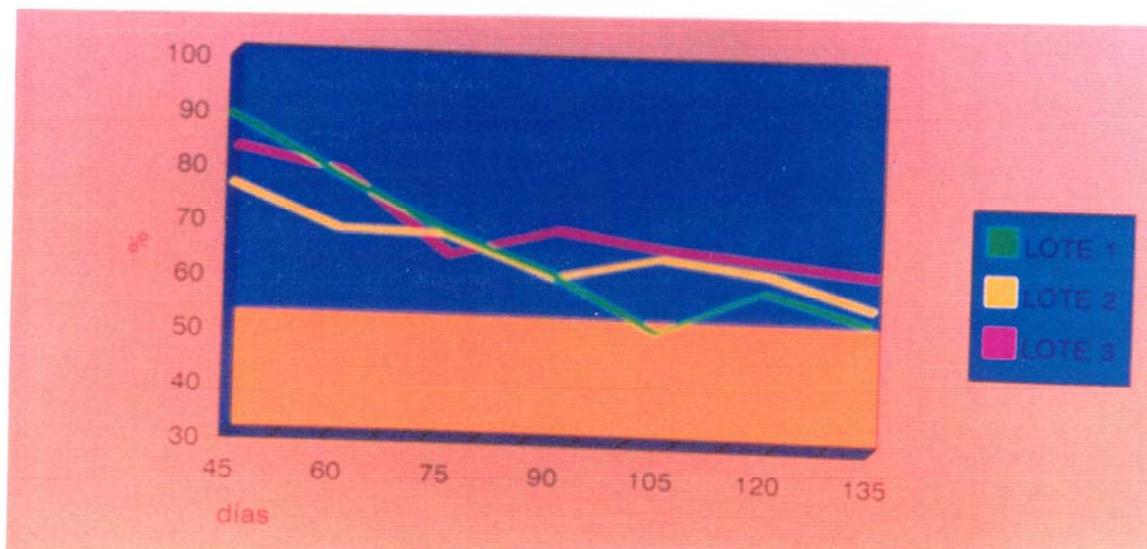


Figura n°4 Proporción de eosinófilos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

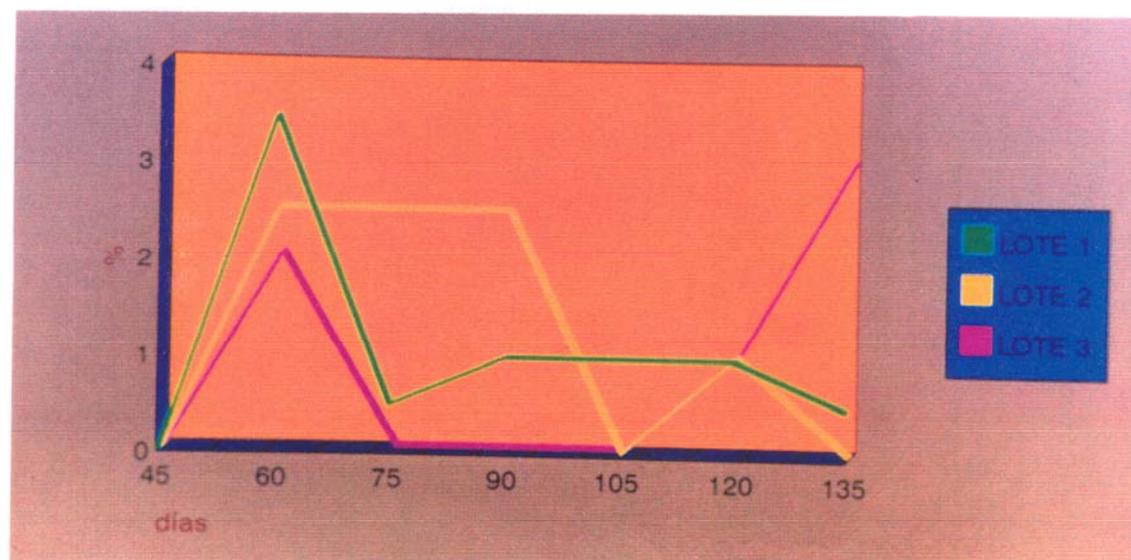


Figura nº5 Proporción de monocitos en los distintos análisis a lo largo de la experiencia.

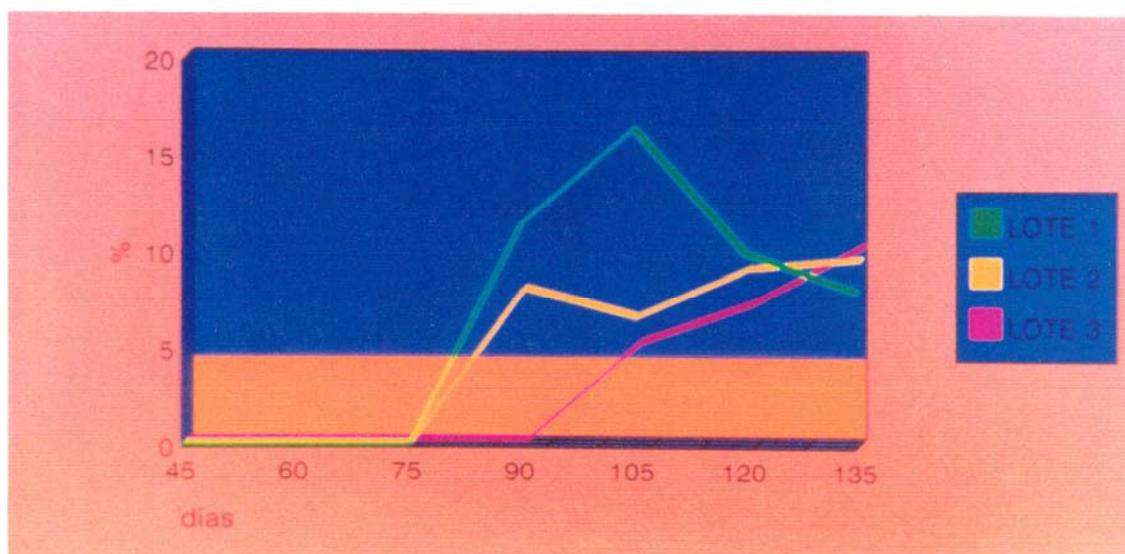


Figura n°6.- Técnica de Hemaglutinación Indirecta en el lote de cabras n° 1

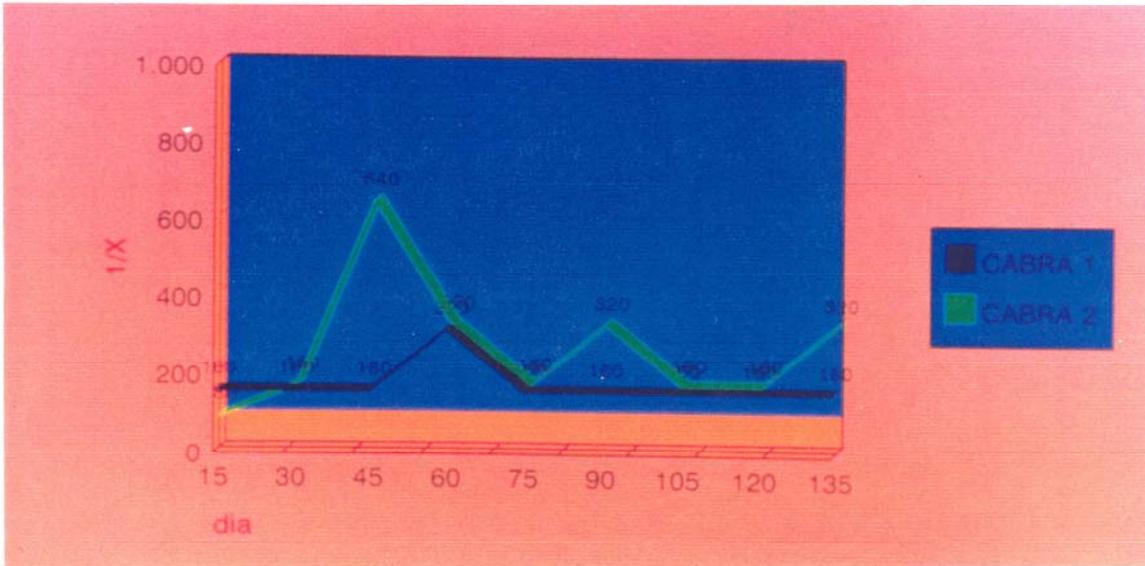


Figura n°7 Técnica de Hemaglutinación Indirecta en el lote de cabras n° 2

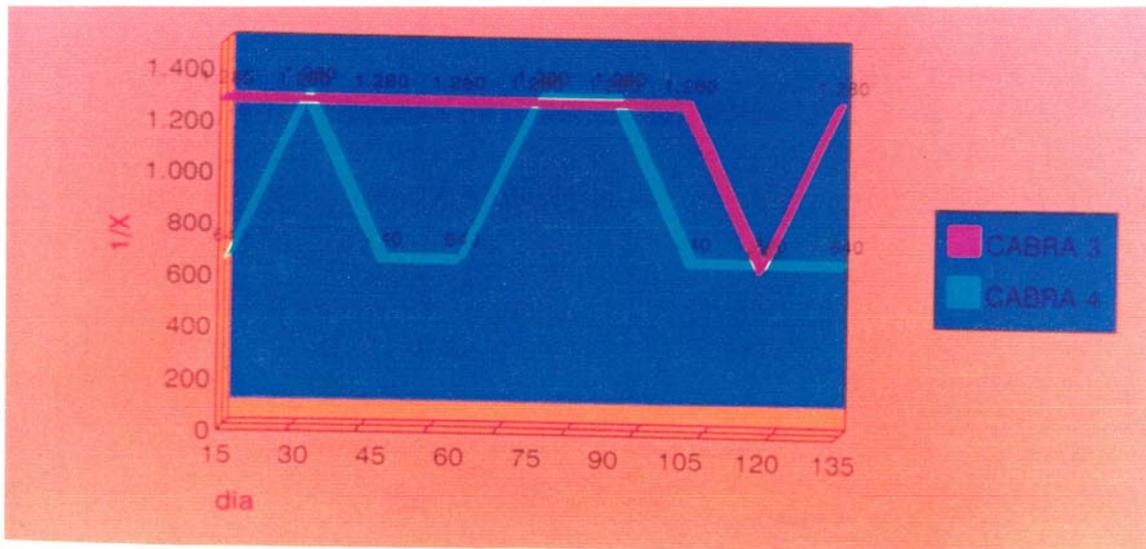


Figura nº8 Técnica de Hemaglutinación Indirecta en el lote de cabras nº 3.

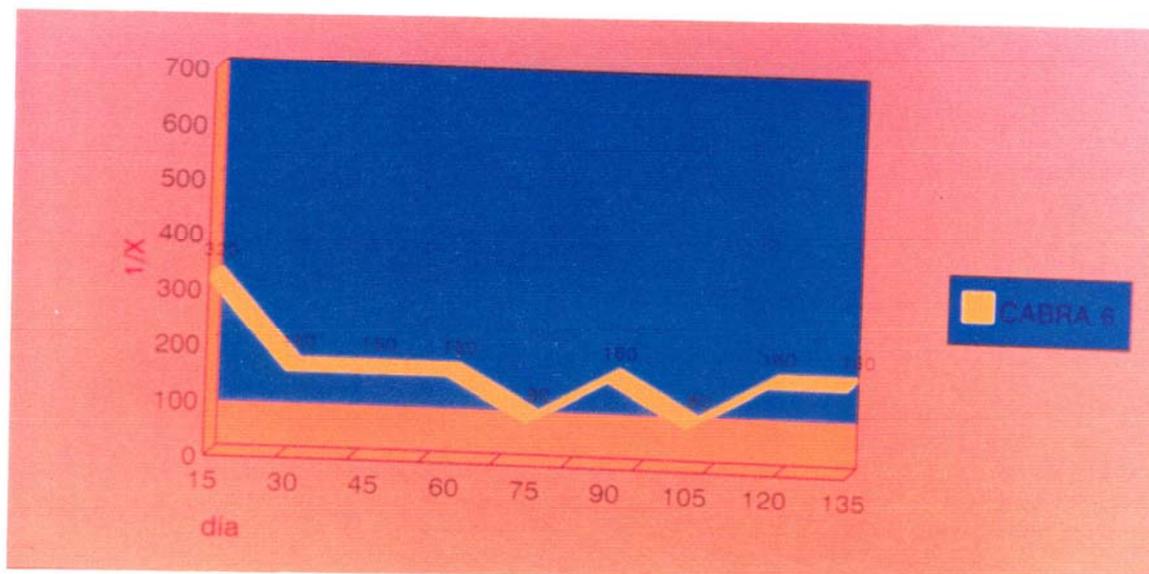


Figura n°9 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. agalactiae*, en el lote de cabras n°1.

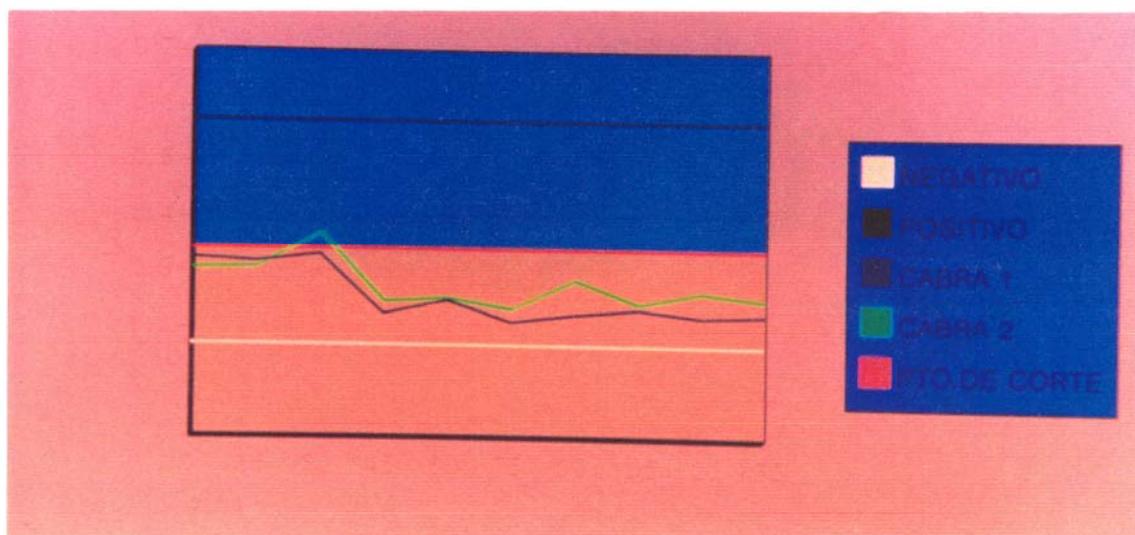


Figura n°10 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. agalactiae*, en el lote de cabras n°2.

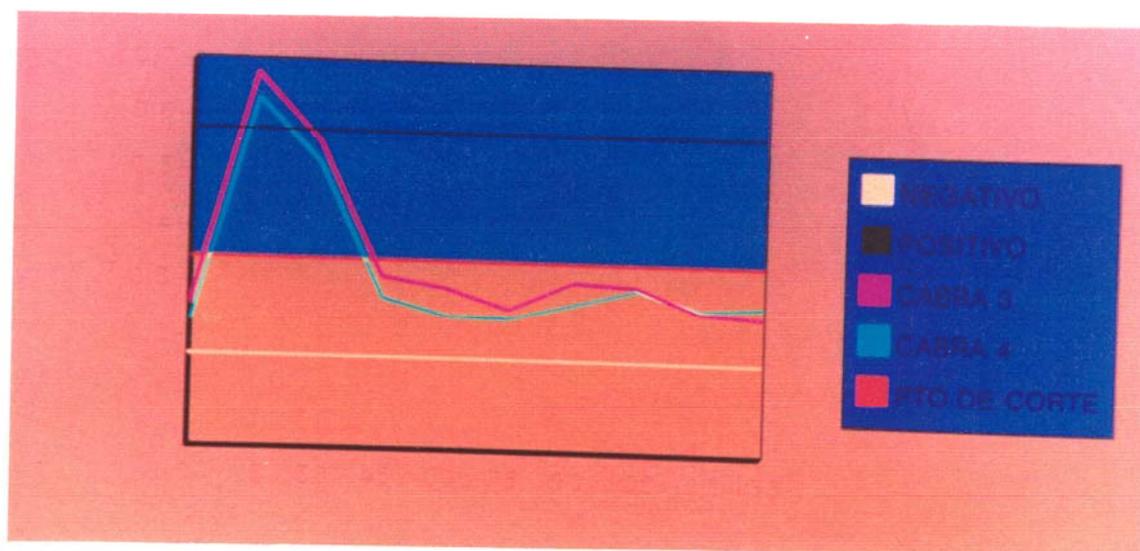


Figura nº11 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. agalactiae*, en el lote de cabras nº3.

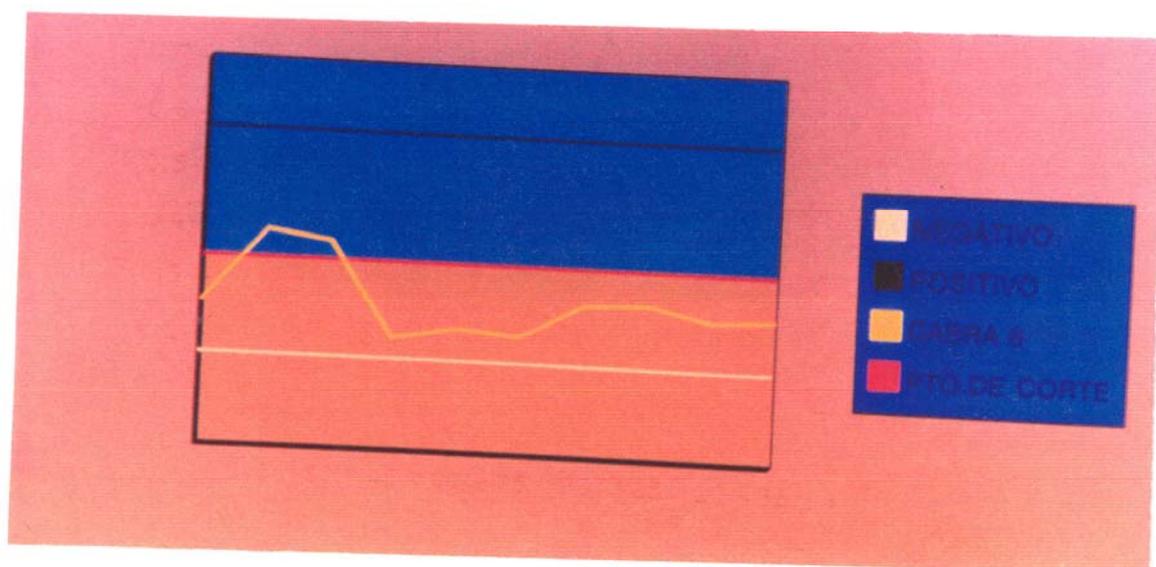


Figura nº12 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. capricolum*, en el lote de cabras nº1.

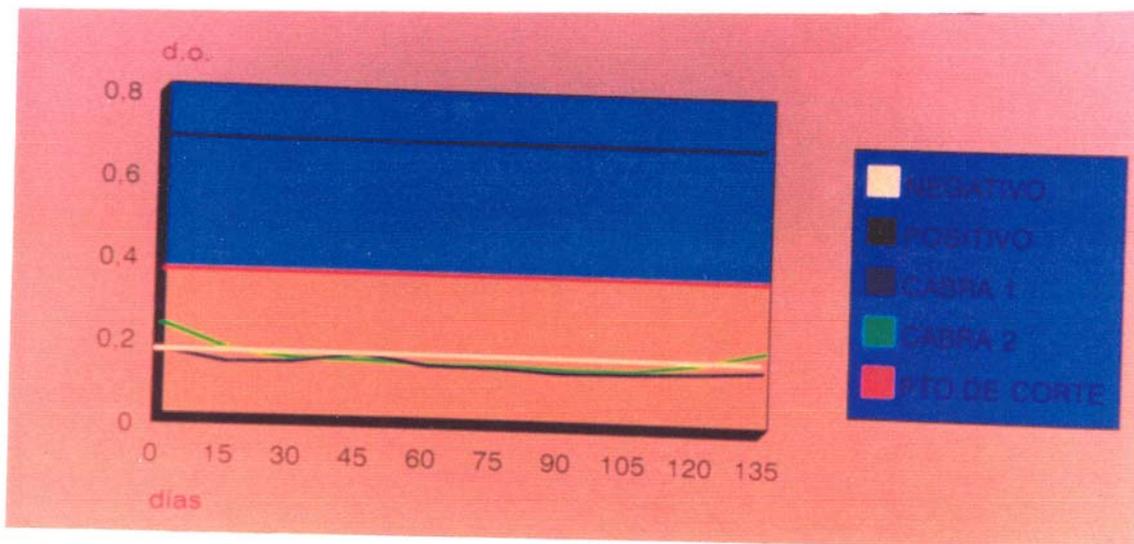


Figura nº13 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. capricolum*, en el lote de cabras nº2.

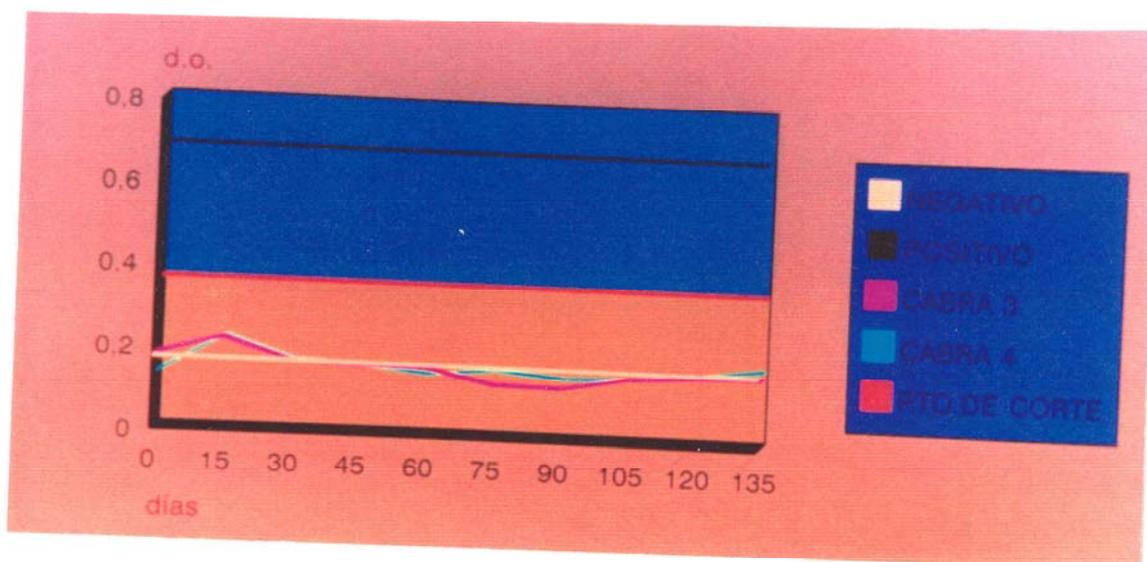


Figura nº14 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. capricolum*, en el lote de cabras nº3.

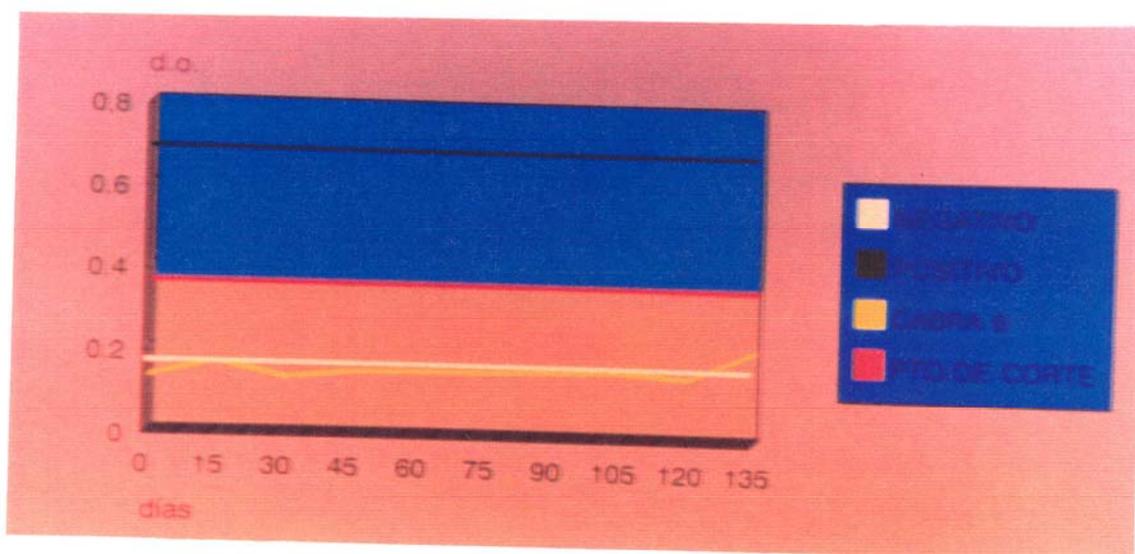


Figura nº15 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides LC*, en el lote de cabras nº1.

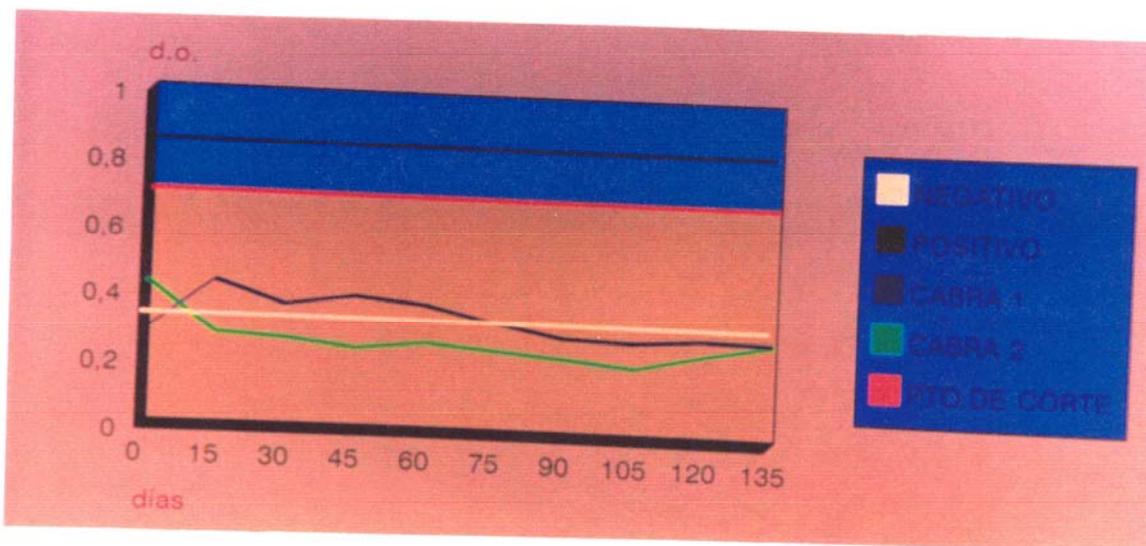


Figura nº16 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides LC*, en el lote de cabras nº2.

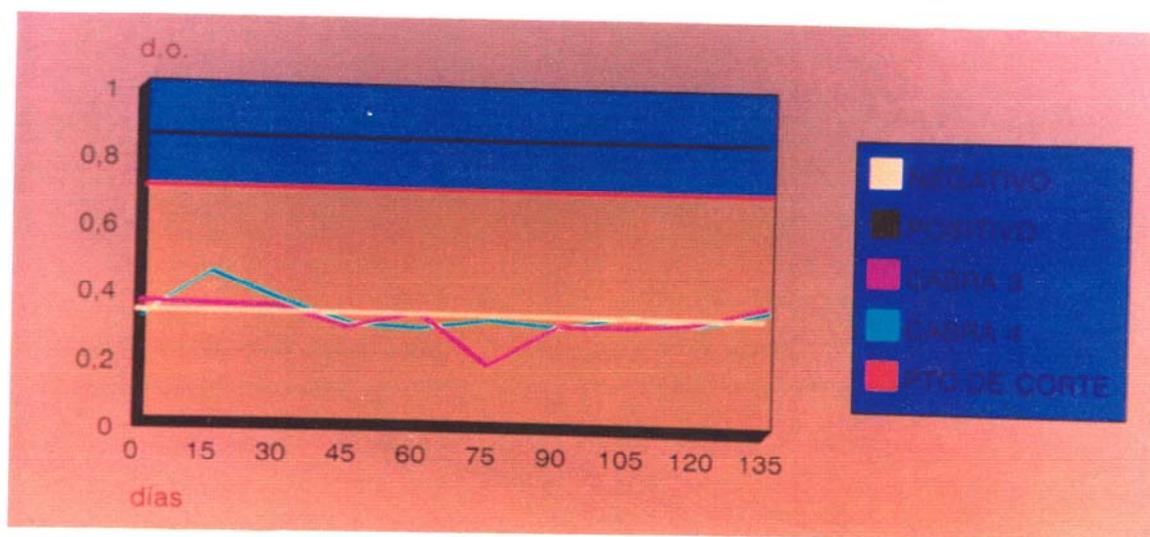


Figura nº17 Técnica de ELISA indirecto según THIRKELL y cols., 1990, con antígeno de *M. mycoides subsp. mycoides LC*, en el lote de cabras nº3.

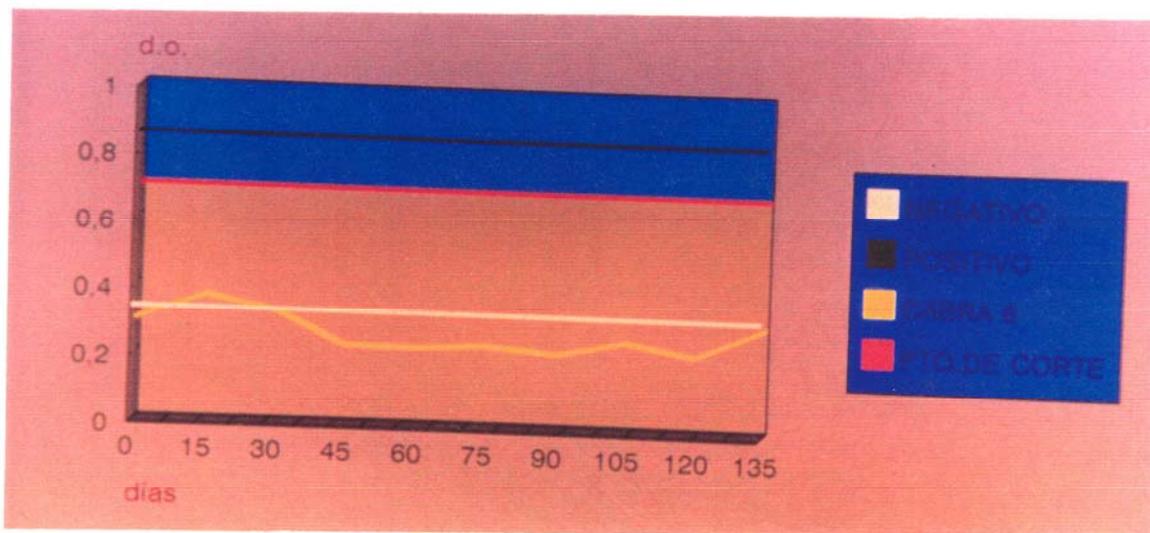


Figura nº18 Técnica de ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, en el lote de cabras nº1.

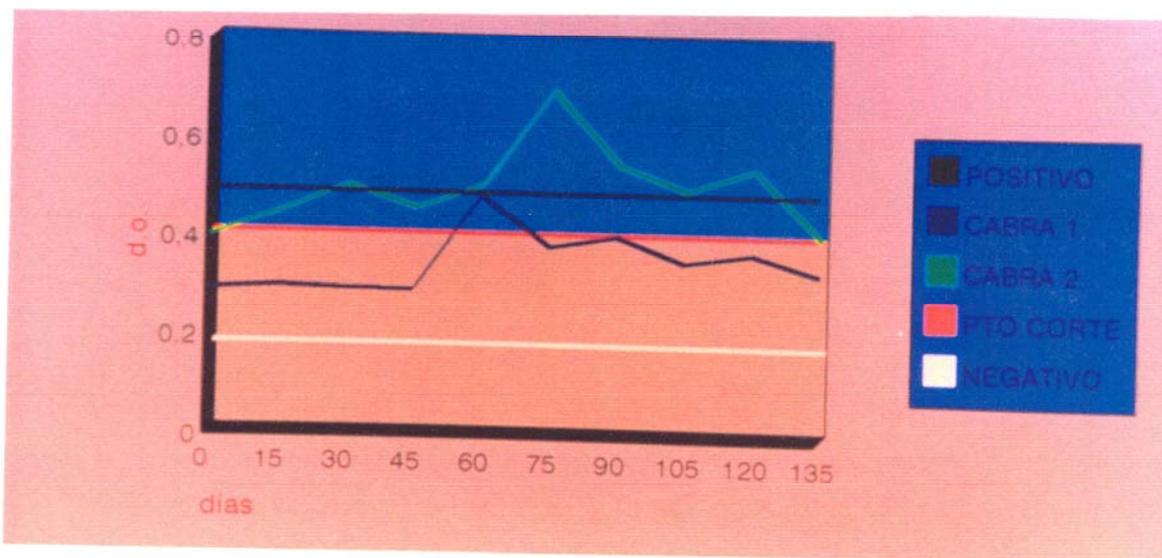


Figura nº19 Técnica de ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, en el lote de cabras nº2.

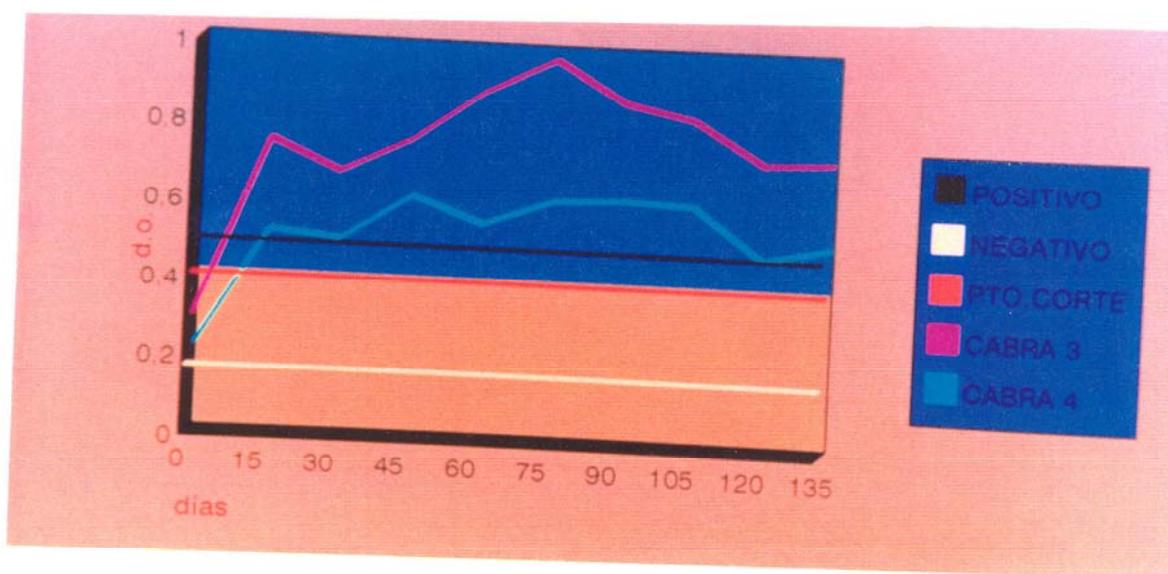
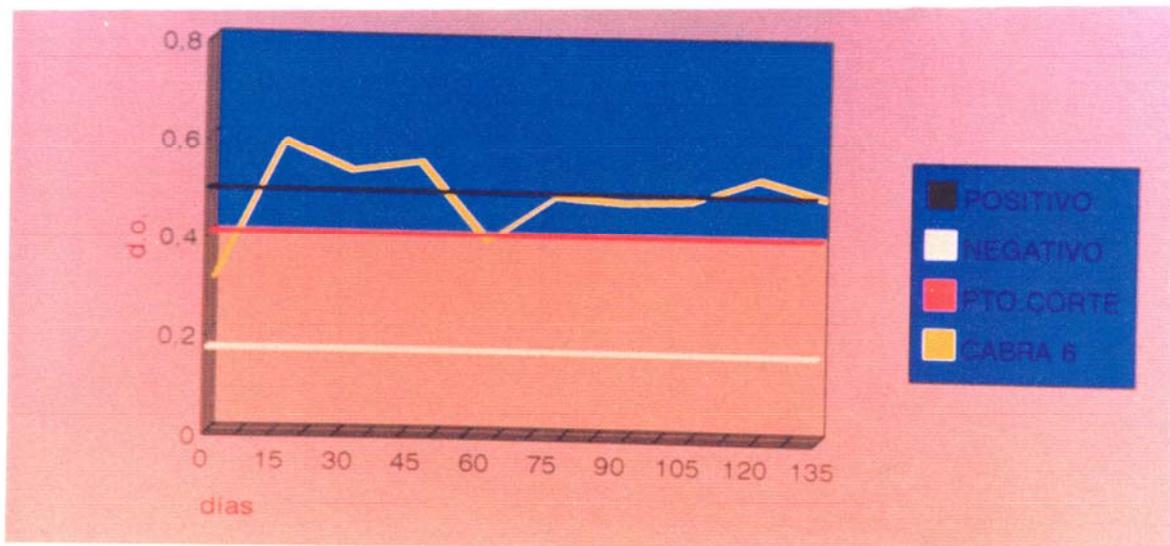


Figura n°20 Técnica de ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, en el lote de cabras n°3.



Discusión

6.1.- ASPECTOS CLÍNICOS, BIOPATOLÓGICOS Y MICROBIOLÓGICOS.

A modo orientativo, la sintomatología más frecuentemente observada (Tabla nº4) en los casos clínicos estudiados correspondió a mamitis (61.1%), poliartritis (44.4%), aunque también se pudo observar en mayor o menor medida, mortalidad perinatal (33.3%), abortos (27.8%), neumonía (27.8%), muerte de hembras en gestación (16.7%) y agalaxia (16.7%). Esto coincide con las descripciones de los síndromes descritos por otros autores (ATALAIA y cols., 1986; DAMASA y cols., 1992; GONÇALVES, 1984; LAMBERT, 1987; LEBRET, 1989; PERREAU, 1979 y REGALLA, 1987). Sin embargo, uno de los síntomas típicos descritos dentro de la triada sintomática de la Agalaxia Contagiosa, como es la queratoconjuntivitis no fue descrito en la historia clínica remitida con los casos al laboratorio, lo que nos puede conducir a pensar que dentro de las distintas cepas de micoplasmas causantes de este síndrome, existen diferencias en cuanto a su tropismo y virulencia. En este sentido, aunque este signo es sin duda el menos frecuente de la triada (CONTRERAS y cols., 1993), se describió como el único síntoma de un brote de queratoconjuntivitis ovina asociado a *M. agalactiae* (FERNÁNDEZ y cols., 1989).

En cuanto al curso y al pronóstico de la infección por *Mycoplasma spp.*, los cuadros clínicos que revistieron una mayor gravedad, o que afectaron a un mayor número de animales en un rebaño tuvieron (Tabla nº5) como etiología diferentes cepas de *M. agalactiae* (caso 17/92), y *M. mycoides subsp. capri* y *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* conjuntamente (caso 93/92). Otros autores describen casos graves como EAST, y cols., 1983, que comentan un brote por *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* afectando a 300 cabras en lactación, por otra parte DaMASSA y cols., 1987 describen un brote agudo de mamitis y artritis por *M. putrefaciens* en el cual se sacrificó a 700 animales. Además, recientemente RODRÍGUEZ y cols., 1995 describen la muerte de 800 animales durante la infección por *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*.

Durante la inoculación experimental de las seis cabras de la Agrupación Caprina Canaria, la única sintomatología que se observó fue una mamitis unilateral que solamente afectó a la ubre derecha de los animales del lote 2 (vía intramamaria). En este sentido, según GONÇALVES, 1984, en los focos crónicos, los síntomas son difíciles de observar, y las mamitis suelen evolucionar a subagudas. En ningún momento de la experiencia los animales presentaron fiebre, anorexia, decaimiento, artritis o queratoconjuntivitis, síntomas que son frecuentemente descritos por otros autores, en el curso de la infección experimental por *M. agalactiae*. En esta misma línea, HASSO y cols., 1993 al realizar la inoculación experimental con *M. agalactiae* en cabras adultas en lactación, obtuvieron la triada típica de la Agalaxia Contagiosa, resultando más fuertemente afectados, aquellos animales inoculados por vía subcutánea. De igual manera, estos autores reproducen mamitis agudas en lotes inoculados vía intramamaria, mamitis crónicas en la inoculación subcutánea, gastroenteritis en la inoculación oral, y sinovitis en la inoculación intravenosa.

Como posibles causas de la presentación de esta forma atípica de la enfermedad que afectó a las cabras de nuestro trabajo, podemos pensar en primer lugar que la cepa L9 de *M. agalactiae*, empleada en nuestra experiencia, pudo haber perdido parte de su patogenicidad, debido a los múltiples pases que sufrió en nuestro laboratorio durante el proceso de clonaje y posterior identificación bioquímica y serológica. Sobre este aspecto, cabe resaltar que en Turquía se emplean vacunas vivas atenuadas de *M. agalactiae*, las cuales pierden su virulencia después de 40-80 pases sucesivos en medios específicos para micoplasmas (ERDAG, 1989).

No obstante, aunque conocíamos previamente este inconveniente, pues ya habíamos advertido la incapacidad de esta cepa para adsorber hematíes de distintas especies, se decidió intentar su reactivación mediante tres pases sucesivos en animales jóvenes, en lugar de emplear otras cepas de *M. agalactiae* con muy pocos

pases, procedentes de brotes de Agalaxia Contagiosa de Andalucía y Extremadura, por el peligro inminente de introducir en nuestra isla, cepas foráneas frente a las cuales la población caprina local no tuviese la adecuada resistencia.

Por otra parte, el interés de esta inoculación experimental no era estrictamente el reproducir la enfermedad, pues esta ha sido suficientemente documentada en muchos trabajos, sino comprobar la evolución de la respuesta inmune mediante la técnica de ELISA indirecto y Hemaglutinación Indirecta (IHA) a lo largo de los 135 días que duró la experiencia.

Asimismo, es de todos conocido el componente multifactorial que posee la Agalaxia Contagiosa (DAMASSA y cols., 1992), cuya evolución no solamente depende del tropismo y virulencia de las especie implicadas en este síndrome, sino también en la sensibilidad o resistencia de los hospedadores. En este sentido, la oveja parece ser más resistente que la cabra, pero aún las distintas poblaciones de esta última especie, pueden manifestar distintos grados de resistencia dependiendo de la selección natural que se imponga al convivir durante muchas generaciones con un mismo grupo de patógenos. Esta última situación es la que en mayor o menor medida puede haberse presentado en la población caprina de las islas Canarias, tanto por el aislamiento derivado de la insularidad, como por la prohibición de importar ganado caprino de otras regiones, incluyendo la Península Ibérica.

Esta hipótesis se sustenta sobre la base de que la enfermedad como tal ha pasado desapercibida a las autoridades sanitarias durante muchos años. Así, GARRIDO y cols. 1987 consideran a las islas Canarias libres de Agalaxia Contagiosa. Sin embargo, la falta de sintomatología típica del síndrome que nos ocupa, aboga por un posible equilibrio entre los patógenos y sus hospedadores respectivos.

Después de recibir el informe anatomopatológico, una vez realizada la

eutanasia y necropsia de los animales, comprobamos que estos no estaban exentos de otras infecciones y/o infestaciones. La cabra nº1 presentaba neumonía verminosa y linfadenitis eosinofílica. En la cabra nº3 se detectó *Sarcocystis* en corazón además de linfadenitis eosinofílica, y en la cabra nº 4 se apreció hepatitis granulomatosa eosinofílica. Estos hallazgos nos impidieron obtener conclusiones relevantes de la biopatología clínica que realizamos con sus muestras.

La discusión de los resultados de biopatología clínica, obtenidos en los animales infectados experimentalmente podemos dividirla en varios puntos:

Serie blanca

* Recuento total de leucocitos. En las cabras del lote 1 el recuento de leucocitos experimentó un aumento con la producción de un ascenso puntual sobre el día 105 postinoculación. En las cabras del lote dos los leucocitos se mantuvieron dentro de los límites normales, aunque se detectaron dos ascensos (uno el día 15 postinoculación y otro el día 120). En las cabras del lote tres, se produjeron dos picos que sobrepasaron los valores normales.

La leucocitosis, es un fenómeno que ha sido observado y descrito por varios autores en las infecciones por distintas especies de micoplasmas (ALAFIATAYO y cols., 1990; EAST y cols., 1983; GUTIERREZ, 1995; NAYAK y BHOWMIK, 1988; RANHNAN y SINGH, 1990 y WESONGA, 1991).

* Linfocitos. En todos los lotes se produjo una marcada linfopenia, cosa que suele ocurrir en los procesos septicémicos causados por algunas bacterias (MORRIS y LARGE, 1990), y como parte del secuestro leucocitario ocurrido en el proceso séptico (JAIN, 1986). GUTIERREZ, 1995 encuentra también una linfopenia en una inoculación experimental en cabritos de la Agrupación Caprina Canaria.

* Neutrófilos. Se detectó neutrofilia en todos los animales inoculados

experimentalmente. Este tipo de respuesta ha sido observado también por **ALAFIATAYO y cols., 1990, EAST y cols., 1983, GUTIERREZ, 1995; NAYAK y BHOWMIK, 1988 y RAHMAN y SINGH, 1990** en infecciones por *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* y *M. mycoides subsp. capri*. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los hallazgos de **OJO, 1976**, quien no encontró alteraciones en la fórmula leucocitaria, lo que puede ser debido al origen y a la especial virulencia de la cepa implicada en la infección.

* **Eosinófilos.** Los eosinófilos no mostraron variaciones en ninguno de los animales de la experiencia, con lo que coincidimos con otros autores que nunca han descrito alteraciones con referencia a este parámetro.

* **Monocitos.** La monocitosis ha sido señalada en las fases crónicas de estas enfermedades (**EAST y cols., 1983**), en casos naturales por *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*, y en casos experimentales por *M. mycoides subsp. capri* (**RAHMAN y SINGH, 1990; ALAFIATAYO y cols., 1990**). En nuestra experiencia, a partir del día 75 se empieza a producir una monocitosis en los tres lotes, que persistió hasta el final coincidiendo con las formas más crónicas frecuentemente descritas. (**GARRIDO y cols., 1982 y MONTAGNA, 1989**).

Serie Roja

Nosotros no encontramos ningún cambio significativo en la serie roja de nuestros animales, coincidiendo con **ALAFIATAYO y cols. en 1990, GUHA y VERMA en 1987b; ROSENDAL en 1983; NAYAK y BHOWMIK en 1991 y OJO en 1976b**.

Bioquímica clínica

No se produjo ningún incremento significativo de los valores de estos parámetros en ninguno de los lotes experimentales, manteniéndose dentro de los valores normales descritos para esta especie (**KANEKO, 1980**).

Para el aislamiento de micoplasmas a partir de los casos clínicos, el primer medio empleado en nuestro laboratorio fue el medio de Hayflick modificado según JONES 1989, el cual presentó algunos inconvenientes para el aislamiento y replicación de ciertas cepas de *M. agalactiae* y *M. putrefaciens*. Posteriormente, empleamos también el medio SP4 según las indicaciones de POVEDA (comunicación personal), excluyendo de la modificación de WHITCOMB, 1983, la glucosa. De esta forma se dispuso de un medio capaz de proporcionar los factores necesarios para el crecimiento de cualquier especie de micoplasma caprino, incluyendo *M. capricolum subsp. capripneumoniae*, la especie más difícilmente cultivable en medios artificiales.

De los 29 aislamientos obtenidos en nuestro laboratorio, 6 correspondieron a *M. agalactiae* (20.7%), 17 a *M. mycoides subsp. mycoides LC* (58.6%), 3 a *M. capricolum subsp. capricolum* (10.3%), 1 a *M. mycoides subsp. capri* (3.5%), 1 a *M. putrefaciens* (3.5%) y 1 a una cepa intermedia entre *M. mycoides subsp. mycoides* y *M. mycoides subsp. capri* (3.5%).

Con respecto a la etiología del síndrome de Agalaxia Contagiosa, en España GARRIDO y cols. en 1987 encontraron que de 128 cepas aisladas entre 1982 y 1985 un 73% correspondían a *M. agalactiae* y un 22% a *M. mycoides subsp. mycoides LC*. En Portugal ATALAIA en 1986 en un estudio de 80 cepas aisladas de brotes clínicos, entre 1980 y 1984, clasifica un 82,5% por *M. agalactiae* y un 13.25% por *M. mycoides subsp. mycoides LC*. Por otra parte, en Francia PERREAU 1974 y 1984 describe a *M. mycoides subsp. capri*, *M. mycoides subsp. mycoides LC*, *M. agalactiae* y *M. capricolum subsp. capricolum* como los microorganismos participantes en el síndrome de Agalaxia Contagiosa en este país. En Italia, de 146 cepas aisladas entre 1985 y 1988, MONTAGNA y cols. en 1989 aseguran que un 57.5% corresponden a *M. agalactiae*, un 2% a *M. mycoides subsp. mycoides LC*, un 23% a *M. capricolum*, un 4% a *Mycoplasma spp.* y un 13% a *Acholeplasma spp.* En

Grecia en un estudio reciente realizado por MARCO y cols., 1993, el único agente implicado en el síndrome de Agalaxia Contagiosa es *M. agalactiae*. Sin embargo, es clásica la descripción de la enfermedad de los edemas de las cabras de Esparta, en la que participa *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*(SARRIS y cols., 1987 y SIMOS, 1987). En Canadá se ha aislado *M. mycoides subsp. mycoides LC* asociado a poliartritis y mamitis (RUHNKE y cols, 1983). En EEUU están implicados en este síndrome *M. mycoides subsp. mycoides LC*, *M. capricolum subsp. capricolum*, *M. agalactiae* y *M.putrefaciens* (DAMASSA, 1983 y DAMASSA y cols., 1987). En Brasil se han descrito dos brotes de Agalaxia Contagiosa producidos por *M. mycoides subsp. mycoides LC* y *M. mycoides subsp. capri* (NASCIMIENTO y cols., 1986).

Sin embargo, en el este y norte de Africa, la enfermedad más importante y de mayores consecuencias en cabras para el ganado caprino es la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina Clásica, cuyo agente causal *M. capricolum subsp. capripneumoniae (F38)*, manifiesta un claro tropismo pulmonar.

6.2.- EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS SEROLÓGICOS EMPLEADOS.

Con el método ELISA indirecto según THIRKELL y cols., (1990) (Tabla nº16) sólo obtuvimos 7 resultados positivos de los 45 sueros extraídos en las diferentes fases de la experiencia, correspondiendo los títulos más elevados en los animales inoculados por vía intramamaria. La baja sensibilidad de este método, puede tener relación con el procedimiento de obtención y purificación del antígeno. Sobre este aspecto, creemos que es muy difícil reproducir en distintos laboratorios, las características de un antígeno sonicado, pues la intensidad y tiempo de acción de los ultrasonidos, deberían variar según las concentraciones de micoplasmas, y probablemente dependa igualmente de la inmunogenicidad de las distintas cepas y/o especies de micoplasmas.

Al emplear el ELISA indirecto del Dr. Bommeliang mejoró la sensibilidad, ya que se obtuvo un mayor número de sueros positivos (37 sueros de diferentes extracciones) (Tabla nº16). Asimismo, con el mencionado kit comercial, se detectó positividad en animales que nunca manifestaron síntomas clínicos (cabras inoculadas por vía transtratraqueal y oral).

A pesar de todo, los mejores resultados se obtuvieron con el método de Hemaglutinación Indirecta (IHA). Esta técnica, realizada según las directrices de CHO y cols., (1975), nos permitió detectar títulos positivos durante todas las extracciones en los tres lotes de cabras (nunca dio sueros negativos, aunque del total, tres de ellos tuvieron títulos dudosos), siendo por consiguiente la más sensible, aunque como inconvenientes, habría que citar que tanto su puesta a punto, como su empleo, resultan más laboriosos que un ELISA indirecto, además de consumir mayor cantidad de antígeno. Esta observación, concuerda con MUTHOMI y cols., 1983, que comparan esta técnica con la de Fijación del Complemento, empleando sueros de cabras enfermas, infectadas tanto natural como artificialmente, y obtuvieron una mayor sensibilidad para el IHA. Estos autores, concluyen que la mencionada técnica, es un método de diagnóstico ideal para detectar la forma crónica de la pleuroneumonía contagiosa caprina. En esta misma línea, POUMARAT y cols., 1989, durante una infección experimental para reproducir la pleuropneumonía contagiosa bovina, llegan a la conclusión de que la Hemaglutinación Indirecta, detecta los anticuerpos con mayor prontitud que la reacción de Fijación del Complemento y la Prueba de Aglutinación en porta, aunque aseguran que es menos específica, que no detecta casos crónicos, ni tampoco casos de infección latente sin síntomas ni lesiones. No coincidimos con las últimas afirmaciones, ya que en nuestro caso la Hemaglutinación Indirecta sí detectó la infección hasta el final de la experiencia (135 días), y, además, en animales que no mostraban signos de enfermedad, y que en la necropsia no tenían ninguna lesión. Por otra parte, somos conscientes de que actualmente no existe una técnica que posea unos valores de sensibilidad y especificidad del 100%, ya que todo esfuerzo dirigido a incrementar el valor de uno de ellos, va en detrimento de

la magnitud que se alcanza con el otro (THRUSFIELD, 1990).

No obstante, debemos de hacer constar que en nuestra experiencia, la Hemaglutinación indirecta dispuso de una ventaja adicional sobre la técnica de ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, ya que se ejecutó con el mismo antígeno con el que se practicó la inoculación experimental, lo cual puede haber influido en el nivel de respuesta de las cabras inoculadas, en tanto que el antígeno del ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, fue en cierta medida un antígeno heterólogo, al tratarse de una cepa suiza de *M. agalactiae*, siendo sobradamente conocida la heterogenicidad antigénica que existe entre diferentes cepas de *M. agalactiae*, y responsable en última instancia de la diversidad de la respuesta.

Por otra parte, CORREIA y cols.(1976) encuentran los mismos valores de especificidad para el Hemaglutinación indirecta y la reacción de Fijación del Complemento, así como una alta sensibilidad para la primera, resultados que concuerdan en líneas generales con los nuestros. Coincidimos también con HAYAT y cols., 1991, en cuanto a la sensibilidad y especificidad de la técnica de Hemaglutinación Indirecta, pero no en cuanto a su versatilidad, como ya hemos señalado anteriormente. Finalmente, SORENSEN y cols., 1992, comparan el ELISA de captura con anticuerpos monoclonales frente a la Hemaglutinación indirecta, demostrando como habría de esperar, una mayor sensibilidad y especificidad para el primero, así como la comodidad en su realización.

6.3.- EPIDEMIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN POR M. AGALACTIAE Y M.MYCOIDES SUBSP. MYCOIDES (LC)

Los resultados epidemiológicos, obtenidos con la técnica de ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, nos confirman la presencia y extensión de la Agalaxia Contagiosa en las islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro, y nos permite suponer su existencia en el resto del Archipiélago Canario. Sobre este aspecto,

REAL en 1982, ya había demostrado previamente mediante reacción de Fijación del Complemento, en un estudio serológico realizado en cabras de la isla de Tenerife, una seroprevalencia del 11.5% para *M. agalactiae*. Por otra parte, **POVEDA en 1987 (comunicación personal)**, estudió microbiológicamente, muestras de leche mamítica procedentes de cabras de la isla de Tenerife, aislando *M. mycoides subsp. mycoides (LC)*, como responsable de las mismas.

Sin embargo, **GARRIDO y cols. en 1987**, en un trabajo publicado por la Comisión de la Comunidad Económica Europea, consideran al Archipiélago Canario libre de Agalaxia Contagiosa. Sin conocer en que condiciones se realizó este estudio, sólo podemos afirmar que no es cierta dicha situación actualmente, la cual ha sido demostrada mediante sendos estudios microbiológicos, realizados por **VILLALBA y cols.**, en 1992 y **REAL y cols.** en 1994.

La existencia solapada de estos microorganismos, en el ganado caprino del Archipiélago Canario, puede asumirse sobre la base de una posible adaptación patógenos-hospedador, que ya señalamos previamente, creando un equilibrio, que solamente se rompe en algunas circunstancias.

Los resultados de la seroprevalencia para *M. agalactiae* en las islas de Gran Canaria y Lanzarote son relativamente bajos, 2.3% (Tabla nº18) y 7.1% (Tabla nº 22) respectivamente. Sin embargo, son elevados en el caso de la isla del Hierro con un 54.5 % (Tabla nº26). De forma similar se comporta la seroprevalencia para *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* para estas islas, 2.3% (Tabla nº20) y 1.4% (Tabla nº24) respectivamente, siendo también relativamente elevados para la isla del Hierro con un 43.9% (Tabla nº28).

De nuestra revisión bibliográfica, se desprende que muy pocos autores realizan estudios epidemiológicos sobre la Agalaxia Contagiosa en sus regiones o países respectivos. Lo habitual, es la descripción de casos clínicos de Agalaxia Contagiosa, y el estudio microbiológico, que identifica a los microorganismos

responsables. No obstante, TSAKNAKES y cols., (1992) realizan un estudio epidemiológico, empleando la técnicas de ELISA indirecto, y la Prueba de Inhibición de la formación de películas y cristales, con un antígeno de *M. agalactiae*, y sueros procedentes de cabras y ovejas de la región de Chalkidiki al norte de Grecia. Estos autores, estudiaron 586 sueros y detectan anticuerpos en 188, lo que indica una seroprevalencia del 32.1%.

En Argelia, BELAID y cols. 1990 estudiaron la epidemiología de la Agalaxia Contagiosa en 8 departamentos del este, empleando la técnica de ELISA indirecto y la reacción de Fijación del Complemento y obtuvieron una seroprevalencia del 28% para *M. capricolum subsp. capricolum*, 23% para *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* y 17% para *M. agalactiae*.

En nuestro país, hay publicado solamente un trabajo realizado en el País Vasco por PÉREZ y cols., (1992), que es comparable a nuestro estudio, ya que emplea el mismo kit comercial del Dr. Bommeliang.

Se trata de un estudio epidemiológico, que se realizó durante varios años sucesivos, en un área donde se conocía previamente la existencia de la enfermedad, para evaluar su evolución, después de incluir la vacunación en los programas de lucha. Al inicio del mismo, estos autores observaron que hasta un 15% de la explotaciones caprinas elegidas al azar, estaban afectadas por *M. agalactiae*, encontrando que la seroprevalencia variaba enormemente en las tres Provincias Vascas, con un 40% de las explotaciones positivas en Alava, un 3% en Guipúzcoa y un 1% en Vizcaya. Al finalizar este estudio, se declara a Vizcaya y Guipúzcoa como zonas libres de Agalaxia Contagiosa, permaneciendo en Alava la referida enfermedad.

Comparando los resultados, podemos observar una seroprevalencia menor para *M. agalactiae* en las islas de Gran Canaria y Lanzarote, en relación a la región de Chalkidiki y los 8 departamentos del este de Argelia, pero en estos

lugares, la seroprevalencia es inferior que en la isla del Hierro.

De forma similar, la seroprevalencia frente a *M. mycoides subsp. mycoides (LC)* también es menor en las islas de Gran Canaria y Lanzarote, si la comparamos con Argelia, y menor aquí, que la que presenta la isla del Hierro.

En cuanto a explotaciones afectadas, estas son más numerosas en nuestras islas estudiadas, que en el País Vasco, incluso si la comparamos a la primera serología realizada en esta región. Por lo que las autoridades sanitarias de nuestra Comunidad Autónoma, a la luz de estos resultados, deberán adoptar medidas específicas de control y lucha contra esta enfermedad.

Conclusiones

1° De los 29 aislamientos obtenidos en 16 brotes clínicos, de Agalaxia Contagiosa Caprina, estudiados entre 1992 y 1995, el 57.1 % correspondió a *M. mycoides subsp. mycoides LC*, el 21.4 % a *M. agalactiae*, el 7.1 % a *M. capricolum subsp. capricolum*, el 3.5 %, respectivamente para *M. mycoides subsp. capri*, *M. putrefaciens*, y una cepa intermedia entre *M. mycoides subsp. mycoides LC* y *M. mycoides subsp. capri*.

2° De los métodos serológicos empleados, la Hemaglutinación Indirecta, es el que ha mostrado los valores de sensibilidad más elevados, (42 muestras de 45, siendo las otras tres restantes dudosas), seguido por el método ELISA del Dr. Bommeliang (37 muestras de 45), y finalmente el método de ELISA indirecto según Thirkell y cols., 1990 (7 muestras de 45).

3° La seroprevalencia de *M. agalactiae* en el ganado caprino de la Isla de Gran Canaria es de un 8.8 %, en Lanzarote del 7.1 % y en el Hierro del 54.5 %.

4° La seroprevalencia de *M. mycoides subsp. mycoides LC* en el ganado caprino de la Isla de Gran Canaria es de un 2.3 %, en Lanzarote del 1.4 % y en el Hierro del 43.9 %.

Resumen

Se han estudiado 16 brotes de Agalaxia Contagiosa Caprina, con un total de 29 aislamientos, de los cuales 21.3 % correspondieron a *M. agalactiae*, un 57.1 % a *M. mycoides subsp. mycoides LC*, un 7.1 % a *M. capricolum subsp. capricolum*, un 3.5 % a *M. mycoides subsp. capri*, un 3.5 % a *M. putrefaciens* y un 3.5 % a una cepa intermedia entre *M. mycoides subsp. mycoides LC* y *M. mycoides subsp. capri*.

Con la finalidad de estudiar la respuesta inmune y cuantificarla comparativamente con diferentes técnicas serológicas, se realizó la inoculación experimental en seis cabras en lactación de la Agrupación Caprina Canaria. De estas sólo mostraron síntomas de Agalaxia Contagiosa, aquellas que fueron inoculadas por vía intramamaria.

El método de ELISA indirecto según las directrices de Thirkell y cols., en 1990 careció de la adecuada sensibilidad, (sólo detectó 7 sueros positivos de un total de 45 sueros de las diferentes extracciones), aunque mostró una buena especificidad. El ELISA indirecto del Dr. Bommeliang, manifestó una mayor sensibilidad (detectó 37 positivos, de un total de 45 sueros de las diferentes extracciones), manteniéndose la especificidad. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con la técnica Hemaglutinación Indirecta, la cual fue capaz de detectar 42 sueros positivos de los 45.

Se realizó un estudio epidemiológico de la seroprevalencia, para detectar las infecciones de *M. agalactiae* y *M. mycoides subsp. mycoides LC*., mediante el método de ELISA Indirecto del Dr. Bommeliang, en las islas de Gran Canaria, Lanzarote y el Hierro. Se obtuvo una prevalencia del ,8.8 % para *M. agalactiae* y 2.3 % para *M. mycoides subsp. mycoides LC* en la Isla de Gran Canaria. En la isla de Lanzarote la prevalencia resultante es de 7.1 % para *M. agalactiae* y de 1.4 % para *M. mycoides subsp. mycoides LC*. En la isla del Hierro la prevalencia para la infección por *M. agalactiae* se situó en 54.5 % y para *M. mycoides subsp. mycoides LC* fue de un 43.9 %.

Summary

16 outbreaks of Contagious Agalactia have been studied, with a total of 29 isolaments, which 21.3 % where by *M. agalactiae*, 57.1 % by *M. mycoides subsp. mycoides*, 7.1 % by *M. capricolum subsp. capricolum*, 3.5 % by *M. mycoides subsp. capri*, 3.5 % by *M. putrefaciens* and 3.5 % by an intermedium strain between *M. mycoides subsp. mycoides LC* and *M. mycoides subsp. capri*.

We have made the experimental inoculation of dairy goats of the *Agrupación Caprina Canaria* to study the immune response and quantifying with other serological test comparatively. We have only found any clinical signs in those inoculated by intramammary route.

The indirect ELISA method as described Thirkell y cols., 1990 did not have the optimed sensibility because only 7 sera were positive from 45 studied samples, however, this test showed a good specificity. The indirect ELISA test as described Dr. Bommeliang, had a highest sensitivity (37 sera were positive from 45 samples), showing the same especificity. However, the best results were obtained with the Indirect Haemagglutination test, because with this technique, we detected 42 positive sera from 45 samples.

We made a epidemiological serological study in the Islands of: Gran Canaria, Lanzarote and Hierro, to detect the infection caused by: *M. agalactiae* and *M. mycoides subsp. mycoides LC*. The results showed a prevalence of 8.8 % to *M. agalactiae* and 2.3 % to *M. mycoides subsp. mycoides LC* in Gran Canaria Island. In Lanzarote Island the prevalence found is 7.1 % to *M. agalactiae* and 1.4 % to *M. mycoides subsp. mycoides LC*. In Hierro Island it was of 54.5 % to *M. agalactiae* and 43.9 % to *M. mycoides subsp. mycoides LC*.

Agradecimientos

A D. Fernando Real Valcárcel mi más sincero agradecimiento por su constante ayuda, dedicación y orientación durante la realización de este trabajo, además de su amistad y compañerismo.

A D. José Bismarck Poveda Guerrero, agradecer su devoción, interés y guía ofrecida en todo momento para que el trabajo fuera más ameno, inculcándome su pasión por estos "bichos" y sus ansias de saber.

A Dña. Begoña Acosta Hernández, por su extraordinario compañerismo, por amiga y por estar siempre dispuesta a ayudar en el momento que lo necesitaba.

A D. Félix Acosta Arbelo y Conrado Carrascosa Iruzubieta por su amistad y su desinteresada colaboración en la realización de este trabajo, ya que sin su ayuda hubiese resultado muy difícil.

A Dña. Pilar Santana González y Ana Ramírez Corvera por la ayuda y colaboración prestada a lo largo de mi trabajo.

A la Fundación Universitaria de Las Palmas, y a través de ellos a "Pastas la Isleña" que nos concedió una beca con la que se pudo comenzar este trabajo.

Y en general a todos aquellos compañeros, que de una forma u otra, contribuyeron en la realización de esta tesis.

Bibliografía

- ADLER, H.E., DaMASSA, A.J. and BROOKS, D.L. (1980)** Caprine mycoplasmosis: *Mycoplasma putrefaciens*, a new cause of mastitis in goats.. *Am. J. Vet. Res.* 41: 1677-1679.
- ALAFIATAYO, R.A., ADEGBOYE, D.S., SAROR, D.I. and EZEOKOLI, C.D. (1990)** The haematologic picture of experimental contagious caprine pleuropneumonia. *Bull. Anim. Health and Production in Africa* 38(3): 319-324.
- AL-AUBAIDI, J.M. and FABRICANT, J. (1968)** Techniques for the isolation of mycoplasmas from cattle. *Cornell. Vet.* 58: 555-571.
- ALUOTTO, B.B., WITTLER, R.G., WILLIAMS, C.O. and FABER, J.F. (1970)** Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 35-38.
- ANDERSEN, H., CHRISTIANSEN, G. and CHRISTIANSEN, C. (1984)** Electrophoretic analysis of proteins from *Mycoplasma capricolum* and related serotypes using extracts from intact cell and from minicells containing cloned mycoplasma DNA. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1409-1418.
- ARCHIBALD, R.M. (1944)** Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. *J. Biol. Chem.* 156: 121-128.
- ARMSTRONG, C.H., FREEMAN, M.J., SANDS-FREEMAN, L., LOPEZ-OSUNA, M., YOUNG, T. and RUNNELS, L.J. (1983)** Comparison of the Enzyme-linked Immunosorbent Assay and the Indirect Hemagglutination and Complement Fixation Test for detecting antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Can. J. Comp. Med.* 47: 464-470.
- ATALAIA, V. and BRANDAO, E. (1981)** Agalaxia em ovinos e caprinos originada por Micoplasma. *Rep. Trab. L.N.I.V. XII*: 79-86.
- ATALAIA, V., BRANDAO, E. and MACHADO, M. (1986)** Patologia dos pequenos ruminantes. Agalaxia contagiosa em Portugal. *Rep. Trab. L.N.I.V. XVIII*: 11-20.
- ATWELL, R.B. and SUMMERS, P.M. (1977)** Caprine Mycoplasmosis. *Australian Vet. J.* 53: 298-299.
- BAAS, E.J. and JASPER, D.E. (1972)** Agar block technique for identification of Mycoplasmas by use of fluorescent antibody. *Applied Microbiol.* 23: 1097-1100.
- BANGA, H.S., GUPTA, P.P. and SINGH, R. (1989)** Changes in mineral and electrolytes in milk and udder tissues during experimental mycoplasmal mastitis. *Indian J. Anim. Sci.* 59: 555-557.
- BARILLE, M.F. (1983)** Arginine Hydrolysis. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press, pp. 345-349.
- BARILLE, M.F. and SCHIMKE, R.T. (1963)** A rapid chemical method of detecting PPLO contamination of tissue cell culture. *Prod. Soc. Exp. Biol. Med.* 114: 676.
- BARILLE, M.F., SCHIMKE, R.T. and RIGGS, D.B. (1966)** Presence of de arginine-dihidrolase pathway in Mycoplasma. *J. Bacteriol.* 91: 189.
- BAR-MOSHE, B., RAPOPORT, E. and BRENNER, J. (1984)** Vaccination trials against

- Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony-type) infection in goats. *Isr. J. Med. Sci.* 20: 972-974.
- BAR-MOSHE, B. and RAPOPPORT, E. (1981) Observations on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* infection in Saanen goats. *Isr. J. Med. Sci.* 17(7): 537-539.
- BELAID, B., Le-GOFF, C. and LEFEVRE, P.C. (1990) Enquête épidémiologique et sérodiagnostic de l'agalaxie contagieuse des petits ruminants de l'Est algérien. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 43: 37-41.
- BELLI, P., POUMARAT, F., FERRIN, M., LONGCHAMBON, D. and MARTEL, J.L. (1989) Reproduction expérimentale et évolution de la péripneumonie contagieuse bovine dans un groupe de bovins et de caprins: aspects anatomocliniques. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 42: 349-356.
- BENNETT, R.H. and JASPER, D.E. (1978) Immunologic and pathologic responses of cows to naturally occurring *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Microbiol.* 2: 325-340.
- BING, D.H., WEYAND, J.G.M. and STAVITSKY, (1967) Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 124: 1166-1170.
- BLACK, F.T. (1973) Phosphatase activity in T-micoplasmas. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 23: 65-66.
- BOLSKE, B., ENGVALL, G., RENSTR, A., WIERUP, M.L.H.M.Y. and M. (1989) Experimental infections of goats with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*, LC type. *Res. Vet. Sci.* 46: 247-252.
- BOLSKE, B., WIERUP, G., RENSTROM, M., HUMLESIO, L.A., HAMMARBERG, N.E. and K. (1982) Utbrott i Sverige av elakartad lungsjuka hos get. *Svensk Veterinartidning* 34, 15: 673-676.
- BRADBURY, J.M. (1983) Phosphatase activity. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press, pp. 363-366.
- BRADBURY, J.M. (1983) Phosphatase activity. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press, pp. 363-366.
- BREDT, W. (1979) Motility. In: *The Micoplasmas. Vol. I. Cell Biology.*, Barile, M. y Razin, S., Academic Press., pp. 141-156.
- BROOKS, D.L., DaMASSA, A.J. and ADLER, H.E. (1981) Caprine mycoplasmosis: immune response in goats to *Mycoplasma putrefaciens* after intramammary inoculation. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1898-1900.
- BRUGGMANN, S. and KELLER, H. (1977) Quantitative detection of antibodies to *Mycoplasma suis pneumoniae* in pigs' sera by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.* 101: 109-111.
- CARPALLO, F.C. (1983) Agalaxia Contagiosa. *Hygia Pecoris* 5(3): 47-57.
- CHIMA, J.C. and ONOVIRAN, O. (1982) A passive haemagglutination test for the detection of antibodies against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* using glutaraldehyde-fixed sheep erythrocytes. *Vet. Microbiol.* 7: 343-349.
- CHIMA, J.C., ERNO, H. and OJO, M.O. (1986) Characterization and identification of caprine,

genital mycoplasmas. *Acta vet. scand.* 27: 531-539.

CHO, J., RUHNKE, H.L. and LANGFORD, E.V. (1975) The Indirect Hemagglutination Test for the detection of antibodies in cattle naturally infected with Mycoplasmas. *Can. J. comp. Med.* 40: 20-29.

CHRISTIANSEN, C. and ERNO, H. (1982) Classification of the F388 group of caprine Mycoplasma strains by DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2523-2526.

CIRILLO, V.P. and RAZIN, S. (1973) Distribution of a phosphoenolpyruvate sugar phosphotransferase system in Mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 113: 212-217.

CLYDE, V.A. Jr, (1983) Growth inhibition test. In: *Methods in Mycoplasmaology, Razin, S. and Tully, J.G.*, New York. Academic Press, pp. 405-410.

CLYDE, W.A. (1964) Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific sera. *J. Immunol.* 92: 958-965.

COHEN, P.P. and BROWN, G.W. (1960) Ammonia metabolism and urea biosynthesis. *Comp. Biochem.* 2: 161-164.

CONTRERAS, A., CORRALES, J.C., ROMEO, L.Y. and MARCO, J.C. (1993) Etiología de la Agalaxia Contagiosa. *OVIS Aula Veterinaria* 29: 9-25.

CONTRERAS DE VERA, A., CORRALES, J.C., SIERRA, D. and MARCO, J. (1992) Mamitis subclínicas en cabras murciano-granadinas. XVII Jornadas S.E.O.C., Salamanca.

CORDY, D.R. (1984) Septicaemia and pneumonia in *Mycoplasma capricolum* infections of young goats. *Australian Vet. J.* 61: 201-202.

CORREIA, I., REGALLA, J., FERREIRA, H., CORREA, D.E.S.A.L., ALBUQUERQUE, T., VACAS, D.E., CARVALHO, J., PENHA-GON, and ALVES, A. (1988) Comparative study of immunological test: Complement Fixation Test, Passive Haemagglutination and Radial Reverse immunodiffusion as applied to the serological diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia. Contagious Bovine Pleuropneumonia: A seminar in the Community Programme for the coordination of Agricultural Research, 7-8 December, Lisboa volume: .

COSTAS, M., LEACH, R.H. and MITCHELMORE, (1987) Numerical analysis of PAGE proteins patterns and the taxonomic relationships within the "*Mycoplasma mycoides* cluster". *J. Gen. Microbiol.* 133: 3319-3329.

COTTEW, G.S. (1985) Infection with mollicutes in sheep and goats. In: *Infektionen durch Mycoplasmatales, Veb Gustav Fischer, Iena.*

COTTEW, G.S. and LLOYD, L.C. (1965) And outbreak of pleurisy and pneumonia in goats in Australia attributed to a mycoplasma specie. *J. Comp. Pathol.* 75: 363-374.

COTTEW, G.S. and YEAST, F.R. (1981) Occurrence of mycoplasmas in clinically normal goats. *Australian Vet. J.* 57: 52-53.

COTTEW, G.S. and YEATS, F.R. (1978) Subdivision of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

- from cattle and goats into two types. *Australian Vet. J.* 54: 293-294.
- COTTEW, G.S. and YEATS, F.R. (1982) Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. *Australian Vet. J.* 59: 77-81.
- COTTEW, G.S., BREARD, A., DaMASSA, A.J., ERNO, H., LEACH, R.H., LEFEVRE, P.C., RODWELL, A.W. and SMITH, G.R. (1987) Taxonomy of the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Israel J. Med. Sci.* 23: 632-635.
- COTTEW, G.S., WATSON, W.A., ARISOY, F., ERDAG, O. and BUCKLEY, L.S. (1968) Differentiation of *Mycoplasma agalactiae* from other mycoplasmas of sheep and goats. *J. Comp. Path.* 78: 275-283.
- DaMASSA, A.J. (1983) Prevalence of Mycoplasmas and Mites in the external auditory meatus of goats. *California Vet.* 37: 10-13, 17.
- DaMASSA, A.J. (1983a) Recovery of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goat milk. *JAVMA* 183(5): 548-549.
- DaMASSA, A.J. and BROOKS, D.L. (1991) The external ear canal of goats and other animals as a mycoplasma habitat. *Small Rum. Res.* 4: 85-93.
- DaMASSA, A.J. and POTER, T.L. (1987) Acute disease in lambs caused by a *Mycoplasma* species. *Vet. Rec.* 121: 166-167.
- DaMASSA, A.J., BROOKS, D.L., ADLER, H.E. and WATT, D.E. (1983c) Caprine mycoplasmosis: acute pulmonary disease in newborn kids given *Mycoplasma capricolum* orally. *Australian Vet. J.* 60: 125-126.
- DaMASSA, A.J., BROOKS, D.L. and ADLER, H.E. (1983b) Caprine mycoplasmosis: Widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* (LC). *Am.J.Vet.Res.* 44(2): 322-325.
- DaMASSA, A.J., BROOKS, D.L. and HOLMBERG, (1986) Induction of mycoplasmosis in goat kids by oral inoculation with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. *Am. J. Vet. Res.* 47: 2084-2089.
- DaMASSA, A.J., BROOKS, D.L. and HOLMBERG, C.A. (1984) Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Israel J. Med. Sci.* 20: 975-978.
- DaMASSA, A.J., BROOKS, D.L., HOLMBERG, C.A. and MOE, A.I. (1987a) Caprine mycoplasmosis: An outbreak of mastitis and arthritis requiring the destruction of 700 goats. *Veterinary Record* 120: 409-413.
- DaMASSA, A.J., HOLMBERG, C.A. and BROOKS, D.L. (1987b) Comparison of caprine mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, and *Mycoplasma putrefaciens*. *Isr. J. Med. Sci.* 23: 636-640.
- DaMASSA, A.J., HOLMBERG, C.A. and BROOKS, D.L. (1987b) Comparison of caprine Mycoplasmosis caused by *Mycoplasma capricolum*, *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* and *Mycoplasma putrefaciens*. *Israel J. Med. Sci.* 23: 636-640.

- DAMASSA, A.J., WAKENELL, P.S. and BROOKS, D.L. (1992)** Mycoplasmas of goats and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4: 101-103.
- DELGIUDICE, R.A., ROBILLARD, N.F. and CARSKI, T.R. (1967)** Immunofluorescence identification of *Mycoplasma* on agar by use of incident illumination. *J. Bacteriol.* 93: 1205-1209.
- DENIZ, S., REAL, F., ACOSTAS, B., FERRER, O., y, and POVEDA, J.B. (1993)** Estudio de tres focos de Agalaxia Contagiosa en Gran Canaria. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 23-25 Septiembre, Albacete.
- DOUTRE, M., PERREAU, P. and NDIAYE, A.M. (1981)** Un foyer d'agalaxie contagieuse de la chèvre à *Mycoplasma agalactiae* au Senegal. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.* 34: 11-14.
- EAST, N.E., DAMASSA, A.J., LOGAN, L.L., BROOKS, D.L. and MCGOWAN, B. (1983)** Milkborne outbreak of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* infection in a commercial goat dairy. *JAVMA* 182: 1338-1341.
- EDWARD, D.G. ff, (1950)** An investigation of the biological properties of the pleuropneumonia group. With sugestions regarding the identification of strains. *J. Gen. Microbiol.* 4: 311-329.
- EDWARD, D.G. ff and FITZGERALD, W.A. (1954)** Inhibition of growth of pleuropneumonia-like organisms by antibody. *J. Pathol. Bacteriol.* 68: 23-30.
- EDWARD, D.G. ff and MOORE, W.B. (1973)** A method for determining utilization of glucose by mycoplasmas. *J. Med. Microbiol.* 8: 451-454.
- EL HASSAN, S.M., HARBI, M.S.M.A. and MAMOUN, I.E. (1986)** Isolation and identification of *Mycoplasma agalactiae* from mastitic goats in the Sudan. *Br. Vet. J.* 142:3: 289-290.
- ERDAG, O. (1973)** *Mycoplasma agalactiae*: histopathology of infected organs. Symposium sur la Traite Mécanique des Petits Ruminants, Millau.
- ERNO, H. (1972)** Micoplasmosis: serology of infection in the genital tract of bulls. *Interfet. Immun.* 5: 20-23.
- ERNO, H., AL-AUBAIDI, J.M., OJO, M.O., MINGA, U.M. and SIKDAR, A. (1978)** Classification and identification of ovine and caprine mycoplasmas. *Acta vet. scand.* 19: 392-406.
- ERNO, H. and STIPKOVITS, L. (1973)** Bovine mycoplasmas: cultural and biochemical studies. *Acta Vet. Scand.* 14: 450-463.
- FABRICANT, J. and FREUNT, E.A. (1967)** Importance of extension and standardization of laboratory test for the identification and classification of Mycoplasma. *Ann. New york. Acad. Sci.* 143: 50-58.
- FARRINGTON, D.O. (1976)** Immunization of swine againts mycoplasmal pneumonia. *Proc. 4 th. Int. Congr. Fig. Vet. Soc. Ames* : 4.
- FERNANDEZ, A., MARTIN DE LAS MULAS, J., VILLALBA, E., POVEDA, J.B., MOLLEDA, J.M. and GARRIDO, A. (1989)** Brote de queratoconjuntivitis ovina (QCO) asociada a *M. agalactiae*. XIV Jornadas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Jaen.

- FOGGIE, A., JONES, G.E. and BUXTON, D. (1976)** In: The experimental infection of specific pathogen free lambs with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Res. Vet. Sci.* 21: 28-35.
- FREUNDT, E.A. (1983)** Culture media for classic mycoplasmas. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, New York, pp. 127-135.
- FREUNDT, E.A. (1983)** Films and spore production. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press, pp. 323-374.
- FREUNDT, E.A. (1984)** The Mycoplasmas. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 740-793.
- FREUNDT, E.A., ANDREWS, B.E., ERNO, H., KUNZE, M. and BLACK, F.T. (1973)** The sensitivity of *Mycoplasma* to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 1 Abt. orig. A* 225: 104-112.
- GAILLARD-PERRIN, G., PICAUVET, D.P. and PERRIN, G. (1985)** Isolement de *Mycoplasma putrefaciens* dans deux troupeaux de chèvres present tant des symptômes d'agalactie. *Revue Méd Vét.* 137: 67-70.
- GARDELLA, R.S., DELGIUDICE, R.A. and TULLY, J.G. (1983)** Immunofluorescence. In: *Methods of Mycoplasmaology. Vol I*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press, pp. 431-439.
- GARRIDO, F., LEON, L., LADERO, J.L., CUELLAR, L. and DIAZ, M.A. (1987)** Contagious Agalactia in Spain. CEC meeting on contagious agalactia and other micoplasmal diseases of small ruminants, Niza pp: 1-5.
- GARRIDO, F. and LEON, L. (1982)** Mycoplasmosis mayores de los pequeños rumiantes. Situación actual en España. VII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia, pp: 257-262.
- GONÇALVES, R. (1984)** Mycoplasmoses des caprins au Portugal. *Les maladies de la chèvre. Ed. INRA* 28: 279-286.
- GONÇALVES, R. (1984)** Mycoplasmoses des caprins au Portugal. In: *Les Maladies de la chèvre, Les colloques de l'INRA*, Niort (France), pp. 279-286.
- GUHA, C. and VERMA, B.B. (1987)** Contagious caprine pleuropneumonia: experimental infection on kids with local strain of *Mycoplasma agalactiae*. *Indian J. Vet. Med.* 7: 10-13.
- GUHA, C. and VERMA, B.B. (1987)** Contagious caprine pleuropneumonia: experimental infection of kids with local strain of *Mycoplasma agalactiae*. *Indian J. Vet. Med.* 7: 10-13.
- GUHA, C. and VERMA, B.B. (1987)** Studies on pathogenicity of a local strain of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (L.C.) in kids. *Indian J. Ani. Hlth.* 26: 23-26.
- GUTIERREZ, C. (1995)** Estudio clínico y biopatológico de la infección experimental en caprino por micoplasmas del Grupo *M. mycoides* (Aislados en Gran Canaria). *Tesis Doctoral*. Las Palmas de Gran Canaria (España)
- HANKO, E. and OTTERLIN, S.E. (1955)** Ett utbrott av POLO-infektion hos getter och far i

Sverige. *Nord. Vet. Med.* 7: 609-624.

HASSO, S.A., AL-AUBAIDI, J.M. and AL-DARRAJI, A.M. (1993) Contagious agalactia in goats: its severity as related to the route of infection and pregnancy. *Small Rum. Res.* 10(3): 263-275.

HAYAT, O., SIDDIQUE, M.Y. and AWAN, M.A. (1991) Evaluation of indirect haemagglutination and agar gel immunodiffusion test for detecting antibodies against *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri*. *Pakistan Vet. J.* 11: 163-166.

HAYFLICK, L. (1965) Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas Report. Biol. Med.* 23: 285-303.

HAYFLICK, L. (1969) In : *The Mycoplasmatales and the L-Phase of Bacteria*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam.

HAZELL, S.L., CARRIGAN, M.J. and COCKRAM, F.A. (1985) *M. mycoides* subsp. *mycoides* in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis. *Aust. Vet. J.* 62: 421-422.

HILLS, G.M. (1940) Ammonia production by pathogenic bacteria. *Biodem. J.* 34: 1057-1063.

HOOKER, J.M., SMITH, G.R. and MILLIGAN, R.A. (1979) Differentiation of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from certain closely related caprine mycoplasmas by mycoplasmaemia and cross-protection test in mice. *J. Hyg.* 82: 407-418.

HOROWITZ, S.A. and CASSELL, G.H. (1978) Detection of antibodies to *Mycoplasma pulmonis* by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.* 22: 161-170.

HUGGETT, A., ST, G. and NIXON, D.A. (1957) Use of glucose oxidase, peroxidase, and o-dianisidine in determination of blood and urinary glucose. *Lancet* 2: 368-370.

HUIJMANS-EVERS, G.M. and RUYS, A.C. (1956) Microorganisms of the pleuropneumonia group (Family of the *Mycoplasmataceae*) in man. *Antoine Van Leeuwenhoek* 22: 371-384.

HUNG, A.L., ALVARADO, A., LOPEZ, T., PERALES, R.L.I.O. and GARCIA, E. (1991) Detection of antibodies to mycoplasmas in south American camelids. *Res. Vet. Sci.* 51:3: 250-253.

IEMVT, (1985) Mycoplasmes et mycoplasmoses des ruminants. *Documents techniques. IEMVT, Maisons-Alfort, Francia.*

JABLONSKI, E.G. (1989) Detection systems for Hybridization reactions. In: *DNA Probes for Infectious diseases*, Fred. C. Tenover, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 15-30.

JAIN, N.C. (1986) Schalm's Veterinary Haematology. 4th Edition. *Lea & Febiger.*

JIGENG, L., GUIMIN, W., QINYOU, D., SHAOHUA, W. and TAICHONG, Z. (1989) Study on an attenuated vaccine against mycoplasmal pneumonia of swine- development of a lapinized strain of *Mycoplasma hyopneumonia*. *Sci. Agric. Sin.* 22: 75-83.

JONAS, A.M. and BARBER, T.L. (1969) *Mycoplasma mycoides* var. *capri* isolated from goats in Connecticut. *J. Inf. Dis.* 119: 126-131.

JONES, G.E. (1983) Mycoplasmas of sheep and goats: A synopsis. *Vet. Rec.* 113: 619-620.

JONES, G.E. (1987) Contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminant. *Commis. Europ. Com., Luxembourg*, pp. 1-118.

- JONES, G.E.** (1989) Pleuroneumonía contagiosa caprina. *O.I.E.*, Paris, 9: 1-63.
- JONES, G.E. and WOOD, A.R.** (1988) Microbiological and serological studies on caprine pneumonias in Oman. *Res. Vet. Sci.* 44: 125-131.
- JONES, G.E., RAE, A.G., HOLMES, R.G., LISTER, S.A., JONES, M.W., GRATER, G.S. and RICHARDS, N.** (1983) Isolation of exotic mycoplasmas from sheep in England. *Vet. Rec.* 3: 540.
- JOUGLAR, J.Y., MALERGUE, J.J. and PERREAU, P.** (1982) Evolution d'un foyer d'agalaxie contagieuse caprine durant deux années: 1980-1981. *Revue Méd. Vét.* 133: 467-472.
- KANEKO, J.J.** (1980) Clinical biochemistry of domestic animals. 3th Edition. *Academic Press, Inc*, New York.
- KANYIKIBE, M., BIDWELL, D.E., TURP, P. and SMITH, G.R.** (1985) Demonstration of cross-reactive antigens in F-38 and related mycoplasmas by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting. *J. Hyg. Camb.* 95: 95-106.
- KENNY, G.E.** (1979) Antigenic determinants. In: The mycoplasmas. Vol. I, *Barile, M. y Razin, s.*, Academic Press, INC, pp. 351-384.
- KEMPF, I., BLANCHARD, A., GESBERT, F. GUITTET, M. and BENNEJEAN, G.** (1992) The polymerase chain reaction for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma iowae*. Abstracts-9th *International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology*, Ames, Iowa, USA, August, 2-7.
- KIRCHHOFF, H., BINDER, A., SCHMID, G. and KAHLAU, D.** (1987) Isolation of *Mycoplasma mycoides* from milk goats in South Germany. *CEC meeting on contagious agalactia and other micoplasmal diseases of small ruminantsa* Niza: 51-57.
- KOBISCH, M. and NICOLET, J.** (1987) Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and Indirect hemagglutination (IHA) in experimental *Mycoplasma hyopneumoniae* infection of pigs. *Israel J. Med. Sci* 23: 644-646.
- KOSAN, G.S., VERMA, B.B. and THAKUR, D.K.** (1989) Mycoplasmosis in kids. *Indian J. Vet. Med.* 9: 38-39.
- KOTANI, H. and McGARRITY, G.J.** (1985) Rapid and simple identification of Mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Meth.* 85: 257-267.
- KROGSGAARD-JENSEN, A.** (1972) Mycoplasma: Growth precipitation as a serodiagnostic method. *Appl. Microbiol.* 23: 553-558.
- KUMAR, A. and CHANDIRAMANI,** (1987) Isolation and characterization of *Mycoplasma agalactiae* from premature born kids of goat. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. Infect. Dis.* 8: 95-97.
- LAMBERT, M.** (1987) Contagious Agalactiae of sheep and goats. *Rev.Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 6(3): 699-711.
- LEACH, R.** (1983) Preservation of *Mycoplasma* cultures and culture collections. In: Razin, S. and

- Tully, J. *Methods in Mycoplasmaology*, Academic Press, New York, pp. 197-204.
- LEACH, R.H., COSTAS, M. and MITCHELMORE, D.L. (1989) Relationship between *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* ('Large-colony' Strains) and *M. mycoides* subs. *capri*, as indicated by numerical analysis of one-dimensional SDS-PAGE protein patterns. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2993-3000.
- LEBRET, P. (1989) Agalactie contagieuse des petits ruminants: evolution de la maladie et des systèmes de controle dans le departament des Pyrenées-Atlantiques:1966-1988. *Thèse*, Toulouse.
- LEFEVRE, P.C., JONES, G.E. and OJO, M.O. (1987) Pulmonary mycoplasmoses of small ruminants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 6: 759-799.
- Le GOFF, C. and PERREAU, P. (1984) Le diagnostic sérologique de l'agalactiae contagieuse des petits ruminants. Les maladies de la chèvre, 9-11 Octobre, Niort (France).
- LEON, L., CONTRERAS DE VERA, A., CUBERO, M.J., CUELLO, F., CARO, M.R. and GARRIDO, F. (1988) Mycoplasmosis caprina. Queratoconjuntivitis por *M. conjunctivae* y enfermedad parecida a la Agalaxia Contagiosa por *M. putrefaciens*. I Symposium de Patología Ovina y Caprina, Junio, Zaragoza.
- LEON, L., GARRIDO, F., CUBERO, M.J., AYALA, J.A. and OLIVER, P. (1993) Enfermedades caprinas causadas por micoplasmas en la región de Murcia. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 23-25 Septiembre, Albacete.
- LEON, L., GARRIDO, F. and CUBERO, M.J. (1993) Immunoprofilaxis de La Agalaxia Contagiosa (*Mycoplasma Agalactiae*) caprina con vacuna inactivada. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 23-25 Septiembre, Albacete.
- LEVISOHN, S., DAVIDSON, I., CARO VERGARA, M.R. and RAPOPORT, E. (1991) Use of an ELISA for differential diagnosis of *Mycoplasma agalactiae* and *M. mycoides* (LC) in naturally infected goats herds. *Res. Vet. Sci.* 51: 66-71.
- LITTLEJOHNS, I.R. and COTTEW, G.S. (1977) The isolation and identification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* from goats in Australia. *Australian Vet. J.* 53: 297-298.
- LLOYD, L.C., COTTEW, G.S. and ANDERSON, D.A. (1987) Early serological responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *Israel J. Med. Sci.* 23: 647-649.
- LOPEZ, J.L., ARGÜELLO, A., CAPOTE, J.F. and FABELO, F. (1992) Aproximación a la estructura de la explotación caprina en Canarias. I Curso sobre producción y patología caprina, Las Palmas de G.C. pp: 1-17.
- MacOWAN, K.J. (1976) A *Mycoplasma* from chronic caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 8: 28-36.
- MacOWAN, K.J. (1976a) Studies on Contagious Caprine Pleuropneumonia. *PhD Thesis* University of Edinburgh, Escocia.
- MacOWAN, K.J. and MINETTE, J.E. (1976) A micoplasma from chronic caprine pleuropneumonia

in Kenya. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 8: 28-36.

MacOWAN, K.J., BRAND, T.F., McGILLVERAY, N. and HUNTER, A.R. (1984) Experimental infection of castrated lambs with *Mycoplasma agalactiae*. *J. Hyg. Camb.* 93: 455-463.

MARCO, J.C. (1988) Agalaxia Contagiosa: cuadro clínico y lesional. II Jornadas Técnicas de Agalaxia Contagiosa, 22-24 Junio, Almería.

MARCO, J.C. (1990) Mamitis ovinas y Agalaxia Contagiosa. Seminario avanzado sobre la producción de ovino de leche, 19-30 Noviembre, C.I.H.E.A.M. (Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterraneos).

MARCO, J.C., ADURIZ, J.J., ROMEO, M., JUSTE, R.A., y, and CONTRERAS, A. (1994) Diagnóstico de la Agalaxia Contagiosa. *Ovis (Aula Veterinaria)* 30: 9-33.

MARCO, J.C., CORRALES, J.C., EXTAMIANA, A.B. and CONTRERAS, A. (1993) Epidemiología. *Ovis (Aula Veterinaria)* 29: 27-48.

MASOVER, G.H., RAZIN, S. and HAYFLICK, L. (1972) Effectso carbon dioxide, urea and ammonia on growth of *Ureaplasma urealyticum* (T-strain *Mycoplasma*). *J. Bacteriol.* 130: 292-296.

McMARTIN, D.A., McOWAN, K.J. and SWIFT, L.L. (1980) A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *Br. vet. J.* 136: 507-515.

MIEGE, R. (1978) Le foyer de l'Agalactie contagieuse des chèvres des deux Savoies. *Rev. Méd. Vét.* 129: 1978.

MISRI, J., GUPTA, P.P. and AHUJA, S.P. (1988) Biochemical changes in milk in experimental mycoplasmal mastitis in goats. *Acta Vet. Brno* 57: 19-30.

MONTAGNA, C.O. (1988) Eziologia del l'agalassia contagiosa degli ovi-caprini in Puglia e Basilicata. *Obiettivi e Documenti Veterinari* 9:11: 45-46.

MONTAGNA, C.O. and GOFFREDO, G. (1989) L'agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini in Puglia e Basilicata. *Objet. Vet.* 3: 17-20.

MONTAGNA, C.O. and GOFFREDO, G. (1989) L'agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini in Puglia e Basilicata. *Objet. Doc. Vet.* 10(3): 17-20.

MONTAGNA, C.O. and MIRIZZI, O. (1987) Micoplasmosi spontanea e sperimentale indotta da *Mycoplasma capricolum*. *Riv. Zoo. Vet.* 15 (14): 245-249.

MORRIS, D.D. and LARGE, S.M. (1990) Alteration in the leukogram. In: Smith B.P. Large Animal internal medicine, CV Mosby, pp. 425-434.

MOULTON, W.M. (1980) Contagious caprine pleuropneumonia in the United States. *JAVMA* 176: 354-355.

MUTHOMI, E.K. and RURANGIRWA, F.R. (1983) Passive haemagglutination and complement fixation as diagnostic tests for contagious caprine pleuropneumonia caused by the F-38 strain of mycoplasma. *Res. Vet. Sci.* 35: 1-4.

MUTO, A., ANDACHI, Y., YUZAWA, H., YAMAO, F. and OSAWA, S. (1990) The organization

- and evolution of transfer RNA genes in *Mycoplasma capricolum*. *Nucl. Acids Res.* 18: 5037-5043.
- NASCIMIENTO, E.R., NASCIMENTO, M. da G.F., FREUNDT, E.A. and ANDERSEN, H.** (1986) Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. *Br. vet. J.* 142: 246-256.
- NAYAK, N.C. and BHOWMIK, M.K.** (1988) Mycoplasmal polyarthritis associated with septicaemia in kids: clinicohaematological and biochemical studies. *Indian J. Vet. Path.* 12: 13-17.
- NAYAK, N.C. and BHOWMIK, M.K.** (1990) Isolation and characterisation of mycoplasmas from septicaemic polyarthritis of young goats. *Indian vet. J.* 67: 193-196.
- NAYAK, N.C. and BHOWMIK, M.K.** (1990) Goat flea (order *Siphonaptera*) as a possible vector for the transmission of caprine mycoplasmal polyarthritis with septicaemia. *Prev. Vet. Med.* 9: 259-266.
- NAYAK, N.C. and BHOWMIK, M.K.** (1991) Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large colony type) for goat kids. *Small Rumin. Res.* 5: 155-167.
- NICOLAS, J.A., CHAUCHEF, S., PARBELLE, M.E.T. and FÉRIAL, M.L.** (1982) Les mycoplasmoses caprines vues par un laboratoire de diagnostic. *Revue Méd. vét.* 133: 423-426.
- NICOL, C.S. and EDWARD, D.G. ff.** (1953) Role of organism of the pleuropneumonia group in human genital infections. *Br. J. Vener. Dis.* 29: 149-150.
- NICOLET, J. and PAROZ, P.** (1980) Tween 20 soluble proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* as antigen for an enzyme linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* 29: 305-309.
- OJO, M.O.** (1976) Caprine pneumonia IV: Pathogenicity of *Mycoplasma mycoides subsp. capri* and caprine strains of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* for goats. *J. Comparative. Pathol.* 86 (4): 519-529.
- OJO, M.O.** (1987) Large colony (LC) type *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* and contagious bovine pleuro-pneumonia (CBPP): any epidemiological significance. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.* 35: 17-20.
- OKOH, A.E.J. and OCHOLI, R.A.** (1986) Disease associated with *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* in sheep in Nigeria. *Vet. Rec.* 118: 212.
- ONOVIRAN, O. and TAYLOR-ROBINSON, D.** (1979) Detection of antibody against *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* in cattle by enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Rec.* 105(8): 165-167.
- PEARSON, J.E., ROKEY, N.W., HARRINGTON, R., PROCTOR, S.J. and CASSIDY, D.R.** (1972) Contagious caprine pleuropneumonia in Arizona. *JAVMA* 161: 1536-1538.
- PEREZ, I., ROMEO, L., AMENABAR, M.E., MARCO, J.C. and GONZALEZ, L.** (1992) Contagious Agalactia in sheep: and epidemiological study in the Basque Country of Spain. 9th. *International Congress of the Organization for Mycoplasmaology.*, August, Ames, Iowa (U.S.A.).
- PEREZ, I., SOLANES, M., ALVAREZ, J., ALGAR, J., MARCO, J. and FECED, J.** (1990)

Eficacia en el control de un foco de Agalaxia Contagiosa de una vacuna a base de *Mycoplasma agalactiae* inactivado presentado en doble emulsión (Galazel) en un rebaño ovino/caprino en Medinaceli (Soria). XV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, Córdoba.

PERREAU, P. (1974) Syndrome d'agalaxie contagieuse a *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. Nouvelles observations. *Bull. Acad. Vet. France* 47 (4): 179-188.

PERREAU, P. (1977) Les mycoplasmoses des petits ruminants en France-Données actuelles. III Journées Rech. Oviene et Caprine, Paris volume: 228-237.

PERREAU, P. (1979a) Les mycoplasmoses de la chèvre. *Cah. Méd. Vet.* 48: 71-85.

PERREAU, P. (1979c) Mycoplasmosose caprine à *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* en France. *Bull. Acad. Vét. de France* 52: 575-581.

PERREAU, P. (1984) Les mycoplasmosis de la chèvre. *Malad. chèv.* 9: 245-256.

PERREAU, P. and BREARD, A. (1979b) La mycoplasmosose caprine a *M. capricolum*. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2: 87-97.

PERREAU, P., GLAUFFRET, A., CAZAUBON, P. and LAMBERT, M. (1975) Le foyer d'Agalaxie Contagieuse du Pais Basque. *Bull. Acad. Vet.* 48: 349-357.

PICAVET, D.P. (1984) Évolution de deux foyers d'agalactie contagieuse caprine en Ariège. *Revue Méd. Vét.* 135: 517-525.

PICAVET, D.P. (1991) La pleuropneumonie contagieuse de la chèvre (PPCC). *Revue Méd. Vét.* 142: 377-387.

PICAVET, D.P., TAINTURIER, D., CHANTAL, D., FERNEY, J., AKAKPO, J. and BALEZO, P. (1983) A propos de quelques foyers d'agalactiae contagieuse de la chèvre dans le Sudouest de la France. *Rev. Sci. Tec. Off. Int. Epiz.* 2(2): 489-497.

POUMARAT, F., LONGCHAMBON, D. and MARTEL, J.L. (1992) Application of dot immunobinding on membrane filtration (M F dot) to the study of relationships within "M. mycoides cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. *Vet. Microbiol.* 32: 375-390.

POUMARAT, F., FERRIN, M., BELLI, P. and MARTEL, J.L. (1989) Corrélation entre l'excrétion des mycoplasmes et les cinétiques des anticorps mis en évidence par fixation du complément, hémagglutination passive et séroagglutination rapide, au cours d'une infection expérimentale de bovins par *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* SC. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 42: 357-364.

POUMARAT, F., FERRIN, M., BELLI, P., LONGCHAMBON, D., Le GOFF, C. and MARTEL, J.L. (1989) Recherche sur l'origine des fausses réactions positives dans le diagnostic sérologique de la péripneumonie contagieuse bovine. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.* 42: 371-378.

POVEDA, J.B. (1988) Estudio epizootiológico de infecciones por microorganismos del Género

Mycoplasma en aves. Tesis Doctoral, Córdoba, España.

POVEDA, J.B., VILLALBA, E.J., GARRIDO, A., DOMENECH, J. and PORTERO, J.M. (1989) Evaluación de la Técnica de Inhibición del Crecimiento en la identificación de los micoplasmas caprinos. *Proc. Nat. Cong. Microbiol. Spanish Society of Microbiology*. Pamplona: 105.

PRASAD, L.N., GUPTA, P.P. and SINGH, N. (1984) Isolation of mycoplasmas from goat mastitis. *Indian J. Anim. Sci.* 54: 1172-1175.

PRASAD, L.N., GUPTA, P.P. and SINGH, N. (1985) Experimental *Mycoplasma arginini* in goats. *Australian Vet. J.* 62: 341-342.

PURCELL, R.H., TAYLOR-ROBINSON, D., WONG, D.C. and CHANOCK, R.M. (1966) Colour test for the mesurement of antibody of T-strain mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 92: 6-12.

RADWAN, A.I., AL-ZEFTAWI, N.M., AL-ISSA, M.A., BEKAIRI, S.I. and AL-MUKAYEL, A.A. (1985) Mycoplasma isolated from goats and sheep with pleuropneumonia in Saudi Arabia. *Trop. Ani. Hlth Prod.* 17: 233-238.

RAHMAN, T. and SINGH, B. (1990) Clinicopathological features of pulmonary mycoplasma in goats. *Indian vet. J.* 67: 915-919.

RAHMAN, T. and SINGH, B. (1990) Clinicopathological features of pulmonary mycoplasmas in goats. *Indian Vet. J.* 67: 915-919.

RAPOPORT, E. and BAR-MOSHE, B. (1984) *Mycoplasma mycoides* in goats in Israël: Clinical epidemiology and preventive aspects. In: *Les maladies de la chèvre*. Les colloques de l'INRA, pp. 28:257-262.

RAPOPORT, E. and LEVINSHON, S. (1993) *Mycoplasma* as udder pathogens. *Symposium de ordeño mecánico*, Budapest.

RAZIN, S. (1978) The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.* 42(2): 414-470.

RAZIN, S. (1979) Isolation and characterization of micoplasma membranes. In: *The Mycoplasmas*. Vol.I, Barile, M. y Razin, S., Academic Press., pp. 213-230.

RAZIN, S. (1983) Urea hydrolisis. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. I, Razin, S. and Tully J.G., New York. Academic Press, pp. 351-353.

RAZIN, S. and CIRILLO, V.P. (1983) Sugar fermentation. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J.G., New York. Academic Press., pp. 337-343.

REAL, F. (1982) Estudio serológico de distintas infecciones en la población caprina de Santa Cruz de Tenerife. *Hygia Pecoris* IV(7): 15-47.

REAL, F., DENIZ, S., ACOSTA, B., FERRER, O., y, and POVEDA, J.B. (1994) Caprine Contagious Agalactia caused by *M. agalactiae* in the Canary Island. *Vet. Rec.* 135: 15-16.

REGALLA, J. (1987) Notes on the contagious agalactia syndrome in Portugal. *Comission of the European Communities*,: 7-10.

RODRIGUEZ, J.L., ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A., HERRAEZ, P., POVEDA, J.B. and

- FERNANDEZ, A.** (1995) Isolation of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (LC variant)*, from two naturally aborted caprine fetuses. *Theriogenology* 44: 1003-1009.
- RODRIGUEZ, J.L., GUTIERREZ, C., POVEDA, J.B., QUESADA, M. and FERNANDEZ, A.** (1993) Infección por *Mycoplasma putrefaciens* en chivos. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 23-25 Septiembre, Albacete.
- RODRIGUEZ, J.L., POVEDA, J.B., GUTIERREZ, C., ACOSTA, B. and FERNANDEZ, A.** (1994) Polyarthritis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Vet. Rec.* 135: 406-407.
- RODRIGUEZ, J.L., POVEDA, J.B., OROS, J., HERRAEZ, P., SIERRA, M.A. and FERNANDEZ, A.** (1995) High mortality in goats associated with the isolation of a strain of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (Large Colony Type)*. *J. Vet. Med.* 42: 587-593.
- RODRIGUEZ, J.L., RODRIGUEZ, F., ESPINOSA DE LOS MONTEROS, A., HERRAEZ, P., CHACON-M DE LARA and POVEDA, J.B.** (1993) Alta mortalidad en ganado caprino asociada al aislamiento de una cepa intermedia del grupo *Mycoides*. XVIII Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia, 23-25 Septiembre, Albacete.
- RODRIGUEZ, M. and SCHUDEL, A.A.** (1993) Hibridización de ácidos nucleicos y amplificación en cadena por polimerasa en el diagnóstico de enfermedades infecciosas de los animales. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12(2): 385-404.
- ROSENDAL, S.** (1981) Experimental infection of goats, sheep and calves with the large colony type of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*. *Vet. Pathol.* 18: 71-81.
- ROSENDAL, S.** (1983) Susceptibility of goats and calves after experimental inoculation or contact exposure to a canadian strain of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* isolated from a goat. *Can. J. Comp. Med.* 47: 484-490.
- ROSENDAL, S.** (1984) Effect of the caprine variant of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* on endothelium, monocytes, and complement of guinea pig, calf, sheep, and goat serum. *Am. J. Vet. Res.* 45: 2396-2402.
- ROSENDAL, S.** (1986) *Mycoplasma*. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals, C.L. Gyles and C.O. Thoen, The Iowa Stat University Press, pp. 205-215.
- ROSENDAL, S.** (1986) *Mycoplasma*. C.L. Gyles and C.O. Thoen Eds., The Iowa Stat University Press, pp. 205-215.
- ROSENDAL, S. and BLACK, F.T.** (1972) Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B* 80: 615-622.
- ROSENDAL, S., ERNO, H. and WYAND, D.S.** (1979) *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* as a cause of polyarthritis in goats. *JAVMA* 175: 378-380.
- ROTTEN, S. and RAZIN, S.** (1972) Isolation of mycoplasma membranes by digitonin. *J. Bacteriol.* 110: 699-705.
- RUHNKE, H.L., ROSENDAL, S., GOLTZ, J. and BLACKWELL, T.E.** (1983) Isolation of

- Mycoplasma mycoides subspecies mycoides* from polyarthritis and mastitis of goats in Canada. *Can. Vet. J.* 24: 54-56.
- RURANGIRWA, F.R., MASIGA, W.N. and MUTHOMI, E.K. (1984) Immunisation of goats against contagious caprine pleuropneumonia using sonicated antigens of F-38 strain of mycoplasma. *Res. Vet. Sci.* 36: 174-176.
- RURANGIRWA, F.R., McGUIRE, T.C., KIBOR, A. and CHEMA, S. (1987) A latex agglutination test for field diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.* 121: 191-193.
- RURANGIRWA, F.R., McGUIRE, T.C., KIBOR, A. and CHEMA, S. (1987) An inactivated vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.* 121: 397-402.
- RURANGIRWA, F.R., McGUIRE, T.C., MBAL, L., NDUNG, U.L. and WANBUGU, A. (1991) Preliminary field test of lyophilised contagious caprine pleuropneumonia vaccine. *Res. Vet. Sci.* 50: 240-241.
- SAIZ, and MORENO, L. (1959) Agalaxia Contagiosa. Estudio experimental del virus y de sus características ecológicas. *Tesis Doctoral*.
- SANGUINETTI, V., BALDELLI, R. and SEMPRONI, G. (1982) *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, LC type, from goats in Italy. *Vet. Res. Commun.* 5: 327-335.
- SARRIS, K., PAPADOPOULOS, O., ERNO, H. and DIMARELI, (1987) Some aspects of the *Mycoplasma* of Oedema Disease of goats. *CEC meeting on contagious agalactia and other mycoplasmal diseases of small ruminants* Niza: 35-42.
- SCHAEREN, W. and NICOLET, J. (1982) Anwendung eines Micro-ELISA für die serologie der infektiösen agalaktie der Ziegen. *Schweiz. Arch. Tierheilk* 124: 163-177.
- SCHIMKE, R.T. and BARILLE, M.F. (1963) Arginine metabolism in pleuropneumonia-like organisms isolate from Mammalian cell culture. *J. Bacteriol.* 86: 195-206.
- SCHIMKE, R.T., BERLIN, C.M., SWEENEY, W.E. and CARROL, W.R. (1966) Degeneration of energy by the arginine-dihidrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *J. Biol. Chem.* 241: 2228.
- SENERFIT, L.B. (1983) Tetrazolium reduction. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Vol. I, *Razin, S. and Tully, J.G.*, New York. Academic Press., pp. 377-378.
- SENERFIT, L.B. and JENSEN, K.E. (1966) Antimetabolic antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* measure by tetrazolium reduction inhibition. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 122: 786-790.
- SHEPARD, M.C. and HOWARD, D.R. (1970) Identification of "T" mycoplasmas in primary agar cultures by means of a direct test for urease. In: *Ann. New York. Acad. Sci.*, 174: 809-819.
- SIMOS, E.C. (1987) Contagious caprine pleuropneumoniae and Sparta Disease of goats in Greece. *CEC meeting on contagious agalactia and other micoplasmal disease of small ruminants*, Niza, 35-42.
- SINGH, N., RAJYA, B.S. and MOHANTY, G.C. (1974) Granular vulvovaginitis (GVV) in goats associated with *Mycoplasma agalactiae*. *Cornell Vet.* 64: 435-442.

- SMITH, G.R. and OLIPHANT, J.C.** (1981) Observations on the antigenic differences between the so-called SC and LC strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *J. Hyg., Camb.* 87: 437-442.
- SMITH, G.R. and OLIPHANT, J.C.** (1981) The ability of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* and closely related strain from goats and sheep to immunize mice against subspecies *capri*. *J. Hyg.* 87: 321-329.
- SMITH, G.R. and OLIPHANT, J.C.** (1982) Some in-vitro characters of the subspecies of *Mycoplasma mycoides*. *J. Hyg. Camb.* 89: 521-527.
- SMITH, P.F.** (1971) Interaction of mycoplasmas with their environment. In: *The biology of mycoplasmas*, Bueton, E.D.; Cameron, I.L. y Padilla, G.M., New York, Academic Press.
- SOERIPTO and POERWADIKARTA, M.B.** (1990) Isolation of *Mycoplasma spp.* from keratoconjunctivitis of goats. *Penyakit Hewan* 22: 76-79.
- SORENSEN, V., BARFOD, K. and FELD, N.C.** (1992) Evaluation of a monoclonal blocking ELISA and IHA for antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in SPF-pig herds. *Vet. Rec.* 130: 488-490.
- SREERAMULU, P. and KRISHNASWAMY, S.** (1987) Antigenic analysis of *Mycoplasma* isolates from lambs pneumonia. *Indian J. Comp. Microbiol. Immunol. infect. Dis.* 8: 19-23.
- SRIVASTAVA, N.C., CHATTOPADHYAY, S.K., SIKDAR, A., SINGH, V.P. and TRIPATHY, B.N.** (1992) Isolation of *Mycoplasma agalactiae* from acute fibrinous pleuri-pneumonia of sheep. International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, 2-7 August, Ames (Iowa) U.S.A.: 173.
- STANDBRIDGE, E. and REFF, M.E.** (1979) The molecular biology of *Mycoplasma*. In: *The Mycoplasma*. Vol.I. Cell Biology., Barile, M. y Razin, S., Academic Press., pp. 157-186.
- SUBCOMITE DE TAXONOMIA DE MOLLICUTES,** (1979) Proposal of minimal standars for descriptions of new species of the class Mollicutes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29: 172-180.
- SWANEPOEL, R., EFSTRATIOU, S. and BLACKBURN, N.K.** (1977) *Mycoplasma capricolum* associated with arthritis in sheep. *Vet. Rec.* 101: 446-447.
- TALAVERA, J., GONCER, A., y, and FUENTES, O.** (1981) Isolation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) from vagina, nasal cavities and external ear canal of clinically healthy sheep. *Anales Inst. Nac. Invest. Agr. Ganader.* Madrid, 2(1): 149-153.
- TALAVERA, J., y, and GONCER, A.** (1983) Contribución al estudio de la Agalaxia Contagiosa de la oveja y de la cabra en España. *III Symp. Int. Ordeño Peq. Rum. Valladolid* : 539-550.
- TAOUDI, A., JOHNSON, D.W. and KHEYYALI, D.** (1987) Pathogenicity of *Mycoplasma capricolum* in sheep after experimental infection. *Vet. Microbiol.* 14: 137-144.
- TAYLOR-ROBINSON, D.** (1979) Metabolism inhibition test. In: *Methods in Mycoplasmaology*, Razin, S. and Tully, J. , Academic Press., New York, pp. 109-114.
- TAYLOR-ROBINSON, D.** (1983) Metabolism inhibition tests. In: *Methods in Mycoplasmaology*. Vol.I, Razin, s. and Tully, J.G. eds, New York. Academic Press., pp. 411-417.

- TAYLOR-ROBINSON, D., PURCELL, R.H., WONG, D.C. and CHANOK, R.M. (1966)** A color test for the measurement of antibody to certain *Mycoplasma* species based on the inhibition of acid production. *J. Hyg.* 64: 91-104.
- TESSLER, J. and YEDLOUTSCHNIG, R.J. (1972)** Immunofluorescence for identifying *Mycoplasma mycoides* var. *mycoides* and *M. mycoides* var. *capri* Strain. *Can. J. comp. Med.* 36: 403-405.
- THIAUCOURT, F. and MARIA, A. (1989)** Note sur le titrage des vaccins péripneumonie. Nouvelle approche d'un vieux problème, essais préliminaires. *Revue Élev. Méd. vét. Pays trop.* 42: 389-391.
- THIAUCOURT, F.D.I. and MARIA, A. (1992)** A new microtitration method for the enumeration of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) vaccines. *Biolog.* 20: 11-13.
- THIGPEN, J.E., KORNEGAY, R.W., CHANG, J., MCGHEE, C.E. and THIERRY, B.S. (1981)** Pneumonia in goats caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides*. *JAVMA* 178: 711-712.
- THIRKELL, D., SPOONER, R.K., JONES, G.E. and RUSSELL, W.C. (1990)** The humoral response of lambs experimentally infected with *Mycoplasma ovipneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 24: 143-153.
- THRUSFIELD, M. (1990)** In: En "Epidemiología Veterinaria", *Acribia*, Zaragoza.
- TOPLEY, and WILSON'S, (1990)** The *Mycoplasmatales: Mycoplasma, Ureaplasma, Acholeplasma, Spiroplasma* and *Anaeroplasmata*. In: Principles of Bacteriology, Virology and Immunity, *Ton Parker, M. and Duerden, B.I.*, pp. 663-681.
- TORIO, J.P. (1967)** Contribution à l'étude de l'Agalactie Contagieuse en Basse Navarre. *Thèse Toulouse (France)*.
- TOURTELLOTE, M.E. and JACOBS, R.E. (1960)** Physiological and serologic comparison of PPLO from various sources. *Ann. New York. Acad. Sci.*, volume: 79: 521-530.
- TRUSCOTT, R.B. and FINLEY, G.G. (1985)** Studies on *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (LC) in lambs and calves. *Can. J. Comp. Med.* 49: 233-234.
- TSAKNAKES, E., KONTOS, P., MPOUPTZE, E., MEGA, A., SARRES, K., TSANAKIS, I. and SARRIS, K. (1992)** Epidemiological studies on contagious agalactia in sheep and goats in Chalkidiki, northern Greece. *Bull. Hellen. Vet. Med. Soc.* 43(4): 250-254.
- TULLY, J.G. (1983)** Test for diginonin sensitivity and sterol requirement. In: *Methods in Mycoplasmaology. Vol.I, Razin, S. and Tully, J.G.*, New York. Academic Press, pp. 355-362.
- TULLY, J.G., BARILE, M.F., EDWARD, D.G.F.F., THEODORES, T.S. and ERNO, H. (1974)** Characterization of some caprine mycoplasmas, with proposals for new species, *Mycoplasma capricolum* and *Mycoplasma putrefaciens*. *J. Gen. Microbiol.* 85: 102-120.
- TULLY, J.G., BOVE, J.M., LAIGRET, F. and WHITCOMB, R.F. (1993)** Revised Taxonomy of the Class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of Arthropod-Associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for Familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species

(*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the Order *Mycoplasmatales*, Family *Mycoplasmataceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43(2): 378-385.

VALDIVIESO-GARCIA, A. and ROSENDAL, S. (1982) Variation in colony size of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* isolated from goats. *Vet. Rec.* 110: 470-471.

VAN KUPPEVELD, F.J.M., VAN DER LOGT, J.T.M., ANGULO, A.F.; VAN ZOEST, M.J., QUINT, M.G.V., NIESTER, H.G.M., GALAMA, J.M.D. and MELCHERS, W.J.G. (1992) Genus and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. *App. Env. Microbiol.* pp 2606-2615.

VILLALBA, E.J., POVEDA, J.B., FERNANDEZ, A., RODRIGUEZ, J.L., GUTIERREZ, C. and GOMEZ-VILLAMANDOS, J. (1992) An outbreak caused by *Mycoplasma mycoides* species in goats in the Canary Island. *Vet. Rec.* 130: 330-331.

WALLACE, A. and CLYDE, J.R. (1963) Mycoplasma species identification based upon growth inhibition by specific antisera. *J. Immunol.* 92: 958-965.

WEISBURG, W.G., TULLY, J.G., ROSE, D.L., PETZEL, J.P., OYAIZU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T.G., VAN ETTEN, J., MANILOFF, J. and WOESE, C. (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Bacteriol.* 171: 6455-6467.

WEISBURG, W., TULLY, J.G., ROSE, D.L., PETZEL, J.P., OYAIZU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., SECHREST, J., LAWRENCE, T.G., VAN, , ETTEN, J., MANILOFF, J. and WOESE, C.R. (1989) A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *Bacteriol.* 171: 6455-6467.

WESONGA, H.O. (1991) Haematological values of galla goats experimentally infected with *Mycoplasma strain F38*. *Small Rum. Res.* 10: 45-54.

WHITCOMB, R.F. (1983) Culture media for spiroplasmas. *Academic Press*, New York, pp. 159-162.

WHITLEY, J.C. and FINCH, L.R. (1989) Location of sites of transposon Tn916 insertion in the *Mycoplasma mycoides* genome. *J. Bacteriol.* 171: 6870-6872.

WILLIAMS, C.O. and WITTER, L.R. (1971) Hydrolysis of aesculin and phosphatase production by members of the Order *Mycoplasmatales* which do not require sterol. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 21: 73-77.

WOODS, L.L. and SMITH, T.F. (1972) Tetrazolium agar overlay in test for *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl. Microbiol.* 24: 148-149.

ZAVAGLI, V. (1951) L'agalaxie contagieuse des brebis et des chèvres. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 6: 336-362.