

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOLÓGICO Y
MICROBIOLÓGICO DE UN REBAÑO CON ANTECEDENTES DE
PLEURONEUMONÍA CAPRINA**

JORGE IGNACIO ORÓS MONTÓN

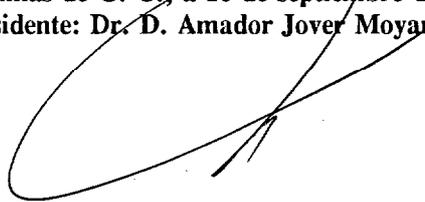
Las Palmas de Gran Canaria, 1995

58/1994-95

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, la aspirante expuso esta TESIS DOCTORAL.

Terminada la lectura y contestadas por el Doctorando las objeciones formuladas por los señores jueces del Tribunal, éste calificó dicho trabajo con la nota de APTO CUM LAUDE (por unanimidad) Las Palmas de G. C., a 16 de septiembre de 1995.
El Presidente: Dr. D. Amador Jover Moyano,



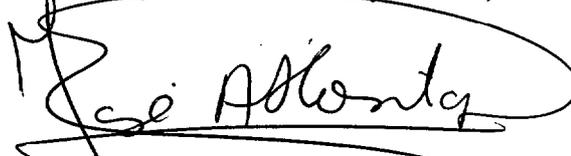
El Secretario: Dr. D. Anselmo Gracia Molina,



El Vocal: Dr. D. Salvador Climent Peris,



El Vocal: Dr. D. José Alberto Montoya Alonso,



El Vocal: Dr. D. Serafín Gómez Cabrera,



El Doctorando: D. Jorge Ignacio Orós Montón,



UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

**ESTUDIO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOLÓGICO Y
MICROBIOLÓGICO DE UN REBAÑO CON ANTECEDENTES DE
PLEURONEUMONÍA CAPRINA**

JORGE IGNACIO ORÓS MONTÓN

Las Palmas de Gran Canaria, 1995

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

DOCTORADO EN VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA

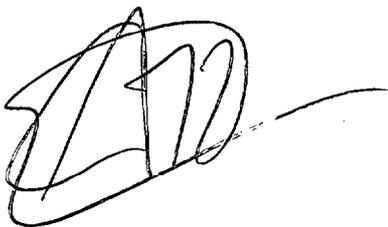
**ESTUDIO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOLÓGICO Y
MICROBIOLÓGICO DE UN REBAÑO CON ANTECEDENTES DE
PLEURONEUMONÍA CAPRINA**

Tesis Doctoral presentada por D. Jorge Ignacio Orós Montón

Dirigida por el Dr. D. Antonio J. Fernández Rodríguez

Codirigida por el Dr. D. José B. Poveda Guerrero

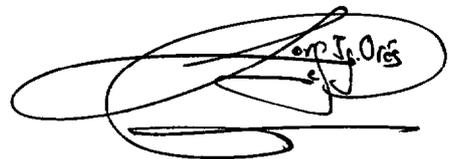
El Director



El Codirector



El Doctorando



Las Palmas de Gran Canaria, 20 de Junio de 1995

ANTONIO J. FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE CONOCIMIENTO DE ANATOMÍA Y ANATOMÍA PATOLÓGICA COMPARADAS DEL DEPARTAMENTO DE MORFOLOGÍA DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA U.L.P.G.C.

INFORMA:

Que **D. JORGE IGNACIO ORÓS MONTÓN**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **ESTUDIO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO DE UN REBAÑO CON ANTECEDENTES DE PLEURONEUMONÍA CAPRINA**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para su presentación por el interesado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, 20 de Junio de 1995



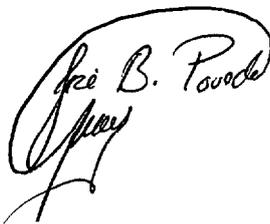
Fdo. Antonio J. Fernández Rodríguez

JOSÉ B. POVEDA GUERRERO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL, PRODUCCIÓN ANIMAL, Y CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE LA UNIVERSIDAD DE LA U.L.P.G.C.

INFORMA:

Que **D. JORGE IGNACIO ORÓS MONTÓN**, Licenciado en Veterinaria, ha realizado bajo mi dirección y asesoramiento el presente trabajo titulado **ESTUDIO HISTOLÓGICO, INMUNOHISTOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO DE UN REBAÑO CON ANTECEDENTES DE PLEURONEUMONÍA CAPRINA**, el cual considero reúne las condiciones y calidad científica para su presentación por el interesado para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

Las Palmas de Gran Canaria, 20 de Junio de 1995

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José B. Poveda Guerrero', written in a cursive style.

Fdo. José B. Poveda Guerrero

*A mis padres y hermanos
A Laura*

Índice

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 MICOPLASMAS Y MICOPLASMOSIS	6
2.1.1 <i>Micoplasmas.</i>	6
2.1.2 <i>Micoplasmosis.</i>	8
2.1.2.1 <i>Enfermedades del aparato respiratorio.</i>	9
2.1.2.2 <i>Enfermedades de las articulaciones.</i>	10
2.1.2.3 <i>Enfermedades del aparato genital y glándula mamaria.</i>	10
2.1.2.4 <i>Enfermedades del globo ocular.</i>	11
2.2 MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS MICOPLASMOSIS RESPIRATORIAS	12
2.2.1 <i>Factores dependientes de los micoplasmas.</i>	13
2.2.1.1 <i>Exposición o contacto con el epitelio respiratorio.</i>	13
2.2.1.2 <i>Unión de los micoplasmas a las células epiteliales.</i>	13
2.2.1.3 <i>Capacidad de producción de toxinas.</i>	14
2.2.1.4 <i>Presencia de una cápsula.</i>	15
2.2.1.5 <i>Adquisición o síntesis de antígenos comunes a los del propio hospedador.</i>	15
2.2.2 <i>Factores dependientes del hospedador.</i>	16
2.2.2.1 <i>Interacción del micoplasma con el sistema defensivo primario del organismo (macrófagos y neutrófilos).</i>	16
2.2.2.2 <i>Interacción con el sistema complemento.</i>	17

2.2.2.3	<i>Activación del sistema de coagulación.</i>	17
2.2.2.4	<i>Actividad inmunosupresora.</i>	17
2.2.2.5	<i>Mitogénesis no específica de linfocitos.</i>	18
2.2.2.6	<i>Desarrollo de una respuesta inmune específica.</i>	18
2.3	MICOPLASMAS Y MICOPLASMOSIS DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES.	19
2.4	NEUMONÍAS PRODUCIDAS POR ESPECIES DEL GRUPO <i>MYCOPLASMA MYCOIDES</i> EN CAPRINO	23
2.4.1	<i>Pleuroneumonía contagiosa caprina clásica.</i>	23
2.4.2	<i>Neumonía producida por <u>Mycoplasma mycoides</u> subsp. <u>mycoides</u> de grandes colonias.</i>	25
2.4.3	<i>Neumonía producida por <u>Mycoplasma mycoides</u> subsp. <u>capri</u>.</i>	33
2.4.4	<i>Neumonía producida por <u>Mycoplasma capricolum</u> subsp. <u>capricolum</u>.</i>	35
2.5	NEUMONÍAS CAUSADAS POR OTROS MICOPLASMAS	36
2.5.1	<i>Neumonía producida por <u>Mycoplasma ovipneumoniae</u>.</i>	36
2.5.2	<i>Neumonía producida por <u>Mycoplasma agalactiae</u>.</i>	36
2.6	OTRAS ESPECIES NO PATÓGENAS DE MICOPLASMAS.	37
2.7	NEUMONÍAS POR PASTEURELAS EN EL GANADO CAPRINO Y OVINO.	37
2.8	NEUMONÍA ENZOÓTICA	39
2.8.1	<i>Neumonía enzoótica en vacuno.</i>	39
2.8.2	<i>Neumonía enzoótica en ovino.</i>	40
2.8.3	<i>Neumonía enzoótica en porcino.</i>	42
2.9	DEMOSTRACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MICOPLASMAS EN TEJIDOS FIJADOS	43
2.10	BACILO ASOCIADO A LA MUCOSA RESPIRATORIA CILIADA (CAR-BACILLUS)	45
2.10.1	<i>Descripción y evolución histórica.</i>	45
2.10.2	<i>Aislamiento.</i>	48
2.10.3	<i>Diagnóstico serológico.</i>	49
2.10.4	<i>Lesiones.</i>	49
2.10.4.1	<i>Ratas.</i>	49
2.10.4.2	<i>Ratones.</i>	50
2.10.4.3	<i>Conejos.</i>	50

2.10.4.4	<i>Cobayas</i>	51
2.10.4.5	<i>Hámster</i>	51
2.10.4.6	<i>Bovino</i>	52
2.10.4.7	<i>Caprino y ovino</i>	52
2.11	MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS MOLLICUTES	52
2.12	MÉTODOS SEROLÓGICOS DE IDENTIFICACIÓN	54
	MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1	MATERIAL	58
3.1.1	<i>Animales</i>	58
3.1.2	<i>Material para el estudio microbiológico e histológico</i>	59
3.1.2.1	<i>Muestras procesadas</i>	59
3.1.2.2	<i>Medios de cultivo para Micoplasmas</i>	59
3.1.2.3	<i>Medios de cultivo para otras bacterias</i>	60
3.1.3	<i>Antisueros empleados</i>	60
3.1.3.1	<i>Sueros anti-Micoplasmas</i>	60
3.1.3.2	<i>Sueros anti-Pasteurella</i>	60
3.1.3.3	<i>Suero anti-CAR bacillus</i>	61
3.1.3.4	<i>Antisuero secundario y otros reactivos</i>	61
3.2	METODOLOGÍA	61
3.2.1	<i>Estudio estructural</i>	61
3.2.2	<i>Estudio microbiológico. Micoplasmas</i>	62
3.2.2.1	<i>Aislamiento de Micoplasmas</i>	62
3.2.2.2	<i>Clonaje de los aislamientos</i>	63
3.2.2.3	<i>Pruebas bioquímicas</i>	63
3.2.2.4	<i>Identificación serológica</i>	67
3.2.3	<i>Estudio microbiológico. Otras bacterias</i>	69
3.2.3.1	<i>Aislamiento</i>	69
3.2.3.2	<i>Identificación</i>	70
3.2.4	<i>Estudio inmunohistológico</i>	70

3.2.5	<i>Estudio ultraestructural.</i>	72
3.2.6	<i>Estudio serológico.</i>	72
3.2.7.	<i>Estudio hematológico</i>	73
RESULTADOS		74
4.1	LESIONES MACROSCÓPICAS	75
4.2	ESTUDIO ESTRUCTURAL.	76
4.2.1	<i>Lesiones pulmonares.</i>	76
4.2.2	<i>Lesiones en tráquea.</i>	87
4.2.3	<i>Demostración histoquímica de los CAR-bacilli.</i>	87
4.2.4	<i>Relación lesiones pulmonares-CAR bacilli.</i>	89
4.2.5	<i>Relación traqueítis-CAR bacilli.</i>	89
4.3	AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO	90
4.3.1	<i>Micoplasmas.</i>	90
4.3.2	<i>Otras bacterias.</i>	91
4.3.3	<i>Relación lesiones pulmonares-aislamiento microbiológico.</i>	94
4.4	ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO	95
4.5	ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL	97
4.6	ESTUDIO SEROLÓGICO	97
4.6.1	<i><u>Mycoplasma mycoides</u> subsp. <u>mycoides</u> Large Colony.</i>	98
4.6.2	<i><u>Mycoplasma agalactiae.</u></i>	99
4.7	ESTUDIO HEMATOLÓGICO	99
ICONOGRAFÍA		101
DISCUSIÓN		127
CONCLUSIONES		142
RESUMEN		145
SUMMARY		148
AGRADECIMIENTOS		151
BIBLIOGRAFÍA		153

Introducción

Durante la 62ª Asamblea General de la Oficina Internacional de Epizootias (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, considerándose éste muy importante a nivel mundial. En particular se consideró que enfermedades como la pleuroneumonía contagiosa bovina, la pleuroneumonía contagiosa caprina y la agalaxia de los pequeños rumiantes y los bovinos, causadas por diferentes especies de micoplasmas, debían estudiarse con especial interés, así como controlarse de una manera eficaz mediante sistemas de diagnóstico y vigilancia epidemiológica apropiados. Igualmente la OIE recomendó priorizar la investigación sobre las micoplasmosis infecciosas en el ganado bovino, ovino y caprino con el fin de desarrollar nuevos, eficaces y accesibles métodos de diagnóstico para estos agentes infecciosos. (Resolución OIE nº XI, 1994).

En efecto, las infecciones por micoplasmas en el ganado caprino son responsables de importantes pérdidas económicas en países del continente Africano, países europeos del área Mediterránea, Estados Unidos y la India. La dificultad que presentan algunos micoplasmas patógenos para su aislamiento e identificación, los distintos cuadros clínicos y lesionales fácilmente atribuibles a otros microorganismos, y la falta de un conocimiento profundo del mecanismo patogénico de las infecciones por micoplasmas, hacen suponer que la incidencia de estas micoplasmosis caprinas es mucho mayor que la referenciada en la bibliografía.

En el año 1991 se constituyó un grupo de investigación en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, en colaboración con otras Facultades y centros de investigación nacionales y extranjeros. Esta colaboración se ha concretado en una acción COST (Contagious bovine, ovine and caprine mycoplasmosis: control, diagnostic and prevention) a nivel europeo, en la que nuestro grupo tiene como principal objetivo el estudio de la patología provocada por micoplasmas del grupo *Mycoplasma mycoides* en el ganado

caprino. Nuestros trabajos se iniciaron a raíz de un brote de Pleuroneumonía Caprina en un rebaño de 700 animales de raza autóctona canaria, entre los meses de Septiembre y Diciembre de 1990, y localizado en el municipio de San Nicolás de Tolentino en la isla de Gran Canaria. Los antecedentes clínicos del colectivo señalaban una periodicidad estacional, durante los meses de otoño e invierno desde la primera aparición de la enfermedad en 1985, en la que la mortalidad alcanzó el 50% del rebaño. En años sucesivos, la mortalidad se mantuvo alta y cuando se produjo el nuevo brote de Pleuroneumonía en 1990 se iniciaron los primeros trabajos anatomopatológicos y microbiológicos con la finalidad de determinar los agentes causales de la enfermedad.

Fruto de estos estudios se presentó la Tesis Doctoral "Estudio Estructural y Ultraestructural de las Lesiones Pulmonares Inducidas por la Infección Natural y Experimental de Micoplasmas del Grupo *M. Mycoides* (Aislados en Gran Canaria)" (Rodríguez, 1993). Dicho trabajo demostró la participación de *M. mycoides* subsp. *capri* (*Mmc*) en el brote de Pleuroneumonía Caprina, constituyendo la primera referencia de esta especie en España, y el aislamiento de *M. mycoides* subsp. *mycoides Large Colony* (*MmmLC*) por primera vez en las Islas Canarias, lo que confirmó la amplia difusión de este microorganismo (Villalba y cols., 1992).

En cuanto al estudio de la patogenia de la enfermedad se concluyó que la adhesión de los micoplasmas a los cilios de las células epiteliales del tracto respiratorio es determinante para el inicio, desarrollo y persistencia de la infección micoplásmica, siendo la lesión bronconeumónica la fase previa para el desarrollo de la Pleuroneumonía. La aparición de los focos de necrosis, la lesión de los septos interlobulillares y de la pleura, el aumento de los micoplasmas extracelulares y la vehiculación y multiplicación de los mismos en sangre son las características morfológicas, inmunohistológicas y microbiológicas más importantes en la fase patogénica intermedia de la enfermedad. La fase patogénica final de la enfermedad está representada por la bacteriemia-septicemia, siendo la responsable de la aparición de cuadros clínico-lesionales adicionales no respiratorios.

El estudio experimental demostró que la reproducción de las lesiones pleuroneumónicas fue posible únicamente al inocular simultáneamente ambos micoplasmas (*Mmc* y *MmmLC*) por vía intratraqueal en cabritos de siete días de edad, mientras que en cabritos de tres a cuatro meses de edad sólo se desarrollaron lesiones bronconeumónicas, lo que confirmó que la vía de inoculación, la dosis, la edad, el sistema inmune, el estado fisiológico del animal, y el sinergismo patogénico son factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad aguda.

Dadas las cuantiosas y continuas pérdidas económicas que sufría la citada explotación, con sucesivos brotes de Pleuroneumonía cada otoño-invierno que afectaban a un alto número de animales constituyendo un pesado lastre para la rentabilidad de la misma, la Consejería de

Agricultura del Gobierno Autónomo Canario, a petición de los propietarios, decidió practicar un vaciado sanitario de la explotación mediante el sacrificio de los casi 1000 animales de que constaba la granja. El sacrificio se llevó a cabo en Septiembre de 1993 por técnicos veterinarios de la citada Consejería de Agricultura en colaboración con los miembros del Grupo de Investigación en Micoplasmosis Animales (GIMA) de la Facultad de Veterinaria de la ULPGC. Un 10% de los animales sacrificados, elegidos entre los que presentaban de ligera a grave sintomatología respiratoria, han sido el objeto de estudio y la base del trabajo desarrollado en la presente Tesis Doctoral.

Sobre estos datos y con la finalidad básica de mejorar el conocimiento sobre la persistencia de la infección de especies de M. mycoides en el ganado caprino de esta explotación, se establecieron los objetivos de la presente Tesis Doctoral:

1.- Estudio microbiológico de los animales sacrificados, con especial atención al aparato respiratorio.

2.- Estudio histológico del aparato respiratorio de los animales sacrificados.

3.- Detección inmunohistológica de micoplasmas en el aparato respiratorio de los animales sacrificados.

Revisión Bibliográfica

2.1 MICOPLASMAS Y MICOPLASMOSIS

2.1.1 *Micoplasmas.*

La última revisión taxonómica de la clase MOLLICUTES corresponde a la realizada por Tully y cols. en 1993. Según esta clasificación se distinguen cuatro órdenes dentro de la clase MOLLICUTES. El orden I MYCOPLASMATALES, con una única Familia (MYCOPLASMATACEAE) y dos Géneros (MYCOPLASMA y UREAPLASMA) engloba aquellos mollicutes dependientes de esteroides y asociados a vertebrados. El orden II ENTOMOPLASMATALES agrupa a mollicutes no helicoidales (Fam. ENTOMOPLASMATACEAE, Géneros ENTOMOPLASMA y MESOPLASMA) y helicoidales (Fam. SPIROPLASMATACEAE, Gén. SPIROPLASMA) de insectos y plantas. El orden III ACHOLEPLASMATALES (Fam. ACHOLEPLASMATACEAE, Gén. ACHOLEPLASMA) se compone de mollicutes que no requieren colesterol y que afectan a animales vertebrados y a algunas plantas e insectos. Finalmente el orden IV ANAEROPLASMATALES (Fam. ANAEROPLASMATACEAE, Géneros ANAEROPLASMA y ASTEROLEPLASMA) agrupa a aquellos mollicutes anaerobios estrictos descritos en el rumen de bovinos y ovinos.

Los miembros de la clase Mollicutes son procariotas de pequeño tamaño, microscópicamente visibles y desprovistos de pared celular, por lo que son organismos muy pleomórficos con formas esféricas, cocoideas, filamentosas o filamentosas helicoidales. Están envueltos solamente por una membrana plasmática trilaminar con proteínas y una alta proporción de lípidos, siendo incapaces de sintetizar peptidoglucanos (Topley y Wilson's, 1990).

Los micoplasmas poseen un diámetro medio de 300 a 800 nm, pudiendo atravesar filtros entre 220 y 450 nm. Sin embargo, las formas visibles más pequeñas tienen aproximadamente 300 nm. No poseen flagelos ni microvellosidades, pero algunos de ellos son móviles. Los micoplasmas son Gram (-), se colorean mal con otras técnicas rutinarias de tinción de bacterias, pero sí en cambio con el Giemsa. El genoma de los micoplasmas es de 500-1000 Mdaltos, con un porcentaje de guanina + citosina relativamente bajo (23-46%). Resisten a la penicilina y a la lisozima y son sensibles a la lisis por shock osmótico, detergentes, alcoholes y anticuerpos específicos fijadores del complemento (Topley y Wilson's, 1990).

Estos microorganismos son capaces de multiplicarse en medios celulares, necesitando cultivos enriquecidos con colesterol (lo que se consigue mediante la adición de sueros de diferentes especies animales), y precursores de ácidos nucleicos. Cuando se cultivan en medios líquidos crecen produciendo un ligero enturbiamiento, 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, teniendo tendencia 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.

Además de las pruebas bioquímicas, los mejores métodos para la identificación de los micoplasmas son la inhibición de crecimiento y la inhibición del metabolismo, así como la utilización de la técnica de inmunofluorescencia directa o indirecta sobre colonias utilizando sueros específicos anti-micoplasmas (Picavet, 1991). En los últimos años se han desarrollado técnicas diagnósticas basadas en el empleo de anticuerpos monoclonales (Guerin y cols., 1993; Belton y cols., 1994; Thiaucourt y cols., 1994) y basadas en técnicas de biología molecular como PCR (Polymerase Chain Reaction) (Brandao y cols., 1994; Topley y cols., 1992 y 1994a,b; Hotzel y cols., 1994; Johansson y cols., 1994; Nicholas y cols., 1994).

Mediante microscopía electrónica se observa una membrana celular trilaminar, característica de todos los miembros de la clase Mollicutes, de 7.5-10 nm de grosor y una lámina intermedia menos electrodensa que las interna y externa. Periféricamente, no poseen pared rígida pero sí se ha demostrado en ciertos micoplasmas la presencia de una especie de "cápsula" compuesta por hidratos de carbono y glucolípidos de gran importancia en los mecanismos patogénicos de estos microorganismos (Topley y Wilson's, 1990).

El interior de los micoplasmas está constituido por un citoplasma poco denso, con ribosomas y material nuclear fibrilar muy manifiesto en algunas especies, en contraste con otras especies que presentan una moderada electrodensidad del material nuclear.

2.1.2 *Micoplasmosis.*

En 1990, Topley y Wilson's describieron 77 especies de micoplasmas, 28 de ellas patógenas para el hombre y los animales domésticos y salvajes. La especificidad de estos micoplasmas con respecto a su hospedador es bastante alta, aunque se han descrito casos puntuales de interespecificidad.

Las micoplasmosis son los típicos ejemplos de enfermedades multifactoriales, en las que factores tales como la existencia de infecciones intercurrentes, la constitución genética del individuo, el manejo, las condiciones climáticas adversas, la edad, el hacinamiento, etc., juegan un papel determinante en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Lefèvre y cols., 1987b; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992).

El poder patógeno de las diferentes especies de micoplasmas es muy variable, pudiéndose distinguir entre micoplasmas responsables de producir entidades patológicas calificadas como micoplasmosis mayores, como la Perineumonía Contagiosa Bovina (PNCB), micoplasmosis oportunistas y micoplasmosis saprofiticas (Perreau, 1979b). Las especies de micoplasmas patógenos muestran una alta especificidad por su hospedador, que puede estar basada en factores de colonización específicos proporcionados por el propio hospedador. Así, los receptores son necesarios para la adhesión a la membrana celular de *M. pneumoniae* o de *M. gallisepticum* (Gourlay y Howard, 1982).

Las enfermedades causadas por micoplasmas pueden ser divididas, según Rosendal (1988), en:

- 1.- Enfermedades en las cuales la septicemia es la característica más importante.
- 2.- Enfermedades en las que existe una fase septicémica, difícilmente detectable, seguida de la localización e inflamación de las serosas y/o las articulaciones.
- 3.- Enfermedades localizadas en el tracto respiratorio, tracto genital, glándula mamaria o conjuntiva. Este grupo de enfermedades puede desarrollarse después de la multiplicación local incontrolada de micoplasmas y la inmigración no invasiva a partes más sensibles del sistema u órgano.

Entre las enfermedades de este tercer grupo citaremos a continuación algunas de las más frecuentes en relación al sistema o aparato afectado.

2.1.2.1 *Enfermedades del aparato respiratorio.*

Aunque se han aislado muchos micoplasmas del aparato respiratorio del hombre y de los animales, los intentos de reproducir la enfermedad han sido en muchos casos no concluyentes. Esto parece deberse, fundamentalmente, a las dificultades que presenta el pulmón para la reproducción de enfermedades experimentales (Blood y cols., 1988).

M. mycoides subespecie mycoides (Short Colony) "MmmSC" causa la Perineumonía Contagiosa Bovina (PNCB). Ésta es la enfermedad más grave causada por microorganismos del género Mycoplasma en bovinos. Se caracteriza por ser altamente contagiosa y cursa con una pleuroneumonía fibrinosa mortal en muchos casos. Además, este micoplasma puede dar lugar a artritis sépticas con o sin lesiones pulmonares en terneros de edad inferior a las seis semanas (Blood y cols., 1988).

M. ovipneumoniae ha sido aislado tanto de lesiones neumónicas como de pulmones y tráquea de ovinos y caprinos completamente normales. Tradicionalmente, y junto a la Pasteurella haemolytica biotipo A, se ha asociado a una neumonía intersticial crónica o neumonía atípica de los corderos. (Blood y cols., 1988). La infección experimental en ovejas por vía intravenosa o aerógena, induce una neumonía intersticial similar a la observada en los casos naturales (DaMassa y cols., 1992). En este sentido, Mohan y Obwolo (1990) también observaron una neumonía intersticial en ovejas y cabras inoculadas experimentalmente con M. ovipneumoniae.

M. hyopneumoniae es el agente etiológico primario de la Neumonía Enzoótica Porcina (NEP) (Switzer, 1967). Ésta es una enfermedad muy contagiosa que se manifiesta clínicamente por signos respiratorios moderados y por una disminución en el índice de crecimiento y engorde. Histopatológicamente, la lesión se corresponde con una neumonía broncointersticial crónica. M. hyorhinis también ha sido aislado de brotes neumónicos, pero se considera un patógeno secundario, que normalmente complica cuadros causados por otros microorganismos, como M. hyopneumoniae. M. hyorhinis también ha sido asociado a cuadros de artritis y poliserositis (Switzer, 1955; Gois y Kuksa, 1974). Este microorganismo es un habitante frecuente de la cavidad nasal de cerdos sanos y enfermos, y es considerado como uno de los micoplasmas que contaminan los cultivos celulares (Barile, 1981).

M. pneumoniae es el agente causal de la Neumonía Atípica Primaria (NAP) en la especie humana, afectando principalmente a niños y jóvenes. Las lesiones, normalmente nodulares, afectan a uno de los lóbulos inferiores, en los que microscópicamente se observa una neumonía intersticial junto a una bronquitis descamativa y una bronquiolitis (Razin y Barile, 1985).

2.1.2.2 *Enfermedades de las articulaciones.*

Se considera que las lesiones en las articulaciones se producen siempre tras procesos septicémicos. Algunos ejemplos son los producidos por:

M. bovis, que desarrolla una poliartritis preferentemente en animales jóvenes, M. hyosynoviae, agente causal de una artritis no purulenta en cerdos en crecimiento, M. hyorhinis, que produce artritis y poliserositis predominantemente en cerdos jóvenes, M. agalactiae, el cual se localiza frecuentemente en articulaciones produciendo un poliartritis serosa, y M. capricolum subsp. capricolum, especialmente patógeno en el ganado caprino, aunque también ha sido descrito en ovinos y bovinos. Este micoplasma posee un claro tropismo articular, causando una poliartritis fibrinopurulenta. En inoculaciones experimentales por vía parenteral u oral causa una enfermedad sobreaguda o aguda, con septicemia y posterior artritis, afectando en menor grado al pulmón, la mama y el ojo. M. putrefaciens también se ha observado en artritis en cabritos (DaMassa y cols., 1987b; Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992; Rodríguez y cols., 1994).

2.1.2.3 *Enfermedades del aparato genital y glándula mamaria.*

Mycoplasma bovis, hasta hace poco conocido como M. agalactiae subsp. bovis, es la causa más frecuente de mamitis micoplásmica en ganado vacuno, siendo necesarios muy pocos microorganismos para reproducir experimentalmente la enfermedad. Los signos de curso rápido con inflamación de la mama y aumento en el recuento de células en leche. Además, puede causar vulvovaginitis, endometritis y salpingitis en bovinos, ovinos y caprinos. (DaMassa y cols., 1992). Ureaplasma spp. produce vulvitis granulomatosa en oveja, habiéndose logrado la reproducción de la enfermedad de forma experimental (Blood y cols., 1988).

M. agalactiae es un microorganismo patógeno que se caracteriza por producir mamitis en cabras y ovejas con una alta morbilidad y baja mortalidad. La enfermedad producida por este microorganismo se ha denominado tradicionalmente "Agalaxia contagiosa de caprinos y ovinos", término que hoy en día se considera erróneo por tres razones. En primer lugar, no está demostrado que la enfermedad sea especialmente contagiosa en cabras y ovejas adultas; en segundo lugar, no sólo se afectan las hembras; y en tercer lugar, existen otros micoplasmas,

especialmente en el ganado caprino, que también producen agalaxia (Blood y cols., 1988). La enfermedad ha sido reproducida experimentalmente induciendo una mamitis aguda que puede dar lugar a una corta y transitoria micoplasmemia, causando con frecuencia poliartritis y queratoconjuntivitis, y siendo infrecuentes las lesiones pulmonares (Rosendal, 1988; DaMassa y cols., 1992). Recientemente ha sido descrito un brote de agalaxia contagiosa caprina causado por M. agalactiae, constituyendo ésta la primera referencia de infección por este microorganismo en las Islas Canarias (Real y cols., 1994).

M. putrefaciens se ha asociado a mamitis en caprino en California y Francia (Adler y cols., 1980; Galliard-Perrin y cols., 1985). La enfermedad se caracteriza por una elevada leucocitosis en leche seguida de un súbito descenso de la producción, sin existencia de otros signos clínicos. Unos pocos microorganismos inoculados por vía intracanalicular producen una mamitis purulenta en animales en lactación (Brooks y cols., 1981). En California fue descrito un brote de mamitis y poliartritis fibrinopurulenta por este micoplasma (DaMassa y cols., 1987a). También ha sido descrito un caso de poliartritis en cabritos asociado con M. putrefaciens en la isla de Gran Canaria, en el que 15 cabritos alimentados artificialmente con leche procedente del mismo rebaño presentaron artritis fibrinopurulenta en las articulaciones carpales y tarsales; sin embargo, no se detectó mamitis clínica en el rebaño (Rodríguez y cols., 1994).

2.1.2.4 *Enfermedades del globo ocular.*

En este grupo de enfermedades las micoplasmosis más frecuentes son las producidas por:

M. bovoculi, que ha sido asociado con brotes de queratoconjuntivitis en bovinos, ovinos y caprinos, M. agalactiae, que también puede producir queratoconjuntivitis en el ganado caprino y ovino y, M. conjunctivae, el cual ha sido aislado de forma única o asociado con otros microorganismos en queratoconjuntivitis ovinas y caprinas (Egwu, 1992). Las lesiones observadas en la enfermedad natural han podido ser reproducidas experimentalmente al inyectar subconjuntivalmente este microorganismo (Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992).

2.2 MECANISMOS PATOGENICOS DE LAS MICOPLASMOSIS RESPIRATORIAS

Perreau (1979a y 1984) clasifica las distintas especies de micoplasmas en tres grupos atendiendo a su patogenicidad. Sin embargo, indica que todas ellas pueden provocar infecciones asintomáticas:

-Micoplasmas de poder patógeno indiscutible, responsables de lo que se conoce como micoplasmosis mayores. Entre otras, la Perineumonía Contagiosa Bovina (PNCB) y la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica y el denominado "Síndrome de Agalaxia Contagiosa" de los pequeños rumiantes, las cuales han sido reproducidas sin dificultad en condiciones experimentales.

-Micoplasmas oportunistas, con un poder patógeno menos claro, responsables de neumonías y mamitis en rumiantes.

-Micoplasmas saprofitos, huéspedes naturales del organismo, principalmente de las mucosas del tracto respiratorio y genital de numerosas especies animales, como M. arginini.

En general, los factores patogénicos de los micoplasmas residen, entre otros menos conocidos, en su especificidad por el hospedador, en factores tóxicos, en su capacidad de activar el complemento, en su capacidad de activar los factores de la coagulación, y en su capacidad de estimular y suprimir la respuesta del sistema inmune (Gourlay y Howard, 1982).

Según Gourlay y Howard (1982), la patogenia de las micoplasmosis respiratorias se puede dividir en las siguientes etapas:

-Exposición.

-Unión o adhesión de los micoplasmas a la superficie epitelial.

-Producción de toxinas.

-Interacción con el sistema defensivo primario (macrófagos y neutrófilos) y con el sistema inmune (celular y humoral) del hospedador.

-Inducción de factores que esquivan la respuesta del organismo como son la síntesis de cápsula, la inmunosupresión y la producción o adquisición de antígenos del hospedador.

-Inducción de una respuesta inmune específica.

Con todo, el desarrollo o no de la enfermedad dependerá, en primer lugar, del micoplasma implicado y en segundo, de la especie animal afectada así como del estado del animal en el momento de la exposición.

2.2.1 Factores dependientes de los micoplasmas.

2.2.1.1 Exposición o contacto con el epitelio respiratorio.

Los factores patogénicos en esta fase están relacionados con la capacidad de movimiento, el tamaño y la posibilidad de evitar a las sustancias micoplasmicidas. El mucus secretado por las células de la mucosa respiratoria posee capacidad micoplasmicida para los micoplasmas, al prevenir el contacto de los agentes extraños con la superficie epitelial de las vías respiratorias (Gourlay y Howard, 1982).

Algunos micoplasmas patógenos del tracto respiratorio tienen la capacidad de ser móviles, por lo que pueden modificar su estructura citoplasmática y dirigirse hacia las células epiteliales blanco de la mucosa respiratoria, a las que se adhieren. Otro factor que también ha sido indicado, es el tamaño de los micoplasmas, el cual favorece su penetración a través de la capa de mucus que recubre toda la superficie del epitelio respiratorio (Gourlay y Howard, 1982).

2.2.1.2 Unión de los micoplasmas a las células epiteliales.

Una vez que los micoplasmas acceden al aparato respiratorio, se unen a las células epiteliales para evitar su expulsión mediante los movimientos ciliares y/o el reflejo tusígeno. Esta capacidad de unión a sus células blanco es común para todos los micoplasmas respiratorios patógenos y apatógenos (Gourlay y Howard, 1982).

La capacidad de los micoplasmas para adherirse a las células eucariotas es la propiedad patógena mejor estudiada de los patógenos respiratorios (Rosendal, 1988). Algunos micoplasmas como *M. pneumoniae* y *M. gallisepticum* poseen una proteína de adhesión en su superficie mediante la cual se unen a la membrana celular de la célula huésped. La proteína específica ha sido identificada como la Proteína P1, y ha podido ser bloqueada mediante anticuerpos específicos, evitándose así el fenómeno de la adhesión. Los pases por medios de cultivo pueden provocar la pérdida de la capacidad de adhesión, disminuyendo de esta forma

el poder patógeno de este microorganismo (Taylor-Robinson y cols., 1981; Brunner y cols., 1985).

Igualmente, han sido descritas sustancias fabricadas por ciertos micoplasmas que permiten la adhesión a receptores de las células blanco (Gourlay y Howard, 1982; Topley y Wilson's, 1990). En este sentido, otro indicador patogénico de los micoplasmas es su capacidad de hemadsorción, la cual ha sido observada en 12 de los 28 micoplasmas patógenos descritos por Topley y Wilson's (1990), mientras que solamente 13 de las 49 especies no patógenas presentan esta propiedad.

2.2.1.3 Capacidad de producción de toxinas.

La producción de toxinas por parte de las distintas especies de micoplasmas es uno de los aspectos más controvertidos de la patogenicidad de los micoplasmas (Gourlay y Howard, 1982).

La íntima asociación entre los micoplasmas y las células hospedadoras permite el intercambio de sustancias, de ahí que cualquier sustancia tóxica producida por este microorganismo puede causar un efecto citopático directo sobre la célula epitelial. En este sentido, el único caso completamente demostrado es la neurotoxina producida por M. neurolyticum. Este micoplasma produce una proteína de 200 kdaltons que induce la muerte de los ratones infectados a las pocas horas de su inoculación intravenosa. También han sido consideradas como sustancias tóxicas, ciertos productos finales del metabolismo de los micoplasmas (Gourlay y Howard, 1982).

Son ejemplos de toxicidad la toxina presente en la cápsula del MmmSC denominada galactano, que contiene principalmente galactofuranosa, e induce efectos tóxicos al inocularla a embriones de pollo, así como edema y microtrombosis pulmonar en vaca, oveja y cabra, jugando un papel importante en la prolongación de la micoplasmemia en el ganado vacuno (Lloyd y cols., 1971).

Entre otras sustancias tóxicas también se han descrito lipoglicanos que inducen un síndrome febril en las infecciones por ciertos *Acholeplasmas*, aunque estas sustancias no se consideran factores patogénicos al ser apatógenos todos los *Acholeplasmas* conocidos (Gourlay y Howard, 1982).

La cilioestasis es uno de los efectos tóxicos más graves producidos por los micoplasmas. Un gran número de especies patógenas del aparato respiratorio poseen dicho efecto perjudicial, habiéndose observado pérdida de cilios y cambios citopáticos en células de tráquea cultivadas. Inicialmente se pensó que los micoplasmas tenían que ser metabólicamente activos para

producir cilioestasis; sin embargo, se ha demostrado que los aislados de membrana producen el mismo efecto que los microorganismos completos (Carson y cols., 1979; Kahane, 1984).

En un estudio comparativo entre MmmSC y Mmc se observó que éste último produce efectos más intensos sobre el cultivo de células de tráquea bovina a través de la liberación de peróxido de hidrógeno, fenómeno que no ha sido descrito en la infección "in vivo" (Gourlay y Howard, 1982; Kahane 1984).

Con M. pneumoniae se han realizado experimentos en hámsters, observándose cambios citotóxicos del epitelio traqueal por la peroxidación de los lípidos de la membrana citoplasmática. Este micoplasma induce la producción de aniones superóxido que inactivan la enzima catalasa, que se encuentra en el epitelio, permitiendo así la actividad del peróxido de hidrógeno (Kahane, 1984).

En relación a los Ureaplasmas spp., la producción de ureasa probablemente da lugar a la aparición de amoníaco, lo que podría constituir un importante factor de toxicidad, si bien esto no ha sido demostrado fehacientemente (Gourlay y Howard, 1982).

Otros micoplasmas como MmmLC producen en las infecciones en caprino un efecto citopático endotelial, pero sus mecanismos patogénicos más íntimos están aún por investigar (Valdivieso-García y cols., 1982b; Rosendal 1984a,b).

2.2.1.4 *Presencia de una cápsula.*

Los micoplasmas carecen de pared celular, pero un gran número de especies patógenas presentan un material extracelular que rodea a la membrana citoplasmática. Esta estructura a modo de microcápsula se tiñe con el rojo rutenio, y parece que desempeña un papel importante en la virulencia de estos micoplasmas. Parte de este material extracelular es una proteína inhibidora de la fagocitosis en las infecciones por M. pulmonis (Howard y Gourlay, 1974; Gourlay y Howard, 1982).

2.2.1.5 *Adquisición o síntesis de antígenos comunes a los del propio hospedador.*

Los micoplasmas pueden presentar antígenos comunes a las células del hospedador (por un fenómeno de adsorción de material de la superficie celular o por síntesis del mismo). Mediante este mecanismo, el micoplasma puede eludir la respuesta inmune, representando un

fenómeno realmente novedoso en la patogenia de la enfermedad. Estos antígenos han sido observados en la estructura de M. hyorhinis, MmmSC y M. pneumoniae. De esta forma, parte de la composición del galactano encontrado en el MmmSC presenta similitud antigénica con ciertas proteínas del pulmón bovino y por otro lado, algunas proteínas de M. pneumoniae muestran una composición antigénica similar a la de algunas proteínas del pulmón y del cerebro humano (Gourlay y Howard, 1982).

Este hecho ha conducido a demostrar que tras la inoculación de MmmSC en bovinos inmunodeprimidos, se produce una mayor diseminación del micoplasma en el pulmón, pero las lesiones resultaron menos intensas que en el caso de animales con un sistema inmunológico normal. Esto puede indicar que los fenómenos de necrosis observados durante la infección pulmonar por MmmSC pudieran deberse a una reacción inmunopatológica (Gourlay y Howard, 1982; Rosendal, 1988; Topley y Wilson's, 1990).

2.2.2 Factores dependientes del hospedador.

2.2.2.1 Interacción del micoplasma con el sistema defensivo primario del organismo (macrófagos y neutrófilos).

Se ha demostrado en estudios "in vitro" que los micoplasmas patógenos pueden adherirse a macrófagos y neutrófilos, no siendo fagocitados en ausencia de anticuerpos específicos. Este fenómeno a través del cual M. pulmonis evita la fagocitosis ha sido correlacionado con su mayor capacidad de virulencia en el aparato respiratorio (Howard y Taylor, 1985). Igualmente, otros micoplasmas como M. bovis, M. dispar, M. arthritidis y M. hominis son capaces de impedir su fagocitosis por parte de los polimorfonucleares neutrófilos (Gourlay y Howard, 1982).

La capacidad de digestión de los micoplasmas por parte de los macrófagos y los neutrófilos también es menor que para el resto de las bacterias. Esto se debe a que la membrana de los micoplasmas es muy rica en lípidos, lo que impide una digestión efectiva. Por esta razón, parte de la membrana de los micoplasmas que no ha sido digerida puede ser expulsada al exterior de los neutrófilos y macrófagos junto a enzimas hidrolíticas, lo que provoca una digestión heterolítica del tejido pulmonar adyacente (Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985).

2.2.2.2 *Interacción con el sistema del complemento.*

La activación del sistema del complemento puede inducir la lisis del micoplasma a través de la cascada del complemento sobre la membrana del mismo (Rosendal, 1984a,b). MmmLC puede activar la vía clásica del complemento en ausencia de anticuerpos detectables, lo que provoca la liberación de las anafilotoxinas (fracción C3a y C5a), mediadores químicos inflamatorios, que actúan simultáneamente como activadores de la coagulación. Todos estos fenómenos pueden afectar directa o indirectamente a las células blanco ("células inocentes") a las que está adherido el micoplasma (Rosendal 1984a). El conjunto de la activación de estos factores parece establecer el inicio del proceso inflamatorio a nivel pulmonar en la enfermedad natural (Larsen y cols., 1980).

2.2.2.3 *Activación del sistema de coagulación.*

MmmLC es capaz, en la fase septicémica de la enfermedad, de activar el sistema de la coagulación. En este caso se piensa que la activación del sistema de coagulación se debe al daño producido por el micoplasma sobre las células endoteliales de forma directa, lo que ha sido demostrado en estudios "in vitro" sobre cultivos de aorta caprina. Este daño endotelial expone el colágeno subendotelial al contacto con los factores de la coagulación activándose entonces la vía intrínseca de este sistema (Rosendal, 1984a,b).

En el caso de la Perineumonía Bovina no se ha sugerido este mecanismo patogénico para explicar la coagulopatía que se presenta en la enfermedad. No hay duda, sin embargo, de la activación del sistema de coagulación al observarse una trombosis diseminada en varios órganos, indicativo de una coagulación intravascular diseminada (CID) (Rosendal, 1981; Gourlay y Howard, 1982).

2.2.2.4 *Actividad inmunosupresora.*

Las micoplasmosis crónicas y las infecciones persistentes asintomáticas sugieren que la respuesta inmune frente a la infección por estos microorganismos es inadecuada. Se han descrito varias especies de micoplasmas que presentan actividad inmunosupresora "in vivo": MmmSC en vacuno, M. gallisepticum en pollos, M. arthritis en ratón y M. pneumoniae en humanos (Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985).

En individuos que padecen una infección por *M. pneumoniae* se ha observado una anergia transitoria a la prueba de la tuberculina, debido a una reducción de la respuesta inmunológica celular. También, en las fases más tempranas de la infección por *M. hyopneumoniae* se ha descrito una inmunosupresión transitoria. Además, este micoplasma produce una supresión de la mitogénesis linfocitaria (Gourlay y Howard, 1982).

2.2.2.5 *Mitogénesis no específica de linfocitos.*

Existen varias especies de micoplasmas con capacidad de estimular, de forma inespecífica, la división de linfocitos en detrimento de una correcta respuesta específica por parte del organismo. La actividad mitogénica puede variar dentro de una misma especie, lo que sugiere una posible correlación entre mitogenicidad y patogenicidad. En relación a este fenómeno se ha observado que extractos de membrana de *M. pulmonis* inoculados por vía intranasal, producen traqueitis y neumonía intersticial con infiltración de linfocitos a nivel perivascular y peribronquial (Gourlay, 1981).

2.2.2.6 *Desarrollo de una respuesta inmune específica.*

La naturaleza y la composición antigénica de los micoplasmas es compleja y está aún sometida a discusión. En 1987 Erno estableció dos grupos de antígenos:

a.-Antígenos de superficie, que determinan la especificidad de especie, y que son detectados mediante la prueba de la inhibición del crecimiento, inhibición del metabolismo e inmunofluorescencia.

b.-Antígenos internos o citoplasmáticos, más o menos comunes a grupos de micoplasmas emparentados, como los que constituyen el grupo *Mycoplasma mycoides*, y que se demuestran por inmunoelectroforesis.

Para Howard y Taylor (1985), la especificidad antigénica no es en ningún caso muy patente entre los micoplasmas, ya que existen numerosas reacciones serológicas cruzadas entre micoplasmas de diferentes especies, entre micoplasmas y otros gérmenes, y ciertos antígenos celulares.

La infección por micoplasmas induce una respuesta inmune humoral y celular específica. En la primera, se producen anticuerpos frente a los micoplasmas de forma local y sistémica, lo que se demuestra serológicamente con técnicas de fijación del complemento, aglutinación,

precipitación, inmunodifusión, inmunofluorescencia de colonias, inhibición del crecimiento e inhibición del metabolismo. La respuesta celular se demuestra por intradermorreacción "in vivo" y por estimulación de linfocitos y producción de linfocinas "in vitro" (Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985). Sin embargo, el poder inmunógeno es muy variable entre especies y cepas, y la curación de una infección natural no suele acompañarse de una protección sólida y duradera (Howard y Taylor, 1985).

2.3 MICOPLASMAS Y MICOPLASMOSIS DE LOS PEQUEÑOS RUMIANTES

En la Tabla I se presentan las especies de micoplasmas aisladas con mayor frecuencia en caprinos y ovinos. En esta tabla se hace mención a la cepa de referencia por la importancia clínico-patológica de cada brote y por los errores de identificación cometidos durante los primeros aislamientos. Se han incluido las nuevas especies de micoplasmas, M. auris, M. cottewii y M. yeatsii, aisladas del canal auditivo externo de cabras (Damassa y cols., 1994), así como M. adleri (Del Giudice y cols., 1995). Igualmente, se ha recogido la nueva designación propuesta por Leach y cols. (1993), por la que el biotipo F-38 pasa a denominarse M. capricolum subsp. capripneumoniae, mientras que M. capricolum pasa a denominarse M. capricolum subsp. capricolum.

También se exponen en ella los hospedadores más frecuentes y/o posibles, así como el grado de patogenicidad de cada micoplasma, para lo cual han sido clasificados en micoplasmas patógenos primarios (capaces de producir micoplasmosis mayores); otros aislados, con los que se ha logrado reproducir experimentalmente la enfermedad, pero que poseen una capacidad patógena variable en la naturaleza y, por último, micoplasmas que no desarrollaron la enfermedad de forma experimental ni natural.

La localización más frecuente de la que se ha aislado una determinada especie, así como el órgano más afectado, se exponen en la columna correspondiente. Igualmente, se hace mención a la enfermedad con la que se asocia, aunque en los distintos brotes descritos puede haber pequeñas variaciones en relación al órgano afectado. Finalmente, se especifican algunas observaciones sobre cada especie.

Tabla I. Micoplasmas más Frecuentes en Pequeños Rumiantes

Especie	Cepa de referencia	Hospedador Natural	Patogenicidad	Localización más frecuente	Otras localizaciones	Enfermedad a la que se asocia	Observaciones
<i>M. agalactiae</i>	PG2	O, C	Patógeno primario	Mamas	A, Oj, P, Ur.	Clásica AC con mamitis, Artritis, Queratoconjuntivitis, neumonía, vulvovaginitis.	Afecta a ambas especies. Su tropismo pulmonar es menor que el manifestado por <i>MmmLC</i> y <i>Mmc</i> .
<i>M. arginini</i>	G.230	O, C otros	Dudosa	Tracto Respiratorio	Ug, A, Oj.	Germen ubicuo, tiene múltiples localizaciones.	No es patógeno por sí solo en tracto respiratorio. Poco estudiado
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	California Kid	C, raro O	Patógeno	Articulaciones	M, P, Ug, Or.int.*	Poliartritis, mamitis y muerte de cabritos.	Serológicamente, presenta reacción cruzada con <i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i> .
<i>M. conjunctivae</i>	HRC. 581	O, C	D. Exp.	Ojos	Tracto Respiratorio	Queratoconjuntivitis.	Patógeno para cabras y ovejas.
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	F38	C	Patógeno	Tracto Respiratorio	Or. int.**	Produce la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica.	Único agente de la PNCC clásica, muy contagioso. Crecimiento restringido. No metaboliza la arginina.
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	PG3	C	Patógeno	Tracto Respiratorio	Raro	Enfermedad similar a la PNCC.	Experimentalmente ha sido poco contagioso y patógeno para cabras y ovejas. Muy pocas descripciones recientes.
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides (LC)</i>	GM12 Y-goat	C, raro en O y V.	Patógeno	Tracto respiratorio y Articulaciones	Mama Ojo	Neumonía, mamitis, poliartritis, queratoconjuntivitis.	Forma pleuroneumónica parecida a la PNCC clásica, más frecuente en cabritos. Produce muchas muertes en animales jóvenes por infección oral.

C: cabra D. Exp: Demostrado experimentalmente, enfermedad natural depende de otros factores.

O: oveja No D: Patogenicidad no demostrada.

V: vacuno Or. int*: Organos internos debido a septicemia.

M:mama; A:articulaciones; Oj:ojos; Ug: aparato urogenital; P: pulmón.

Tabla I. (Continuación) Micoplasmas más Frecuentes en Pequeños Rumiantes

Especie	Cepa de referencia	Hospedador Natural	Patogenicidad	Localización más frecuente	Otras localizaciones	Enfermedad a la que se asocia	Observaciones
<i>Mmm(SC)</i>	PGI	C, raro	No D.	Tracto Respiratorio.	---	No produce enfermedad.	Importante el ganado caprino como posible portador de <i>Mmm(SC)</i> .
<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	Y-98	O, C	D. Exp.	Tracto Respiratorio.	Ojo Tracto Urogenital	Neumonía intersticial crónica.	Muy importante las infecciones concomitantes con <i>P. haemolytica</i> y <i>P. multocida</i> para desarrollar enfermedad.
<i>M. putrefaciens</i>	KS-1	C	D. Exp.	Mamas	Oído Pulmón	Mamitis contagiosa.	Su verdadera importancia está aún por conocer.
<i>A. laidlawii</i>	PgB	Muchos	No D.	Tracto Urogenital.	Tracto Respiratorio.	Ninguna.	En relación con una enfermedad es secundario.
<i>A. oculi</i>	19L	C, O y otros	D. Exp.	Ojos	Tracto Urogenital Pulmones	Queratoconjuntivitis.	No se ha demostrado si es patógeno primario, experiencias recientes le atribuyen mediana patogenicidad.
<i>Ureaplasmas</i>	Varios	O, C	D. Exp.	Tr. Urog.	Raro en Tracto Respiratorio	Vulvovaginitis, enfermedad uterina.	Varios serotipos, cuya patogenicidad no es conocida aún.
<i>Mycoplasma sp.</i>	2D	C.	N. D.	Tr. Urog.	---	Ninguna.	Forma parte de la flora saprofita de la mucosa.

C: cabra D. Exp: Demostrado experimentalmente, enfermedad natural depende de otros factores.

O: oveja No D: Patogenicidad no demostrada.

V: vacuno Or. int*: Organos internos debido a septicemia.

Tabla I. (Continuación) Micoplasmas más Frecuentes en Pequeños Rumiantes

Especie	Cepa de referencia	Hospedador Natural	Patogenicidad	Localización más frecuente	Otras localizaciones	Enfermedad a la que se asocia	Observaciones
<i>M. adleri</i>	GI45	C	Desconocida	---	---	---	Sólo se ha realizado un aislamiento a partir de un absceso en una extremidad.
<i>M. auris</i>	UIA	C	Desconocida	Conducto auditivo externo	---	---	Aislado únicamente en Australia y USA.
<i>M. cottewii</i>	VIS	C	Desconocida	Conducto auditivo externo	Senos nasales	---	Aislado únicamente en Australia y USA.
<i>M. yeatsii</i>	GIH	C, raro en V	D. Exp.	Conducto auditivo externo	Ganglio linfático retrofaringeo, tracto nasal, órganos internos, leche.	Mamitis	Sólo se ha demostrado la patogenicidad de la cepa GM790A.

C: cabra

V: vacuno

D. Exp: Demostrado experimentalmente, enfermedad natural depende de otros factores.

DaMassa y cols., 1994; Del Giudice y cols., 1995; Jones, 1989; Leach y cols., 1993; Lefèvre y cols., 1987a,b; Perreau, 1984.

2.4 NEUMONÍAS PRODUCIDAS POR ESPECIES DEL GRUPO *MYCOPLASMA MYCOIDES* EN CAPRINO

Entre los micoplasmas patógenos del aparato respiratorio, las especies más importantes se encuentran agrupadas dentro de lo que se conoce como grupo *Mycoplasma Mycoides*, con características serológicas, bioquímicas y genéticas similares (Cottew y cols., 1987; Bergemann y cols., 1990; Bascunana y cols., 1994; Bashiruddin y cols., 1994). Dentro de este grupo, los micoplasmas patógenos para el ganado caprino son MmmLC y Mmc, así como M. capricolum subsp. capripneumoniae (antiguo M. Biotipo F-38) y M. capricolum subsp. capricolum (Erno y cols., 1978; Costas y cols., 1987; Cottew y cols., 1987; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992; Taylor y cols., 1992; Leach y cols., 1993).

Las enfermedades provocadas en caprinos por este grupo de micoplasmas se describen a continuación con mayor detalle.

2.4.1 *Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica.*

La enfermedad más grave que afecta al aparato respiratorio del ganado caprino es la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica. Esta enfermedad está causada por M. capricolum subsp. capripneumoniae (Leach y cols., 1993), antes "M. Biotipo F38", que afecta exclusivamente a los caprinos.

La enfermedad difiere de las neumonías producidas por otros miembros del grupo *Mycoplasma Mycoides* en sus aspectos clínicos, lesionales y epidemiológicos, y se define como una enfermedad producida exclusivamente por las distintas cepas de M. capricolum subsp. capripneumoniae (MacOwan y Minette, 1976; Jones, 1989; Picavet, 1991; DaMassa y cols., 1992; Leach y cols., 1993).

La distribución geográfica de la PNCC clásica está limitada al continente Africano, habiéndose descrito en Kenia (MacOwan, 1976; MacOwan y Minette, 1977b; Litamoi y cols., 1990), Sudán (Harbi y cols., 1981), Etiopía (Firke, 1984; Thiaucourt y cols., 1992), Túnez y Libia (Perreau, 1982), Omán y Turquía (Jones y Wood, 1988) y el Chad (Lefèvre y cols., 1987a). Sin embargo, Lefèvre y cols., en un artículo de revisión, indican que probablemente en un futuro la distribución de este micoplasma será más amplia (Lefèvre y cols., 1987b).

La enfermedad, que fue descrita por vez primera en 1881 por Hutcheon en África del Sur, se caracteriza por presentar exclusivamente lesiones pleuroneumónicas muy graves que causan la muerte después de un curso agudo. Los brotes suelen aparecer por la introducción de animales portadores sanos o con afección crónica en rebaños libres de la enfermedad. En estos casos, la enfermedad se extiende rápidamente con una morbilidad que puede llegar al 100% en pocas semanas y una mortalidad que oscila entre el 40 y el 70% del colectivo. Los animales que sobreviven permanecen como portadores crónicos, lo que permite el mantenimiento de la enfermedad de forma enzoótica (MacOwan y Minette, 1977b; Picavet, 1991).

El contagio de la enfermedad natural se realiza por vía aérea (Kaliner y MacOwan, 1976; Perreau, 1984; Perreau y cols., 1984; Lefèvre y cols., 1987a; Morin, 1987), siendo ésta la única vía a través de la cual se ha conseguido reproducir la enfermedad experimentalmente. La inoculación por vía subcutánea o intramuscular no produjo celulitis ni reacción edematosa local, ni tampoco reprodujo la enfermedad (Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan y Minette, 1977a; McMartin y cols., 1980; Harbi y cols., 1983; Picavet, 1991).

El período de incubación es de 6 a 10 días, comenzando la enfermedad con una hipertermia brusca (42°C a los 2 ó 3 días postinfección). Los síntomas generales son el abatimiento, la tendencia a retrasarse en el rebaño y la disminución del apetito. Los signos respiratorios más frecuentes son tos débil y dolorosa, disnea, miembros separados con la cabeza baja y extendida y secreción nasal mucopurulenta. En la fase terminal los animales se postran y la respiración es penosa y muy dolorosa (Lefèvre y cols., 1987b; Jones, 1989; Picavet, 1991; DaMassa y cols., 1992;).

La evolución de la enfermedad puede ser sobreaguda, subaguda y crónica, caracterizadas las dos últimas por síntomas de insuficiencia respiratoria, tos, moco y adelgazamiento (MacOwan, 1984; Lefèvre y cols., 1987b; Picavet, 1991).

Las lesiones macroscópicas pueden ser unilaterales o bilaterales. En los casos agudos, la pleura de las regiones pulmonares afectadas está recubierta normalmente por membranas de fibrina. En la cavidad pleural se observa la presencia de abundante líquido color paja que contiene flóculos de fibrina, la cual coagula parcialmente al contacto con el aire. Las regiones afectadas del parénquima pulmonar constituyen un mosaico de lobulillos que muestran distinto grado de hepatización y un aspecto granuloso al corte. Entre los lobulillos no hay engrosamiento del septo interlobulillar, predominando las lesiones intralobulillares (Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan, 1984; Jones, 1989).

En los casos crónicos se observan adherencias pleurales fibrosas y, en el parénquima pulmonar, focos necróticos encapsulados por un tejido conectivo. Los nódulos linfáticos regionales aparecen hipertrofiados y edematosos (Kaliner y MacOwan, 1976, Jones, 1989; Picavet, 1991).

Las lesiones microscópicas consisten en una pleuroneumonía fibrinosa focal o en islotes que afectan, en mayor o menor medida, al tejido conectivo intersticial. En la neumonía aguda se observa principalmente una congestión de los capilares, con exudación serofibrinosa en bronquiolos y alvéolos asociada a numerosos macrófagos y neutrófilos. En las neumonías más crónicas se observa engrosamiento de los septos interalveolares, con depósito de fibrina y proliferación del tejido conectivo. La necrosis de los alvéolos induce a la formación de focos de necrosis intralobulillares (Kaliner y MacOwan, 1976; Jones, 1989; Picavet, 1991).

2.4.2 Neumonía producida por *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* de grandes colonias (MmmLC).

MmmLC es un micoplasma patógeno para la especie caprina, aunque ha sido aislado raramente en ovinos, si bien de forma experimental se ha logrado reproducir la enfermedad en esta especie esporádicamente (Rosendal, 1981; Truscott y Finley, 1984; Okoh y Ocholi, 1986). MmmLC no es patógeno para el ganado bovino (Perreau, 1981; Rosendal, 1981; Jones, 1989).

La distribución de este micoplasma es muy amplia, habiéndose aislado en numerosos países del mundo, y constituyendo un importante problema en el ganado caprino de los Estados Unidos (DaMassa y cols., 1983a), Francia (Perreau, 1979a), Israel (Bar-Moshe y Rapaport, 1979 y 1981) y la India (Gupta y cols., 1984), donde es el micoplasma más frecuentemente aislado a partir de lesiones pleuroneumónicas. En España, Goncer Coca y Rodríguez-Ferri (1990) realizaron un estudio en 8 explotaciones de ganado caprino encontrando una amplia difusión de este micoplasma. Estos autores describen que MmmLC es el micoplasma más frecuentemente aislado del pulmón del ganado caprino, en el que provoca un 37.5% de infecciones graves. Igualmente, el aislamiento de MmmLC por primera vez en las Islas Canarias confirma la amplia difusión de este microorganismo (Villalba y cols., 1992).

En una primera comparación entre MmmLC y MmmSC, se observó que el primero presentaba unas colonias con un tamaño prácticamente dos veces mayor que la otra subespecie, lo que determinó el nombre de "Large colony" y "Short colony" (Cottew y Yeats, 1978). Posteriormente, se demostró que esta característica de MmmLC no es constante. Así, Valdivieso-García (1982a) describió variaciones en el tamaño, después de sucesivos clonajes, razón por la cual cuestionó la clasificación de estos micoplasmas en función al tamaño de sus colonias.

A pesar de que MmmLC difiere en ciertos aspectos serológicos del Mmc, su composición proteica y su genoma se asemeja más a esta especie que al MmmSC (Whitley y cols., 1990;

Poumarat y cols., 1991 y 1992; Taylor y cols., 1992), existiendo cepas que se clasifican con características intermedias entre MmmLC y Mmc (Sanguinetti y cols., 1982; Nascimento y cols., 1986; Bölske y cols., 1989). Por esta razón se ha sugerido considerar a MmmLC y a Mmc como un taxón independiente, e incluso como una especie diferente (Costas y cols., 1987; Cottew y cols., 1987). Igualmente, se ha propuesto a MmmLC como una tercera subespecie dentro del grupo *Mycoplasma mycoides* (Cottew y cols., 1987).

Las infecciones naturales y experimentales producidas por cepas de MmmLC aisladas en los distintos países del mundo han presentado las características epidemiológicas, clínicas y lesionales que se exponen en las Tablas II y III.

El contagio natural de este micoplasma se realiza por vía oral, especialmente en cabritos lactantes, a través de leche mamítica (DaMassa y cols., 1983a), siendo necesarias altas concentraciones de microorganismos en la leche para que se produzcan lesiones graves (Bar-Moshe y Rapaport, 1981; DaMassa y cols., 1986). Se han sugerido otras vías naturales de contagio, como la intrauterina (Bar-Moshe y Rapaport, 1981), al observar cabritos neonatos con lesiones articulares de las que se aisló este micoplasma. Además MmmLC ha sido aislado del conducto auditivo externo de cabras sanas y enfermas, lo que ha sugerido la posibilidad, aún no demostrada, de esta vía de contagio (Cottew y Yeats, 1982; DaMassa, 1983a; Hazell y cols., 1985).

Experimentalmente, la enfermedad ha sido reproducida mediante inoculaciones por vía oral, intratraqueal, endobronquial, transtraqueal, intravenosa, subcutánea, intramuscular e intracanalicular (mama). La vía de inoculación, la dosis, la edad, el sistema inmune y el estado fisiológico del animal son factores determinantes en el desarrollo de la enfermedad aguda (Rodríguez, 1993). Se ha demostrado que la ruta de inoculación condiciona la aparición de variaciones lesionales importantes. Por vía intratraqueal, endobronquial y transtraqueal las lesiones observadas han sido especialmente pleuroneumónicas. En cambio, tras la inoculación subcutánea, intravenosa o intramuscular se ha desarrollado una neumonía intersticial con edema pulmonar y pleuritis (Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992).

TABLA II. CASOS NATURALES Y EXPERIMENTALES MÁS IMPORTANTES DESCRITOS DE Mmm (LC) EN LA BIBLIOGRAFÍA.

Autores	País/ Cepa	Natural/ Experim.	Edad	Vía de inoculación	Dosis (ml)/ UFC (ml)	Número animales	Morb.	Mort.	Clínica más frecuente	Observaciones
Bar-Moshe (1981)	Israel local	Nat.	Joven, adulto	(-)	(-)	4.500	60 %	0,15	En madres, fiebre, mamitis aguda, abortos. En cabritos, artritis y queratoconjuntivitis.	El autor sugiere posibles infecciones congénitas. En un rebaño murieron 98 de 108 y en la necropsia se demostró una carencia de Vit E y Selenio.
Bölske (1982)	Suecia	Nat.	Adulto	(-)	(-)	80	100 %	0,25	Signos respiratorios y en algunos, mamitis.	No se hace referencia a la edad de los animales muertos.
Bölske (1989)	Suecia G8	Exp.	3 semanas - 9 meses	TT AC SC IT	$2/9 \times 10^{10}$ $1/9 \times 10^{10}$ $5/9 \times 10^{10}$ $2/9 \times 10^{10}$	2 2 2 5	2 2 2 1	2 2 2 0	Vía TT, AC y SC signos de inflamación en punto inoculación, septicemia y poliartritis. Vía IT síntomas respiratorios.	Vía TT se produjo una intensa necrosis alrededor del punto de inoculación. Vía IT la sintomatología respiratoria apareció sólo en los animales inoculados con las dosis más altas.
DaMassa (1983)	EEUU/ GM12	Nat.	Joven y adulto	(-)	(-)	Más de 200	90 - 100 %	0,9	Signos de neumonía, poliartritis y mamitis.	3 cuadros: sobreagudos sin sintomatología o de tipo nervioso con muertes en 24-72 horas, agudos y subagudos con poliartritis y neumonía.
DaMassa (1983)	EEUU/ GM12	Exp.	10 días 1 año 7 días 2 años	IP IM Oral Mama	1×10^{10} 1×10^{10} 4×10^{10} 1×10^{10}	1 1 1 1	1 1 1 1	1 1 1 1	En todos los casos se produjo fiebre, signos de septicemia y neumonía.	Se produjo inflamación en el punto de inoculación vía parenteral y se reaisló el micoplasma en varios órganos. Vía intramamaria produjo inflamación de la ubre en 24 horas. Muerte en 4-11 días.
DaMassa (1986)	EEUU/ GM12	Exp.	Recién nacido	Oral	$10/1 \times 10^{10}$	51	(-)	37	Fiebre, debilidad, signos de septicemia, poliartritis y neumonía.	Los cabritos no recibieron calostro. De 14 cabritos en contacto directo con animal inoculado enfermaron sólo 8.
East (1983)	EEUU/ GM12	Nat.	2 - 8 semanas y adulto	(-)	(-)	300 madres y cabritos	(-)	170 chivos 70 m.	Fiebre, inflamación de articulaciones, pérdida de peso y neumonía.	Las cabras con mamitis clínicas o subclínicas por micoplasmas pueden eliminar 1×10^{10} UFC/ml causando alta morbilidad/mortalidad en chivos.
Guha (1987)	India/ local	Exp.	2 - 3 meses	IT	$10/3 \times 10^{10}$	5	6	0	Fiebre, debilidad y signos de neumonía.	2 animales se recuperaron en 15 días y 4 en 1 mes. Se sacrificaron a los 35 días reaislándose los micoplasmas inoculados.
Hazell (1985)	Austria/ local	Nat.	Joven y adulto	(-)	(-)		12	12	Signos de neumonía, artritis y mamitis.	Se aisló <u>Mmm</u> (LC) del oído en 2 cabras y se estudió la posible transmisión de la enfermedad mediante ácaros, no llegándose a ninguna conclusión.

TT: vía transtraqueal. AC: vía articulación del carpo. SC: vía subcutánea. IT: vía intratraqueal. IP: vía intraperitoneal. IM: vía intramuscular.
UFC (ml): unidad formadora de colonias por mililitro. Nat.: descripción de un brote natural. Exp.: descripción de una experiencia realizada.

TABLA II (continuación). CASOS NATURALES Y EXPERIMENTALES MÁS IMPORTANTES DESCRITOS DE MmmLC EN LA BIBLIOGRAFÍA.

Autores	País/ Cepa	Natural/ Experim.	Edad	Vía de inoculación	Dosis (ml)/ UFC (ml)	Número animales	Morb.	Mort.	Clinica más frecuente	Observaciones
Kaliner (1975)	Kenia/ Glady	Exp.	Adulto	IT/EB	10/2,5 x 10 ¹⁰	8	3	0	Durante 2 - 5 dpi tres cabras presentaron fiebre pasajera.	El <u>MmmLC</u> fue aislado de una cabra con un pequeño foco neumónico.
Ojo (1976)	Nigeria Ib8	Exp.	6 - 24 meses	EB	10/1 x 10 ⁸	11	5	5	Fiebre, sintomatología respiratoria.	La enfermedad se desarrolló en 2 - 6 días. Sólo hubo afección respiratoria.
Ojo (1976)	Nigeria Ib9	Exp.	6 - 24 meses	EB	10/1 x 10 ⁸	11	10	10	Los animales presentaron una sintomatología más aguda.	Esta cepa se mostró mucho más patógena en las mismas condiciones.
Rapapport (1979)	Israel/ local	Exp.	6 meses	SC	1/1 x 10 ^{8,5} y 4	10	8	8	Alta temperatura desde 3 dpi hasta la muerte. Caquexia, anorexia y debilidad.	Todos los animales enfermaron excepto los que se les inoculó la dosis más baja (10 ⁴) si bien de los dos se reaisló el <u>MmmLC</u> del carpo.
Rosendal (1979)	EEUU/ Y3343	Nat.	Menos de 1 año	(-)	(-)	22, dos brotes	16	(-)	Fiebre, artritis y debilidad.	Adultos sin sintomatología. Pocos signos de neumonía. Se presentó una coccidiosis que pudo favorecer la enfermedad.
Rosendal (1981)	EEUU/ Y3343	Exp.	Adulto	IV	5/1 x 10 ⁷	6	6	6	Fiebre, signos de neumonía y septicemia con poliartritis. Inflamación en punto de inoc.	A diferencia de la enfermedad natural los signos de neumonía fueron intensos. Al inocular ovejas se afectaron 2 de 6.
Rosendal (1983)	Canadá D44	Exp.	2 - 6 meses	EB	10/1 x 10 ⁷ 10/1 x 10 ⁸	6	6	6	Fiebre, signos de neumonía y poliartritis. Descarga nasal mucopurulenta.	Los bovinos infectados vía EB no se afectaron. Cabras en contacto directo tampoco se afectaron.
Ruhnke (1983)	Canadá	Nat.	Joven y adulto	(-)	(-)	210.3 brotes	15	3	Jóvenes: disnea, descarga nasal, artritis. Adulto: mamitis, neumonía y conjuntivitis.	Sólo se afectaron 2 animales adultos. Se aisló <u>MmmLC</u> de animales sin sintomatología clínica.
Sanguinetti (1982)	Italia/ local	Nat.	Joven y adulto	(-)	(-)	137	(-)	19 %	Fiebre y signos respiratorios.	En este brote no se indica el número de animales afectados.
Thigpen (1981)	EEUU	Nat.	Joven	(-)	(-)	100	(-)	3	Fiebre y signos respiratorios.	En este brote los signos más importantes fueron neumónicos, sólo 1 cabrito presentaba signos de artritis.

TT: vía transtraqueal. AC: vía articulación del carpo. SC: vía subcutánea. IT: vía intratraqueal. IP: vía intraperitoneal. IM: vía intramuscular.
UFC (ml): unidad formadora de colonias por mililitro. Nat.: descripción de un brote natural. Exp.: descripción de una experiencia realizada.

TABLA III. Mmc y cepas intermedias entre Mmc y MmmLC.

Autores	País/ Cepa	Natural/ Experim.	Edad	Vía de inoculación	Dosis (ml)/ UFC (ml)	Número animales	Morb.	Mort.	Clínica más frecuente	Observaciones
Bolske (1989)**	Suecia/ M171	Exp.	3 semanas/ 9 meses	SC IT Oral	1-2/2-9 x 10 ¹⁰ 5-2/9 x 10 ¹⁰ 330/11 x 10 ¹⁰	7 6 4	2 4 0	2 1 0	Vía SC: inflamación en punto de inoculación, signos de septicemia. Vía IT: signos de neumonía, fiebre 10-15 dpi. Vía oral sin síntomas.	Vía SC e IT sólo presentaron síntomas respiratorios los animales con dosis más altas. En los 3 animales en contacto con los animales inoculados IT no hubo síntomas.
Kaliner (1976)	Kenia/ F30	Exp.	Adulto	IT/EB	10/2 x 10 ¹⁰	8	8	8	Fiebre y signos de neumonía a los 2 - 5 dpi.	Muerte entre 3 - 14 dpi. 4 cabras en contacto directo no presentaron síntomas.
Littlejohns (1977)	Australia 74/5357L 74/5907A	Nat.	Adulto	(-)	(-)	25	0	0	Una cabra se mostraba débil con artritis crónica.	Se describe el aislamiento de <u>Mmc</u> en 2 animales, sin que ninguno presentara sínto- mas ni lesiones pleuroneumónica.
MacOwan (1976)	Kenia/ F30	Nat.	Adulto	(-)	(-)	(-)	3	3	Síntomas respiratorios crónicos.	Se presentó un brote de pleuroneumonía aguda varios meses antes. De las 3 cabras se aislaron <u>P. haemolytica</u> y de 2 <u>P. multocida</u> .
Misri (1988)	India	Exp.	2,5 - 4 años	Pezón, mama derecha	2/10 ⁷	11	11	0	Inflamación unilateral de la mama infectada.	No afectó mama izquierda, ni se aisló el micoplasma en otras localizaciones.
Nascimento (1986)**	Brasil	Nat.	Joven y adulto	(-)	(-)	119	90 % y 42 %	65% y 17%	Signos de neumonía, artritis y mamitis subclínica.	Se afectaron más los cabritos con síntomas de neumonía muy intensos. Los adultos presentaban pocos síntomas articulares.
Ojo (1976)	Nigeria/ Smith	Exp.	6 - 24 meses	EB	10/1 x 10 ⁸	8	8	8	Fiebre y signos de neumonía aguda.	No describe afección fuera del tracto respira- torio. Se reaisló micoplasma en pulmón.
Ojo (1976)	Nigeria/ Ib7	Exp.	6 - 24 meses	EB	10/1 x 10 ⁸	5	(-)	3	Fiebre y signos de neumonía aguda.	En los animales que sobrevivieron durante más tiempo los signos clínicos disminuyeron. Se reaisló el micoplasma.
Onoviran (1984)	Nigeria/ Smith	Exp.	Adulto	Intranasal	5/1 x 10 ⁸	4	3	2	Debilidad, anorexia y dificultad respiratoria. Muerte a los 10 - 12 dpi.	En otro diseño experimental se incluyó <u>Mmc</u> y el virus de la peste de los pequeños rumian- tes con lesiones más graves.
Sanguinetti (1981)**	Italia/ local	Nat./ Exp.	Todas/ 3 - 5 meses	IT/IM	5/1 x 10 ^{8,9}	137 3	(-) 3	19 % 3	Sólo aparecieron signos de neumo- nía.	No describe morbilidad en rebaño. A 1 de los 2 animales inoculación vía IT se le dio una cepa con más pases por medio de cultivo y la enfermedad se desarrolló más tarde.

** Estas cepas han sido clasificadas por Ermo y cols. (FAO/WHO International Collaborating Centre for Animal Mycoplasma, Institute of Medical Microbiology, University of Aarhus, Denmark), por técnicas de inhibición de crecimiento, inmunofluorescencia y electroforesis en gel, como cepas intermedias entre MmmLC y Mmc.
SC: vía subcutánea. IT: vía intratraqueal. IM: vía intramuscular. UFC (ml): unidad formadora de colonias por mililitro. Nat.: descripción de un brote natural. Exp.: descripción de una experiencia realizada.

La administración intratraqueal o endobronquial de MmmLC produce resultados variables, con morbilidad y mortalidad alta (Ojo, 1976a; Rosendal, 1983), o baja (Kaliner y MacOwan, 1976; Guha y Verma, 1987b; Bölske y cols., 1989; Adesotoye y Ojo, 1990). La enfermedad producida por estas vías presenta una sintomatología prácticamente restringida al aparato respiratorio. Estos síntomas aparecen rápidamente (2-6 días) con disnea, estertores, tos, respiración abdominal y una fuerte descarga mucopurulenta. Por estas vías, se ha comprobado la menor patogenicidad de cepas con varios pases previos por medios de cultivo (Sanguinetti y cols., 1982; Bölske y cols., 1989). La vía intramamaria produjo mamitis a las 24 hpi, con septicemia posterior (MacOwan, 1976; Cottew y Lloyd, 1980; DaMassa y cols., 1983a; Rosendal, 1983).

Bölske realizó experiencias con animales de 3 semanas a 9 meses de edad, no reproduciéndose la enfermedad tras la inoculación por vía oral. Si bien estos resultados pudieron ser debidos a la baja virulencia de la cepa (DaMassa y cols., 1992), es importante indicar que la reproducción de la enfermedad tras la inoculación oral sólo se produce en los animales más jóvenes con altas dosis de micoplasmas y factores predisponentes adicionales (privación de calostro, infecciones parasitarias, bacterianas, víricas, etc.) (DaMassa y cols., 1986).

En todas las inoculaciones ha sido constante una reacción inflamatoria en el punto de inoculación, así como también la relación directa dosis-enfermedad (Bar-Moshe y Rapapport, 1981). En la mayoría de los casos se ha logrado reproducir la enfermedad de forma similar a su presentación natural, con síntomas septicémicos y lesiones de poliartritis, mamitis y neumonía, (Rapapport y Bar-Moshe, 1979; Rosendal, 1981; DaMassa y cols., 1983a; Bölske y cols., 1989).

La enfermedad producida por los distintos aislados de MmmLC se caracteriza por la presencia de varias formas clínicas. Una de curso agudo, con septicemia y desenlace fatal, principalmente en los animales más jóvenes (DaMassa y cols., 1983a); una segunda de curso crónico, muchas veces asepticémica y que afecta a los animales jóvenes y adultos; y una tercera producida por algunas cepas de MmmLC que inducen artritis y mamitis en animales jóvenes y adultos. (Perreau, 1979b; DaMassa y cols., 1986).

En los brotes descritos, la sintomatología en los animales jóvenes ha sido siempre muy parecida, predominando signos como cojera por la artritis, disnea, respiración abdominal, tos, ruidos respiratorios y exudación nasal purulenta. También se presenta sintomatología septicémica (fiebre, debilidad y anorexia) con rápida postración y muerte en cursos sobreagudos y agudos de la enfermedad. En los casos crónicos, los síntomas más frecuentes son la poliartritis, la pérdida de peso y, en algunos casos, diarrea, generalmente por las

complicaciones bacterianas y parasitarias (Perreau, 1979b; Rosendal y cols., 1979; Bölske y cols., 1982; Brooks y cols., 1984; DaMassa y cols., 1983a; Ruhnke y cols., 1983).

Muchos animales se recuperan de la enfermedad, principalmente los adultos, convirtiéndose en portadores inaparentes. Esto ha sido constatado mediante el aislamiento de MmmLC del pulmón y mama de individuos aparentemente sanos y/o con mamitis subclínicas (DaMassa y cols., 1992; Kasali y Ojo, 1981). Muchos autores piensan que son necesarios una serie de factores predisponentes para que se desencadene la enfermedad, entre los que destacan los factores ambientales, el estrés, la presencia de otras especies de micoplasmas o bacterias, como Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida, coccidiosis, gestación avanzada, etc. Así, Rosendal y cols. en 1979, indicaron que en un rebaño estudiado durante al menos de 10 años, los episodios de enfermedad se asociaron con una inmunodepresión por coccidios. En general, cualquier enfermedad infecciosa o parasitaria que disminuya los mecanismos defensivos primarios del hospedador, puede predisponer a que se desencadene la enfermedad por este micoplasma (Cottew, 1984; Rapaport y Bar-Moshe, 1984; Jones, 1989, DaMassa y cols., 1992).

Las lesiones causadas por la infección natural de las distintas cepas de MmmLC se localizan principalmente en pulmón, articulaciones, mamas y ojo, aunque pueden encontrarse otras lesiones como consecuencia de la septicemia (DaMassa y cols., 1992; MacOwan, 1984).

En el aparato respiratorio las lesiones suelen estar localizadas preferentemente en los lóbulos apicales y medios. Éstos presentan áreas de hepatización o consolidación, propias de una bronconeumonía. No en todos los casos se afecta 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 un líquido turbio en la cavidad torácica. Histopatológicamente 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 y cols., 1983a; Rosendal, 1983). Es frecuente que las lesiones iniciales inducidas por MmmLC se compliquen con otros microorganismos, principalmente P. haemolytica y P. multocida, observándose entonces lesiones secundarias en dichos pulmones (Rapaport y Bar-Moshe, 1984; Bölske y cols., 1989).

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 y cols., 1979; Bar-Moshe y Rapaport, 1981; DaMassa y cols., 1983a; East y cols., 1983; Ruhnke y cols., 1983; Hazell y

cols., 1985).

En el parénquima mamario las lesiones consisten en una mamitis purulenta aguda y/o subaguda. Las afecciones oculares son escasas en los casos naturales descritos. Las lesiones debidas 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 y Yedloutschnig, 1969; MacOwan, 1976; Bölske y cols., 1982; Sanguinetti y cols., 1982; DaMassa y cols., 1983a y 1992; East y cols., 1983; Rosendal, 1983).

Las lesiones en las infecciones experimentales variaron atendiendo a la vía de inoculación. La vía que ha desarrollado lesiones pleuroneumónicas con mayor frecuencia ha sido la vía transtraqueal y/o intratraqueal/endobronquial. La diferencia entre ambas consiste en la presencia de celulitis y necrosis en el punto de inoculación. Las lesiones pulmonares son muy marcadas, observándose una bronconeumonía catarropurulenta con presencia de abundante edema, macrófagos alveolares y neutrófilos degenerados (Ojo, 1976a; Rosendal, 1983). Una observación constante es la presencia de una neumonía intersticial localizada especialmente en los septos interlobulillares con abundante edema e infiltrado leucocitario (Ojo, 1976a; Rosendal, 1983; Guha y Verma, 1987b). Con menor frecuencia se observan los fenómenos de necrosis en los septos alveolares, tejido conectivo interlobulillar y pleura (Ojo, 1976a; Rosendal, 1983; Bölske y cols., 1989). En estas infecciones son frecuentes las complicaciones por otros microorganismos, principalmente pasteurelas, que inducen intensos fenómenos de necrosis y una neumonía fibrinosa (Rapaport y Bar-Moshe, 1984; Bölske y cols., 1989).

En un trabajo experimental (Rodríguez, 1993) la reproducción de las lesiones pleuroneumónicas fue posible únicamente al inocular simultáneamente los plasmias Mmc y MmmLC por vía intratraqueal en cabritos de siete días de edad, mientras que en animales de 3-4 meses sólo se desarrollaron lesiones bronconeumónicas. La mayor intensidad de las lesiones pulmonares resultantes de la inoculación de ambos microorganismos, confirma el sinergismo patogénico inducido por más de un agente etiológico en el aparato respiratorio (Rodríguez, 1993).

En las inoculaciones orales de MmmLC realizadas en cabritos neonatos que no recibieron calostro (DaMassa y cols., 1986), las lesiones consistieron en poliserositis fibrinopurulenta, neumonía intersticial con abundante fibrina, pleuritis y pericarditis fibrinosas. En el pulmón se observó una marcada congestión de las arteriolas y los capilares con necrosis vasculares y formación de trombos. Sin embargo, los intentos de reproducir la enfermedad en animales mayores por vía oral, no han sido concluyentes (Bölske y cols., 1989).

2.4.3 Neumonía producida por *Mycoplasma mycoides* subespecie *capri* (*Mmc*).

Mmc está clasificado dentro del grupo *Mycoplasma mycoides*, en íntima relación con *MmmLC*. La presencia de este micoplasma ha sido notificada en África, Asia y Australia, siendo considerado actualmente por muchos investigadores como una especie inusual o rara (MacOwan, 1984; DaMassa y cols., 1992). El aislamiento de *Mmc* en un brote de pleuroneumonía caprina constituye la primera referencia de esta especie en España (Villalba y cols., 1992). La cepa patrón de este microorganismo fue aislada por Chu y Beveridge en 1949, habiéndose considerado durante muchos años como la responsable de la Pleuroneumonía Contagiosa Caprina (PNCC) clásica (Cottew, 1982; Gourlay y Howard, 1982). Posteriormente se comprobó que la inoculación intramuscular de esta cepa desarrollaba lesiones purulentas en el punto de inoculación, y no lesiones neumónicas (MacOwan, 1984). Las lesiones neumónicas sí se producían después de la inoculación intranasal (aerosol), observándose pleuroneumonía en cabra y neumonía en oveja. Estas lesiones diferían claramente de las características propias de la PNCC clásica, por lo que se concluyó que *Mmc* es el agente causal de lesiones pleuroneumónicas, pero no de la PNCC clásica (McMartin y cols., 1980; MacOwan, 1984).

Las técnicas actuales han permitido, en los últimos años, reclasificar retrospectivamente los aislamientos definidos originalmente como *Mmc*, por lo que hoy en día existen dudas razonables sobre el poder patógeno real de *Mmc* (Cottew, 1979; McMartin y cols., 1980; Moulton, 1980; Cottew y Yeats, 1981; MacOwan, 1984; DaMassa y cols., 1992). Así, Al-Aubaidi y cols. en 1972 demostraron que la cepa Von, aislada en Nigeria por Longley (1951) era diferente de la cepa PG3, y la clasificó como *MmmLC*. También, otras cepas aisladas en EEUU (Barber y Yedloutschnig, 1969; Jonas y Barber, 1969; Yedloutschnig y cols., 1971; Pearson y cols., 1972; Nakagawa y cols., 1976), en Turquía (Cottew y cols., 1969) y la cepa denominada AQ aislada en Japón (Nakagawa y cols., 1976), clasificadas originariamente como *Mmc*, fueron reclasificadas como *MmmLC* (Thigpen y cols., 1981; DaMassa y cols., 1992). Sin embargo, los chequeos serológicos en explotaciones caprinas han demostrado que *Mmc* se encuentra ampliamente difundido con carácter endémico en ciertas zonas del mundo, en las que causa una enfermedad parecida a la PNCC clásica (Jones y Wood, 1988).

En los últimos años han sido muy escasos los aislamientos de este micoplasma, por lo que existe muy poca información adicional sobre la patogenicidad de este microorganismo. La enfermedad producida por *Mmc* se caracteriza por afectar casi exclusivamente a la cavidad torácica, pudiéndose presentar en una forma septicémica pasajera, aunque no es frecuente encontrar otra sintomatología orgánica (Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992). Excepcionalmente, *Mmc* ha sido aislado de mama (Perreau y cols., 1972). En los brotes naturales de la enfermedad el curso puede ser agudo o crónico. En el primer caso, se observan

dificultades respiratorias, con respiración abdominal, ruidos, tos y un aumento del reflejo tusígeno. En el segundo caso, los síntomas respiratorios son menos manifiestos y difíciles de detectar, pudiendo pasar desapercibidos (Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992).

La reproducción experimental de la enfermedad se ha conseguido mediante inoculación por vía intratraqueal/endobronquial, induciéndose lesiones pleuroneumónicas muy parecidas a las descritas en la infección pulmonar por MmmLC. En todos los casos se presentó la inflamación en el punto de inoculación, con fiebre y sintomatología respiratoria aguda (Ojo, 1976a). Rodríguez (1993) reprodujo experimentalmente lesiones pleuroneumónicas al inocular simultáneamente los micoplasmas Mmc y MmmLC por vía intratraqueal en cabritos de siete días de edad, mientras que en animales de 3-4 meses sólo se desarrollaron lesiones bronconeumónicas.

Las lesiones observadas tras la infección con Mmc se encuentran normalmente limitadas a pulmón, pleura y pericardio, siendo muy parecidas a las desarrolladas por MmmLC. Macroscópicamente, los lóbulos pulmonares muestran distintos grados de hepatización, con moderada dilatación de los septos interlobulillares. La pleura de los lóbulos afectados se presenta con frecuencia cubierta por membranas de fibrina y adherencias al diafragma, pericardio y pared torácica, siendo constante la presencia de hidrotórax normalmente turbio y rojizo. El pericardio aparece engrosado con aspecto blanquecino debido a la presencia de fibrina. Los ganglios linfáticos regionales, especialmente los bronquiales y mediastínicos, se observan aumentados de tamaño, edematosos y hemorrágicos. Histopatológicamente, las áreas del pulmón afectado muestran congestión de los septos alveolares, edema alveolar intenso, bronconeumonía purulenta aguda, pleuritis fibrino-purulenta aguda y pericarditis fibrinosa (Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan, 1976; Ojo, 1976a).

La inoculación intracanalicular da lugar a una mamitis unilateral con contenido purulento en los acinos mamarios y un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos retromamarios (Misri y cols., 1988). En los animales inoculados intracanalicularmente se observó una mamitis purulenta difusa con marcada descamación y exudación de neutrófilos, evolucionando la lesión hasta una mamitis intersticial crónica con atrofia y fibrosis del parénquima mamario (Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan, 1976; Ojo, 1976a; Misri y cols., 1988).

En el ganado ovino se ha aislado Mmc de pulmón de corderos con neumonía (Sreelamulu y cols., 1987). Tras la inoculación experimental se observó una neumonía intersticial, lesión que los autores consideran específica, ya que previamente se emplearon antibióticos para impedir la colonización bacteriana secundaria que evitaría la presencia de un exudado celular y fibrinoso, que los autores atribuyen a la contaminación de agentes secundarios.

2.4.4 Neumonía producida por Mycoplasma capricolum subespecie capricolum.

La descripción de M. capricolum subsp. capricolum (Leach y cols., 1993) se corresponde con la realizada por Tully y cols. en 1974 para M. capricolum. El ADN de M. capricolum subsp. capricolum presenta un 80% de homología con respecto al del antiguo M. Biotipo F38, por lo que tras diversos estudios (Christiansen y cols., 1982; Erno y cols., 1983; Costas y cols., 1987; Bonnet y cols., 1993) se han considerado los antes denominados M. capricolum y M. Biotipo F-38 como subespecies dentro de una misma especie, pasando a denominarse M. capricolum subsp. capricolum y M. capricolum subsp. capripneumoniae respectivamente (Leach y cols., 1993).

Este micoplasma es especialmente patógeno para el ganado caprino, aunque también se ha aislado del ganado ovino y bovino. Prácticamente todas las cepas aisladas son patógenas, causando cuadros agudos que afectan a animales de todas las edades y, en especial, a los más jóvenes, en los que la morbilidad y mortalidad son mayores. Las lesiones más frecuentes consisten en poliartritis y mamitis, y, con menor frecuencia, neumopatías (DaMassa y cols., 1983b, 1984 y 1992; Bölske y cols., 1988).

En inoculaciones experimentales por vía parenteral, M. capricolum subsp. capricolum produce una enfermedad normalmente aguda, caracterizada por hipertermia marcada, signos de neumonía, poliartritis y mamitis. Esta especie produce septicemia, persistiendo el micoplasma en las articulaciones si el animal sobrevive (DaMassa y cols., 1987b). En los cabritos infectados experimentalmente por vía oral se puede observar una neumonía diferente a la observada en la PNCC clásica, que raramente va acompañada de pleuritis y/o de poliartritis (DaMassa y cols., 1983b).

En los animales jóvenes infectados, los pulmones presentan zonas atelectásicas junto a zonas de consolidación rojizas, pudiendo aparecer alguna adherencia entre los lóbulos y un abundante líquido serohemorrágico en la cavidad torácica. Las lesiones microscópicas en el pulmón consisten en una neumonía intersticial difusa con aumento evidente del número de leucocitos en las paredes alveolares (DaMassa y cols., 1983b y 1987b; Cordy, 1984).

2.5 NEUMONÍAS CAUSADAS POR OTROS MICOPLASMAS

2.5.1 Neumonía producida por *Mycoplasma ovipneumoniae*.

M. ovipneumoniae es un microorganismo ubicuo que ha sido aislado con frecuencia del aparato respiratorio del ganado caprino (DaMassa y cols., 1992). La patogenicidad real de este micoplasma es muy controvertida, así para Goltz y cols. en 1986, *M. ovipneumoniae* causa neumonías agudas y crónicas y pleuritis en el ganado caprino. Las inoculaciones experimentales realizadas con *M. ovipneumoniae* por vía endobronquial producen signos de enfermedad en animales jóvenes y adultos (Goltz y cols., 1986). Sin embargo, otros autores lo consideran apatógeno para el ganado caprino, al haberlo aislado con frecuencia de pulmones de animales sanos (DaMassa y cols., 1992). También hay autores que lo consideran apatógeno para los ovinos, después de haberlo inoculado solo o conjuntamente con *P. haemolytica* (Davies y cols., 1981; Buddle y cols., 1984).

En un estudio experimental con macerados de pulmón que contenían *M. ovipneumoniae*, se observaron lesiones en el 50% de los animales, que consistieron en una neumonía exudativo-proliferativa intensa. Por el contrario, la inoculación de las cepas después de haberlas cultivado indujo lesiones en el 21% de animales, indicando así la atenuación de *M. ovipneumoniae* por pases en cultivo. Las lesiones macroscópicas se caracterizaron por el engrosamiento pleural, adherencias y abundante líquido amarillento en la cavidad torácica. El parénquima pulmonar situado bajo la zona de pleura afectada presentaba un color rojo-pardusco y una consistencia firme (Goltz y cols., 1986). Las lesiones microscópicas descritas fueron pleuritis fibrinopurulenta con bronquiolitis y alveolitis (Goltz y cols., 1986). En otros casos, se ha observado una neumonía leve con atelectasia y engrosamiento de los septos interalveolares, conteniendo éstos numerosos neutrófilos y linfocitos (Mohan y Obwolo, 1990).

2.5.2 Neumonía producida por *Mycoplasma agalactiae*.

Aunque este micoplasma está implicado frecuentemente en el denominado "Síndrome de Agalaxia Contagiosa" de la oveja y de la cabra en periodos de lactación, también ha sido aislado de vías respiratorias (Gupta y cols., 1984). Algunos estudios experimentales han demostrado que *M. agalactiae* puede provocar por vía intratraqueal, neumonías en cabritos de 2 a 4 meses de edad. Sin embargo, la mortalidad en estos trabajos fue muy escasa,

manteniéndose el micoplasma en el pulmón de los animales que sobrevivieron (Guha y Verma, 1987a). Histopatológicamente, las lesiones encontradas fueron de tipo neumónico con distinto grado de intensidad. Los capilares septales mostraron congestión con exudación serosa o serofibrinosa y abundantes macrófagos alveolares. Las lesiones pleuroneumónicas sólo han sido descritas en un caso (Cottew, 1984).

2.6 OTRAS ESPECIES NO PATÓGENAS DE MICOPLASMAS

Del pulmón del ganado caprino han sido aislados otros micoplasmas apatógenos. Estos son M. arginini, M. conjunctivae, Acholeplasma laidlawii, y Acholeplasma oculi (Cottew y Yeats, 1982; Jones, 1983; Hazell y cols., 1985).

2.7 NEUMONÍAS POR PASTEURELAS EN EL GANADO CAPRINO Y OVINO

P. haemolytica y P. multocida son las dos especies de Pasteurella que se encuentran con mayor frecuencia en pulmones de ovinos y caprinos. La distribución de ambas es mundial, siendo la prevalencia de P. haemolytica superior en los pequeños rumiantes (Carter, 1967; Gilmour, 1980). Comparativamente, los aislamientos de P. haemolytica y P. multocida en brotes neumónicos han sido descritos con mayor frecuencia en el ganado ovino que en el caprino (Jones y cols., 1978 y 1982a ; Jones, 1989).

Las infecciones dobles, bien virus y Pasteurella spp. o Mycoplasma spp. más Pasteurella spp., inducen los cuadros lesionales más graves en estos animales (Davies y cols., 1977, 1981 y 1982; Sharp y cols., 1978; Al-Darraji y cols., 1982). Así, la inoculación experimental de P. haemolytica provocó una bronconeumonía purulenta, con presencia de múltiples abscesos con centros necróticos próximos a bronquios, una pleuritis fibrinosa, y una bronconeumonía aguda necrotizante cuando se inoculó previamente el virus Parainfluenza 3 (Davies y cols., 1981 y 1982; Buddle y cols., 1984).

La infección conjunta de M. ovipneumoniae y P. haemolytica indujo una neumonía crónica acompañada, en algunos casos, de pleuritis (Jones y cols., 1978). En la neumonía atípica de la oveja, el aislamiento negativo de P. haemolytica ha sido interpretado como una rápida eliminación de esta bacteria de las lesiones pulmonares en relación al mismo fenómeno de eliminación de M. ovipneumoniae (Gilmour y cols., 1982).

En la literatura se describen pocos casos de pasteurelisis naturales en el ganado caprino, y también son escasas las pruebas experimentales que demuestren el poder patógeno de P. multocida y de P. haemolytica en esta especie (Mugera y Kramer, 1967; Pegram, 1974; Ojo, 1975; Doutre y Perreau, 1983a,b; Ngatia y cols., 1986; Hayashidani y cols., 1988). Se ha descrito la presencia de ambas bacterias y Mycoplasma spp. en animales aparentemente sanos y en animales enfermos.

Doutre y Perreau (1983a) aislaron 3 cepas de M. arginini, 21 cepas de P. multocida y 24 cepas de P. haemolytica de animales asintomáticos. En todos los casos, los aislamientos se realizaron a partir de muestras de senos nasales, laringe y tráquea, siendo negativas las muestras procedentes del parénquima pulmonar. De esta forma concluyeron que las neumonías por Pasteurellas spp. se deben a la complicación de las lesiones producidas por otros agentes. Igualmente, estas bacterias han sido aisladas de brotes de PNCC clásica, así como de lesiones pulmonares de las que se aislaron MmmLC y Mmc (Bölske y cols., 1989; Rodríguez, 1993).

Hasta el artículo publicado por Borgman en 1955, las enfermedades producidas por P. multocida y P. haemolytica en el ganado caprino fueron atribuidas exclusivamente a P. multocida (Hayashidani y cols., 1988). En 1960 Gourlay describió el primer caso en el cual se asociaba el aislamiento de P. haemolytica a lesiones neumónicas en cabras, sin que se aislaran otros microorganismos (Hayashidani y cols., 1988). Posteriormente, Mugera y Kramer en 1967 describieron un brote agudo de neumonía causada por P. haemolytica que afectó a un total de 20 cabras, muriendo 12 de forma aguda con síntomas respiratorios. Las lesiones encontradas se localizaron en pulmón, pleura y pericardio. El pulmón mostró zonas neumónicas en los lóbulos apicales y medios, con septos interlobulillares engrosados y de aspecto edematoso y fibrinoso, afectando a la pleura de la misma forma. En el estudio histopatológico, los alvéolos se encontraron con abundante edema proteináceo junto a linfocitos, neutrófilos, macrófagos alveolares y células epiteliales descamadas. En la pleura se observó una inflamación fibrino-purulenta con focos de necrosis (Jones, 1989).

En inoculaciones experimentales por distintas vías se ha descrito que algunos animales murieron mostrando una pleuroneumonía fibrinosa, con septos interlobulillares dilatados conteniendo líquido serofibrinoso, bronquios repletos de un exudado gris-amarillento y la pleura cubierta por membranas de fibrina en las zonas más afectadas. El parénquima pulmonar presentó una coloración rojiza y de consistencia firme. Histopatológicamente, la lesión se

caracterizó por la presencia de distintas fases evolutivas neumónicas, de distribución lobulillar con afectación de la pleura. En muchos animales se desarrollaron lesiones crónico-proliferativas con engrosamiento de los septos interalveolares conteniendo abundantes leucocitos, concluyéndose que P. haemolytica induce lesiones neumónicas fibrinosas (Mugera y Kramer, 1967; Ngatia y cols., 1986; Hayashidani y cols., 1988). La inoculación intratraqueal de una cepa de P. haemolytica biotipo T provocó neumonía en algunas cabras, pero estas observaciones son difícilmente interpretables debido a que se produjeron infecciones concomitantes por otros microorganismos como P. multocida (Ngatia y cols., 1986).

2.8 NEUMONÍA ENZOÓTICA

Bajo el término genérico de Neumonía Enzoótica se agrupan dos formas de neumonía presentes en grupos de animales jóvenes mantenidos en estrecho contacto. La importancia relativa de cada una de estas dos formas, una bronconeumonía exudativa aguda y una neumonía broncointersticial más crónica, difiere en función de la especie animal afectada (Jubb y cols., 1993).

2.8.1 Neumonía enzoótica en vacuno.

En vacuno esta enfermedad se atribuye a la acción sinérgica de varios virus, micoplasmas y bacterias, lo que condiciona los cambios morfológicos descritos. Se han considerado como agentes víricos más importantes el virus respiratorio sincitial bovino y el virus Parainfluenza 3, evidenciándose que la neumonía aguda es iniciada por la infección vírica (Jubb y cols., 1993).

En la mayoría de los casos se describe además una bronconeumonía aguda de origen bacteriano. Aunque se han aislado más de 20 especies diferentes de bacterias asociadas a este tipo de lesión, las más importantes son Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida. Otras bacterias aisladas en menor medida son Streptobacillus actinoides, Actinomyces pyogenes y E. coli. También ocasionalmente pueden aislarse clamydias (Jubb y cols., 1993).

Diversas especies de micoplasmas, especialmente M. bovis, M. dispar, y Ureaplasma spp. contribuyen igualmente a la forma aguda de neumonía enzoótica, junto con los virus y bacterias

antes mencionados. Los micoplasmas también son importantes como agentes asociados a la forma crónica de neumonía enzoótica. Histológicamente la lesión consiste en una neumonía broncointersticial crónica con componente exudativo y proliferativo. En los estadios más crónicos la lesión más relevante es el estrechamiento de los bronquiolos debido a la presencia de intensas linfoproliferaciones (Jubb y cols., 1993).

2.8.2 Neumonía enzoótica en ovino.

Esta enfermedad presenta una gran similitud con la neumonía enzoótica del vacuno. La forma aguda se corresponde con la pasteurelosis neumónica, mientras que la forma crónica, enzoótica o neumonía broncointersticial, presenta una gran similitud con la descrita en vacuno y porcino. Dado que el término neumonía enzoótica se usó inicialmente sólo para referirse a la pasteurelosis neumónica de la oveja, otros términos como neumonía intersticial proliferativa, neumonía exudativa proliferativa, neumonía atípica y neumonía crónica no progresiva, se han utilizado para referirse a la forma crónica. Para evitar confusiones, esta forma crónica debería denominarse también Neumonía Enzoótica, al igual que en vacuno y porcino (Jubb y cols., 1993).

La neumonía atípica (NA) de la oveja, así denominada para diferenciarla de la Pasteurelosis o Neumonía Enzoótica Clásica y generalmente monogénica, fue descrita por primera vez en 1963, siendo definida por su cuadro anatomopatológico (Sneath y Hisset, 1963).

La NA es una neumonía exudativa y proliferativa en la que aparece una consolidación parcial o total de los lóbulos anteriores de los pulmones, observándose en ocasiones pleuritis. La enfermedad, que afecta a animales de 2 a 12 meses de edad, es crónica, no progresiva, generalmente subclínica y raramente mortal (Jones y cols., 1979).

En cuanto a la etiología de la enfermedad, los principales agentes que intervienen en la NA son M. ovipneumoniae y diversos serotipos de Pasteurella haemolytica, aunque ocasionalmente pueden aislarse otros organismos como Bordetella parapertussis a partir de lesiones de NA, los cuales pueden modificar la enfermedad en mayor o menor grado (Jones y cols., 1979; Jubb y cols., 1993).

El alto grado de asociación entre la presencia de M. ovipneumoniae y las lesiones de NA (Jones y cols., 1979), así como la reproducción experimental de la enfermedad mediante inoculación de homogeneizados pulmonares con este microorganismo, contribuyen a establecer a M. ovipneumoniae como el agente primario de la NA (Alley y Clarke, 1979; Gilmour y

cols., 1979). Sin embargo, este microorganismo es un patógeno facultativo que induce alteraciones patológicas cuando los mecanismos defensivos del hospedador se encuentran comprometidos.

Se considera que Pasteurella haemolytica es el principal factor secundario y complicante de la NA. Excepto a concentraciones muy altas, P. haemolytica no produce lesiones ni persiste cuando es inoculada en los pulmones de ovejas de más de 2-3 meses de edad (Gilmour y cols., 1979). Sin embargo, si se inoculan intranasal o intratraquealmente a una dosis baja de 10^4 microorganismos cultivos u homogeneizados de pulmón con M. ovipneumoniae simultáneamente, o siete días antes que P. haemolytica se inducen síntomas de neumonía aguda (Jones y cols., 1978, 1982a).

Otros microorganismos se han asociado con la NA, tales como M. arginini, Chlamydia psittaci ovis, Pasteurella multocida y Acholeplasma oculi. Los hallazgos de campo sugieren que M. arginini no produce ni modifica la neumonía crónica ovina, pero puede localizarse y desarrollarse en los pulmones de ovejas sometidas a malas condiciones de manejo. La inoculación experimental en pulmones de ovejas con M. arginini no produce colonización pulmonar ni enfermedad (Jones y cols., 1982b). Fruto de estos mismos trabajos se dedujo que las clamydias carecían de un papel relevante en las neumonías crónicas ovinas. Otros microorganismos como P. multocida y Acholeplasma oculi han sido aislados en raras ocasiones a partir de pulmones de ovejas neumónicas. No se ha descrito aislamiento vírico alguno en casos de NA pero en un estudio realizado en corderos estabulados, los datos serológicos indicaron que la infección con virus parainfluenza 3 precedió a la localización pulmonar de micoplasmas y bacterias, así como al desarrollo de la NA (Jones y cols., 1979). Esto sugiere que, bajo condiciones naturales, el virus PI3 puede tener a veces importancia en el inicio de la enfermedad.

La NA puede afectar al 40% de los corderos del rebaño, pero los síntomas son generalmente ligeros y pueden pasar desapercibidos. Los signos principales son: tos crónica acompañada de disnea o hiperpnea, flujo nasal mucopurulento y depresión. Pueden producirse muertes esporádicas. Los trabajos experimentales demuestran que la gravedad de los síntomas está condicionada a la presencia de P. haemolytica. Cuando las bacterias están ausentes no se desarrolla fiebre, apreciándose ésta durante 2-5 días después de su inoculación. La depresión acompaña a la fiebre y la muerte se produce en un 10-25% de los animales entre los 2-90 días postinfección (Jones y cols., 1982b).

Las lesiones de NA están limitadas generalmente a los lóbulos apical y cardíaco y con menor frecuencia, a los bordes anteriores de los lóbulos diafragmáticos del pulmón. Al realizar cortes del tejido consolidado se pueden observar nódulos de color gris blanquecino, frecuentemente prominentes, en la superficie de corte. A veces se observa una pleuritis

caracterizada por la aparición de fibrina o adherencias.

Al realizar la descripción original de la NA (Stamp y Nisbet, 1963) se consideraron dos formas histológicas de la enfermedad, la neumonía intersticial y la hiperplasia linfoide. La neumonía intersticial era la más común, apareciendo en un 90% de los casos observados, y sus características macroscópicas y microscópicas son las anteriormente descritas. Entre las respuestas tisulares observadas destaca la hiperplasia linfoide nodular y la hiperplasia epitelial bronquiolar, así como el aumento de células mononucleares, mayoritariamente linfocitos, en los septos alveolares. Algunos alvéolos pueden estar colapsados, pero la mayoría contienen un exudado en el que los macrófagos son una característica constante, siendo las agrupaciones de neutrófilos de aparición variable. Rara vez se observa una pseudoepitelización de los alvéolos como consecuencia de una hiperplasia de neumocitos tipo II. Una lesión histológica típica de la NA es la presencia de cicatrices nodulares situadas entre, o muy próximas, a las paredes bronquiolares. Tienen un aspecto hialino y pueden proyectarse en la luz de los bronquiolos con una delgada cubierta epitelial; estas cicatrices hialinas aparecen con mayor frecuencia dos meses después de la infección (Gilmour y cols., 1982). El exudado desaparecía hacia los tres meses después de la infección, coincidiendo con la imposibilidad de *M. ovipneumoniae* de resoluciva de los pulmones. Sin embargo, la hiperplasia linfoide nodular parecía ser una característica persistente y resultó ser la principal característica al final de un período de observación de 180 días, siendo entonces cuando el exudado de macrófagos y la hiperplasia epitelial bronquiolar sufrieron aparentemente una regresión. Una característica significativa fue que *M. ovipneumoniae* se aisló de los pulmones en estas últimas fases.

La hiperplasia linfoide, segunda forma de la NA según la descripción original (Stamp y Nisbet, 1963), se caracteriza por la presencia de extensos manguitos de tejido linfoide rodeando las vías aéreas y un ligero exudado de macrófagos en los alvéolos próximos. Esta forma de lesión se ha observado en corderos jóvenes antes de la edad a la cual aparece comúnmente la NA (Jones y cols., 1979), y en las últimas fases de resolución de la neumonía exudativa proliferativa (Gilmour y cols., 1982). En ambos casos, *M. ovipneumoniae* resultó ser el único microorganismo aislado, concluyendo que la hiperplasia linfoide es una manifestación común y generalmente tardía de la infección pulmonar por este micoplasma.

2.8.3 Neumonía enzoótica en porcino.

Este término en porcino se considera sinónimo de Neumonía Enzoótica Micoplásmica. Los micoplasmas aislados más frecuentemente son *M. hyopneumoniae* y *M. hyorhinis*, especialmente el primero de ellos. Otros mollicutes como *M. flocculare* y *Ureaplasma spp.*

pueden aislarse ocasionalmente de estas lesiones. Simultáneamente se han descrito principalmente Pasteurella multocida, Actinomyces pyogenes, Haemophilus spp., Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Klebsiella spp. y Bordetella bronchiseptica (Jubb y cols., 1993).

La lesión macroscópica más importante en este tipo de neumonía es una consolidación de la región craneoventral del pulmón, incluso en ocasiones pequeños nódulos en el centro de lobulillos atelectásicos indican la presencia de tejido linfoide peribronquiolar (Jubb y cols., 1993).

Histológicamente la lesión consiste en una neumonía catarral broncointersticial con linfoproliferación peribronquial, peribronquiolar y perivascular en las fases más crónicas. En los casos más graves los nódulos linfoides hacen prominencia sobre la muscular de la mucosa y ocasionan un estrechamiento de la luz de las vías aéreas, e incluso en ocasiones se observan centros germinales. El epitelio correspondiente se encuentra desprendido, particularmente en bronquiolos donde existe una hiperplasia epitelial. A nivel alveolar se observa un engrosamiento de los septos interalveolares y un acúmulo de exudado en su luz, compuesto fundamentalmente por macrófagos alveolares (Jubb y cols., 1993).

2.9 DEMOSTRACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE MICOPLASMAS EN TEJIDOS FIJADOS

El diagnóstico laboratorial de las infecciones por micoplasmas está basado en su aislamiento a partir de tejidos infectados y en la identificación subsiguiente de las especies implicadas mediante pruebas bioquímicas y serológicas, como son la inhibición de crecimiento e inhibición del metabolismo (Erno y cols., 1978; DaMassa y cols., 1986).

Erno (1977), en su trabajo sobre la identificación de micoplasmas de pequeños rumiantes empleó la técnica de la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre colonias, concluyendo que los antisueros policlonales pueden utilizarse con esta finalidad, pudiendo obviarse alguno de los test bioquímicos necesarios para caracterizar algunos micoplasmas. Otros autores (Al-Aubaidi y cols., 1971; Erno, 1977; Trichard y cols., 1989) han empleado la técnica de IFI para la identificación de colonias de micoplasmas fijadas en alcohol, lo que les ha permitido diferenciar distintas especies o subespecies, como Mmc, MmmLC y M. agalactiae, cuando estos micoplasmas se presentan en cultivos mixtos (Tessler y Yedloutschnig, 1972; Tessler,

1973). Sin embargo, la IFI tiene inconvenientes cuando se utiliza sobre tejidos, al no poder identificar microorganismos individuales, lo que sí pueden hacer las técnicas de inmunoperoxidasa (Hill, 1978). De esta forma se establece la posibilidad de una mayor amplificación de la reacción, al emplear métodos como la peroxidasa antiperoxidasa (PAP) y el Complejo Streptavidina Biotina Peroxidasa (SBp).

En pulmones de ratas infectados con M. pulmonis se observó que la técnica de inmunoperoxidasa (IP) y de inmunofluorescencia (IFI) detectaban específicamente estos microorganismos en el borde apical de las células epiteliales de los bronquios, siendo mejores los resultados con la técnica de inmunoperoxidasa. Esta técnica se empleó entonces para realizar un estudio retrospectivo de M. pulmonis en muestras fijadas en formol, observándose la inmunorreacción en las mismas localizaciones que las descritas en los animales inoculados experimentalmente (Hill, 1978).

El empleo de estas técnicas para la demostración de micoplasmas en tejidos infectados simultáneamente por distintas especies de micoplasmas ha sido realizado por Polak-Vogelzanag y cols. (1978) y Martín de las Mulas y cols. (1990), llegando a hipotetizar, en algunos casos, la posibilidad de diferenciar micoplasmas "in situ", lo que obviaría problemas en el clonaje cuando coexisten en el medio micoplasmas con diferente velocidad de crecimiento (Martín de las Mulas y cols., 1990).

El estudio inmunohistológico mediante la técnica de la Streptavidina-Biotina-Peroxidasa en un trabajo experimental (Rodríguez, 1993), demostró la mayor implicación de los micoplasmas en las lesiones pleuroneumónicas frente a la participación menos relevante de P. multocida. Sin embargo este método no es tan específico como el método de la inhibición del metabolismo, a la hora de identificar subespecies de micoplasmas cuando se utilizan antisueros policlonales (Rodríguez, 1993).

En el ganado porcino se han utilizado estas técnicas (IP y IF) para el diagnóstico de M. hyopneumoniae y M. hyorhinis en pulmones infectados de forma natural y experimental. En los animales inoculados experimentalmente, la inmunopositividad se localizó en las luces de bronquios y bronquiolos primarios (Meyling, 1971; Bruggmann y cols., 1977; Amanfu y cols., 1984). Doster y Lin, en 1988, utilizaron la técnica de inmunoperoxidasa y la de inmunofluorescencia para el diagnóstico de M. hyopneumoniae en pulmones fijados en formol, con resultados similares en las células epiteliales de bronquios y bronquiolos, e intracelularmente en macrófagos, resultando la IP más sensible que la IF.

En el ganado bovino también se han utilizado las técnicas de inmunoperoxidasa e inmunofluorescencia para la detección de micoplasmas. La técnica de la inmunofluorescencia ha sido empleada sobre improntas de parénquima pulmonar, contenido de secuestros pulmonares y líquido pleural en infecciones el MmmSC. Los resultados fueron positivos en un

96% de los animales frente a un 64% en el aislamiento del micoplasma (Trichard y cols., 1989). Con técnicas de inmunoperoxidasa se obtuvieron resultados positivos en el tracto respiratorio pulmonar, en macrófagos alveolares y en la periferia de los focos de necrosis (Ferreira y cols., 1988).

En lesiones pulmonares causadas por M. bovis se detectaron mediante técnicas de inmunoperoxidasa, observándose antígenos de estos microorganismos asociados a la banda de piocitos que delimita los focos de necrosis. También se observó positividad en la luz de los bronquios y bronquiolos, y, en algunos casos, entre las células epiteliales de los bronquiolos (Thomas y cols., 1986; Gourlay y cols., 1989). Igualmente, se detectó P. haemolytica en pulmones infectados con M. bovis, observándose la presencia constante, en estos casos, de leucocitos alargados o en "grano de avena" (Gourlay y cols., 1989).

Las lesiones en bovinos y en otras especies animales, causadas por P. multocida y P. haemolytica en infecciones naturales y experimentales también han sido estudiadas con la técnica de la inmunoperoxidasa empleando anticuerpos policlonales creados en conejos. Con esta técnica se han demostrado antígenos en el citoplasma de neutrófilos y macrófagos en distintas zonas del pulmón y de la pleura. Fue muy característica la presencia de estos microorganismos en las áreas limítrofes de los focos de necrosis (Haritani y cols., 1989a,b y 1990).

2.10 BACILO ASOCIADO A LA MUCOSA RESPIRATORIA CILIADA (CAR-BACILLUS)

2.10.1 Descripción y evolución histórica.

La primera descripción de la bacteria actualmente conocida como CAR-bacillus (Cilia Associated Respiratory Bacillus) (Ganaway y cols., 1985) se realizó en 1980 por van Zwieten y cols. al estudiar el aparato respiratorio de ratas de laboratorio afectadas de enfermedad respiratoria crónica murina (CRD). El estudio histopatológico de las lesiones observadas en este brote natural evidenció linfoproliferaciones peribronquiales, así como bronquiectasias y bronquiolocistias. El borde ciliado de las vías aéreas afectadas se observó mucho más basófilo de lo normal y la técnica Warthin-Starry demostró unas bacterias largas, filamentosas, alineadas

perpendicularmente sobre la superficie del epitelio traqueobronquial, situadas entre los cilios y con una morfología similar a los mismos.

Con el microscopio electrónico se confirmó su localización y la estructura de estas bacterias filamentosas, con un diámetro medio de 210 nm, presentando un estrechamiento de hasta 155 nm en porción apical con un ensanchamiento bulboso terminal de 170 nm, y una longitud media de 8 micras, con un rango de 4 a 12 micras. Ultraestructuralmente se observó una pared celular externa trilaminar de 15 nm de espesor, separada por una zona adielectrónica de 8 nm de una membrana celular interna de 9 nm.

Esta descripción inicial no difiere de la realizada por MacKenzie y cols. en 1981 quienes describieron estas bacterias filamentosas en los bordes ciliados de la mucosa nasal, trompas de Eustaquio, tráquea, bronquios y bronquiolos de ratas salvajes con enfermedad respiratoria crónica. Estos mismos autores describieron también la presencia de estas bacterias en una colonia de *Mystromis albicaudatus*, en conejos y en un ratón. Igualmente observaron el bacilo en una diapositiva de una rata afectada por micoplasmosis respiratoria crónica correspondiente a un caso recibido en el Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas (USA) en 1958.

Ganaway y cols. en 1985 propusieron la denominación de Cilia Associated Respiratory (CAR) Bacillus, al estudiar las vías respiratorias de ratas afectadas de enfermedad respiratoria crónica y realizar el primer aislamiento. Las bacterias observadas presentaron una localización y estructura similar a la descrita por los autores anteriores. Sus características tintoriales fueron las de un microorganismo Gram negativo y PAS negativo, presentando una tinción muy débil con anilinas básicas, si bien se demostraron fácilmente con la técnica de plata Warthin-Starry.

El tratamiento con calor (56°C durante 30 minutos) destruyó la infectividad del bacilo. Igualmente se demostró su resistencia a la congelación/descongelación, a la conservación a -70°C y al mantenimiento a 23°C en fluido alantoideo durante al menos 7 días.

Los intentos de cultivar los CAR-bacilli en medios artificiales no celulares resultaron infructuosos. Ganaway y cols. (1985) lograron aislarlos mediante la inoculación de huevos embrionados de gallina vía alantoidea con lavados y raspados de tráquea y bronquios, fundamentándose en que el saco alantoideo está tapizado con células endodérmicas asociadas con la respiración. Después de tres pases en huevo embrionado se consiguió demostrar ultraestructuralmente la colonización del epitelio alantoideo por CAR-bacilli, los cuales se demostraron estructuralmente mediante la técnica de Warthin-Starry.

El estudio de Ganaway y cols. constituyó también el primer diseño experimental de transmisión del CAR-bacillus a ratas no infectadas mediante inoculación intranasal de raspados y lavados de los bronquios de ratas infectadas, induciendo lesiones típicas de CRD, esto es, acúmulos de células linfoides alrededor de bronquios, bronquiolos, y diversos grados de

bronconeumonía catarro-purulenta.

Posteriormente se llevaron a cabo varias infecciones experimentales en ratas (Matsushita y Joshima, 1989; Matsushita, 1991; Cundiff y cols., 1994), ratones (Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991), conejos (Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991; Cundiff y cols., 1994), cobayas (Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991), hámster sirio (Shoji-Darkye y cols., 1991), así como nuevas descripciones de infecciones naturales en conejos (Waggie y cols., 1987; Kurisu y cols., 1990) y en ratas salvajes (Brogden y cols., 1993), confirmándose las descripciones morfológicas previas, con alguna diferencia en relación a su longitud, como fue el CAR-bacillus en conejo (Schoeb y cols., 1993; Cundiff y cols., 1994), más corto que el aislado de ratas, con 3-5 micras de longitud y una mayor motilidad.

Se describió igualmente la presencia de unas estructuras fibrilares entre el bacilo y la membrana de la célula hospedadora, pudiendo éstas jugar un papel importante en la adhesión y colonización del CAR-bacillus (Kurusu y cols., 1990; Matsushita, 1991).

Hastie y cols. describieron en 1993 dos tipos de bacilos adheridos al epitelio ciliado del tracto respiratorio traqueal de bovinos. El primero fue denominado como "short bacillus" (bacilo corto) presentando una pared celular gruesa típica de las bacterias Gram positivas, con una formación superficial espaciada regularmente (13 nm) de naturaleza glicoproteica en la que se determinaron manosa, galactosa y N-acetilgalactosamina. Las dimensiones medias de este bacilo fueron 214 nm de diámetro y 0.85 micras de longitud.

El otro bacilo, observado en mayor número, fue denominado "filamentous bacillus" (bacilo filamentoso), con una pared celular trilaminar semejante a la presentada por las bacterias Gram negativas y con una cantidad insignificante de polisacáridos en superficie. Fue caracterizado como PAS negativo y sus dimensiones medias fueron de 253 nm de diámetro y 4.3 micras de longitud. Mediante técnicas inmunohistoquímicas con oro coloidal se estableció la relación antigénica de este bacilo filamentoso con el CAR-bacillus descrito en el ganado caprino.

Recientemente CAR-bacillus ha sido descrito en el epitelio ciliado de la tráquea de 12 cabritos de 3 meses de edad que habían sido inoculados con un aislado perteneciente al grupo *M. mycoides*. Estos bacilos presentaron una longitud de 4 a 9 micras y un diámetro de 100-120 nm en la base y de 180-200 en la zona media. Mediante microscopía electrónica prácticamente eran indistinguibles de los cilios, salvo por un pequeño engrosamiento apical característico de estos microorganismos (Fernández y cols., 1995). También han sido observados en el epitelio ciliado de las vías aéreas de pulmón de corderos, presentando unas características morfológicas idénticas a las descritas anteriormente en el ganado caprino (Fernández y cols., 1995).

Schoeb y cols. en 1993 determinaron la secuencia del gen rRNA 16S de la cepa de referencia de CAR-bacillus llegando a la conclusión de que esta bacteria presentaba similitud con los géneros Flavobacterium, Flexibacter, Microscilla y Cytophaga, aunque el mayor grado

de homología fue el presentado con Flavobacterium ferrugineum y Flexibacter sancti. Hasta el momento es difícil establecer una clasificación precisa puesto que la taxonomía del grupo Flavobacterium no está bien establecida.

2.10.2 Aislamiento.

Los primeros intentos para aislar el CAR-bacillus en medios de cultivo rutinarios no celulares resultaron infructuosos (van Zwieten y cols., 1980; MacKenzie y cols., 1981).

Ganaway y cols. en 1985 consiguieron aislar este microorganismo mediante inoculación en huevos embrionados de gallina vía alantoidea con lavados y raspados de tráquea y bronquios de ratas infectadas, demostrándose ya en el tercer pase la presencia de CAR-bacilli mediante la utilización de Microscopía Electrónica.

En 1992 Shoji y cols. describieron por vez primera el crecimiento del CAR-bacillus en un medio artificial, en el que tras ocho días de incubación el número de CAR-bacilli fue treinta veces superior al número original. El medio descrito consistió en medio esencial mínimo Eagle (MEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino y un 20% de HTS (hamster tracheal organ culture soup). La inoculación intranasal en ratones de cepas de CAR-bacillus pasadas 5-6 veces por este medio reprodujo las mismas lesiones que las descritas en la infección natural.

En 1993 Schoeb y cols. demostraron que el CAR- bacillus podía ser cultivado con éxito en un medio de cultivo no celular compuesto por medio esencial mínimo Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), sin adición de células traqueales y tamponado con 25nM de HEPES (N-2-hidroxi-etilpiperacina-N'-2-acido etanosulfónico), demostrando ser tan eficiente como el cultivo en los medios celulares BALB/3T3 llevados a cabo por otros autores (Schoeb y cols., 1993; Cundiff y cols., 1994). El cultivo en este medio (DMEM con FBS) permitió el mantenimiento de los aislados de CAR-bacillus durante al menos 20 pases. Las ventajas de este medio de cultivo estriban en que proporciona una fuente de bacilos libres de componentes celulares para estudios de biología molecular así como se elimina una posible fuente de contaminación.

2.10.3 Diagnóstico serológico.

Ganaway y cols. en 1985 realizaron por primera vez la determinación de IgG frente a CAR-bacillus mediante la técnica de ELISA, concluyendo que dicha técnica podía considerarse como específica y sensible. Mediante esta técnica observaron que la seroconversión tenía lugar a las cuatro semanas postinoculación.

La detección de anticuerpos frente al CAR-bacillus mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) demostró la relación entre la detección de anticuerpos por IFI y el diagnóstico histológico de la infección. Estos autores concluyeron que esta técnica resultó específica y sensible, observando seroconversión a las tres semanas post-infección, por lo que el examen histológico se puede establecer desde las dos primeras semanas tras la infección (Matsushita y cols., 1987).

2.10.4 Lesiones.

2.10.4.1 Ratas.

Las lesiones observadas en ratas en brotes naturales (van Zwieten y cols., 1980; MacKenzie y cols., 1981) coinciden con las descritas mediante la inoculación experimental intranasal (Ganaway y cols., 1985; Matsushita y Joshima, 1989; Matsushita, 1991).

En la experiencia llevada a cabo por Matsushita y Joshima en 1989, las ratas inoculadas mostraron tos, descenso de la actividad y pérdida de peso a partir de las tres semanas postinfección. Las principales lesiones macroscópicas consistieron en focos atelectásicos en pulmón y la presencia de un fluido mucoide transparente en tráquea y bronquios.

Microscópicamente, a partir del día 14 post-infección se demostró la presencia de CAR-bacilli sobre el epitelio ciliado y subsiguiente infiltración con células plasmáticas y linfocitos en la lámina propia de las vías aéreas y regiones periféricas, progresando las lesiones hacia vías aéreas superiores e inferiores. Se observó también esporádicamente una bronconeumonía purulenta asociada con un gran número de macrófagos y algunos linfocitos en alvéolos, hiperplasia del epitelio alveolar, no detectándose CAR-bacilli en las células alveolares ni en las células inflamatorias, lo que indica que la inflamación se expandió desde los bronquiolos afectados hacia los alvéolos periféricos.

Estos datos coinciden con los obtenidos en la segunda experiencia (Matsushita, 1991), en la que se observó que el grado de lesión aumentó con el transcurso del tiempo, iniciándose aproximadamente hacia los 14 días post-infección. Los bronquios y bronquiolos ligeramente afectados mostraron un incremento en el número de células caliciformes y un descenso en el número de células de Clara, como consecuencia de una metaplasia. Los bronquios y bronquiolos más afectados presentaron un epitelio con una altura superior en tres veces a la normal; las células con CAR-bacillus perdieron los cilios, presentando corpúsculos basales diseminados en el citoplasma apical. No se observaron CAR-bacilli atravesando la membrana citoplasmática de las células epiteliales y los cilios se perdieron en aquellas células epiteliales intensamente colonizadas por los CAR-bacilli.

Tanto en los casos naturales como en las inoculaciones experimentales en ratas la enfermedad difirió de la micoplasmosis respiratoria crónica murina en que el grado de las lesiones fue mayor que las lesiones causadas sólo por *Mycoplasma pulmonis* (Lindsey y cols., 1978). Con estos datos Ganaway y cols. (1985) sugirieron que el CAR-bacillus podía ser el agente etiológico primario de CRD en ratas.

2.10.4.2 Ratones.

La experiencia desarrollada por Matsushita y cols. en 1989 demostró que la inoculación intranasal en ratones de cepas de CAR-bacillus procedentes de ratas, a las cuatro semanas post-infección, observándose varios grados de colonización en los bordes ciliados del tracto respiratorio. Igualmente se observó una intensa infiltración de células linfoides en lámina propia, con presencia de neutrófilos en esta localización y en la luz de bronquios y bronquiolos y presencia de gran cantidad de macrófagos en los alvéolos. Los folículos linfoides peribronquiales y peribronquiolares se encontraron aumentados de tamaño y con abundantes neutrófilos asociados.

2.10.4.3 Conejos.

La infectividad en conejo ha sido objeto de controversia entre los distintos autores. En un caso de infección natural en conejos se observó que los epitelios laríngeo, traqueal y bronquial fueron de normales a ligeramente hipertróficos e hiperplásicos, con áreas de escasa pérdida de cilios asociado a una ligera infiltración de heterófilos, linfocitos y células plasmáticas en la lámina propia. Las lesiones fueron catalogadas como menos graves que las producidas en ratas (Kurisu y cols., 1990).

En un diseño experimental desarrollado por Shoji-Darkye y cols. en 1991 en el que se inocularon intranasalmente cepas de CAR-bacillus procedentes de ratas, los anticuerpos se detectaron a las 8 semanas post-infección, no observándose lesiones; únicamente se detectaron pequeñas cantidades de antígeno en cavidad nasal, tráquea y bronquios a las cuatro semanas p.i. En general se ha demostrado que los conejos son susceptibles a la infección, siendo necesario un período de tiempo más prolongado para el desarrollo de las lesiones (Shoji-Darkye y cols., 1991).

Por otra parte el análisis de la secuencia del gen RNAr 16S del CAR-bacillus llevado a cabo por Schoeb y cols. en 1993 demostró que el CAR-bacillus en conejo está menos relacionado con la cepa de referencia que los aislados de ratas, sugiriéndose que las cepas de CAR-bacillus pueden variar según los hospedadores.

Dado que la infección por CAR-bacillus en conejo no desarrolla traqueobronquitis o neumonía aunque haya muchas bacterias asociadas al tracto respiratorio, Cundiff y cols.(1994) intentaron caracterizar el CAR-bacillus aislado de ratas y conejos. Este trabajo concluyó que aunque existen diferencias en las características de crecimiento entre los aislados de rata y conejo, la producción de cápsula, los perfiles antigénicos y los estudios de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) no diferenciaron ambos aislados. Sin embargo los aislados de conejo fueron menos virulentos en ratón que los de rata, con una colonización limitada, ausencia de lesiones y sin seroconversión.

2.10.4.4 Cobayas.

Dado que no existen descripciones de infecciones naturales en cobayas, los principales datos acerca de la patogenia del CAR-bacillus en estos animales proceden de diseños experimentales. La inoculación intranasal de CAR-bacillus en cobayas no fue capaz de originar lesiones histopatológicas, detectándose anticuerpos frente a CAR-bacillus a las cuatro semanas p.i. (Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991), y antígeno en cavidad nasal y tráquea a las dos y cuatro semanas p.i., y desapareciendo a las ocho semanas (Shoji-Darkye y cols., 1991). Con estos datos se concluyó que los cobayos demostraron tener menor sensibilidad que los conejos a la infección por CAR-bacillus (Shoji-Darkye y cols., 1991).

2.10.4.5 Hámster.

La primera descripción de infección experimental por CAR-bacillus en hámster fue realizada por Shoji-Darkye y cols. en 1991. En esta experiencia se observaron cambios histológicos a las ocho semanas p.i. con proliferación linfoide en la submucosa traqueal y

bronquial con engrosamiento del epitelio respiratorio e infiltración del epitelio con células mononucleares. Igualmente se detectaron anticuerpos frente a CAR-bacillus y antígeno entre las 4-8 semanas p.i. Con estos datos se concluyó que el grado de sensibilidad a la infección por CAR-bacillus en el caso del hámster es intermedia entre ratones y conejos.

2.10.4.6 Bovino.

Las lesiones observadas por Hastie y cols. en 1993 en estos animales consistieron en ligeras infiltraciones leucocíticas en la submucosa, si bien no fue una observación constante. Sin embargo se describió una pérdida muy significativa de cilios, lo que llevó a sugerir que esto podría reducir la defensa mucociliar y permitir así una infección más extensa.

2.10.4.7 Caprino y ovino.

Las lesiones descritas por Fernández y cols. (1995) en los cabritos *capra hircus* demostró la presencia de CAR-bacillus consistieron en un moderado infiltrado leucocitario subepitelial a nivel traqueal y en los bronquios de mayores dimensiones, mientras que los corderos estudiados mostraron mayoritariamente una neumonía crónica, en muchos casos con una intensa proliferación linfoide asociada a bronquios y bronquiolos e hiperplasia epitelial.

2.11 MÉTODOS BIOQUÍMICOS DE IDENTIFICACIÓN DE LOS MOLLICUTES

La identificación de los microorganismos agrupados en la clase Mollicutes se basa en una serie de técnicas estandarizadas y descritas por el Subcomité de Taxonomía de Mollicutes (1979).

Así, los requerimientos en esteroides de la mayoría de las especies, la hidrólisis de la urea (que define a los miembros del género *Ureaplasma*), su capacidad de fermentación de azúcares y la hidrólisis de la arginina en aquellas especies que utilizan la vía arginina-dihidrolasa, son métodos bioquímicos usuales en la identificación de estos microorganismos (Tully, 1983).

Existen otras pruebas de valor más limitado, pero igualmente recomendadas, tales como la actividad fosfatasa, la reducción del tetrazolium, el estudio de la actividad proteolítica (coagulación de la caseína, de la gelatina), el estudio de las acciones lipolíticas, traducidas por la liberación de ácidos grasos y la acumulación de sus sales en películas y cristales.

Los requerimientos de esteroides se pueden determinar comprobando si la especie aislada crece en un medio exento de suero. Sin embargo, Freundt y cols.(1973), propusieron un método indirecto para determinar estas necesidades; el método consiste en depositar en la superficie de un medio sólido para micoplasmas una pequeña cantidad de un cultivo líquido del microorganismo a investigar, y a continuación depositar discos de papel de filtro impregnados en una solución alcohólica de digitonina al 1,5%. Después de incubar a 37°C durante 24-96 horas, se observa la sensibilidad a esta sustancia por la aparición de zonas de inhibición de crecimiento alrededor del disco.

La hidrólisis de la urea puede detectarse según el procedimiento de Aluotto y cols. (1970), al comprobar la alcalinización de un medio de cultivo suplementado con urea al 1%, teniendo el inconveniente de que los micoplasmas que hidrolizan la arginina, y que no poseen actividad ureásica, pueden provocar la alcalinización del medio al metabolizar dicho aminoácido presente en pequeñas cantidades en los medios convencionales.

La determinación del metabolismo de la glucosa basándose en el descenso del pH del medio fue descrita por Aluotto y cols.(1970). Consiste en adicionar a un medio de cultivo líquido glucosa al 1% y un indicador de pH, normalmente rojo fenol al 1%, ajustando el pH a 7,4. De esta manera, un descenso de 0,5 unidades, comparado con un tubo control, constituye una reacción positiva. Edward y Moore (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 ácido glucónico y peróxido de hidrógeno, el cual por medio de la peroxidasa libera radicales reactivos que reaccionan con un compuesto cromógeno (la ortofenilendiamina), generando uno coloreado, fácilmente detectable por espectrofotometría.

Las especies del género *Mycoplasma* que hidrolizan la arginina realizan este proceso con el concurso de tres enzimas, la arginina-deiminasa, la ornitina-transcarbamilasa y la carbamatoquinasa (Barile, 1983). Un método sencillo y práctico para comprobar esta acción hidrolítica fue ideado por Schimke y cols. en 1966, y por Aluotto y cols. en 1970, basándose en la detección de amoníaco al alcalinizarse un medio de cultivo líquido suplementado con arginina.

La capacidad de reducir el 2,3,5, trifeniltetrazolium, dando una coloración rojiza, es una característica de numerosas especies de micoplasmas. Esta actividad reductora puede investigarse siguiendo la técnica de Erno y Stipkovits (1973), agregando al medio líquido el 2,3,5, trifeniltetrazolium a una concentración del 0,2%; Tras sembrar dos tubos con el microorganismo problema, se incuban en aerobiosis y anaerobiosis respectivamente, durante

dos semanas como máximo. Se considera la reacción positiva cuando aparece un precipitado rojizo. La prueba puede ofrecer variabilidad en sus resultados, ya que suelen presentarse diferencias significativas debidas a la mayor o menor densidad de crecimiento (Senterfit, 1983).

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 son detectables durante un estadio tardío del crecimiento. La película está constituida por colesterol y fosfolípidos, y los cristales se atribuyen al depósito de las sales de calcio y magnesio procedentes de los ácidos grasos que se liberan 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).

En la Tabla IV se reflejan los perfiles bioquímicos de las principales especies de micoplasmas aislados en el ganado caprino.

2.12 MÉTODOS SEROLÓGICOS DE IDENTIFICACIÓN

Los métodos serológicos de identificación juegan un papel importante en la clasificación de estos microorganismos, ya que el estudio único de los caracteres bioquímicos y enzimáticos es de valor muy limitado.

Los antígenos de los micoplasmas, de naturaleza proteica, lipídica o polisacárida, se localizan principalmente en la membrana celular, y por ello las pruebas serológicas más interesantes son aquellas que se orientan hacia la determinación de estos antígenos. Estas pruebas son la inhibición del crecimiento, la inhibición metabólica, y los métodos de inmunofluorescencia, tanto directos como indirectos, y proporcionan una gran seguridad en la identificación de micoplasmas bajo una variedad de condiciones (Tully, 1983).

Nicol y Edward (1953) fueron los primeros en observar que el crecimiento de los micoplasmas se inhibía por la acción de los antisueros; sin embargo, no fue hasta 1964 cuando Clyde ideó un método práctico de identificación, fundamentado en la obtención de antisueros específicos mediante la inoculación a conejos de suspensiones activas de micoplasmas conocidos, para luego enfrentarlos en un medio sólido inoculado con los aislamientos problema.

TABLA IV. PRINCIPALES PERFILES BIOQUÍMICOS DE LOS MICOPLASMAS AISLADOS EN GANADO CAPRINO.

	Fermentación Glucosa	Hidrólisis Arginina	Reducción Tetrazolium (Ae/An)	Películas y Cristales
<i>M. adleri</i>	-	+	variable	
<i>M. agalactiae</i>	-	-	+/+	*
<i>M. arginini</i>	-	+	-/+	-
<i>M. auris</i>	-	+	-/0	-
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	+	*	+/+	-
<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capripneumoniae</i>	+	-	+/+	-
<i>M. conjunctivae</i>	+	-	w/+	-
<i>M. cottewii</i>	+	-	+/0	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>capri</i>	+	-	+/+	-
<i>M. mycoides</i> subsp. <i>mycoides</i> (LC)	+	-	+/+	-
<i>M. ovipneumoniae</i>	+	-	w/+	-
<i>M. putrefaciens</i>	+	-	w/+	+
<i>M. yeatsii</i>	w	+	+/0	-

Ae: aerobiosis.

An: anaerobiosis.

w: reacción débil.

* positividad en el 11-89% de las cepas.

Después de un apropiado período de incubación, la ausencia de crecimiento en presencia de uno de los antisueros identifica el microorganismo en cuestión. Dado que el material problema debe estar representado por un cultivo puro de micoplasmas, los primeros aislamientos deben clonarse y filtrarse para garantizar dicha pureza, asegurándose así la especificidad de la posible zona de inhibición. Igualmente es muy importante la concentración del inóculo, de forma tal que para placas con medio sólido, de 10 cm. de diámetro se recomienda una concentración de 10^4 UFC/ml (Tully, 1983). En algunas ocasiones y aunque se detecte una zona real de inhibición del crecimiento, pueden observarse cierto número de colonias cercanas al disco. En relación a ello, y según la recomendación de Clyde (1983), una zona de clarificación debe ser considerada positiva cuando se trabaja con sueros mono-específicos, considerándose como negativas aquellas zonas de inhibición iguales o inferiores a 1,5 mm.

La inhibición del metabolismo es esencialmente una técnica de inhibición del 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 Micoplasmaología Comparada, 1975). Consiste en que estos microorganismos se multiplican en un medio líquido conteniendo un sustrato metabólico específico que, dependiendo de la especie en estudio puede estar representado por el 2,3,5-trifeniltetrazolium al 0,05%, glucosa al 0,1%, arginina al 0,5% y urea al 0,1% (Taylor-Robinson, 1983). La variación del pH por la acción de los subproductos metabólicos, detectable mediante un indicador como el rojo fenol, demuestra el crecimiento del microorganismo, que deberá inhibirse con la adición del antisuero específico, detectable al no variar el pH en este caso.

Las técnicas de inmunofluorescencia en la identificación de micoplasmas fueron introducidas por Del Giudice y cols. (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.

Estas técnicas, directas o indirectas, se basan en síntesis, en el marcaje de las inmunoglobulinas específicas presentes en los antisueros con un fluorocromo del tipo del isotiocianato de fluoresceína. En los procedimientos directos, se adiciona sobre bloques de agar que contienen las colonias problema, una pequeña cantidad del antisuero marcado; después de incubar durante 30 minutos en atmósfera húmeda y de realizar tres lavados con PBS, se observan con microscopio de fluorescencia (Freundt y cols., 1979). En la inmunofluorescencia indirecta se debe disponer un tercer elemento representado por un suero antiglobulinas de especie conjugado con el fluorocromo. Rosendal y Black (1972) consideran este sistema más sensible y específico que los métodos directos.

Material y Métodos

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animales.

En septiembre del año 1993 se procedió al sacrificio de los casi 1000 caprinos de que constaba la explotación objeto de estudio localizada en el municipio de San Nicolás de Tolentino. El sacrificio se llevó a cabo mediante inyección endovenosa de una mezcla de Tiopental sódico (Tiobarbital 1 g) y Succinilcolina HCL (Mioflex 100 mg) en vena yugular.

Previamente al sacrificio se realizó la toma de sangre en 192 animales (33 cabritos de 3-4 meses de edad y 159 cabras adultas) que presentaban una sintomatología respiratoria desde ligera a grave. De estos animales, y tras el sacrificio de la totalidad del colectivo se separaron 83 animales (50 cabras adultas y 33 cabritos), que constituyeron el material de estudio de la presente Tesis Doctoral.

La necropsia de los animales adultos fue practicada en pleno campo, mientras que la necropsia de los cabritos se llevó a cabo en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de Las Palmas, recogándose en ambos casos muestras para su estudio histológico, microbiológico e inmunohistológico.

3.1.2 *Material para el estudio microbiológico, histológico e inmunohistológico.*

3.1.2.1 *Muestras procesadas.*

En todos los animales objeto de estudio las muestras procesadas para el estudio microbiológico fueron bazo y pulmón, además de útero en las hembras adultas preñadas. Para el estudio histológico se procesaron muestras de pulmón y tráquea.

3.1.2.2 *Medios de cultivo para Micoplasmas.*

Como medio de cultivo artificial libre de células para el crecimiento de micoplasmas se utilizó el medio SP-4, tanto líquido como sólido, siguiendo la fórmula de Whitcomb (1983), modificada por Poveda (Poveda, 1994, comunicación personal), y que a continuación se describe:

Medio líquido.

1ª Fase

Bacto PPLO broth (DIFCO)	4,2 g
Bacto Peptona (DIFCO)	6,4 g
Bacto Triptona (DIFCO)	12,0 g
Agua Bidestilada	535,0 ml

Ajustar el pH a 7,8

Esterilizar en autoclave a 121°C 20 minutos

2ª Fase

CMRL 1066 (10 x) con glutamina	60,0 ml
Extracto fresco de levadura (25% p/v)	42,0 ml
Yeast Extract (DIFCO) (5g/250 ml)	120,0 ml
Penicilina (solución de 100.000 UI/ml)	6,0 ml
Rojo Fenol (solución 1%)	36,0 ml
Agua Bidestilada	200,0 ml

Ajustar el pH a 7,2

Prefiltrar a través de papel de filtro y filtrar por membrana Millipore de 0,22 micrómetros.

3ª Fase

Suero de caballo	251,0 ml
(Estéril e inactivado a 56°C 30 minutos)	

Mezclar asepticamente las tres fases y a continuación distribuir 2 ml en tubos estériles y guardar en refrigeración hasta su uso.

Medio sólido.

Para la elaboración del medio sólido SP-4 se agregaron 12,5 g de agar n° 1 de OXOID a la primera fase para después ajustar el pH a 7,8 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. Posteriormente las tres 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.

3.1.2.3 Medios de cultivo para otras bacterias.

Los medios empleados para el aislamiento de otras bacterias fueron medios sólidos Columbia y McConkey (MCK), así como los medios requeridos para la realización de las pruebas Voges-Proskauer, Reducción de Nitratos, y SIM (Sulfhídrico, Indol y Motilidad).

3.1.3 Antisueros empleados.

3.1.3.1 Sueros anti-Micoplasmas.

Se emplearon sueros frente a Mmc, MmmLC, M. agalactiae, M. arginini, M. capricolum, M. putrefaciens, M. conjunctivae y M. ovipneumoniae, facilitados por el Dr. Poveda. Estos sueros se desarrollaron en conejos tras hiperinmunización a partir de las correspondientes cepas de referencia de micoplasmas caprinos suministradas por el Dr. R.H.Leach (National Collection of Type Cultures, Central Public Health Laboratory, London).

Igualmente se utilizaron antisueros frente a MmmLC, Mmc, M. putrefaciens, M. auris y M. adleri facilitados por el Dr. Damassa (Universidad de Davies, California) creados en conejos.

3.1.3.2 Sueros anti-Pasteurella.

Con la finalidad de detectar antígenos pertenecientes a especies de pasteurellas en los pulmones estudiados, se utilizó un suero cedido por el Dr. Poveda, creado en conejo utilizando antígenos vacunales de Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica.

Igualmente se empleó un suero anti-Pasteurella multocida creado en conejo y facilitado por el Dr. Stokoffe (Bacteriology Laboratory, Lelystad, Netherlands).

3.1.3.3 *Suero anti-CAR bacillus.*

Con la finalidad de demostrar inmunohistológicamente la presencia de CAR-bacillus se utilizó un suero anti-CAR bacillus de rata, creado en ratón, cedido por el Dr. Matsushita (Matsushita y cols., 1987).

3.1.3.4. *Antisuero secundario y otros reactivos.*

Para la técnica del Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBp) se utilizaron los reactivos secundario (suero anti-IgG de conejo y ratón biotinado, creado en cabra) y terciario (Streptavidina conjugada con Peroxidasa) del Kit Universal DAKO.

3.2 METODOLOGÍA

3.2.1 *Estudio estructural.*

Las muestras obtenidas tras la necropsia de los animales se fijaron en alcohol y se procesaron según la técnica de Sainte-Marie (1962), con algunas modificaciones que a continuación se describen:

1. Fijación de las muestras en etanol al 96%, durante 18 horas a 4°C.
2. Deshidratación mediante 2 pases de 1 hora cada uno en etanol absoluto y xilol, sucesivamente.
3. Inclusión en parafina líquida a 60°C durante 45 minutos. Posteriormente el tejido se incluyó en bloques de parafina.

También se fijaron muestras de cada animal en formol tamponado al 4% y se procesaron según el método habitual para microscopía óptica, incluyéndose igualmente en

parafina. De las muestras fijadas en formol se realizaron cortes de 4 micras de grosor, que fueron teñidos mediante la técnica de **Hematoxilina-Eosina**.

Para la demostración de los bacilos asociados a la mucosa respiratoria (CAR-bacilli) se utilizó la técnica histoquímica **Warthin-Starry** (Luna, 1968) sobre cortes histológicos de tráquea y bronquios fijados en formol. Dicha técnica se describe a continuación:

1.- Se realizan soluciones de Nitrato de Plata al 1%, Gelatina al 5%, e Hidroquinona al 0,15%, utilizando como solvente agua acidificada, previamente elaborada añadiendo una solución de ácido cítrico al 1% a 1 l de agua bidestilada hasta conseguir un pH de 4,0. Estas soluciones se mantienen en baño maría a 54°C.

2.- Simultáneamente se coloca en estufa a 43°C una solución de Nitrato de Plata al 0,5% durante 30 minutos, con la preparación.

3.- Cuando salga de la estufa se tendrán ya preparadas a 54°C las siguientes cantidades de los reactivos del apartado 1:

Nitrato de Plata (1%)	1,5 ml
Gelatina (5%)	3,75 ml
Hidroquinona (0,15%)	2,0 ml

Se procede a colocar el tejido sobre la solución.

4.- Controlar bajo microscopio la coloración obtenida, mediante un control positivo.

5.- Lavar rápidamente en agua bidestilada precalentada a 56°C.

6.- Enjuagar en agua destilada.

7.- Deshidratar, aclarar y montar.

3.2.2 Estudio microbiológico. *Micoplasmas*.

3.2.2.1 Aislamiento de *Micoplasmas*.

Para el aislamiento de los micoplasmas caprinos se procedió a cauterizar la superficie de las muestras tomadas, pulmón y bazo principalmente, (en algunos animales se tomaron además muestras de carúncula uterina y ganglios mediastínicos), incidiéndose posteriormente en esta zona con un bisturí flameado. De esta forma se accedió al interior del órgano con una

torunda estéril evitando su posible contaminación por bacterias de la superficie.

El paso siguiente consistió en incubar las torundas en 2 ml de medio líquido SP-4 modificado a 37°C. En las siguientes 48 horas, y para evitar posibles crecimientos de otras bacterias que no fueran micoplasmas, los cultivos se filtraron por una membrana Millipore de 0,45 micrómetros de diámetro, y el filtrado fue sembrado nuevamente en 2 ml de SP-4 líquido e incubado a 37°C. Posteriormente se sembraron en medio sólido SP-4 mediante inoculación de 200 microlitros del cultivo anterior, incubándose a 37°C en cámara húmeda.

Después de 3 a 10 días de incubación en estas condiciones, se comprobó la presencia de colonias de micoplasmas mediante microscopio empleando el objetivo de 40 aumentos. En aquellas placas donde se evidenció crecimiento se procedió a cortar bloquecitos de agar, conservándose en viales estériles a -80°C para su posterior identificación.

De igual forma se procedió a sembrar las muestras de sangre en medio SP-4 líquido y sólido, con el fin de determinar posible bacteriemia.

3.2.2.2 *Clonaje de los aislamientos.*

El clonaje de las colonias de cada muestra se realizó según las técnicas estandar descritas por el Subcomité de Taxonomía de la clase Mollicutes, (1979), mediante el uso de pipetas Pasteur estériles, tomando cada colonia en cuestión e introduciéndola en 3 ml de medio líquido para micoplasmas, incubando a 37°C durante 3 a 4 días. Estos subcultivos fueron filtrados por membrana Millipore de 0,45 micrómetros para a partir de los mismos sembrar nuevamente en medio líquido y sólido.

Durante el proceso de clonaje se observó con detenimiento la morfología colonial de cada muestra, y en las que había evidencia de existencia de colonias diferentes, se procedió a su clonaje hasta obtenerlas en cultivo puro. Los cultivos fueron conservados a -80°C hasta el momento de su identificación.

3.2.2.3 *Pruebas bioquímicas.*

a) sensibilidad a la Digitonina.

Se utilizó el método desarrollado por Freundt y cols.,(1973), para la determinación

indirecta de las necesidades de colesterol de las distintas cepas aisladas.

Se partió de una solución alcohólica de digitonina al 15%, calentándola suavemente en baño maría para su disolución. A continuación, con una micropipeta se procedió a la impregnación de discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con un volumen de 20 microlitros. Estos discos se guardaron a 4°C hasta su uso.

Para la realización de esta prueba, se utilizó un cultivo líquido de cada cepa, con una concentración aproximada de 10^5 UFC/ml; de éste se depositaron 200 microlitros en una placa de medio sólido con un 20% de suero de caballo (Tully, 1983), y se dejó deslizar sobre todo el diámetro de la placa al inclinar ésta.

Una vez absorbido el inóculo por el medio, se depositaron los discos impregnados con digitonina sobre la superficie del agar, para a continuación incubar en cámara húmeda a 37°C durante 24-96 horas.

Se consideraron positivas aquellas zonas de inhibición de crecimiento de 5 a 15 mm de diámetro alrededor del disco. Con esta prueba se pretendió diferenciar los *Micoplasmas* y *Ureaplasmas*, que resultan inhibidos por la digitonina, de los *Acholeplasmas*, que crecen en su presencia.

b) fermentación de la Glucosa.

En la determinación del metabolismo de la glucosa se empleó el método de Aluotto y cols (1970), que se describe a continuación:

1ª Fase (Fase esterilizable)

BHI (DIFCO)	74 ml
Rojo Fenol al 0,5%	1 ml

Ajustar ph a 7,6
Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos

2ª Fase (Fase filtrable)

Glucosa al 10%	10 ml
Yeast extract	5 ml

Ajustar el pH a 7,6
Filtrar por membrana Millipore de 0,22 micrómetros

3ª Fase

Suero de caballo 10 ml
(Estéril e inactivado a 56°C 30 minutos)

El sustrato obtenido se distribuyó en tubos estériles a razón de 2 ml por tubo, y a continuación se realizó la inoculación con un cultivo fresco de 24-48 horas de cada una de las cepas de micoplasmas a investigar. Posteriormente se incubaron a 37°C en condiciones de anaerobiosis mediante el sellado de cada tubo con parafina líquida estéril.

En cada serie se utilizó un control negativo con medio sin inocular. Las lecturas se basan en que los positivos presentan un cambio de color del rojo al naranja, debido a un descenso en el pH, mientras que los negativos no varían su coloración.

c) hidrólisis de la Urea.

En esta determinación también se utilizó el método descrito por Aluotto y cols. (1970). La elaboración del medio es muy similar al descrito para la fermentación de la glucosa, con las siguientes únicas variaciones:

- En la 2ª Fase (Fase filtrable) se sustituyó la solución de glucosa por un volumen igual de solución de Urea al 10%

- El pH fue ajustado a 7,0

Igualmente se utilizó un control negativo con medio sin inocular. Las lecturas positivas se basan en la alcalinización que sufre el medio por la hidrólisis de la urea, variando el color hacia rojo violáceo.

d) hidrólisis de la Arginina.

También en esta prueba bioquímica fue utilizado el método descrito por Aluotto y cols. (1970). Las únicas variaciones que presenta la elaboración del medio con respecto al utilizado en la fermentación de la glucosa son las siguientes:

- En la 2ª Fase (Fase filtrable) se sustituyó la solución de glucosa por un volumen igual de solución de Arginina al 10%

- El pH fue ajustado a 7,0

Se utilizó también un control negativo con medio sin inocular. Las lecturas positivas

se basan en la alcalinización del medio por la hidrólisis de la arginina, variando el color hacia rojo violáceo.

e) reducción del Tetrazolium.

El método para determinar la reducción del Tetrazolium en aerobiosis y anaerobiosis descrito por Aluotto y cols.(1970) es el siguiente:

1ª Fase

BHI (DIFCO) 74 ml

Ajustar el pH a 7,6

Esterilizar en autoclave a 121°C 20 minutos

2ª Fase

Yeast Extract 5 ml

2,3,5 Trifeniltetrazolium 2% 1 ml

Ajustar el pH a 7,6

Filtrar a través de membrana Millipore de 0,22 micrómetros

3ª Fase

Suero de caballo 10 ml

(Estéril e inactivado a 56°C 30 minutos)

Se mezclaron asépticamente las tres fases y se distribuyeron en tubos estériles a razón de 2ml.

Para demostrar la capacidad de reducción del Tetrazolium se dispusieron dos tubos para cada cepa problema. En uno de ellos, una vez realizada la inoculación, se depositó en su superficie una pequeña cantidad de parafina líquida estéril, a fin de conseguir un ambiente anaerobio. Los tubos problema junto con los correspondientes controles negativos se incubaron a 37°C durante dos semanas.

La presencia de un precipitado rojizo en el fondo de los tubos demostró la positividad de la reacción.

f) producción de películas y cristales.

En la investigación de la actividad lipolítica, con la consiguiente formación de películas y cristales, se siguió la metodología descrita por Aluotto y cols. (1970), elaborando el medio sólido siguiente:

1ª Fase

BHI agar (DIFCO) 75 ml

Ajustar el pH a 7,8
Esterilizar a 121°C 20 minutos

2ª Fase

Yeast Extract 5 ml

Ajustar el pH a 7,8
Filtrar a través de membrana Millipore de 0,22 micrómetros

3ª Fase

Suero de caballo 20 ml

(Estéril e inactivado a 56°C 30 minutos)

Se mantuvieron las tres fases en baño maría a 45°C y se mezclaron asépticamente, distribuyéndose en placas de Petri estériles de un solo uso.

Estas placas fueron inoculadas con el cultivo líquido de cada una de las cepas e incubadas a 37°C durante 2 semanas en cámara húmeda. Las lecturas se realizaron con objetivo de 4 aumentos para observar, en caso positivo, la formación de cristales y películas en las cercanías de las colonias.

3.2.2.4. Identificación serológica.

a) inhibición del crecimiento.

En base a los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas, se procedió al estudio serológico de todas las cepas aisladas. De esta forma el perfil bioquímico resultante estableció las posibilidades de tipificación de las especies, simplificando por tanto la identificación de las mismas.

La metodología seguida fue la técnica de Inhibición del Crecimiento, según la modificación descrita por Clyde en 1964.

Se emplearon discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro depositados en una placa de petri estéril, e impregnados mediante una micropipeta calibrada con 20 microlitros de cada uno de los antiseros elaborados en conejos.

La técnica de identificación fue la siguiente:

1. Se dispusieron placas de medio sólido elaboradas de igual forma que las utilizadas para la prueba bioquímica de producción de películas y cristales y se secaron en estufa a 37°C durante 30 minutos.

2. Se prepararon diluciones de los cultivos problemas en medio líquido con una concentración aproximada de 10^4 a 10^6 UFC/ml.

3. Se sembró cada placa mediante la inoculación de 200 microlitros de cada cultivo problema.

4. Una vez absorbido el inóculo por el medio, se procedió a depositar con ayuda de unas pinzas flameadas los discos impregnados con los antiseros, dejando al menos una separación de 2 cm entre ellos.

5. Con el fin de permitir la difusión del antisuero antes del crecimiento de los micoplasmas, se procedió a mantener todo el conjunto en cámara húmeda a 25°C durante 24 horas. (Damassa y cols, 1994).

6. Posteriormente se procedió a la incubación a 37°C en cámara húmeda durante 24-96 horas.

7. Se examinaron con microscopio las posibles zonas de inhibición de crecimiento alrededor de los discos.

Se consideraron positivas las zonas de inhibición de crecimiento, perfectamente definidas, entre 1,5 mm y 2 mm. No obstante, en algunas lecturas se observaron zonas de clarificación del crecimiento bastante manifiestas que fueron consideradas positivas siguiendo la recomendación de Clyde (1983).

b) inhibición del metabolismo.

Esta técnica fue llevada a cabo según el protocolo de Taylor-Robinson (1983), que a continuación se describe:

1.- En cada pocillo de la placa de microtitulación estéril (pocillos de la A a la H, y del 2 al 11) se depositan con micropipeta 25 μ l de medio (el medio debe ser el adecuado para el crecimiento del micoplasma a investigar, así como debe contener un metabolito, en este caso Tetrazolium).

2.- En los pocillos A₁ a D₁ se adicionan 50 μ l de suero positivo, y en los pocillos E₁ a H₁ 50 μ l de suero negativo control.

3.- A continuación se realizan con los microdiluidores diluciones seriadas hasta la columna de pocillos número 10. De este modo se consiguen diluciones del suero 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, etc...

4.- Adicionar con la micropipeta en la serie A (pocillos 1 a 11) 25 μ l de antígeno problema sin diluir.

En la serie B (1 -11), 25 μ l de antígeno diluido a 1/10

En la serie C (1-11), 25 μ l de antígeno diluido a 1/100

En la serie D (1-11), 25 μ l de antígeno diluido a 1/1000

5.- Se realiza la misma operación en las series de pocillos E, F, G, H, con el antígeno utilizado como control negativo.

6.- Agregar en cada pocillo de la placa de microtitulación 150 μ l de medio.

7.- Cerrar la placa de microtitulación e incubar a 37°C durante 24-48 horas, observando la presencia o no de precipitado rojizo como consecuencia de la reducción del Tetrazolium.

3.2.3 Estudio microbiológico. Otras bacterias.

3.2.3.1 Aislamiento.

Para el aislamiento de otras posibles bacterias se procedió también a la cauterización de la superficie de las muestras procesadas, cortando posteriormente la muestra mediante unas tijeras flameadas, enfrentando una amplia superficie de la muestra con el correspondiente medio de cultivo sólido y arrastrándola por la placa. De esta forma se consigue que el aislamiento sea más eficaz que con la clásica asa de platino. Las placas fueron incubadas a 37°C y se procedió a su lectura en las siguientes 24-48 horas y posterior clonación.

3.2.3.2 Identificación.

Las pruebas llevadas a cabo para la identificación de las bacterias aisladas fueron las siguientes:

- Catalasa
- Oxidasa
- GRAM
- Crecimiento en medio de McConkey (DIFCO)
- SIM (SH₂, Indol, Movilidad)
- Voges-Proskauer
- Reducción de Nitratos

Igualmente se utilizaron las galerías de identificación API 20 E y API 20 NE (BioMérieux) para la identificación de los aislamientos bacterianos que presentaron perfiles próximos a Pasteurella.

3.2.4 Estudio inmunohistológico.

Para la realización de las técnicas inmunohistológicas (sueros anti-micoplasmas y anti-pasteurellas) se emplearon cortes de tejidos incluidos en parafina fijados en alcohol. Los cortes fueron recogidos en portas cubiertos de poly-L-lysina para evitar el desprendimiento del tejido durante la realización de las técnicas, e incubados durante 18-24 horas en estufa a 37°C. Sobre estos cortes se realizó la demostración de antígenos de micoplasmas y de pasteurelas utilizando la técnica del Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa, descrita a continuación:

- 1.- Desparafinado mediante tres pases de 10 minutos en xilol.
- 2.- Inicio de la rehidratación en una escala descendente de alcoholes (100%, 96%) durante 5 minutos cada uno.
- 3.- Inhibición de la peroxidasa endógena, con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 30 minutos.
- 4.- Continuación de la rehidratación en alcohol de 70% durante 5 minutos.

- 5.- Agua destilada, dos pases de 5 minutos.
- 6.- Lavado con PBS, 3 pases de 10 minutos.
- 7.- Incubación en cámara húmeda con suero normal de cabra diluido al 1% en PBS.
- 8.- Incubación con el correspondiente antisuero primario en cámara húmeda, 2 horas a temperatura ambiente (20°C). Los sueros empleados fueron anti-Mmc, anti-MmmLC, anti-P. multocida en todos los animales, así como anti-M. putrefaciens en aquellos animales en los que se había aislado este micoplasma. La dilución empleada fue en todos los casos 1/500 en suero normal de cabra al 1% en PBS.
- 9.- Lavado con PBS, 3 pases de 10 minutos.
- 10.- Incubación con el anticuerpo secundario biotinado, diluido al 20% en suero normal de cabra al 1% en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente y en cámara húmeda.
- 11.- Lavado con PBS, 3 pases de 10 minutos
- 12.- Incubación con el Complejo Streptavidina-Biotina-Peroxidasa durante 30 minutos y en cámara húmeda. Este reactivo fue utilizado al 50% en suero normal de cabra al 1% en PBS.
- 13.- Lavado con PBS, 3 pases de 10 minutos.
- 14.- Revelado de la reacción inmunoenzimática utilizando 0,070 g de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) en 200 ml de PBS, y peróxido de hidrógeno al 0,02%, durante 1 minuto.
- 15.- Lavado en agua corriente durante 10 minutos.
- 16.- Contraintinción nuclear con hematoxilina durante 1 minuto, deshidratación y montaje.

También se utilizó como revelador de la reacción inmunoenzimática el 3-amino-9-etilcarbazol (Sigma), mediante el siguiente procedimiento:

Disolver 20 mg de 3-amino-9-etilcarbazol en 5 ml de N,N-dimetilformamida. Añadir 70 ml de tampón acetato sódico 0,1 M pH 5,2 y 0,75 ml de peróxido de hidrógeno al 3% y filtrar a través de papel de filtro. Incubar los cortes con esta dilución durante 5 minutos. Lavar en agua corriente, contrateñir con Hematoxilina de Mayer, lavar 10 minutos en agua corriente y montar en medio acuoso (Immu-Mount, SHANDHON).

Para la demostración inmunohistológica de CAR-bacillus se utilizaron cortes fijados en formol. La técnica utilizada fue la misma que la descrita anteriormente, con la salvedad de que en este caso se realizó un tratamiento con pronasa al 0.1 % durante 5 minutos entre los lavados

del paso número 6. La dilución empleada del suero anti-CAR bacillus fue 1/400 en suero normal de cabra al 1% en PBS.

3.2.5 *Estudio ultraestructural.*

Con el fin de demostrar ultraestructuralmente los CAR-bacilli detectados mediante la técnica de Warthin-Starry, se procedió a reprocesar las muestras fijadas en formol correspondientes a tráquea y grandes bronquios de algunos animales Warthin-Starry positivos. Para ello, las muestras fijadas en formol se mantuvieron en tampón fosfato PBS, 2 pases de 1 hora, y un último pase de 12 horas, realizándose posteriormente una inclusión rutinaria según el protocolo para microscopía electrónica (Wanson y Drochman, 1968). Las muestras fueron visualizadas y fotografiadas con un M.E.T. Philips CM10.

También se estudiaron muestras de estas localizaciones mediante microscopía electrónica de barrido; así, tras dorado mediante recubrimiento de las muestras con oro con un sombreador Edwards S150A, los cortes fueron visualizados y fotografiados con un M.E.B. Jeol JSM 6300.

3.2.6 *Estudio serológico.*

El estudio serológico frente a MmmLC fue realizado por el Dr. Thiaucourt en el "Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement. Département d'élevage et de médecine vétérinaire" (CIRAD-EMVT, Maisons Alfort, Francia). Para ello se enviaron a dicho centro de investigación 192 sueros correspondientes a 33 cabritos y 159 cabras adultas.

Las pruebas serológicas realizadas fueron las siguientes:

1. Test de Fijación del complemento (CFT) con antígeno de MmmLC.
2. Blocking ELISA con el anticuerpo monoclonal 4F10B2 (Le Goff-Thiaucourt, Pathotrop Laboratory, CIRAD-EMVT).
3. ELISA indirecto, con el fin de comprobar una posible correlación entre el CFT y el Blocking ELISA.

El estudio serológico frente a M. agalactiae sobre los 192 sueros antes mencionados

fue realizado mediante el test comercial ELISA CHEKIT (Dr. Bommeli AG), consistente en un ELISA indirecto.

3.2.7 Estudio hematológico.

Previamente al sacrificio de los animales se procedió a la toma de sangre de 192 animales (33 cabritos y 159 adultos) que mostraban una sintomatología respiratoria de ligera a grave. La toma de sangre se realizó mediante punción en la vena yugular utilizando agujas y jeringuillas desechables. De esta forma se extrajo de cada animal un volumen de sangre de 10 ml, que fue repartido como sigue:

- 2,5 ml se depositaron en tubos de poliestireno con EDTA tripotásico como anticoagulante, con el fin de proceder al estudio de los parámetros hemáticos.

- 7,5 ml se depositaron en tubos de poliestireno con gránulos incorporados (Serotub) para la separación del suero, centrifugando durante 10 minutos a 3000 r.p.m., inmediatamente después de la obtención de la sangre. El suero así obtenido se separó en partes alícuotas y fue congelado a -80°C hasta el momento de su utilización en el diagnóstico serológico.

Con ayuda de un contador semiautomático SYSMEX F-800 se realizaron las siguientes determinaciones hemáticas en los animales que fueron necropsiados (33 cabritos y 50 cabras adultas):

- Recuento de eritrocitos
- Hemoglobina
- Valor Hematocrito
- Índices hematimétricos de Wintrobe:

Volumen Corpuscular Medio (VCM)

Hemoglobina Corpuscular Media (HCM)

Concentración Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM)

- Recuento de Leucocitos
- Recuento diferencial de Leucocitos

Resultados

4.1 LESIONES MACROSCÓPICAS.

El 85% de los cabritos estudiados presentaron lesiones a nivel pulmonar, afectándose principalmente los lóbulos apical y medio derechos. En los animales que presentaron lesiones bilaterales, éstas se encontraron en los lóbulos apicales y medios, permaneciendo los lóbulos caudales con apariencia normal o ligeramente congestivos. Los lóbulos pulmonares craneales y medios mostraron áreas de consolidación difusa con patrón lobulillar. Al corte, se observaron áreas con diferente grado de hepatización, así como la presencia de un exudado blanco-amarillento en el interior de los bronquios. En los casos más graves se observó turbidez de la pleura, así como membranas de fibrina sobre la superficie pleural, que establecían adherencias entre los distintos lóbulos pulmonares y la pared costal. En estos mismos animales el pericardio se mostró muy engrosado, con adherencias fibrinopurulentas y abscesos de la misma naturaleza en la cavidad pericárdica.

El 12% de los cabritos necropsiados presentaron traqueitis, observándose un intenso enrojecimiento de la mucosa traqueal. En un 10% se observaron lesiones en las vías respiratorias más altas, a nivel de los meatos nasales, consistentes en congestión, adquiriendo un color rojo muy intenso.

Se observaron igualmente adherencias en la superficie esplénica en un 10% de los cabritos necropsiados. En un 21% de los cabritos se detectaron artritis, siendo las articulaciones más afectadas las carpianas, con una inflamación articular y periarticular, así como aumento de la cantidad de líquido sinovial con aspecto turbio.

En las cabras adultas las lesiones pulmonares fueron menos frecuentes e intensas, reduciéndose a casos de ligera neumonía intersticial con dilatación de los septos

interlobulillares y congestión pulmonar. En ninguno de los animales adultos necropsiados se observó artritis. En 2 cabras se observó linfadenitis caseosa y 3 cabras preñadas mostraron lesiones a nivel de las carúnculas uterinas. Los restantes órganos no presentaron ninguna lesión macroscópica significativa.

4.2 ESTUDIO ESTRUCTURAL.

Las Tablas 1 y 2 reflejan las principales lesiones pulmonares y traqueales en cada animal objeto de estudio, así como la presencia y localización de CAR bacilli, demostrados mediante la técnica de Warthin-Starry.

4.2.1 Lesiones pulmonares.

En el caso de los cabritos estudiados, sólo el 9% no presentaron cambios histológicos significativos a nivel pulmonar. En un 9% se observaron lesiones consistentes en bronconeumonía purulenta, caracterizada por la presencia de un gran número de polimorfonucleares neutrófilos en las luces alveolares, bronquiales y bronquiolares, con escaso número de macrófagos alveolares.

El 82% de los animales jóvenes mostraron lesiones neumónicas que encuadramos dentro de lo que hemos denominado como **neumonía enzoótica**, consistente histológicamente en una neumonía broncointersticial con linfoproliferación peribronquial, peribronquiolar y perivascular en las fases más crónicas. La lesión se caracteriza por un marcado incremento de células mononucleares en los septos interalveolares, así como la presencia de un número variable de macrófagos alveolares en las luces de los alvéolos. Las linfoproliferaciones peribronquiolares pueden en ocasiones originar un estrechamiento de la luz de estas vías aéreas y el epitelio correspondiente puede encontrarse desprendido en bronquiolos donde existe una hiperplasia epitelial. Igualmente se pueden observar bronquiolitis obliterantes en los casos más graves.

En función de 1) la intensidad de la neumonía broncointersticial, 2) el número de linfoproliferaciones peribronquiales y peribronquiolares, y 3) las consecuencias de estas linfoproliferaciones sobre las correspondientes vías aéreas, definimos tres grados de neumonía enzoótica, ligero (+), moderado (++) y grave (+++). Igualmente en ocasiones coexistieron lesiones de neumonía enzoótica con bronconeumonía purulenta. En la Figura 1 se reflejan los distintos porcentajes relativos de neumonía enzoótica hallados en cabritos.

TABLA 1. Estudio histopatológico, inmunohistoquímico, histoquímico y microbiológico de los cabritos.

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
6	N. E. +	MmmLC	+	-	-	-	-	P: Streptococcus spp. Burkholderia cepacia B: E L +
9	BN p ++	-	+(céls. descamadas)	-	-	-	P: M. putrefaciens B: M. putrefaciens	P: E L -/+ B: E L +
32	N. E. +++	-	-	-	-	-	P: M. putrefaciens M. spp.	P: E L -/+ B: E L -/+
39	N. E. ++ BN p +	-	-	-	+	Br ++	P: M. arginini	P: Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
20	N. E. +/-	-	-	P. multocida	+	-	P: M. putrefaciens	P: Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
1669	N. E. +++	-	+	P. multocida	+	-	P: M. agalactiae	-
24	N. E. +++ BN p +	Mmc	+	-	-	-	-	P: Moraxella spp. Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
42	N. E. ++	Mmc	+	-	-	Br +	-	P: Streptococcus spp.

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
23	N. E. ++	-	-	-	-	-	P: M. putrefaciens	P: Staphylococcus spp. B: E L +
44	N. E. +++	Mmc	+	P. multocida	-	-	-	P: E L + B: E L +
37	N. E. +/++ BN p +	-	+	-	+	-	P: M. putrefaciens	P: Moraxella spp.
18	N. crónica	-	+	P. multocida	+	-	P: M. spp.	P: Bacillus spp.
4	*	-	-	-	-	-	P: M. agalactiae	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
33	N. E. -/+	-	-	-	-	-	P: M. putrefaciens	P: Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
16	N. E. + BN p ++	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
21	N. E. +/++	-	-	-	-	Br + débil	P: M. agalactiae M. putrefaciens B: M. capricolum	P: E L + Bacillus B: E L +/-

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
26 b	N. E. +++	-	-	-	+	Br +	-	P: Moraxella spp.
31	N. E. +++	-	-	-	-	Br + débil	-	P: E L + B: E L +
34	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
38	N. E. +	-	-	P. multocida	-	Br ++	-	B: Staphylococcus spp. E L -
43	BN p + Traqueítis	-	+(cél. descamadas)	-	-	+ tráquea	-	B: Staphylococcus spp. E L -
1651	N. E. +/++ Traqueítis	-	-	-	-	+ tráquea	-	P: E L + B: Bacillus spp.
5016	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: E L +
5443	N. E. +/++	-	-	-	+	-	-	P: E L + B: E L +
1	N. E. ++	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
3	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Streptococcus spp. E L - B: E L +

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
30	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
1544	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
41	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp. B: Staphylococcus spp.
36	BN p +	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp. E L +
35	N. E. ++	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp. E L +
26	*	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
1651b	*	-	-	-	-	-	-	P: E L +

N.E.: Neumonía Enzoótica.

BN p: Bronconeumonía purulenta.

* Sin cambios histopatológicos significativos.

Br: Bronquio.

P: Pulmón.

B: Bazo.

EL+: Enterobacteria lactosa positiva.

EL-: Enterobacteria lactosa negativa.

TABLA 2. Estudio histopatológico, inmunocitoquímico, histoquímico y microbiológico de las cabras adultas.

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. Mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
1515	N. E. +++ BN p +	-	-	-	-	Br +	P: M. spp	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
828	*	-	-	-	-	-	B: M. putrefaciens U: M. putrefaciens	-
1632	N. E. + Traqueitis	-	-	-	-	+++ tráquea	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
1495	N. E. +++ Traqueitis	-	-	-	-	Br tráq ++	B: Ureaplasma spp.	-
MOR	Neumonía granulomatosa parasitaria	-	-	-	-	-	P: M. spp.	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
921	*	-	-	-	-	-	B: M. agalactiae	-
5449	N. E. ++ BN p + Traqueitis	-	+(LC)	-	+	+++ tráquea	P: M. spp. B: M. spp.	P: Staphylococcus spp. B: Staphylococcus spp.
5435	N. E. +++ BN p +	-	-	-	+	Br +++	-	P: E L + B: Staphylococcus sp

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL --: Enterobacteria lactosa --. U: útero

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
1653	NE+++/BNp+ Traqueitis	-	-	-	-	++ tráquea	-	P: Staphylococcus spp.
1130	N. verminosa Traqueitis	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
280	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1611	N. E. +++ BN p +	-	-	-	+	Br +++	-	P: Staphylococcus spp.
1635	NE +++/BNp+ Traqueitis	-	-	-	-	Br ++ tráq+++	-	P: Staphylococcus spp.
1646	N. E. ++/+++ Traqueitis	-	-	-	-	++ tráquea	-	-
12	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
88350	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
82296	*	-	-	-	-	-	-	-
8853	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
5428	N. E. ++ BN p + Traqueitis	-	-	-	-	+++ tráquea	-	-

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.
U: útero

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
5015	*	-	-	-	-	-	-	-
3205	*	-	-	-	-	-	-	-
2064	Traqueitis	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
40 m	N. E. ++	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
1153	*	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
1275	Traqueitis	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
1312	*	-	-	-	-	-	-	-
1527	N. E. +/++	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
01315	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1359	N. E. +	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. U: Staphylococcus spp. Bacillus spp.

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.
U: útero

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
1354	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1368	N. verminosa	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1405	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
672	N. E. +/-	-	-	-	-	-	-	-
202	*	-	-	-	-	-	-	-
515	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1033	N. verminosa	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
4m	N. E. ++	-	-	-	-	+tráq y luz br.	-	P: Staphylococcus spp Bacillus spp.
863	*	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.
880	Traqueitis	-	-	-	-	+tráq y luz br.	-	P: Bacillus spp.
931	N. E. +++	-	-	-	-	-	-	-
955	Traqueitis	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp.

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-
U: útero

Animal n°	Histopatología	Aislamiento M. mycoides	ICQ M. mycoides	Aislamiento Pasteurella	ICQ P. multocida	CAR Bacillus	Otros Micoplasmas aislados	Otras bacterias aisladas
1000	N. verminosa	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp.
1032	N. E. +/++ BN p +	-	-	-	+	+ tráquea	-	P: E L -
1527 b	*	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
88534	*	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. U: Bacillus spp.
1025	*	-	-	-	-	-	-	-
671	N. E. + Traqueitis	-	-	-	-	+ tráquea	-	P: E L - U: E L -
88537	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp. U: Bacillus spp.
995	Traqueitis	-	-	-	-	-	-	P: Staphylococcus spp. Bacillus spp.
88282	*	-	-	-	-	-	-	P: Bacillus spp. B: Bacillus spp.

NE: Neumonía Enzoótica; BN p: Bronconeumonía purulenta. *Sin cambios histopatológicos significativos. Br: Bronquio. P: Pulmón. B: Bazo. EL +/-: Enterobacteria lactosa +/-.
U: útero

El 35% de las **cabras adultas** presentaron lesiones de neumonía enzoótica, con las mismas características histológicas que las descritas en el caso de los animales más jóvenes, y también desglosadas en los grados ligero, moderado y grave, así como en asociación con bronconeumonía purulenta (Fig 2). En un 10% de las cabras estudiadas se observaron lesiones de neumonía verminosa y un 55% no mostró cambios histológicos significativos a nivel pulmonar.

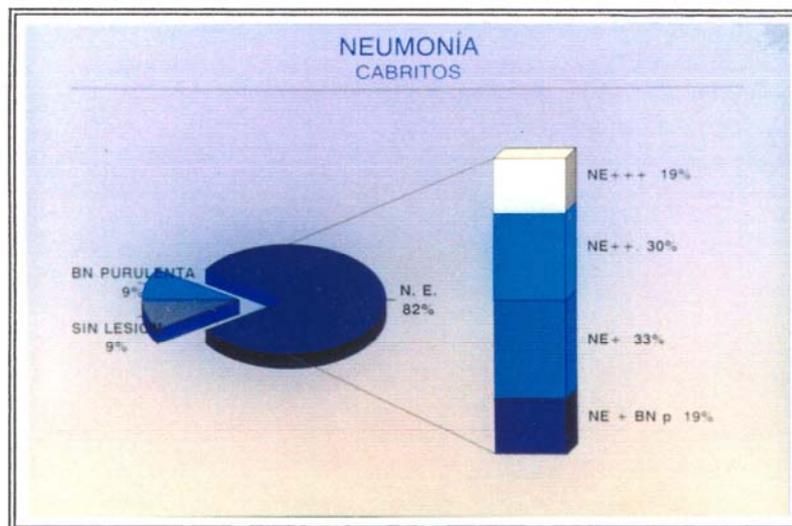


Figura 1.- Tipos de neumonía observados en los cabritos necropsiados. NE: Neumonía enzoótica. BNp: Bronconeumonía purulenta.

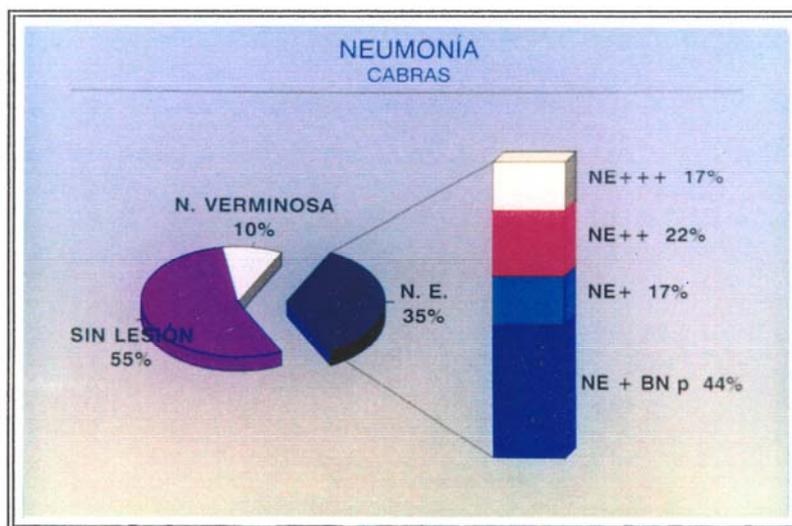


Figura 2.- Tipos de neumonía observados en las cabras adultas necropsiadas. NE: neumonía enzoótica. BNp: Bronconeumonía purulenta.

4.2.2 Lesiones en tráquea.

El 6% de los **cabritos** estudiados presentaron lesiones en tráquea consistentes en una traqueitis linfoplasmocitaria, caracterizada por un intenso infiltrado en áreas subepiteliales compuesto básicamente por linfocitos y células plasmáticas, así como congestión en los vasos sanguíneos de la submucosa. También se pudo observar en ocasiones desprendimiento del epitelio traqueal y pérdida de cilios.

En el caso de las **cabras adultas** se observó traqueitis linfoplasmocitaria en un 12% de los casos, traqueitis linfoplasmocitaria asociada con neumonía enzoótica en un 16%, mientras que no se observaron cambios histológicos significativos a nivel traqueal en el 72% restante (Fig. 3).

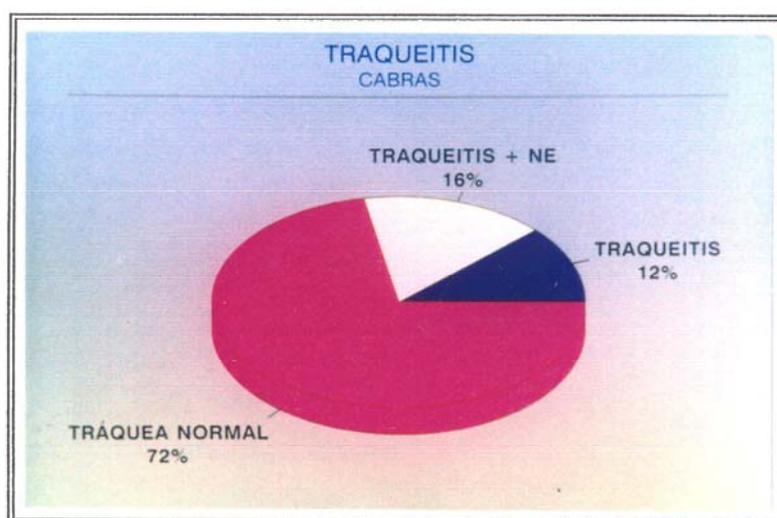


Figura 3.- Lesiones observadas en tráquea de cabras adultas.

4.2.3 Demostración histoquímica de *CAR Bacillus*.

Para la demostración de los *CAR bacilli* se utilizó la técnica argéntica de Warthin-Starry, resultando negativos el 76% de los **cabritos** estudiados. Un 6% presentaron reacción positiva a nivel traqueal, caracterizada por la observación de pequeñas bacterias filamentosas adheridas al epitelio traqueal y situadas de forma paralela y ordenada entre los cilios. Sus dimensiones fueron similares a las de los cilios vecinos, y en ocasiones también se observaron en células epiteliales descamadas. Un 18% mostraron reacción positiva a nivel bronquial, generalmente en grandes bronquios, caracterizándose por una reacción similar a la descrita en la tráquea. De

igual forma se observaron CAR bacilli en el epitelio bronquial descamado (Fig. 4).

En el caso de las cabras adultas, un 72% fue Warthin-Starry negativo. El 14% mostró reacción positiva en tráquea, con las mismas características que la descrita en el caso de los animales más jóvenes. Un 6% mostraron reacción positiva en bronquios, igualmente de grandes dimensiones, mientras que un 8% de los animales adultos presentaron positividad en tráquea y bronquios simultáneamente (Fig. 5).

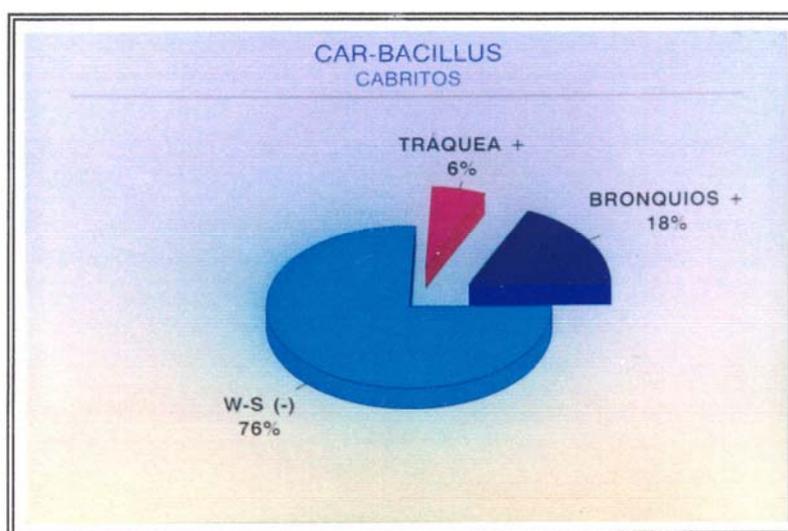


Figura 4.- Demostración histoquímica de CAR-bacillus en cabritos.

W-S: técnica de Warthin-Starry.

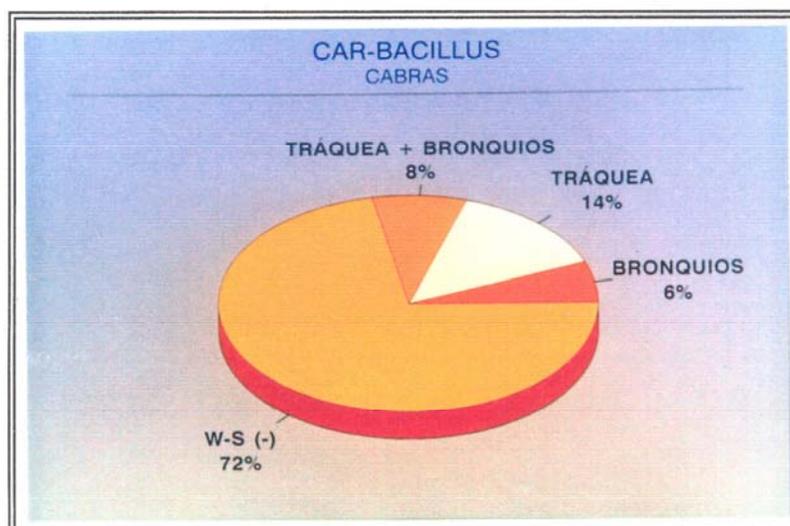


Figura 5.- Demostración histoquímica de CAR-bacillus en cabras adultas.

W-S: técnica de Warthin-Starry.

4.2.4 Relación lesiones pulmonares-CAR Bacilli.

Del total de cabritos que presentaron CAR bacilli (24%), en un 75% se observaron lesiones de neumonía enzoótica exclusivamente, un 13% presentaron lesiones combinadas de neumonía enzoótica y bronconeumonía purulenta, mientras que el 13% de los animales con CAR bacilli mostraron traqueitis (Fig. 6).

En el caso de las cabras adultas que mostraron CAR bacilli en localización bronquial (14%), en un 57% se observaron lesiones de neumonía enzoótica junto con bronconeumonía purulenta, mientras que el 29% presentaron lesiones de neumonía enzoótica exclusivamente. Tan sólo el 14% no mostraron ningún tipo de lesión pulmonar.

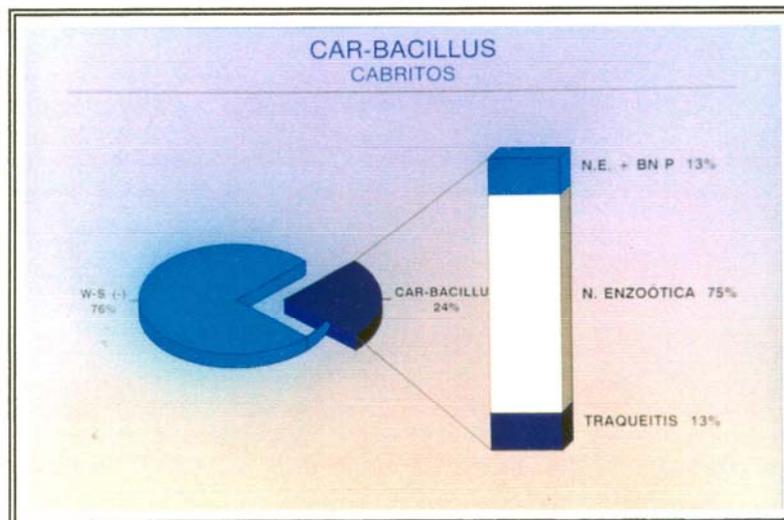


Figura 6.- Lesiones asociadas con la presencia de CAR-bacillus en cabritos. NE+BNp: Neumonía enzoótica + bronconeumonía purulenta.

4.2.5 Relación traqueitis-CAR Bacilli.

Las tráqueas de los dos únicos cabritos que presentaron traqueitis fueron Warthin-Starry positivas. También en el caso de las cabras adultas con traqueitis (28%), el porcentaje de animales con CAR bacilli en tráquea se aproximó a la totalidad (92%), permaneciendo tan sólo un 8% Warthin-Starry negativos (Fig. 7).

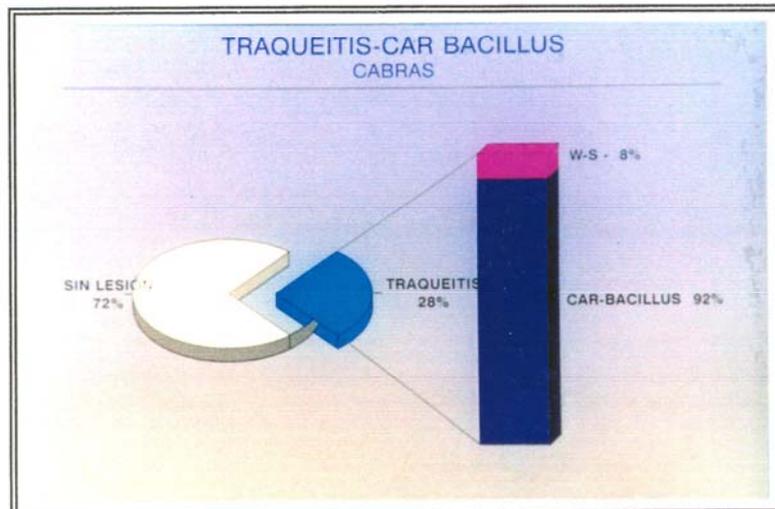


Figura 7.- CAR-bacillus asociados a traqueitis en cabras adultas.

W-S: técnica de Warthin-Starry.

4.3 AISLAMIENTO MICROBIOLÓGICO.

4.3.1 *Micoplasmas.*

La Tabla 3 recoge todos los aislamientos de micoplasmas y ureaplasmas logrados a partir de las muestras procesadas de los 83 animales estudiados. En ella se señalan los diferentes órganos a partir de los cuales se realizó el aislamiento, así como el perfil bioquímico mostrado por estas cepas y, finalmente, la especie identificada mediante inhibición del crecimiento y/o inhibición del metabolismo. Todas las cepas fueron sensibles a la digitonina. Sólo en 6 aislamientos no fue posible la identificación de la especie, quedando referenciadas como M. spp.

Atendiendo únicamente a los micoplasmas aislados de pulmón, en el 49% de los cabritos estudiados se aislaron micoplasmas, quedando desglosados como sigue: MmmLC (3%), Mmc (9%), otros micoplasmas (37%). De este último grupo cabe destacar el porcentaje relativo que supone el aislamiento de M. putrefaciens (54%), seguido por M. agalactiae (23%), M. spp. (15%) y M. arginini (8%) (Fig. 8).

En cuanto a las cabras adultas, sólo un 6% fueron positivas al aislamiento de micoplasmas en pulmón, no pudiendo determinar la especie en ninguno de los casos (Fig. 9).

El cultivo de las muestras de sangre en SP-4 líquido y sólido fue negativo en todos los casos.

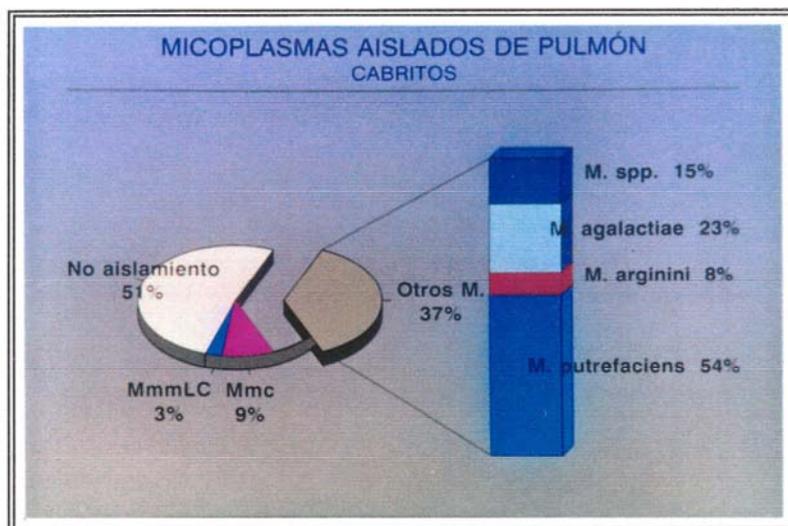


Figura 8.- Micoplasmas aislados de pulmón de los cabritos necropsiados.

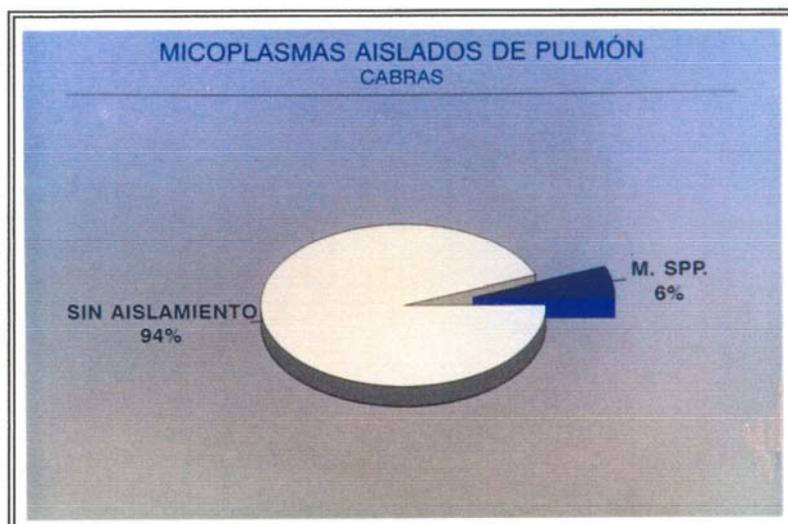


Figura 9.- Micoplasmas aislados de pulmón de cabras adultas.

4.3.2 Otras bacterias.

Las Tablas 1 y 2 reflejan en dos de sus apartados los aislamientos de Pasteurella multocida y de otras bacterias a partir de las muestras procesadas de los cabritos y cabras adultas respectivamente.

En el caso de los cabritos objeto de estudio, P. multocida fue aislada en un 15% de los casos, mientras que no se obtuvo ningún aislamiento de este microorganismo en las cabras adultas.

TABLA 3. Perfil bioquímico e identificación serológica de los micoplasmas aislados de los cabritos y cabras adultas.

Animal nº	Órgano	Fermentación Glucosa	Hidrólisis Arginina	Hidrólisis Urea	Reducción Tetrazolium (Ae/An)	Películas y Cristales	Inhibición del Crecimiento	Inhibición del Metabolismo
6	Pulmón	+	-	-	+/+	-	MmmLC	MmmLC
9	Pulmón	+	-	-	+/+	-	M. putrefaciens	
9	Bazo	+	-	-	+/-	-	M. putrefaciens	
32	Pulmón	+	-	-	+/+	+	M. putrefaciens	
32	Pulmón	-	+	-	-/-	-	-	M. spp.
39	Pulmón	-	+	-	-/-	-	M. arginini	
20	Pulmón	+	+	-	+/+	+	-	M. putrefaciens
1669	Pulmón	-	+	-	+/+	+	-	M. agalactiae
24	Pulmón	+	-	-	+/+	-	Mmc	
42	Pulmón	+	-	-	+/+	-	Mmc	
23	Pulmón	+	-	-	+/+	+	M. putrefaciens	
44	Pulmón	+	-	-	-/+	-	Mmc	
37	Pulmón	+	-	-	+/+	+	M. putrefaciens	
18	Pulmón	-	+	-	-/-	-	M. spp.	
4	Pulmón	-	-	-	+/+	+	M. agalactiae	

Animal n°	Órgano	Fermentación Glucosa	Hidrólisis Arginina	Hidrólisis Urea	Reducción Tetrazolium (Ae/An)	Películas y Cristales	Inhibición del Crecimiento	Inhibición del Metabolismo
21	Pulmón	-	+	-	-/+	+	<i>M. agalactiae</i>	
21	Pulmón	+	-	-	+/+	+	<i>M. putrefaciens</i>	
21	Bazo	+	+	-	+/+	+	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>	<i>M. capricolum</i> subsp. <i>capricolum</i>
33	Pulmón	+	-	-	+/+	+	<i>M. putrefaciens</i>	
828*	Bazo	+	-	-	+/+	+	<i>M. putrefaciens</i>	
828*	Útero	+	-	-	+/+	+	<i>M. putrefaciens</i>	
1515*	Pulmón	-	+	-	-/-	-	<i>M. spp.</i>	
1495*	Bazo	-	+	+	-/-	-	<i>Ureaplasma spp.</i>	
MOR*	Pulmón	-	+	-	-/-	-	<i>M. spp.</i>	
921*	Bazo	-	-	-	-/+	-	<i>M. agalactiae</i>	
921*	Ganglio	-	-	-	-/+	-	<i>M. agalactiae</i>	
5449*	Pulmón	-	+	-	-/-	-	<i>M. spp.</i>	
5449*	Bazo	-	+	-	-/-	-	<i>M. spp.</i>	

* Cabras adultas

4.3.3 Relación lesiones pulmonares-aislamiento microbiológico.

En la Figura 10 se detallan los distintos aislamientos microbiológicos (o demostración histoquímica en el caso del CAR bacillus) logrados a partir de las muestras pulmonares de aquellos cabritos que presentaron lesiones de neumonía enzoótica en todas sus variantes.

En el caso de las **cabras adultas**, los distintos porcentajes relativos de los agentes aislados (o demostrados histoquímicamente en el caso del CAR bacillus) a partir de las lesiones de neumonía enzoótica se reflejan en la Figura 11.

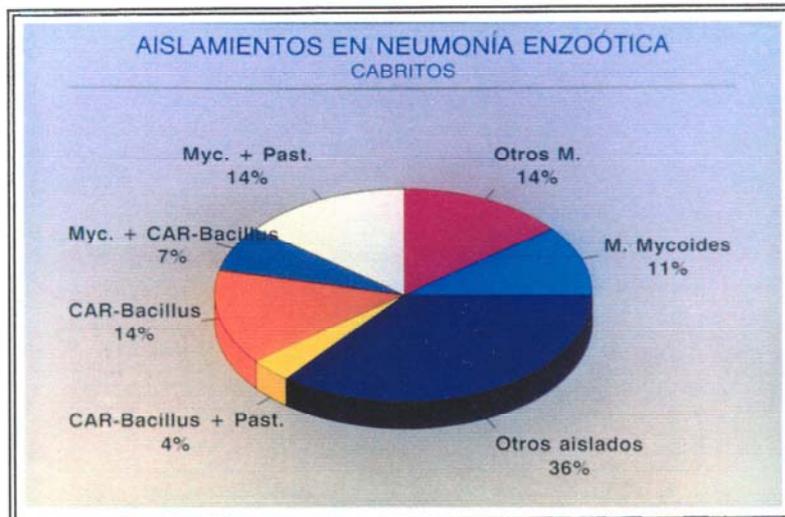


Figura 10.- Aislamientos microbiológicos y detección de CAR-bacillus en cabritos con neumonía enzoótica.

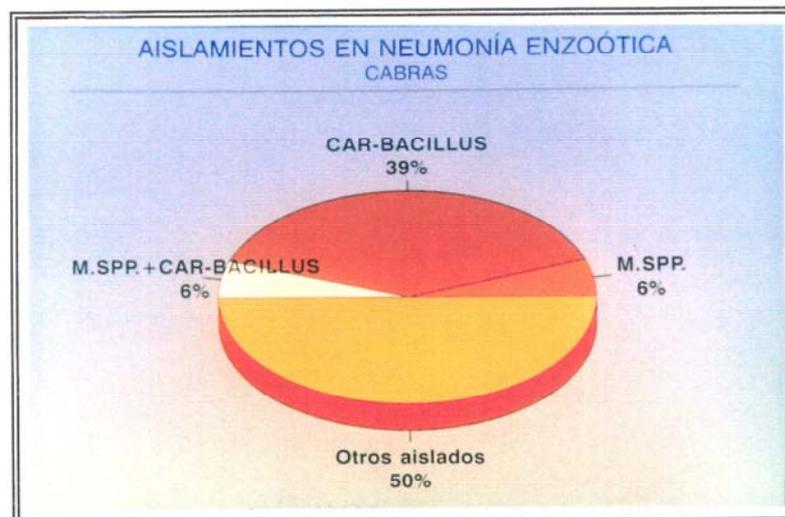


Figura 11.- Aislamientos microbiológicos y detección del CAR-bacillus en cabras con neumonía enzoótica.

4.4 ESTUDIO INMUNOHISTOLÓGICO.

En las Tablas 1 y 2 se detallan los animales con inmunorreacciones positivas frente a M. mycoides y Pasteurella multocida.

Un 27% de los **cabritos** estudiados mostraron inmunorreacción positiva frente a M. mycoides, caracterizada por su aspecto puntiforme, generalmente en el interior de células inflamatorias (neutrófilos y macrófagos), y en ocasiones también asociada a células epiteliales descamadas.

Un 21% de los cabritos presentaron inmunorreacciones positivas frente a Pasteurella multocida en el citoplasma de neutrófilos y macrófagos.

Sólo una **cabra adulta** presentó inmunorreacción positiva frente a M. mycoides, mientras que fueron cuatro animales (8%), entre los que se encontraba el animal anteriormente citado, los que evidenciaron positividad frente a P. multocida.

En las Figuras 12, 13 y 14 se expresan gráficamente las relaciones entre el número de animales (cabritos, cabras y totalidad de animales, respectivamente) inmunocitoquímicamente positivos a M. mycoides y P. multocida y el número de animales en los que se aislaron estos agentes a nivel pulmonar.

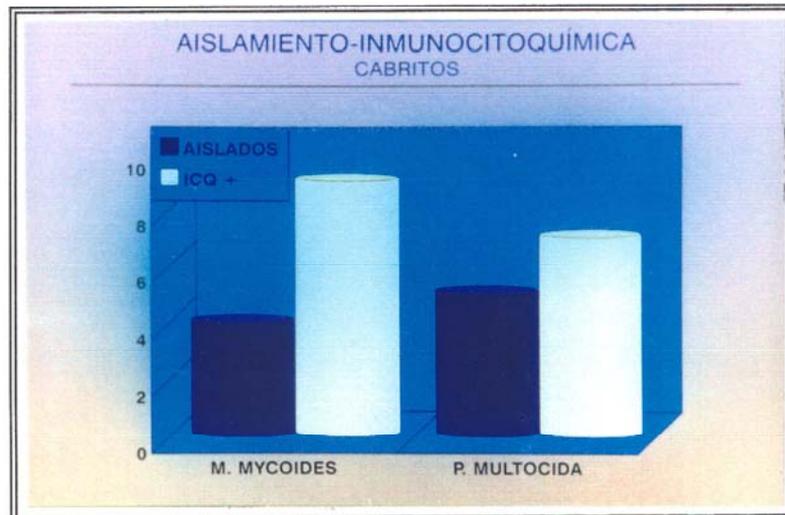


Figura 12.- Estudio comparativo (aislamiento/inmunocitoquímica) frente a M. mycoides y Pasteurella multocida en cabritos.

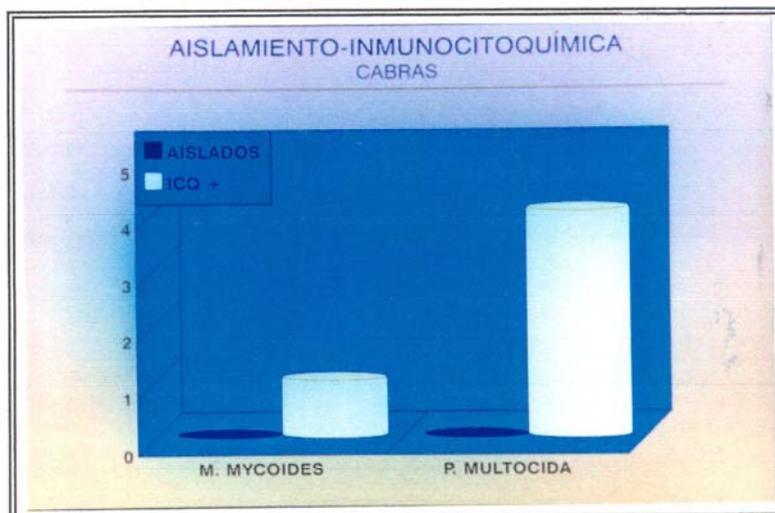


Figura 13.- Estudio comparativo (aislamiento/inmunocitoquímica) frente a *M. mycoides* y *Pasteurella multocida* en cabras adultas.

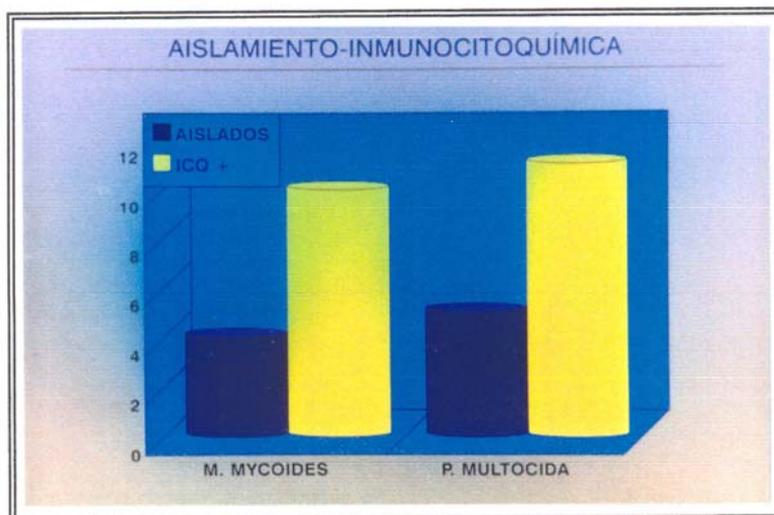


Figura 14.- Estudio comparativo (aislamiento/inmunocitoquímica) frente a *M. mycoides* y *Pasteurella multocida* en la totalidad de animales necropsiados.

Con el suero anti-*Mmc* (cedido por el Dr. Poveda) se observó igualmente una inmunorreacción positiva de carácter filamentososo a nivel del epitelio respiratorio ciliado en aquellos animales Warthin-Starry positivos. Sin embargo no se observó positividad en estos mismos animales con el suero anti-CAR bacillus de rata, creado en ratón y cedido por el Dr. Matsushita.

4.5 ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.

Mediante microscopía electrónica de transmisión observamos la presencia de un gran número de bacilos asociados a las células epiteliales de la mucosa traqueal y bronquial, ordenados de forma paralela y entre los cilios. Estas bacterias presentaron una longitud de 4 a 9 micras y un diámetro de 100-120 nm en la base y de 180-200 en la zona media. Con la microscopía electrónica de barrido estos bacilos prácticamente se mostraron indistinguibles de los cilios, salvo por un pequeño engrosamiento apical característico de estas bacterias.

4.6 ESTUDIO SEROLÓGICO.

Las Figuras 15 y 16 muestran los resultados serológicos frente a MmmLC y M. agalactiae obtenidos tras el estudio de 192 sueros (33 cabritos y 159 cabras adultas).

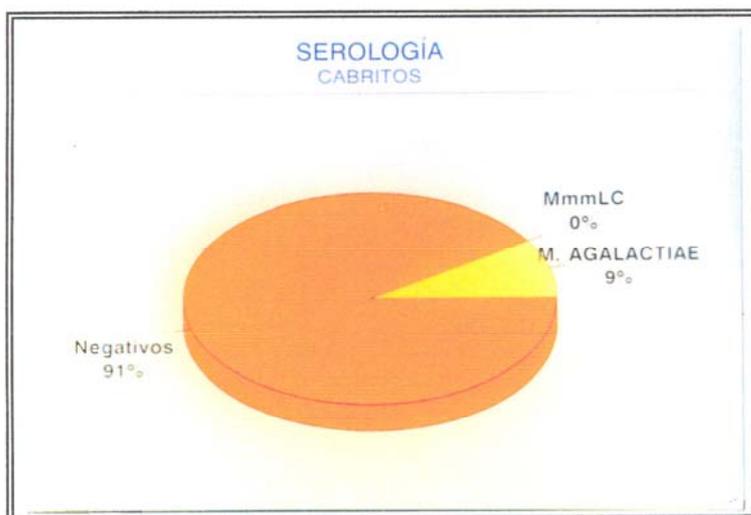


Figura 15.- Resultados serológicos en cabritos.

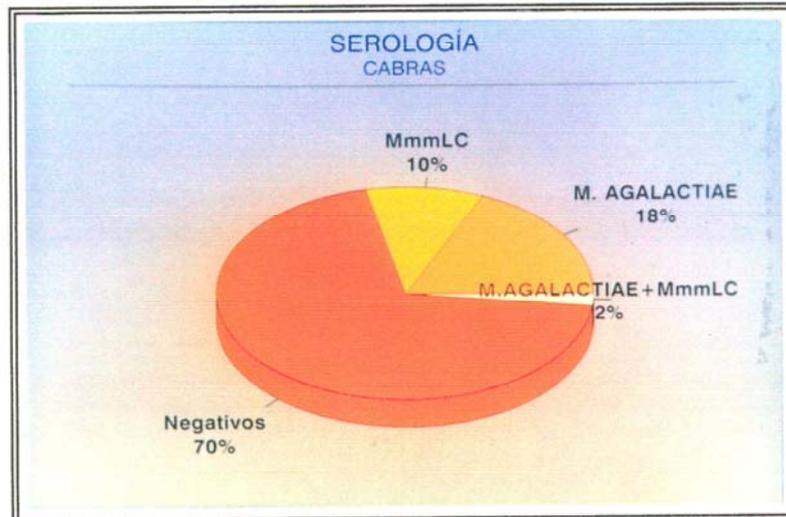


Figura 16.- Resultados serológicos en cabras adultas.

4.6.1 *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides Large Colony.*

Con el Test de Fijación del Complemento (CFT) con antígeno de MmmLC los animales positivos fueron los números: 424, 584, 807, 902, 912, 966, 1252, 1260, 1283, 1341 y 88524, todos ellos correspondientes a cabras adultas.

Mediante la técnica de **Blocking ELISA** con el anticuerpo monoclonal 4F10B2 frente a MmmLC los animales positivos fueron también todos ellos cabras adultas, encontrándose animales con títulos muy altos (números 623, 942, 1130 y 1330) y animales con títulos ligeramente altos (números 822, 898, 1346 y 2085). Sólomente el animal 1130 fue necropsiado.

Mediante la técnica de **ELISA indirecto** se intentó comprobar si existía alguna correlación entre el CFT y el Blocking ELISA, concluyendo que no había ninguna.

4.6.2 *Mycoplasma agalactiae*.

En el caso de los 33 cabritos estudiados serológicamente, sólo se detectaron anticuerpos frente a *M. agalactiae* en los números 7, 18 y 21, todos ellos necropsiados.

Las cabras adultas positivas fueron los números: 150, 424, 584, 610, 671, 753, 811, 863, 880, 912, 921, 931, 973, 1033, 1117, 1184, 1188, 1226, 1247, 1276, 1333, 1347, 1407, 1413, 1495, 1602, 1632, 1654, 2057, 5943, 88524, 88586.

De estos animales fueron necropsiados los números 671, 863, 880, 921, 931, 1033, 1495 y 1632.

4.7 ESTUDIO HEMATOLÓGICO.

Los resultados del estudio hematológico realizado sobre 83 animales (33 cabritos y 50 cabras adultas) se reflejan en la Tabla 4.

Estos resultados indican que todas las medias de los parámetros hemáticos analizados se encontraron dentro del rango de valores normales (Duncan y Prasse, 1986).

TABLA 4. RESULTADOS DEL ESTUDIO HEMATOLÓGICO.

Parámetro hemático	Media	Desviación típica	Error estadístico	Mínimo	Máximo	V. normal*	
						Rango	Media
WBC (x 10 ³ /μl)	11.80	4.99	0.71	5.8	20.6	4-13	9
RBC (x 10 ⁶ /μl)	12.71	2.75	0.37	9.02	19.05	8-18	13
HGB (g/dl)	10.09	1.13	0.14	8	14.9	8-12	10
HCT (%)	27.95	5.17	0.70	20.8	41.7	22-38	28
VCM (fl)	21.63	2.49	0.33	16	26.1	16-25	20
HCM (pg)	7.41	1.44	0.19	5	10.06	5.2-8	6.5
CHCM (g/dl)	36.4	5.69	0.77	22.8	47.1	30-37	33
% Linfocitos	54.0	9.32	1.45	26.2	66.4	50-70	56
% Monocitos + Granulocitos	46.0	9.32	1.45	33.6	73.8	35-51	43
Linfocitos (x 10 ³ /μl)	6.37	2.30	0.36	3.1	11	2-9	5.5
Monocitos + Granulocitos (x 10 ³ /μl)	5.42	2.11	0.33	2.7	12.2	1.3-7	5.1

WBC: Recuento leucocitario
RBC: Recuento eritrocitario
HGB: Hemoglobina
HCT: Valor hematócrito

VCM: Volumen Corpuscular Medio
HCM: Hemoglobina Corpuscular Media
CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media

n: Tamaño de la muestra para todos los parámetros = 83 animales.

* Valores normales tomados de Duncan & Prasse, 1986.

Iconografía

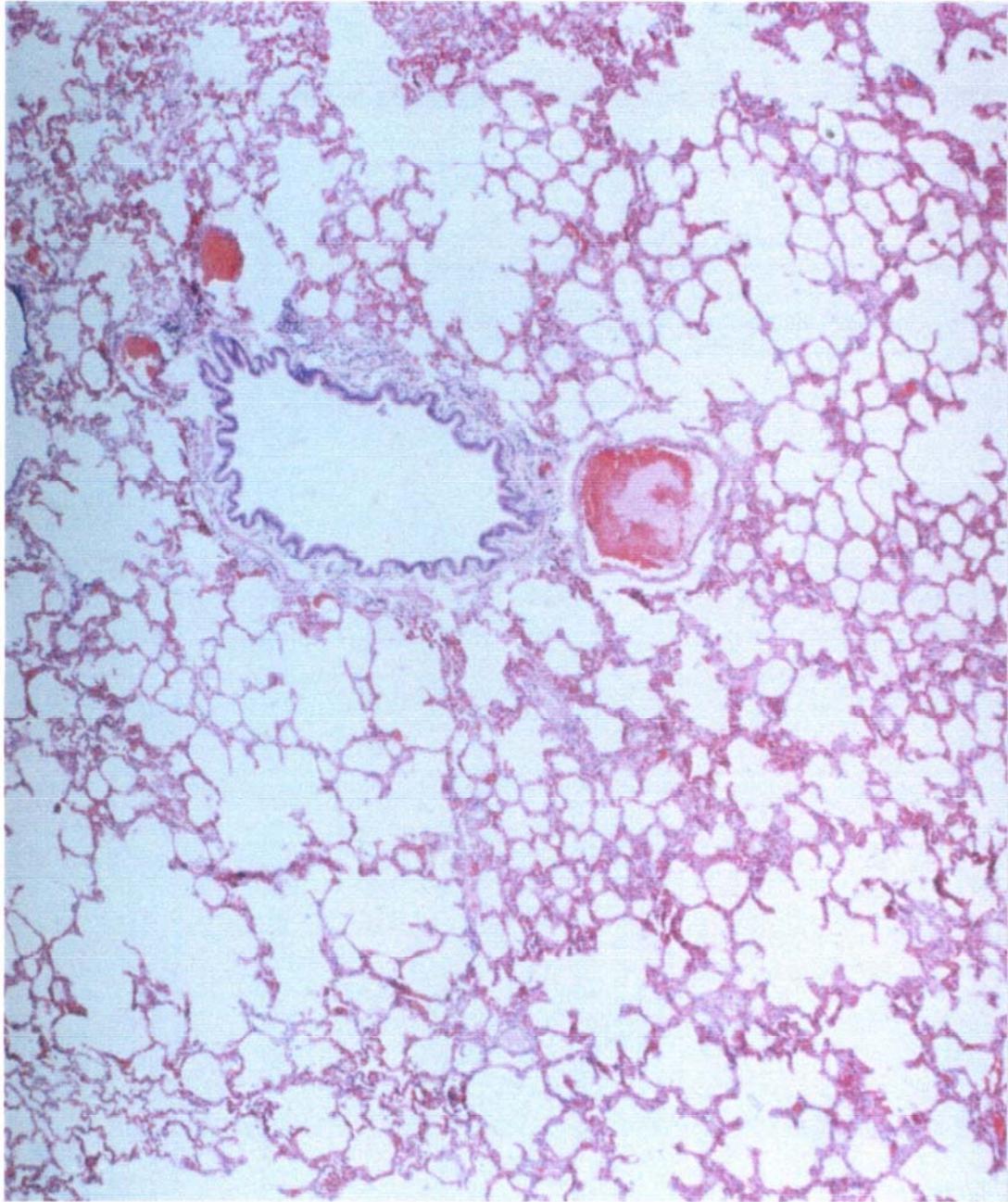


Figura 1.- Cabra adulta nº 280. Pulmón histológicamente normal. En este animal no se aislaron micoplasmas ni pasteurelas. Tampoco se detectaron CAR-bacilli. H-E x10

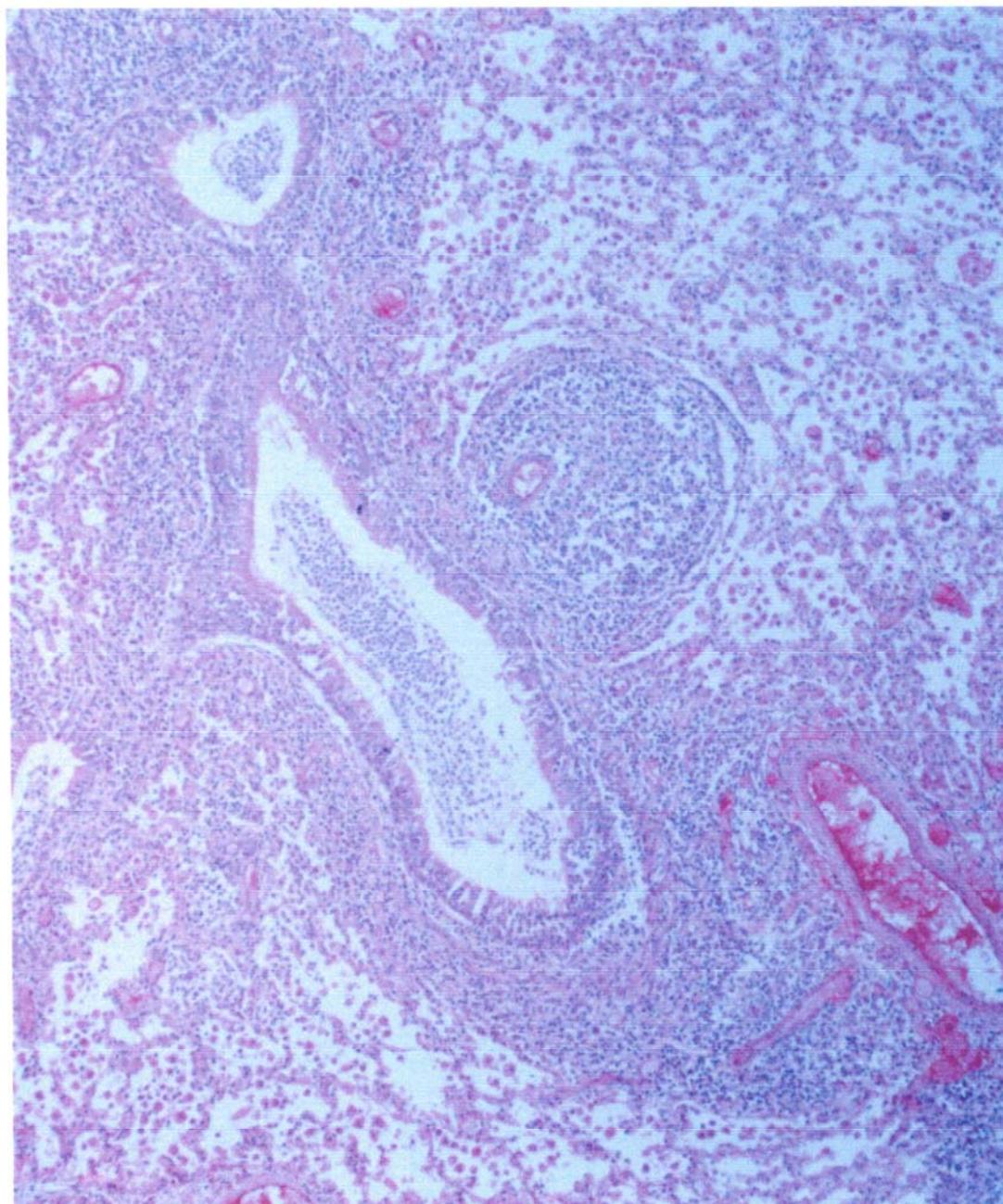


Figura 2.- Cabrito n° 24. Pulmón. Bronconeumonía catarropurulenta con infiltración peribronquial y presencia de gran número de macrófagos alveolares. En este animal se aisló Mmc y se evidenció una inmunorreacción positiva frente a M. mycoides. También fue aislada de pulmón Moraxella spp. H-E x16

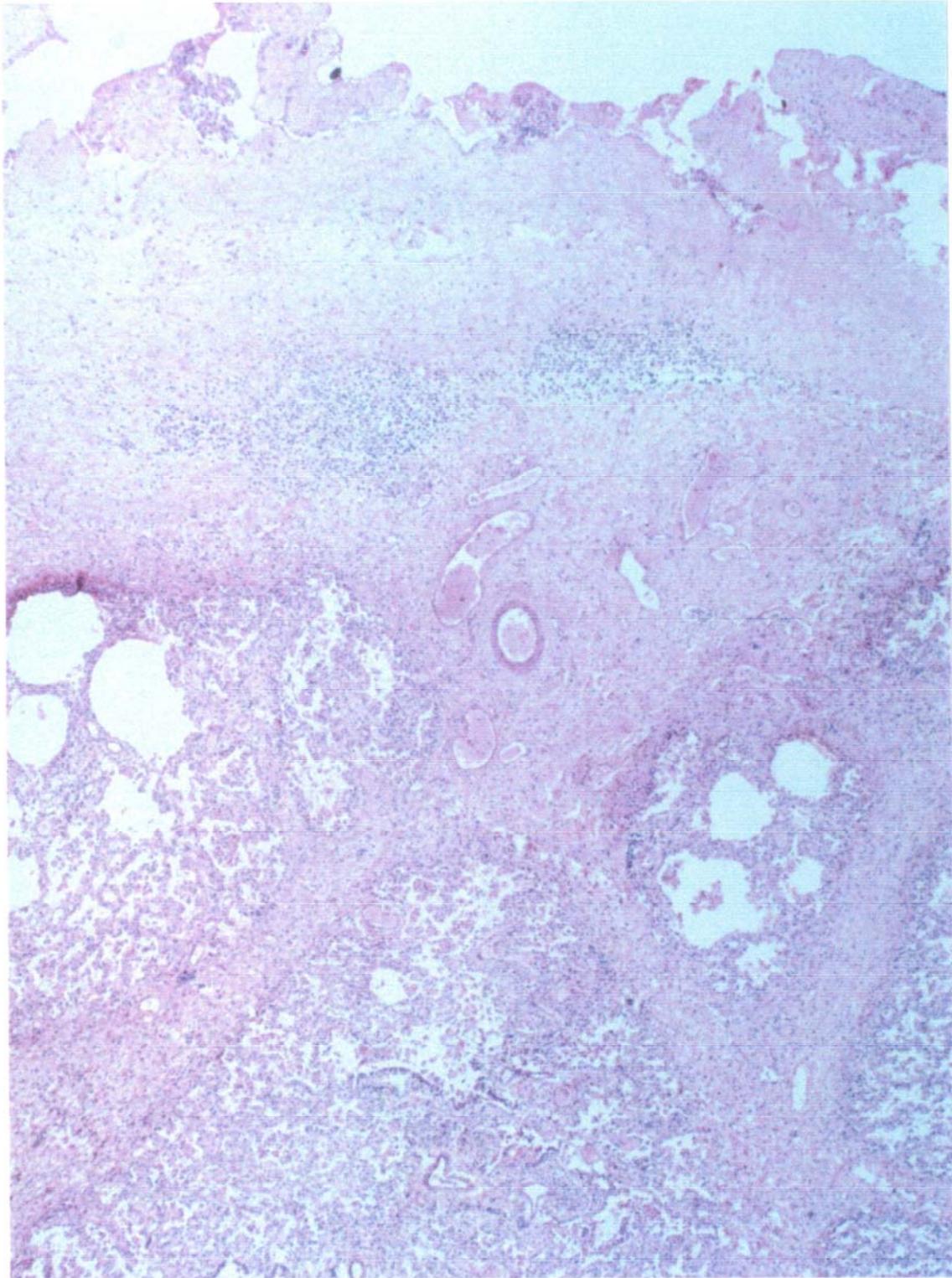


Figura 3.- Cabrito nº 3. Pulmón. Pleuritis fibrinosa, dilatación moderada de septos interlobulillares. Abundante exudado alveolar compuesto fundamentalmente por macrófagos alveolares. No se aislaron micoplasmas ni pasteurelas a partir de este pulmón. H-E x10

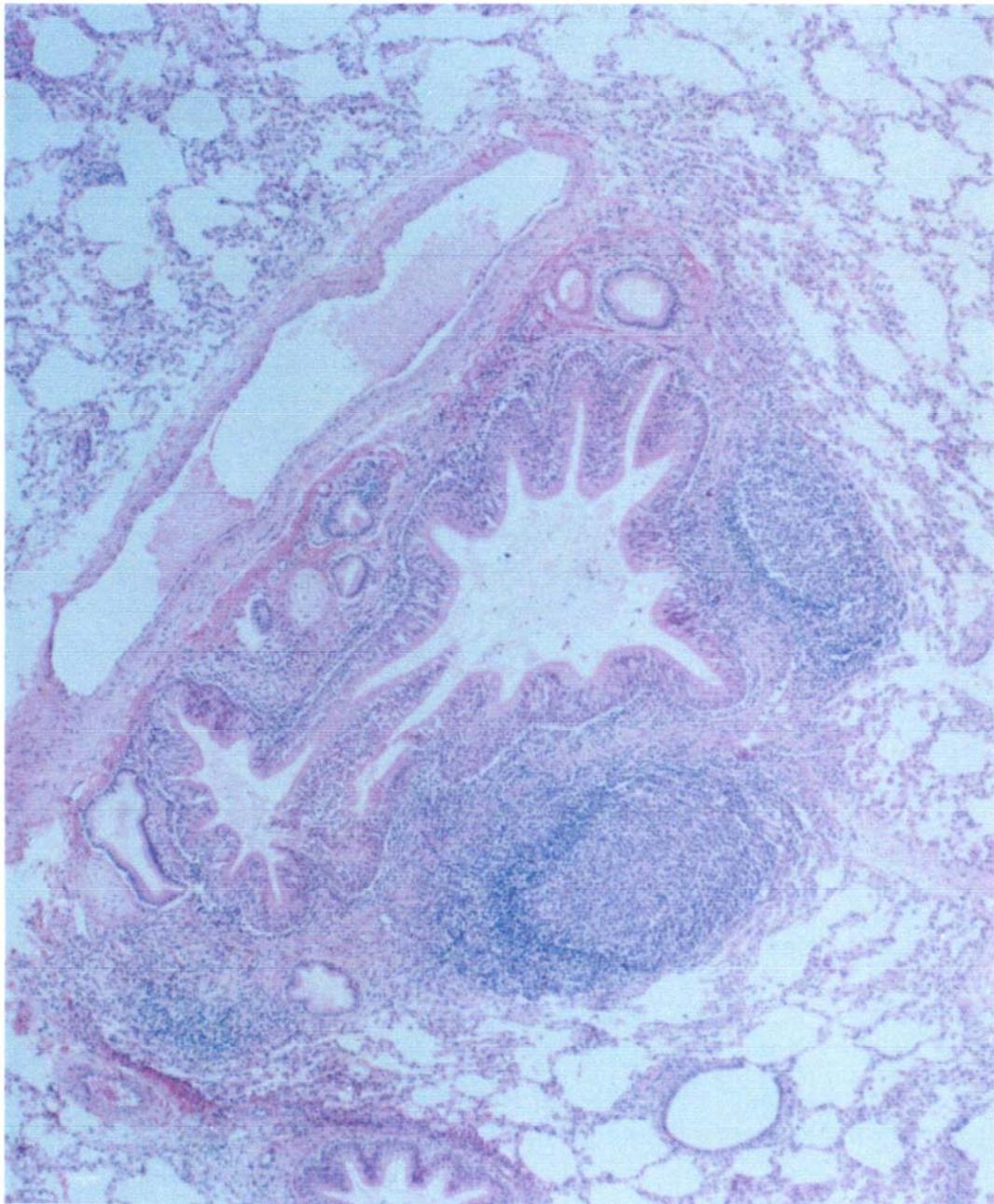


Figura 4.- Cabra adulta nº 1632. Pulmón. Linfoproliferaciones peribronquiales con infiltrado sub e intraepitelial. No se aislaron micoplasmas ni pasteurelas a partir de esta lesión. H-E x10

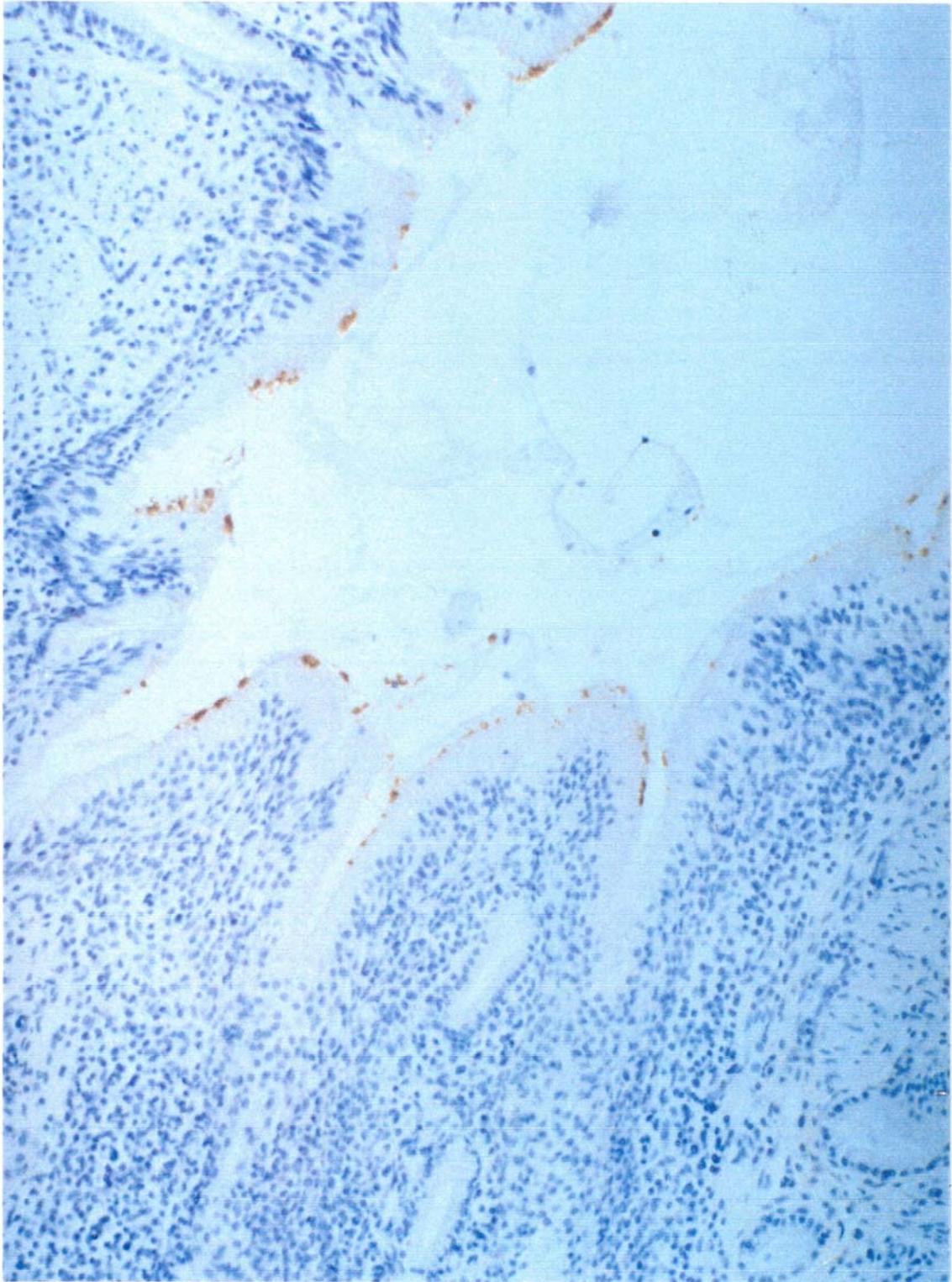


Figura 5.- Cabra adulta n° 1632. Bronquio. Inmunorreacción positiva considerada como inespecífica con el suero anti-Mmc (Dr. Poveda) en el epitelio ciliado bronquial. No se aislaron micoplasmas ni pasteurelas en este animal. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x10



Figura 6.- Cabra adulta nº 1515. Pulmón. Intensa linfoproliferación peribronquiolar típica de neumonía enzoótica (+++), junto a una bronconeumonía purulenta. Se aisló *M. spp.* y fueron detectados CAR-bacilli en el epitelio ciliado. H-E x16

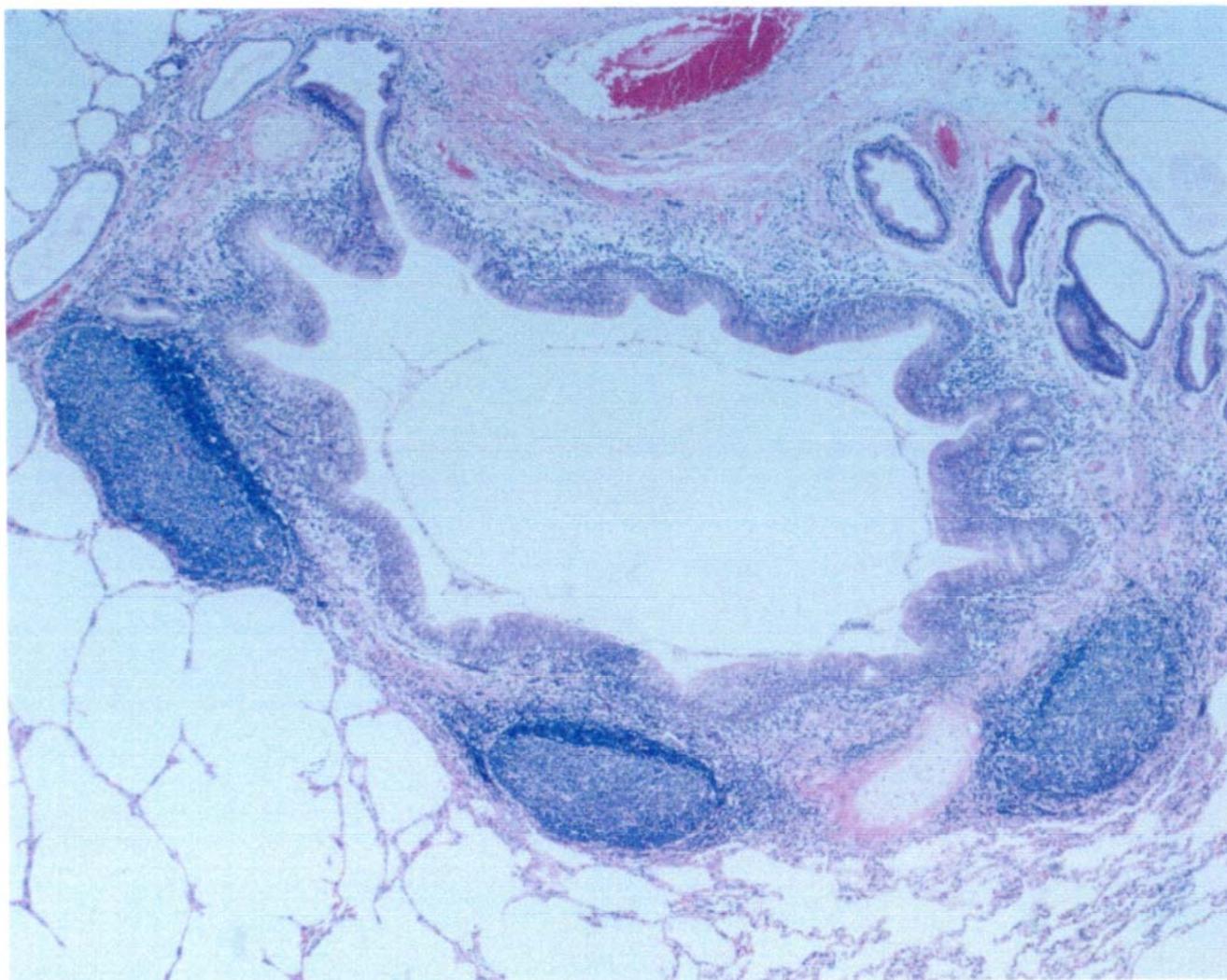


Figura 7.- Cabra adulta n° 1495. Pulmón. Intensas proliferaciones peribronquiales correspondientes a un caso de neumonía enzoótica (+++). Se detectaron CAR-bacilli en relación al epitelio bronquial mediante la técnica de Warthin-Starry. No se aislaron micoplasmas ni pasteurelas a partir de esta lesión. H-E x10

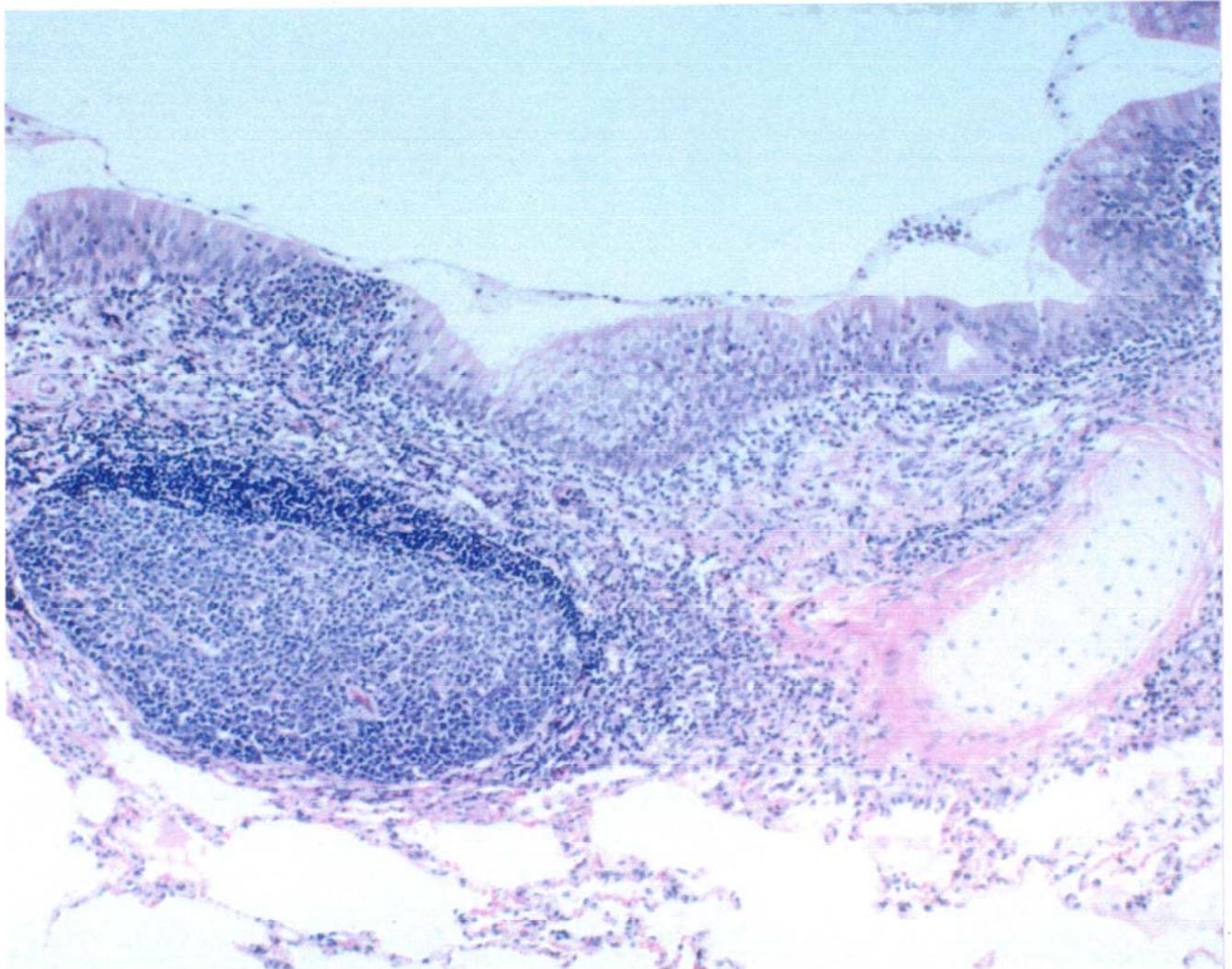


Figura 8.- Cabra adulta n° 1495. Bronquio. Linfoproliferación peribronquial e infiltrado inflamatorio sub e intraepitelial. Este animal presentó neumonía enzoótica (+++). Se detectaron CAR-bacilli en relación al epitelio bronquial mediante la técnica de Warthin-Starry. No se aislaron micoplasmas ni pasteurelas a partir de esta lesión. H-E x25

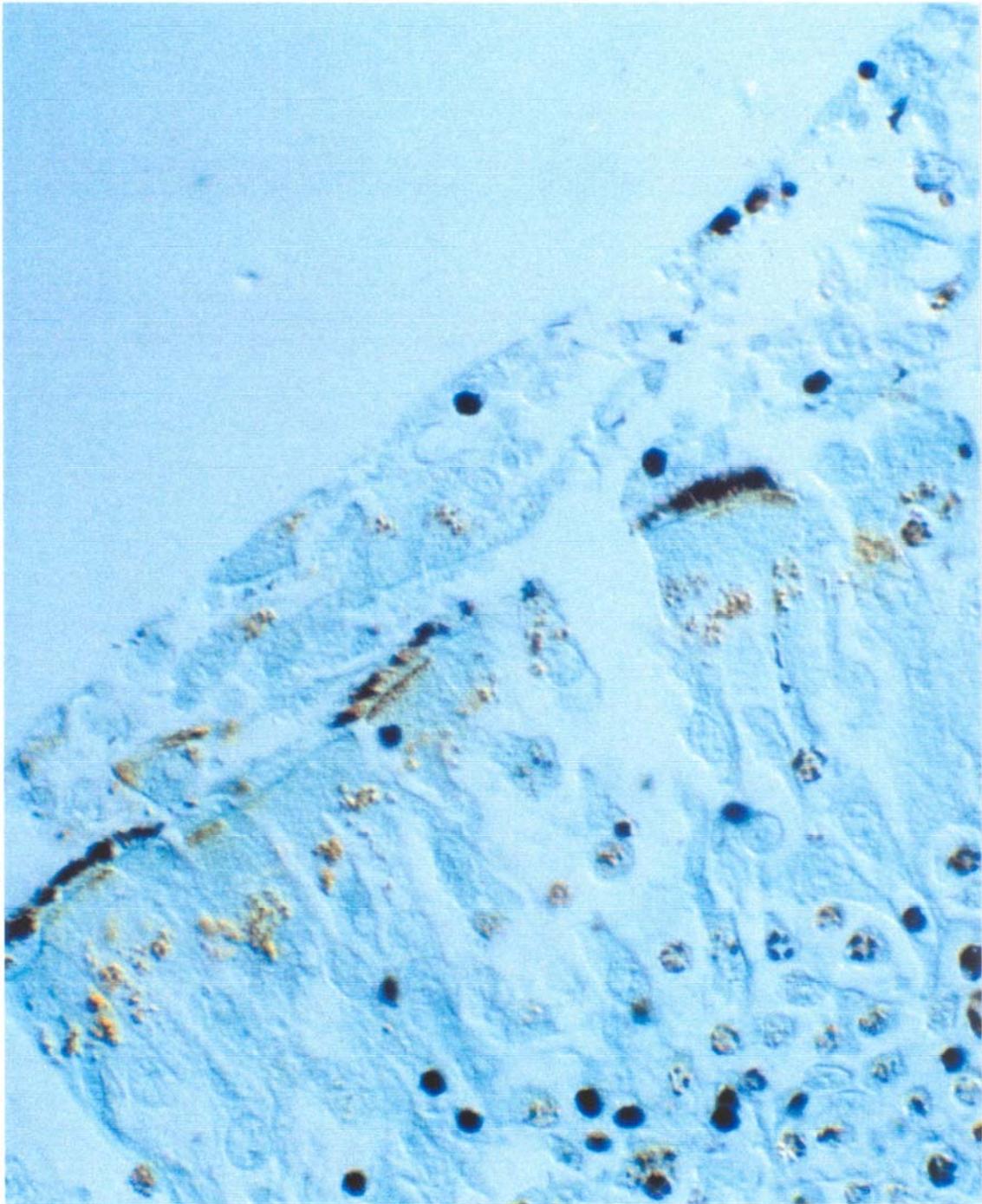


Figura 9.- Cabrito nº 38. Bronquio. Demostración histoquímica de CAR-bacillus en el epitelio ciliado mediante la técnica de Warthin-Starry. Este animal mostró lesiones de neumonía enzoótica (+), aislándose únicamente Pasteurella multocida. W-S x40 (Nomarsky).

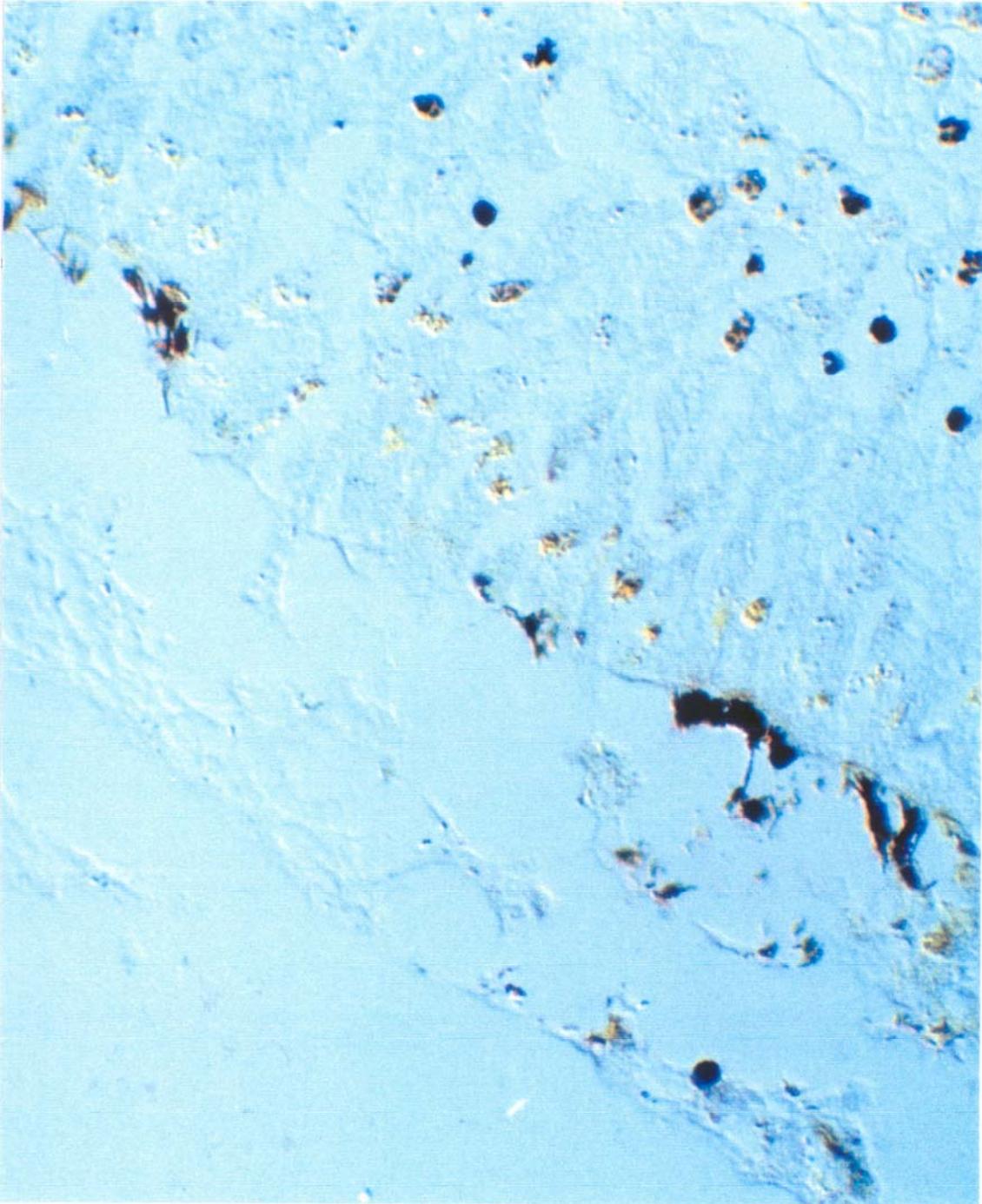


Figura 10.- Cabrito nº 39. Bronquio. Demostración histogímica de CAR-bacillus en el epitelio ciliado. Este animal mostró lesiones de neumonía enzótica (++) y bronconeumonía purulenta, aislándose *M. argymini* y mostrando también inmunorreacción positiva frente a *Pasteurella multocida*. W-S x40 (Nomarsky).

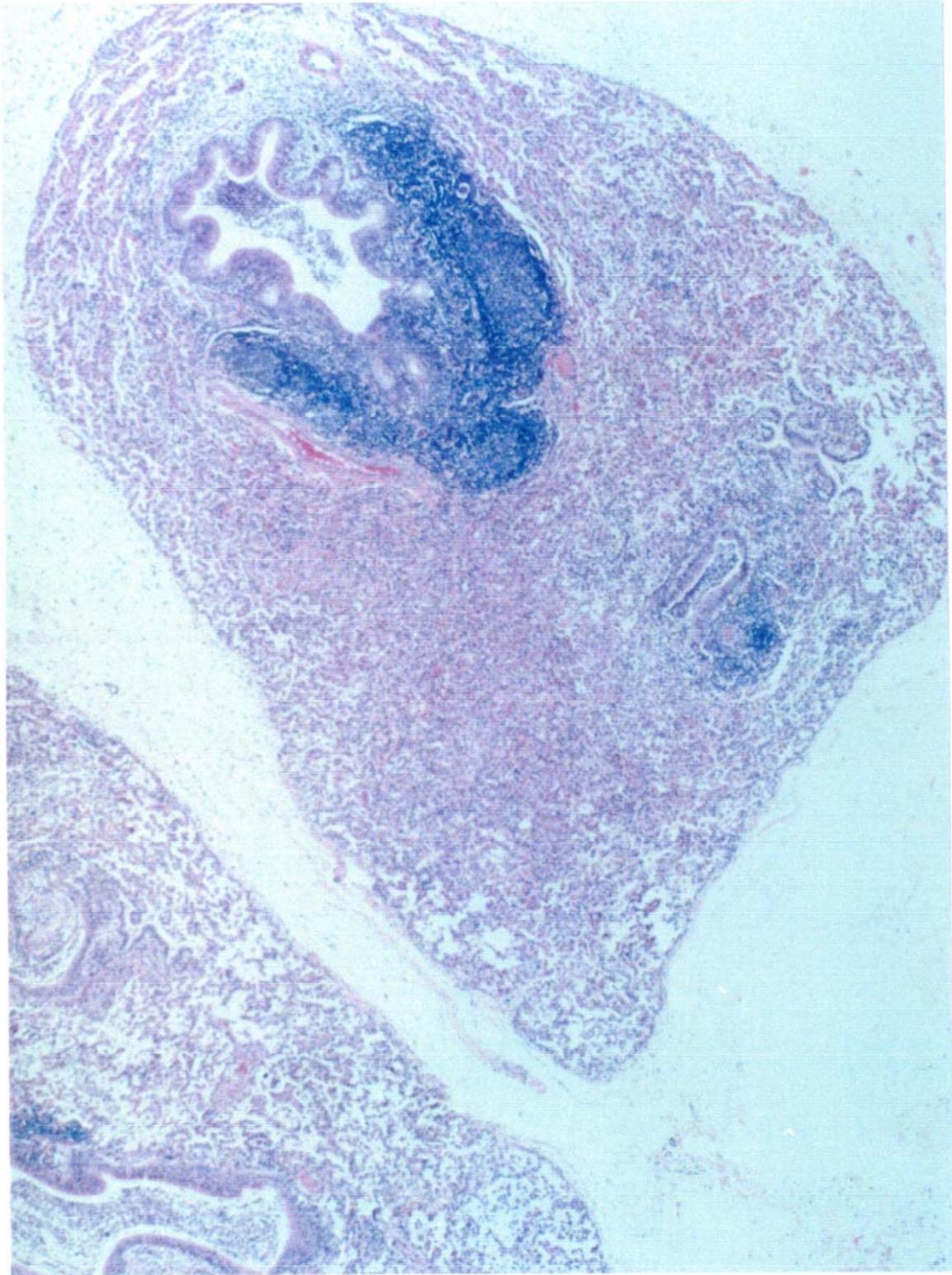


Figura 11.- Cabra adulta n° 5435. Pulmón. Lobulillo pulmonar mostrando linfoproliferaciones peribronquiolares típicas de neumonía enzoótica (+++), junto a gran cantidad de exudado alveolar compuesto mayoritariamente por macrófagos y neutrófilos. Se detectaron CAR-bacillus a nivel del epitelio ciliado, no aislándose micoplasmas ni pasteurelas, si bien hubo inmunorreacción positiva frente a Pasteurella multocida. H-E x10

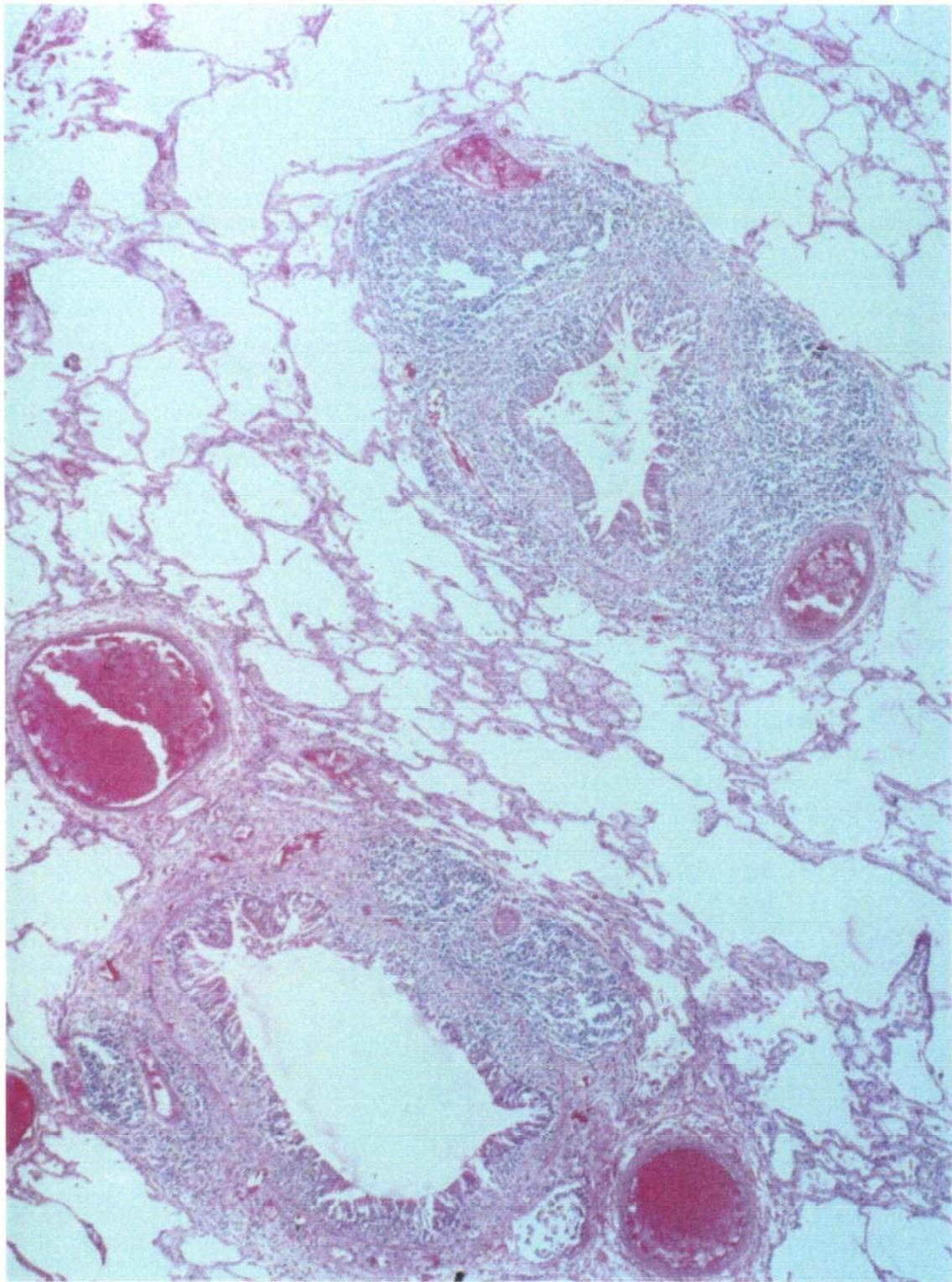


Figura 12.- Cabrito nº 31. Pulmón. Linfoproliferaciones peribronquiolares en un caso de neumonía enzoótica (+++). En este animal tan sólo se detectó CAR-bacillus en el epitelio bronquial. H-E x10

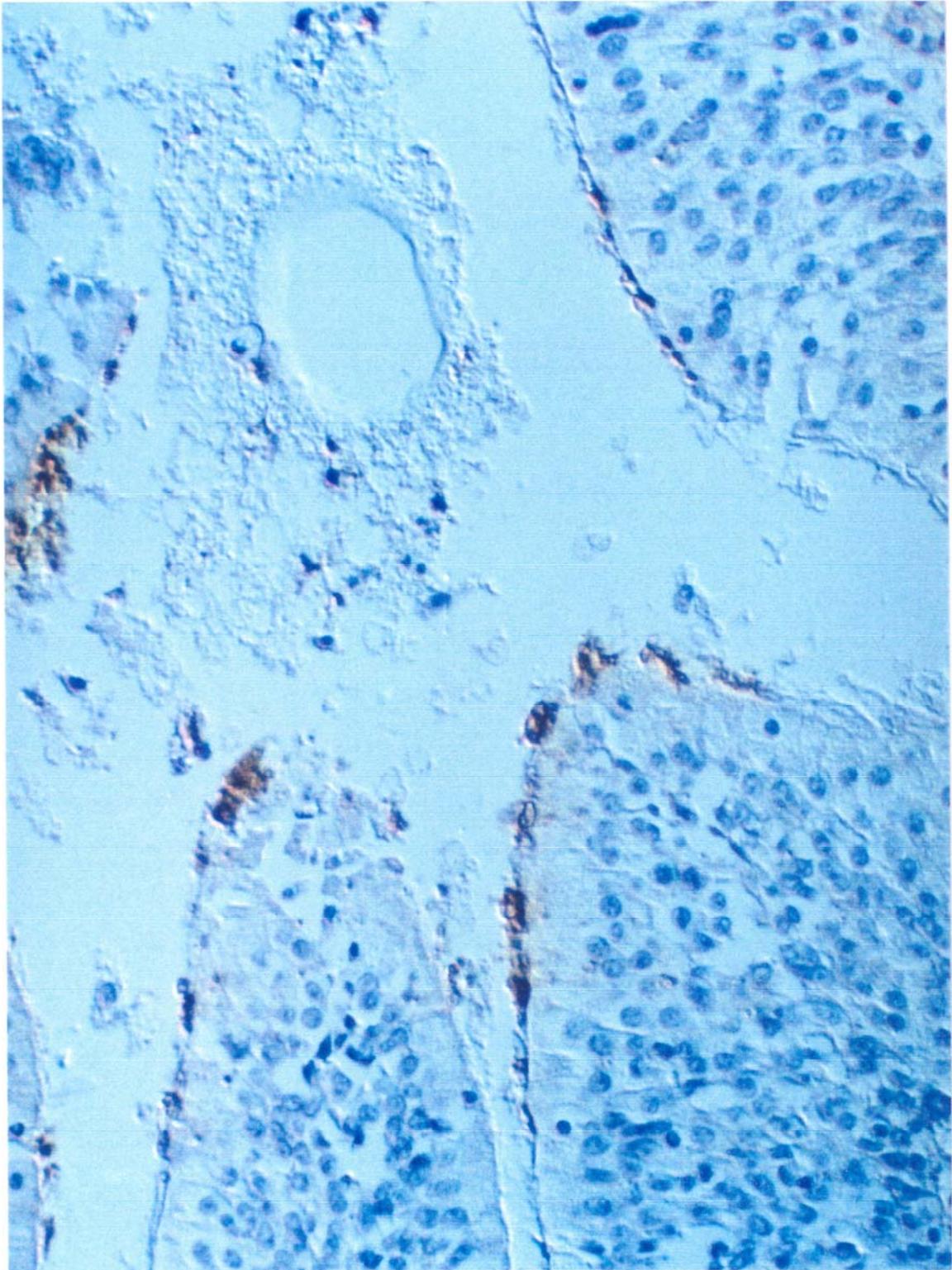


Figura 13.- Cabrito nº 38. Bronquio. Inmunorreacción positiva considerada inespecífica con el suero anti-Mmc (Dr. Poveda) en el epitelio ciliado bronquial. Este animal presentó lesiones de neumonía enzoótica(+), aislándose Pasteurella multocida y detectándose CAR-bacillus en este mismo epitelio. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40 (Nomarsky).

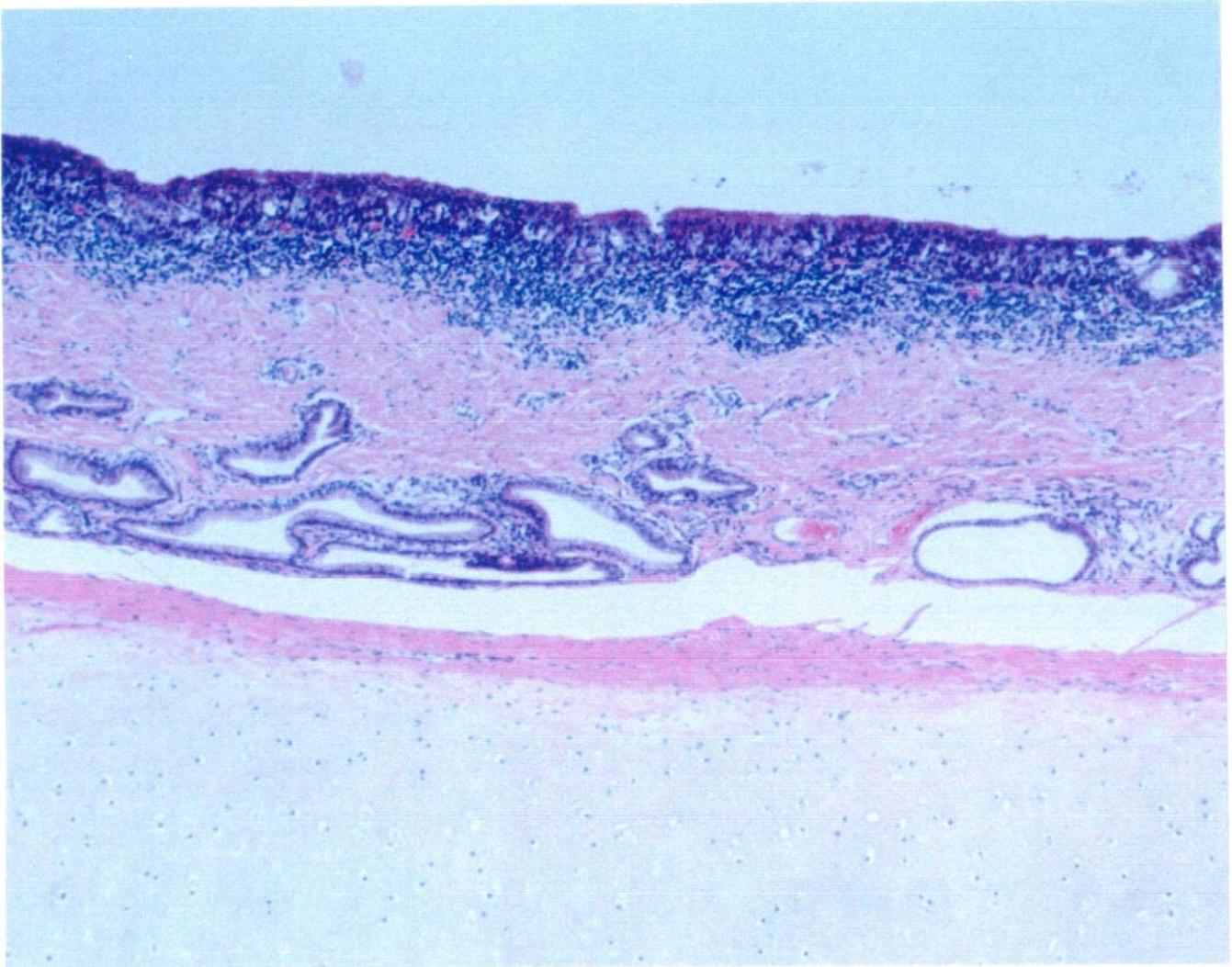


Figura 14.- Cabra adulta nº 1495. Tráquea. Traqueitis linfoplasmocitaria. Se detectaron CAR-bacilli en el epitelio traqueal mediante la técnica de Warthi-Starry. H-E x16

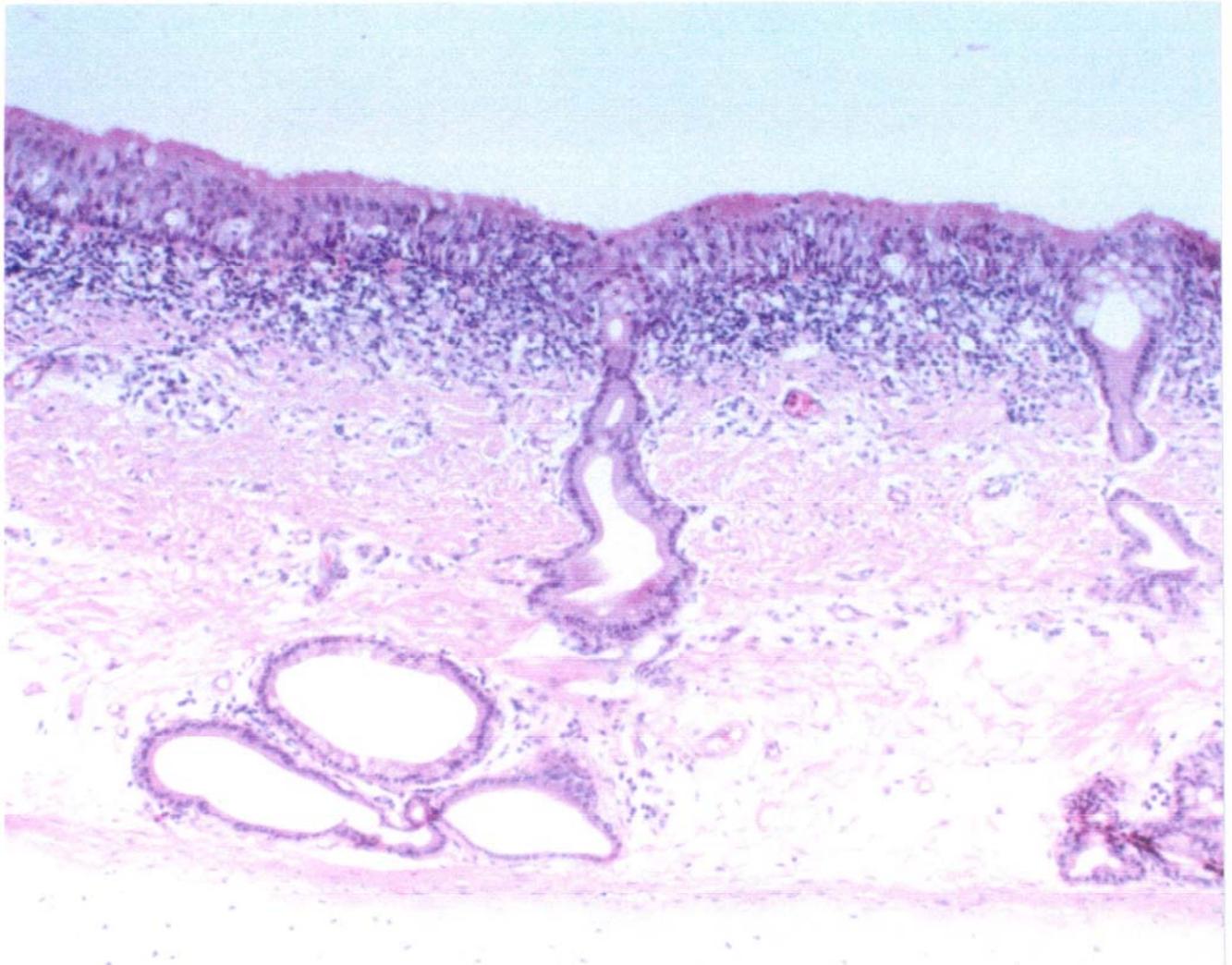


Figura 15.- Cabra adulta n° 1632. Tráquea. Traqueitis linfoplasmocitaria. En esta tráquea también se detectaron CAR-bacilli Warthin-Starry (+). H-E x25

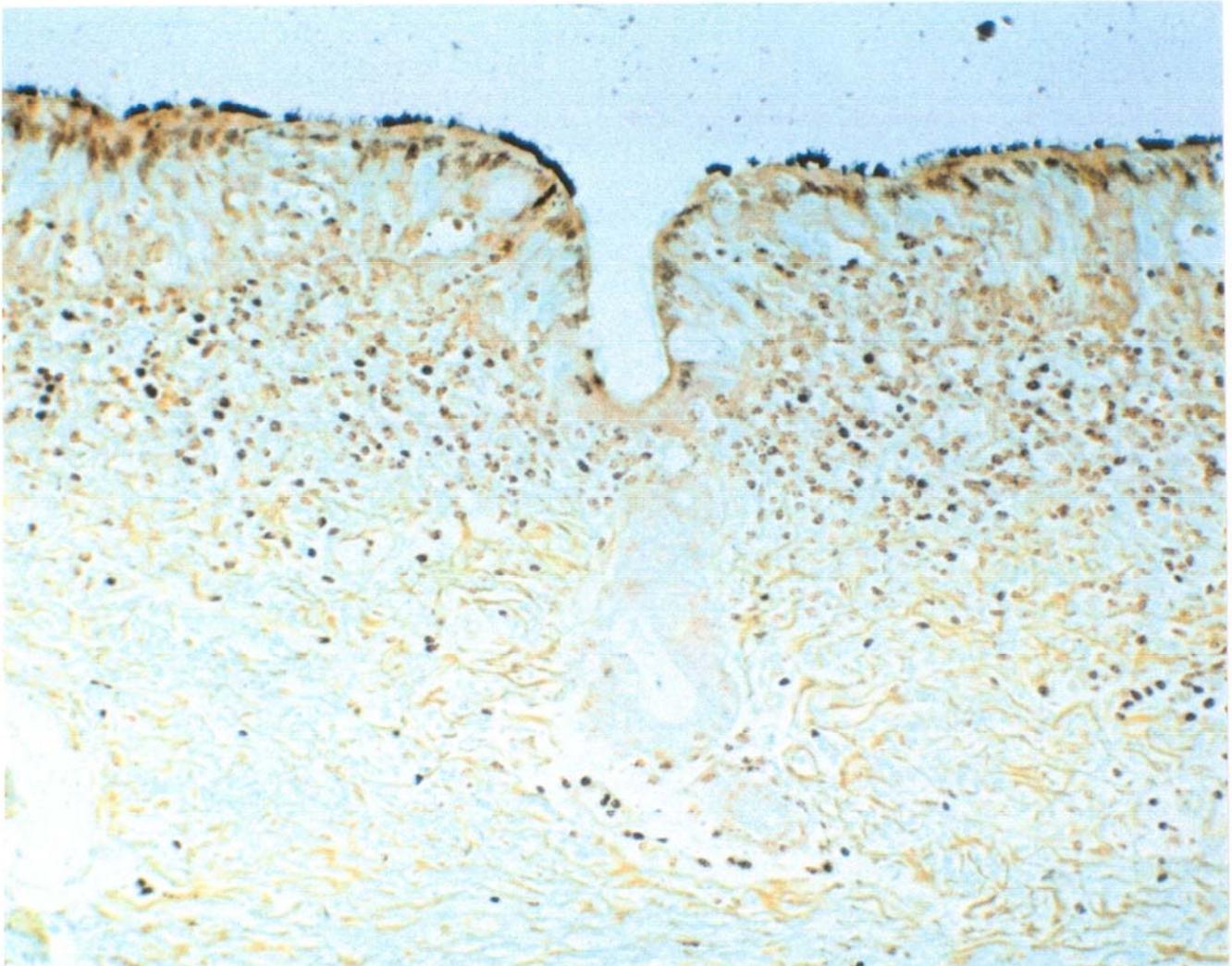


Figura 16.- Cabra adulta nº 1632. Tráquea. Demostración histoquímica de CAR-bacillus en el epitelio ciliado (Fig. 15) mediante la técnica de Warthin-Starry. W-S x20

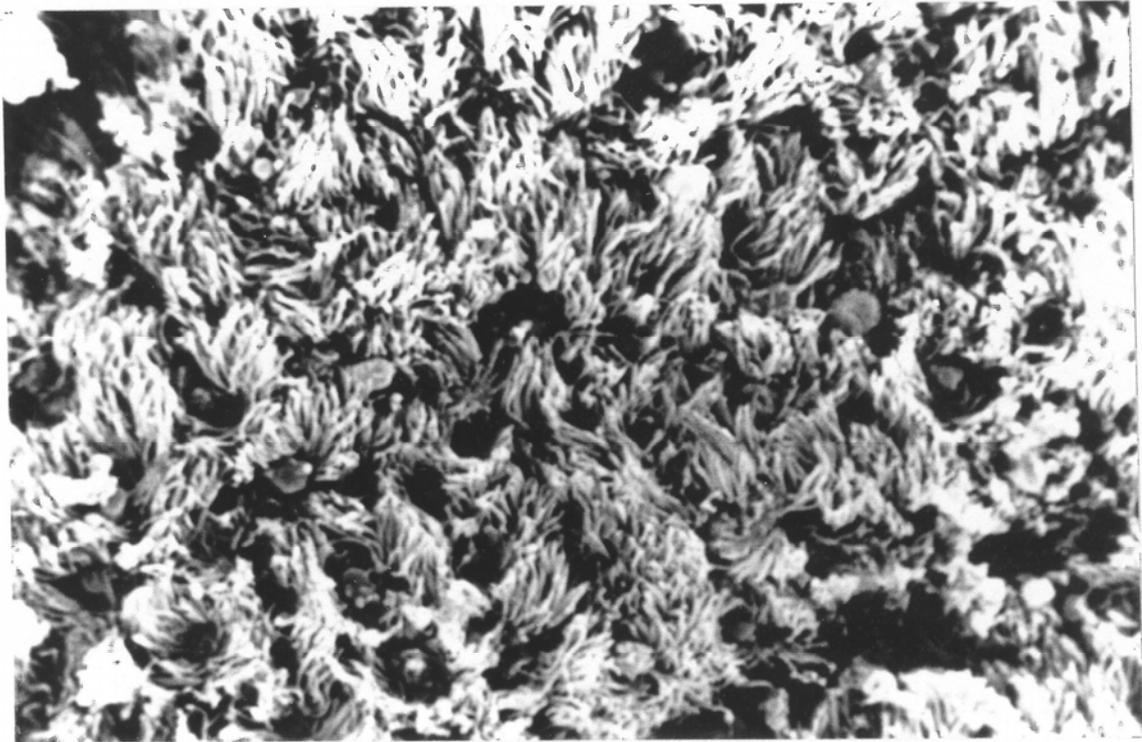


Figura 17.- Cabra adulta n° 1632. Tráquea. Superficie del epitelio traqueal con un gran número de CAR-bacilli. Obsérvese su morfología filamentosa, prácticamente indistinguibles de los cilios, salvo por un pequeño engrosamiento en el extremo apical. M.E.B. x1000

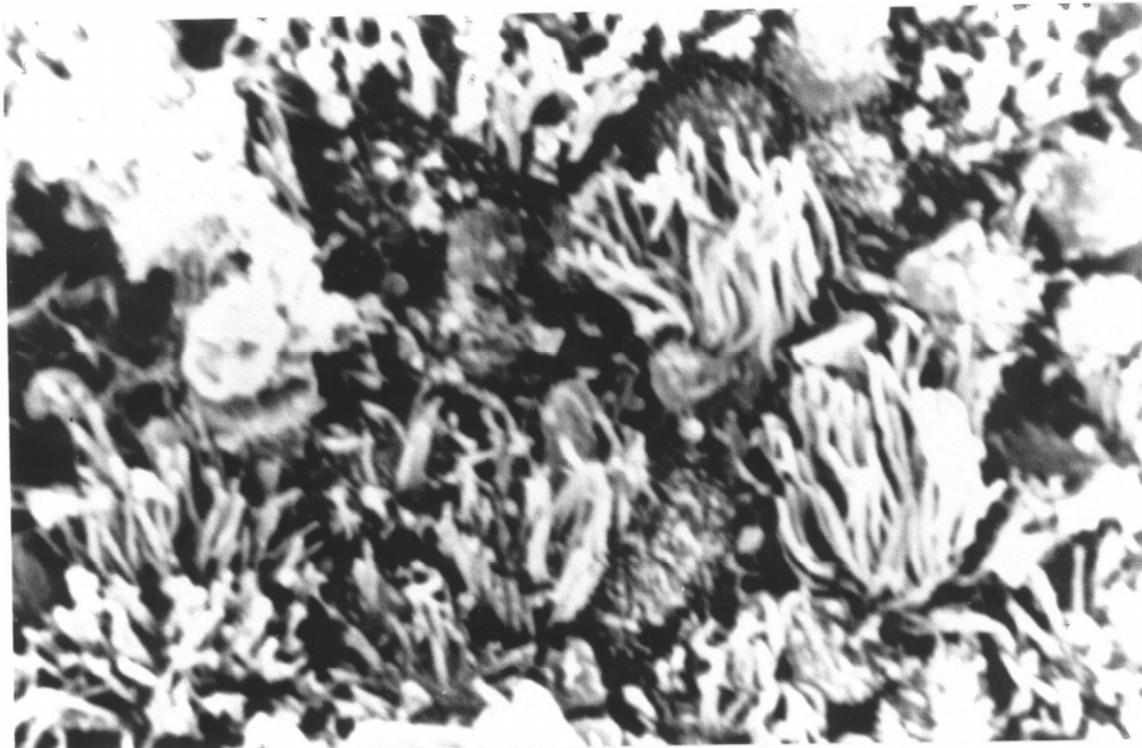


Figura 18.- Cabra adulta n° 1632. Tráquea. Superficie epitelial traqueal, con un gran número de células caliciformes y una intensa colonización del epitelio ciliado por CAR-bacillus. Se evidencia con mayor claridad el pequeño y característico engrosamiento bulboso terminal. M.E.B. x2700

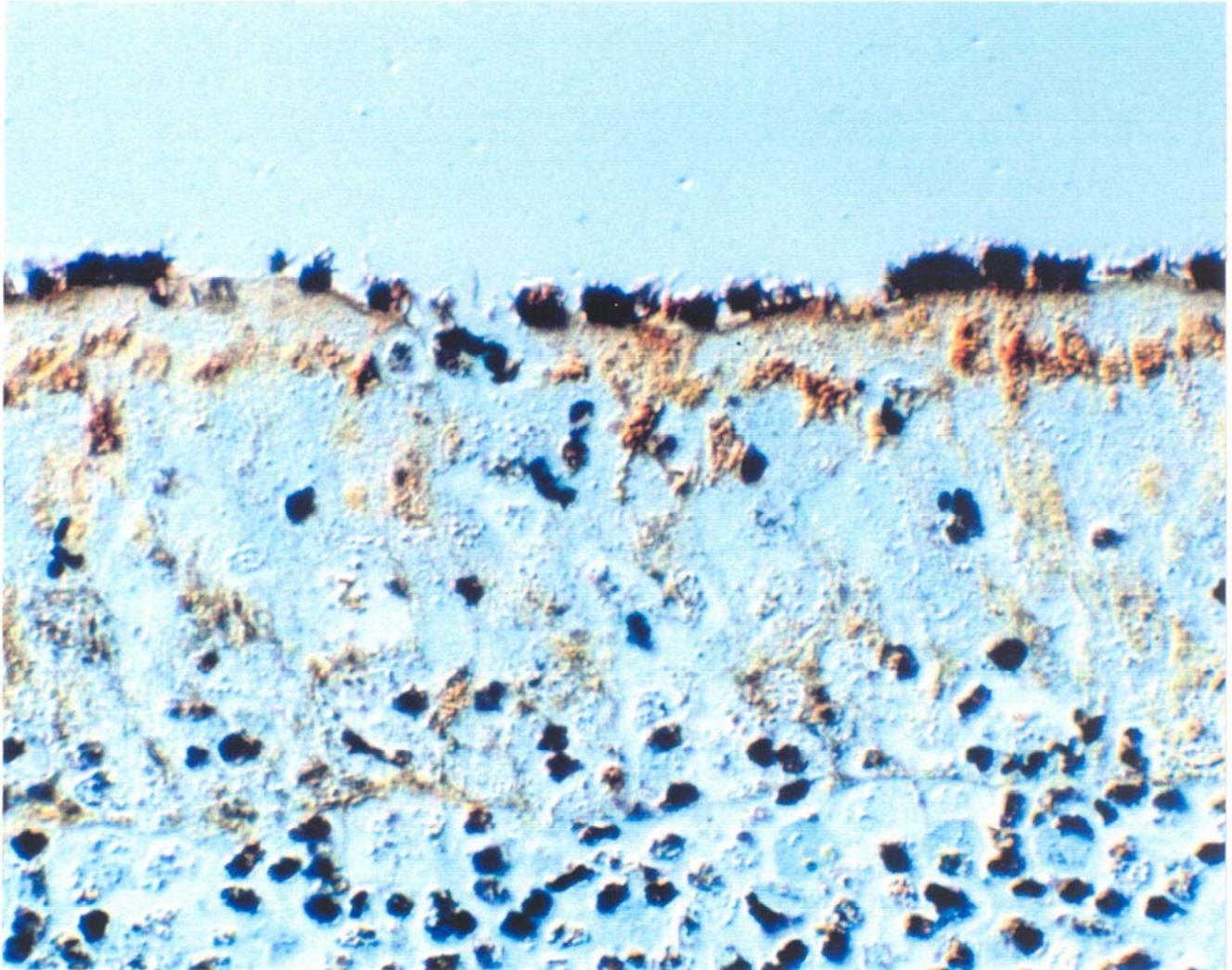


Figura 19.- Cabra adulta n° 5428. Tráquea. Demostración histoquímica de CAR-bacillus en el epitelio ciliado mediante la técnica de Warthin-Starry. El animal mostró una intensa traqueitis linfoplasmocitaria. W-S x40 (Nomarsky).

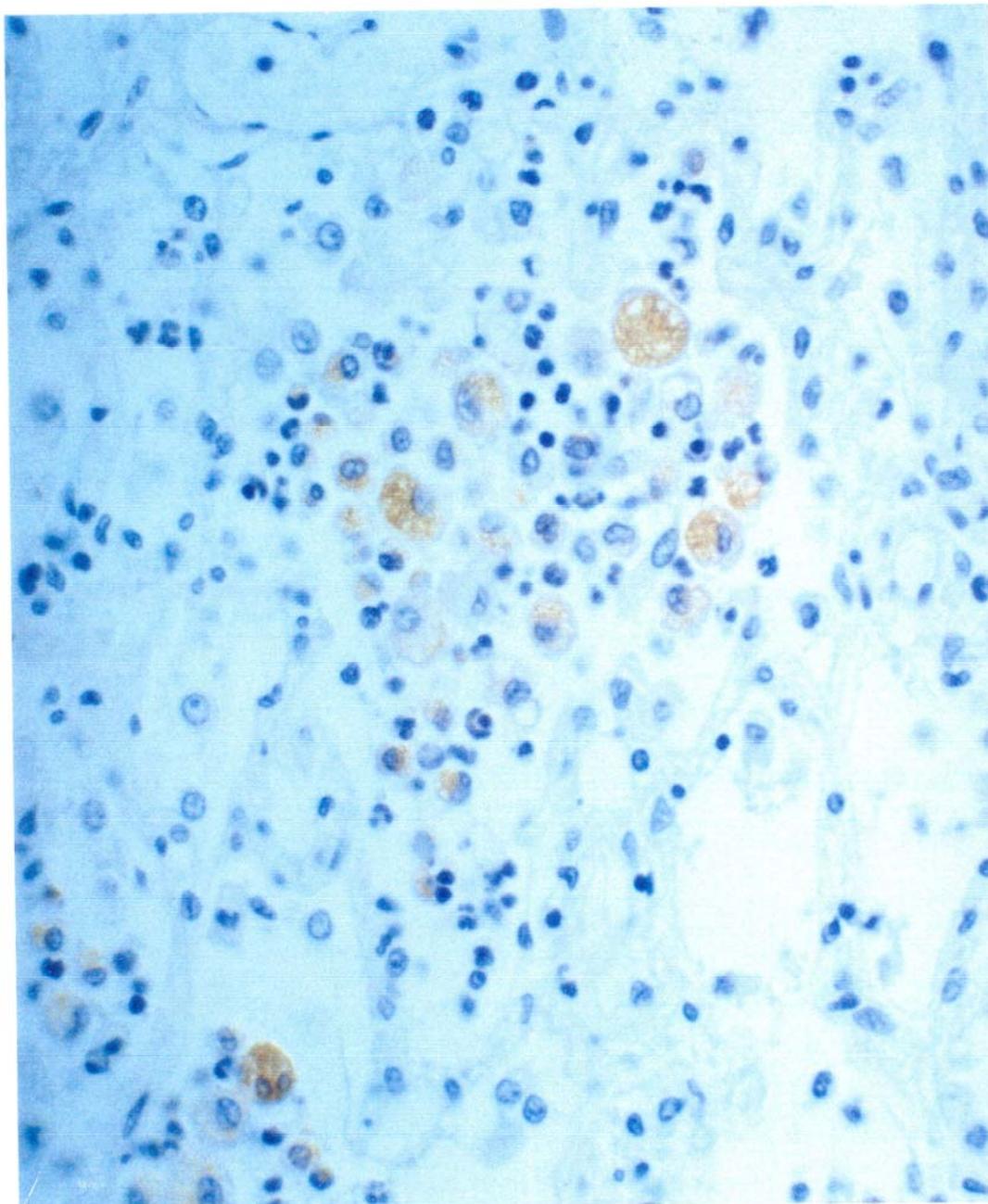


Figura 20.- Cabrito n° 5443. Pulmón. Inmunorreacción positiva frente a Mmc en el citoplasma de macrófagos alveolares. Este animal presentó lesiones de neumonía enzoótica (+/+). Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40

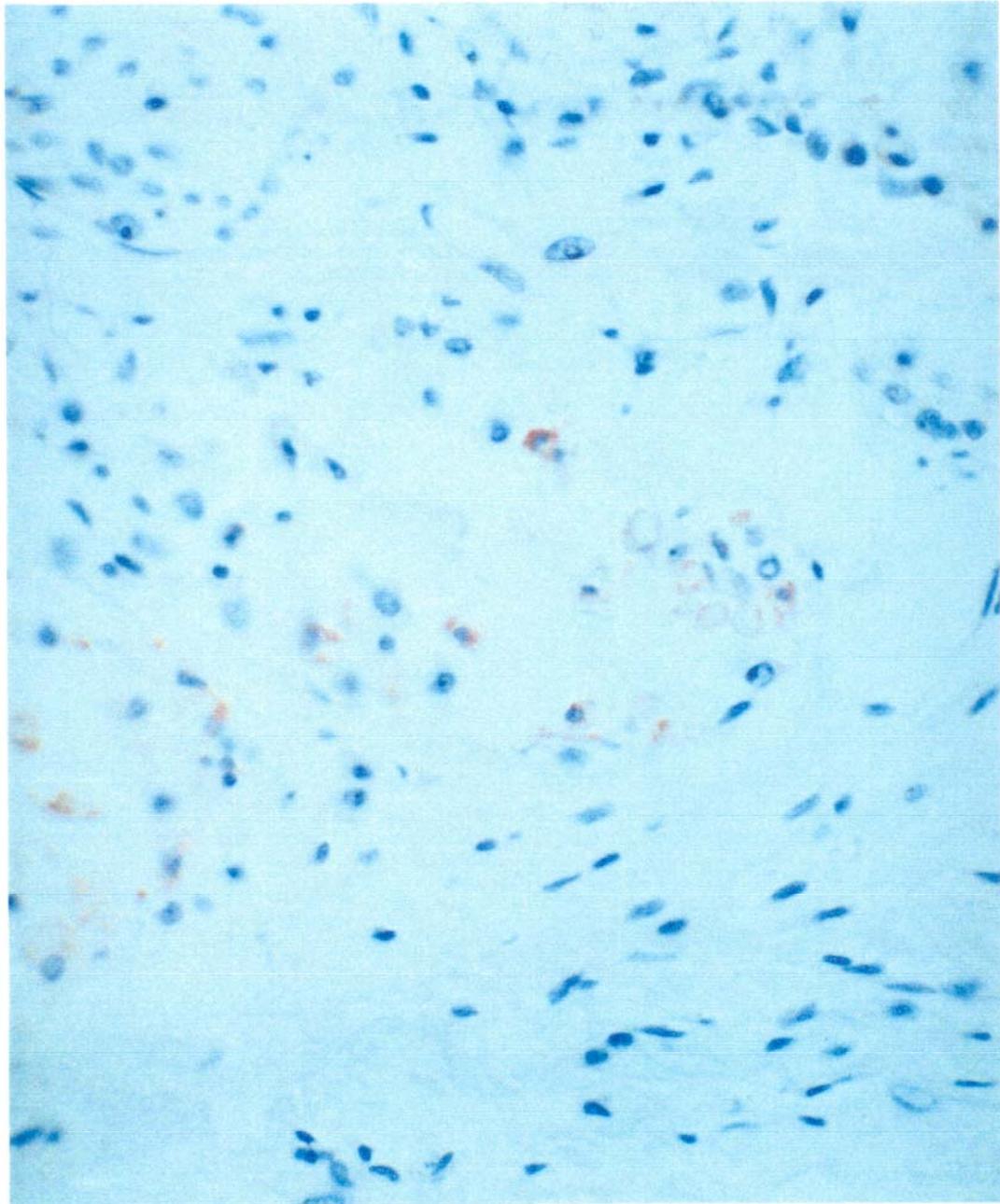


Figura 21.- Cabrito nº 20. Pulmón. Inmunorreacción positiva frente a *M. mycoides* en el interior de macrófagos. Este animal mostró lesiones de neumonía enzoótica (+/++), aislándose solamente *M. putrefaciens* y *Pasteurella multocida*. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40

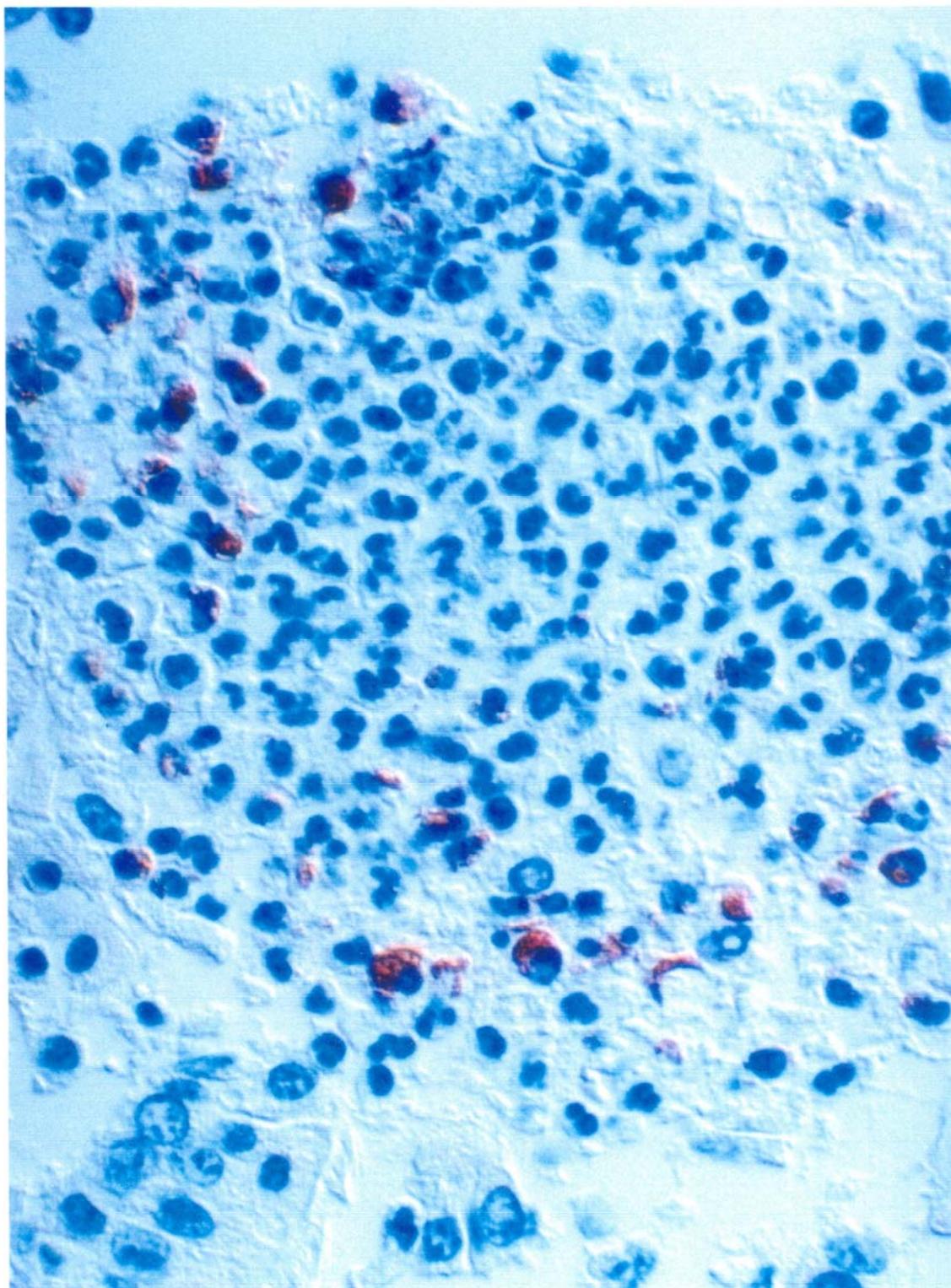


Figura 22.- Cabrito nº 37. Pulmón. Bronconeumonía catarropurulenta con inmunorreacción positiva frente a M. putrefaciens en el interior de células inflamatorias. Este animal mostró lesiones de neumonía enzoótica +/++. Se aisló M. putrefaciens, presentando también inmunorreacción positiva frente a Pasteurella multocida. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40 (Nomarsky).

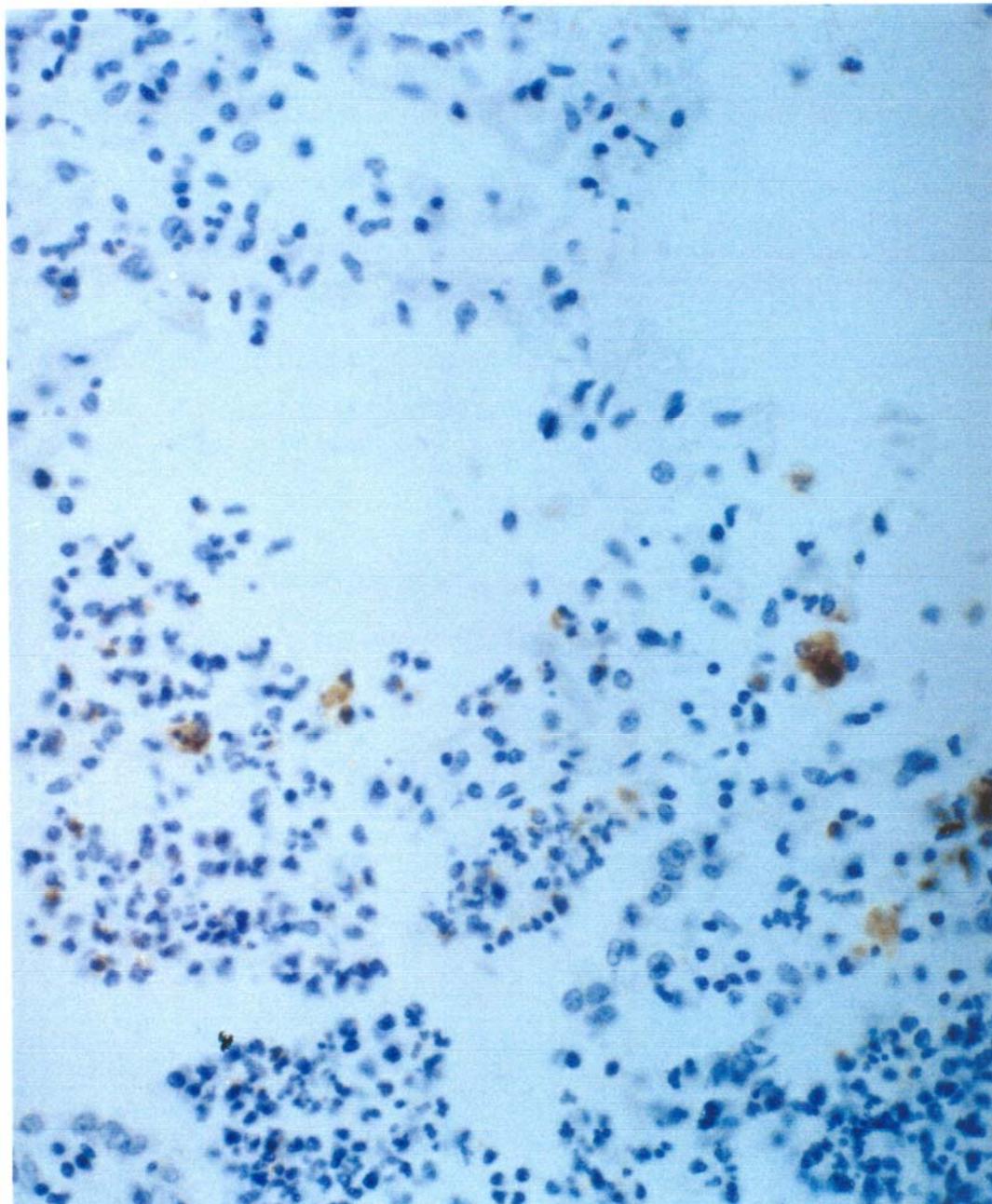


Figura 23.- Cabrito nº 37. Pulmón. Bronconeumonía catarropurulenta con inmunorreacción positiva frente a Pasteurella multocida en el citoplasma de las células inflamatorias. Este animal también mostró lesiones de neumonía enzoótica (+/+). Se aisló M. putrefaciens, presentando también inmunorreacción positiva frente a este microorganismo. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x20

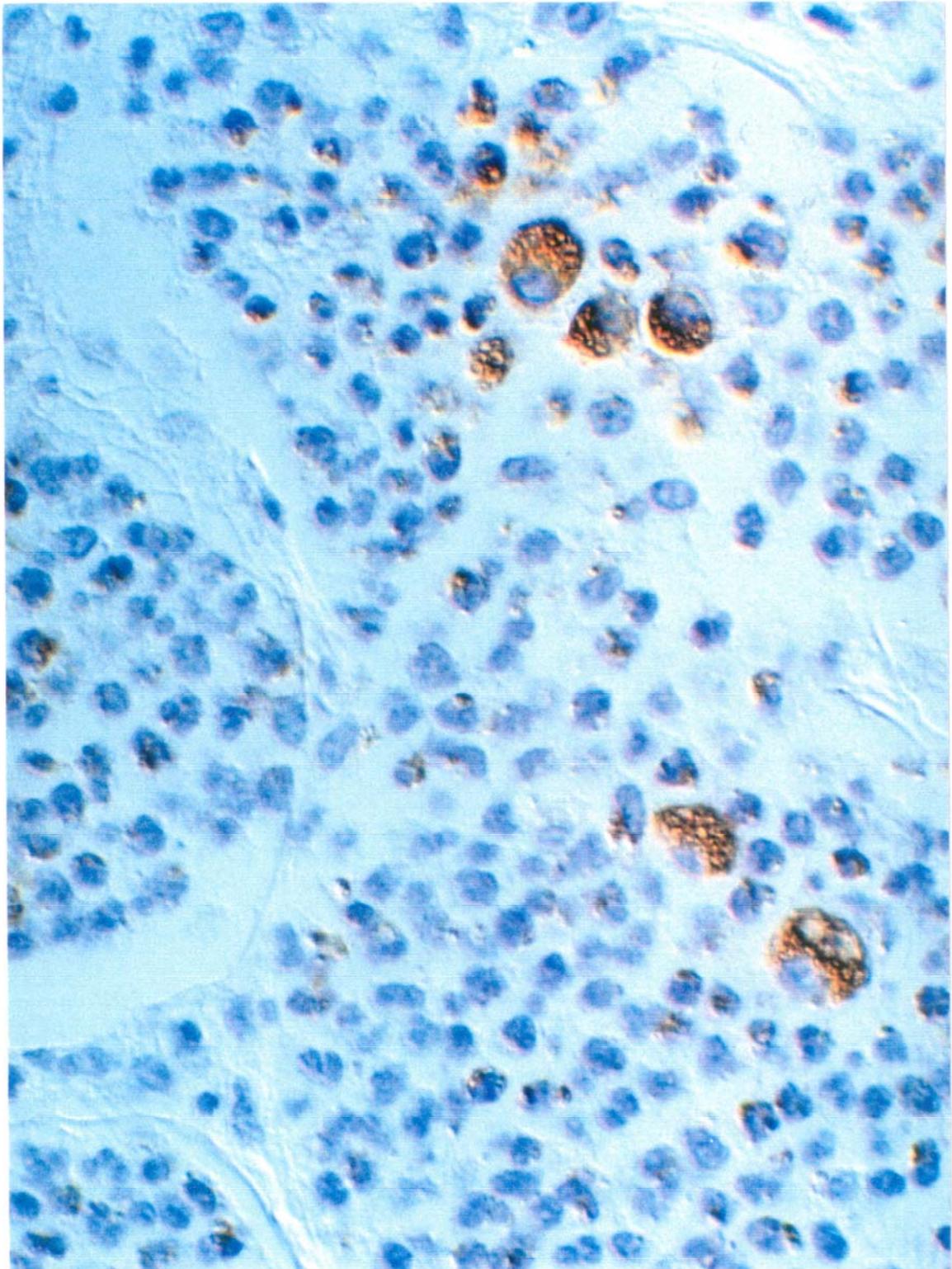


Figura 24.- Cabra adulta n° 5449. Pulmón. Inmunorreacción positiva frente a Pasteurella multocida en el interior de macrófagos. El animal mostró lesiones de neumonía enzoótica (++) y bronconeumonía purulenta, aislándose M. spp. También presentó inmunorreacción positiva frente a MmmLC. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40 (Nomarsky).

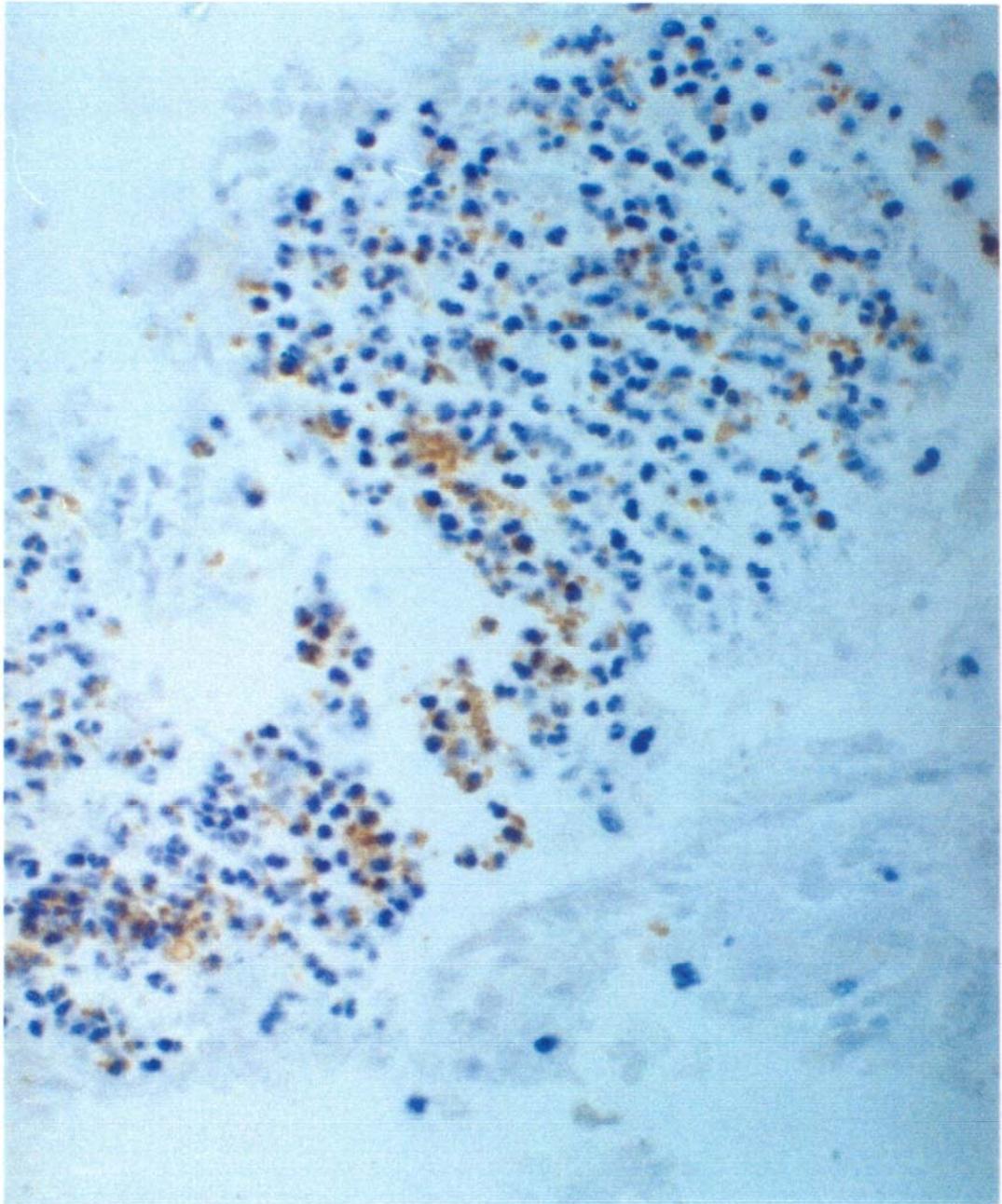


Figura 25.- Cabrito nº 18. Pulmón. Exudado bronquial catarropurulento con inmunorreacción positiva intra y extracelularmente frente a Pasteurella multocida. Streptavidina-biotina-peroxidasa. x20

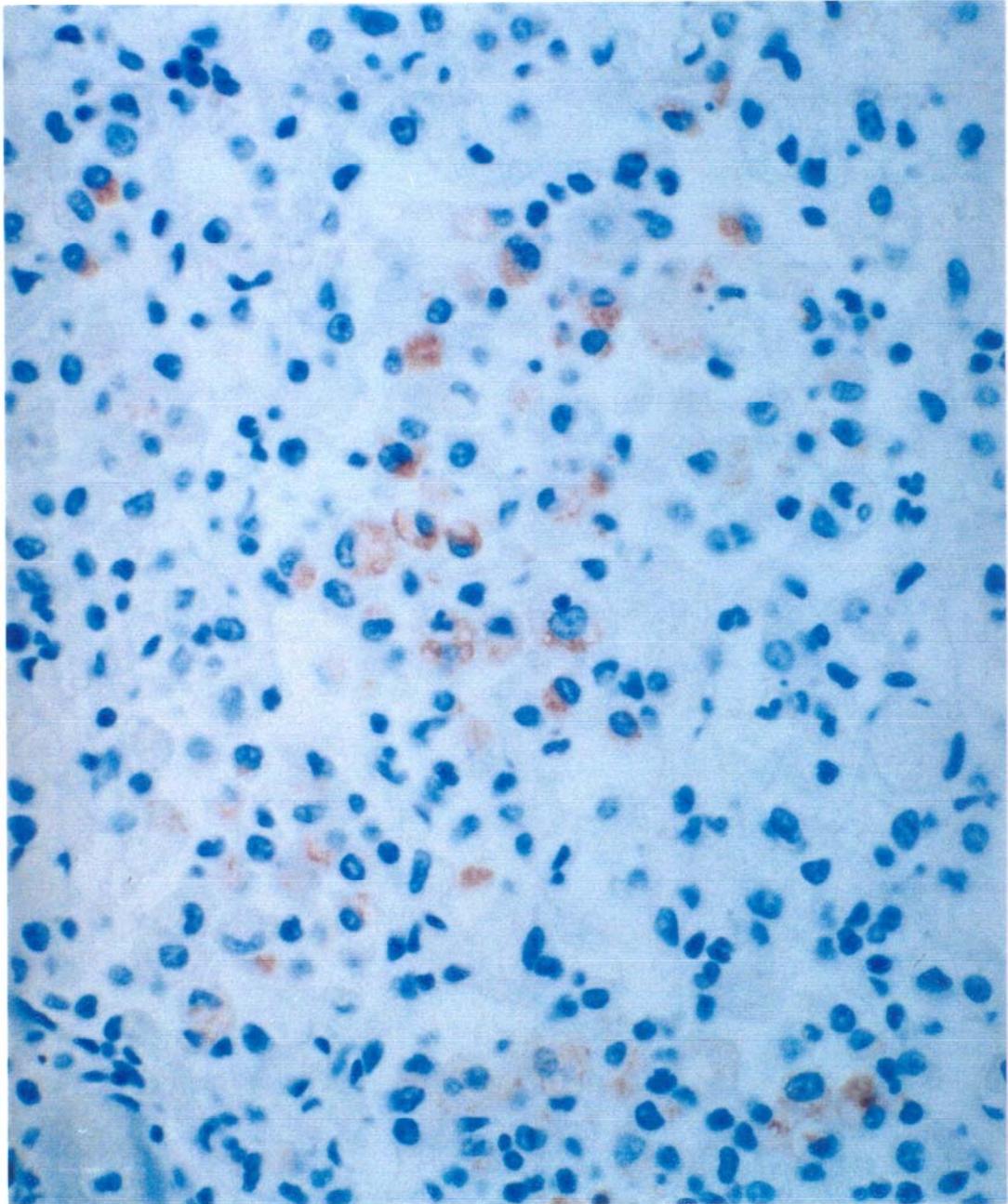


Figura 26.- Cabrito nº 5443. Pulmón. Inmunorreacción positiva frente a Pasteurella multocida en el citoplasma de macrófagos alveolares. Este animal presentó lesiones de neumonía enzoótica (+/++). Streptavidina-biotina-peroxidasa. x40

Discusión

En este trabajo se confirma la complejidad y carácter multifactorial de las micoplasmosis caprinas, en las que factores tales como la edad de los animales, las condiciones de manejo, las condiciones climáticas y la existencia de otras infecciones concomitantes son considerados como factores predisponentes de gran importancia en el inicio y desarrollo de la enfermedad (Lefèvre y cols., 1987b; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992).

En efecto, la edad de los animales objeto de estudio fue un factor determinante y diferencial que ha condicionado numerosos resultados del presente trabajo. El 85% de los cabritos estudiados presentaron lesiones macroscópicas de diferente grado a nivel pulmonar, mientras que en el caso de las cabras adultas estas lesiones fueron mucho menos frecuentes e intensas. Las lesiones macroscópicas que mostraron los animales de 3-4 meses de edad a nivel pulmonar consistieron en áreas de consolidación difusa con patrón lobulillar en los lóbulos pulmonares apical y medio derechos, turbidez de la pleura y presencia en algún caso de membranas de fibrina sobre la superficie pleural, estableciendo adherencias de forma inconstante entre los distintos lóbulos pulmonares y la pared costal. Estas lesiones se corresponden con las descritas por otros autores en infecciones del ganado caprino por MmmLC (DaMassa y cols., 1983a; Rosendal, 1983; DaMassa y cols., 1986; Bölske y cols., 1989; Rodríguez, 1993), Mmc (Kaliner y MacOwan, 1976; MacOwan, 1976; Ojo, 1976a; Rodríguez, 1993), M. capricolum subsp. capricolum (DaMassa y cols., 1983b; Cordy, 1984; DaMassa y cols., 1987b), y M. agalactiae (Cottew, 1984).

De igual forma la presencia de artritis (21% de los cabritos necropsiados), afectándose principalmente las articulaciones carpianas, ha sido descrita por otros autores en infecciones por MmmLC (Rosendal y cols., 1979; Bar-Moshe y Rapapport, 1981; DaMassa y cols., 1983a;

East y cols., 1983; Ruhnke y cols., 1983; Hazell y cols., 1985), *M. capricolum* subsp. *capricolum* (DaMassa y cols., 1983b y 1987b), *M. agalactiae* (Rosendal, 1988; DaMassa y cols., 1992; Real y cols., 1994) y *M. putrefaciens* (DaMassa y cols., 1987b; Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992; Rodríguez y cols., 1994).

El alto porcentaje de lesiones pulmonares observadas en los cabritos necropsiados puede explicarse atendiendo a la edad de los animales y al sistema inmune de estos animales. Ello indica claramente la importante función que desempeña el sistema inmune en las infecciones por micoplasmas, respuesta que ha sido perfectamente descrita en las infecciones por estos microorganismos en el ganado vacuno, y en las que son importantes el desarrollo y/o una respuesta inadecuada por parte de este sistema (Gourlay y Howard, 1982; Howard y Taylor, 1985).

Por el contrario, el desarrollo completo del sistema inmune en los animales adultos y la ausencia de factores predisponentes en la mayoría de éstos, tales como gestación y hacinamiento, junto con unas condiciones climáticas muy favorables en los meses previos al sacrificio (Agosto y especialmente Septiembre son meses muy calurosos en la isla de Gran Canaria), podrían explicar el bajo porcentaje de lesiones observadas en las cabras adultas.

Bajo el término de Neumonía Enzoótica se agrupan dos formas de neumonía presentes en grupos de animales jóvenes mantenidos en estrecho contacto. La importancia relativa de cada una de estas dos formas, una bronconeumonía exudativa aguda y una neumonía broncointersticial más crónica, difiere en función de la especie animal afectada (Jubb y cols., 1993). En el ganado ovino el término neumonía enzoótica se usó inicialmente para referirse a la pasteurelisis neumónica de la oveja, apareciendo otros términos para referirse a la forma más crónica, tales como neumonía intersticial proliferativa, neumonía exudativa proliferativa, neumonía atípica y neumonía crónica no progresiva. Para evitar confusiones, esta forma crónica debería denominarse también Neumonía Enzoótica, al igual que en vacuno y porcino (Jubb y cols., 1993).

El 82% de los cabritos necropsiados mostraron lesiones neumónicas compatibles con neumonía enzoótica, consistente histológicamente en una neumonía broncointersticial con linfoproliferaciones peribronquiales y peribronquiolares en las fases más crónicas. La lesión se asemeja fundamentalmente a la neumonía enzoótica descrita por otros autores en el ganado porcino (Neumonía Enzoótica Micoplásmica) (Jubb y cols., 1993) caracterizada por un marcado incremento de células mononucleares en los septos interalveolares y acúmulo de exudado en las luces alveolares, compuesto fundamentalmente por macrófagos alveolares. Igualmente, las linfoproliferaciones peribronquiolares pueden en ocasiones originar un estrechamiento de la luz de estas vías aéreas y el epitelio correspondiente puede encontrarse desprendido en bronquiolos donde existe una hiperplasia epitelial. Una lesión histológica típica

de la neumonía enzoótica de la oveja y que también hemos observado en algún animal, es la presencia de bronquiolitis obliterante, la cual aparece en el ganado ovino con mayor frecuencia dos meses después de la infección (Gilmour y cols., 1982).

El 35% de las cabras adultas también presentaron lesiones de neumonía enzoótica, con las mismas características histológicas que las descritas en el caso de los animales más jóvenes. Esta diferencia porcentual en cuanto a animales jóvenes y adultos difiere de la encontrada por Traore (1989) en un estudio realizado sobre 2200 ovejas y cabras; este autor definió una neumonía enzoótica, probablemente de múltiple etiología, caracterizada por una neumonía intersticial aguda o subaguda generalizada, complicada frecuentemente con neumonía exudativa, siendo los animales más afectados los de edades comprendidas entre los 2-3 años.

El origen de estas linfoproliferaciones podría atribuirse a una respuesta inmunológica inespecífica de tipo celular formada fundamentalmente por linfocitos T (Gourlay, 1981; Cassel y cols., 1985), si bien son necesarios estudios de determinación de subpoblaciones linfocitarias para corroborar esta hipótesis en las lesiones linfoproliferativas observadas en la neumonía enzoótica de estos animales.

Los aislamientos microbiológicos (o demostración histoquímica en el caso de los CAR-bacilli) a partir de los pulmones de cabritos con lesiones de neumonía enzoótica demuestran que son los micoplasmas los microorganismos más frecuentemente aislados de este tipo de lesión (46%), solos o en asociación con otros microorganismos tales como Pasteurella multocida y CAR-bacillus. Ello podría confirmar el alto grado de similitud de las lesiones en estos animales con las descritas en los cerdos jóvenes afectados de neumonía enzoótica, término que en ganado porcino se considera sinónimo de neumonía enzoótica micoplásmica, puesto que los microorganismos más frecuentemente aislados son M. hyopneumoniae y M. hyorhinis (Jubb y cols., 1993).

Ninguno de los micoplasmas aislados de los pulmones de cabritos con neumonía enzoótica fue identificado como M. ovipneumoniae, principal microorganismo asociado con la neumonía enzoótica del ganado ovino (Alley y Clarke, 1979; Gilmour y cols., 1979; Jones y cols., 1979; Gilmour y cols., 1982; Gracia y cols., 1987; Jones y Gilmour, 1991; Jubb y cols., 1993). Ello indica que en el caso del ganado caprino, micoplasmas como MmmLC, Mmc, M. putrefaciens, M. agalactiae, M. arginini y M. spp. pueden encontrarse asociados con lesiones de neumonía enzoótica en los animales más jóvenes.

La presencia de Pasteurella multocida (sola o junto a micoplasmas o CAR-bacilli) en un 18% de los pulmones de los cabritos afectados de neumonía enzoótica no coincide exactamente con los datos acerca de la neumonía enzoótica en la oveja, en la que Pasteurella haemolytica es el principal factor secundario y complicante de esta enfermedad (Gilmour y cols., 1979; Jones y cols., 1979; Jones y Gilmour, 1991; Baysal y Guler, 1992; Jubb y cols.,

1993). No obstante, Pasteurella multocida también ha sido asociada con la neumonía enzoótica de la oveja, al igual que otros microorganismos como M. arginini, Chlamydia psittaci ovis y Acholeplasma oculi (Jones y cols., 1982b). En la neumonía enzoótica porcina sí se ha descrito P. multocida como microorganismo complicante, junto con Actinomyces pyogenes, Haemophilus spp., Streptococcus spp., Staphylococcus spp., Klebsiella spp. y Bordetella bronchiseptica (Jubb y cols., 1993).

En el 25% de los cabritos con neumonía enzoótica se detectaron CAR-bacilli en el epitelio bronquial mediante la técnica de plata Warthin-Starry, solos o en asociación con micoplasmas o P. multocida. La presencia de estas bacterias filamentosas en el epitelio de bronquios de grandes dimensiones de cabritos inoculados experimentalmente con un aislado perteneciente al grupo M. mycoides ha sido descrita recientemente por Fernández y cols. (1995). Sin embargo en nuestro estudio un 14% de cabritos afectados de neumonía enzoótica presentaron CAR-bacilli no asociados a ningún otro microorganismo, lo que permite establecer por vez primera a estas bacterias como microorganismos asociados con la neumonía enzoótica de los cabritos.

Los aislamientos microbiológicos (o demostración histoquímica en el caso de los CAR-bacilli) a partir de los pulmones de cabras adultas afectadas de neumonía enzoótica demuestran que M. spp. estuvo asociado con estas lesiones en un 12% de los casos (solo o en asociación con CAR-bacilli), mientras que CAR-bacillus estuvo presente en el 45% de los pulmones con neumonía enzoótica (en un 39% no estuvo asociado con ningún otro microorganismo y en un 6% coexistió con M. spp.). Dado que no existe referencia bibliográfica alguna de presencia de CAR-bacillus en pulmón de caprinos adultos, ésta constituye la primera descripción de este microorganismo en pulmón de cabras adultas, así como la primera referencia de CAR-bacillus asociado con lesiones de neumonía enzoótica en cabras adultas.

La presencia de otros microorganismos asociados con las lesiones de neumonía enzoótica de los animales jóvenes y adultos necropsiados, tales como Staphylococcus spp., Streptococcus spp., Moraxella spp., Pseudomonas spp., y Bacillus spp. coincide con los datos aportados por otros autores al estudiar las bacterias aisladas de ovejas y cabras con neumonía enzoótica (Traore, 1989; Baysal y Guler, 1992).

Numerosos autores han demostrado la utilidad de la técnica argéntica de Warthin-Starry (Luna, 1968) para la demostración histoquímica de CAR-bacillus en muestras de tráquea y bronquios de diferentes especies animales fijadas en formol (van Zwieten y cols., 1980; MacKenzie y cols., 1981; Ganaway y cols., 1985; Waggie y cols., 1987; Matsushita y cols., 1989; Kurisu y cols., 1990; Shoji-Darkye y cols., 1991; Brogden y cols., 1993; Hastie y cols., 1993; Fernández y cols., 1995). En nuestro estudio dicha técnica fue la más apropiada para la detección de CAR-bacillus en el epitelio respiratorio de muestras fijadas en formol, si bien en

el caso de muestras fijadas en alcohol los resultados han sido negativos, lo que Rodríguez y Quesada (1993) atribuyen a la solubilidad de las granulaciones argentícas en alcohol.

El estudio ultraestructural de las tráqueas y bronquios Warthin-Starry positivos de los animales necropsiados permitió observar la presencia de un gran número de bacterias filamentosas asociadas a las células epiteliales ciliadas de la mucosa traqueal y bronquial, situadas de forma paralela entre los cilios. Las dimensiones de estos bacilos, con una longitud de 4-9 micras y un diámetro de 100-120 nm en la base y de 180-200 nm en la zona media se corresponden con los datos morfológicos descritos por otros autores al referirse al CAR-bacillus en ratas (van Zwieten y cols., 1980; MacKenzie y cols., 1981; Ganaway y cols., 1985; Matsushita y Joshima, 1989; Matsushita, 1991; Brogden y cols., 1993; Cundiff y cols., 1994), ratones (Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991), conejos (Waggie y cols., 1987; Matsushita y cols., 1989; Kurisu y cols., 1990; Shoji-Darkye y cols., 1991), hámster (Shoji-Darkye y cols., 1991), bovinos (Hastie y cols., 1993) y caprinos y ovinos (Fernández y cols., 1995). No obstante, estos datos morfológicos difieren de los descritos por Schoeb y cols. (1993) y Cundiff y cols. (1994) al referirse al CAR-bacillus en conejo, más corto que en otras especies, con una longitud de 3-5 micras.

La localización de estas bacterias en el aparato respiratorio de los animales necropsiados se redujo a la tráquea y bronquios de grandes y medianas dimensiones, no observándose CAR-bacillus en el epitelio ciliado de los bronquios de menores dimensiones y bronquiolos. Ello coincide con lo descrito por otros autores (van Zwieten, 1980; Ganaway y cols., 1985; Kurisu y cols., 1990; Shoji-Darkye y cols., 1991; Hastie y cols., 1993; Fernández y cols., 1995), si bien en ocasiones también ha sido referenciada la colonización del epitelio bronquiolar (MacKenzie y cols., 1981; Matsushita y Joshima, 1989; Matsushita, 1991).

Al igual que otros autores no hemos encontrado CAR-bacillus en el interior de células epiteliales, presentándose en todos los casos en relación a las células epiteliales ciliadas de tráquea y bronquios, y ordenándose de forma paralela entre los cilios del epitelio respiratorio, según la descripción inicial de van Zwieten y cols. en 1980. Sólomente Matsushita (1991) describió la localización intracelular de CAR-bacillus en células epiteliales necróticas descamadas. En ocasiones también hemos podido constatar la presencia de CAR-bacillus en relación a las células epiteliales descamadas, pero nunca intracelularmente.

El 24% de los cabritos necropsiados mostraron mediante la técnica de Warthin-Starry la presencia de CAR-bacillus en el epitelio ciliado del aparato respiratorio (6% en tráquea y 18% en bronquios). El 76% restante fueron Warthin-Starry negativos en dichas localizaciones orgánicas. En el caso de las cabras adultas, un 14% de los animales presentaron positividad sólo en el epitelio traqueal, un 6% lo hicieron en bronquios y un 8% en tráquea y bronquios de forma simultánea, siendo el resto de los animales (72%) Warthin-Starry negativos. Aunque

no existen datos epidemiológicos sobre la presencia de CAR-bacillus en el ganado caprino, nuestros resultados indican que la colonización del epitelio respiratorio por parte de esta bacteria en el ganado caprino es independiente de la edad del animal, puesto que los porcentajes de cabritos y cabras adultas Warthin-Starry positivos son similares. En el caso de otras especies animales, tampoco han sido descritas diferencias significativas debidas a la edad de los animales en la presencia de CAR-bacillus.

Se ha discutido anteriormente el posible significado de las lesiones de neumonía enzoótica halladas en cabritos y animales adultos asociadas con la presencia de CAR-bacillus. Las lesiones descritas en ratas de laboratorio que presentaron CAR-bacillus en el epitelio respiratorio ciliado (van Zwieten y cols., 1980) consistieron igualmente en fenómenos de linfoproliferación peribronquiales, así como bronquiectasias y bronquioloectasias. Descripciones similares han sido referenciadas en ratones infectados experimentalmente vía intranasal con cepas de CAR-bacillus procedentes de ratas (Matsushita y cols., 1989). Las lesiones descritas en infecciones naturales y experimentales en conejos han sido catalogadas como menos graves que las producidas en ratas (Kurusu y cols., 1990; Shoji-Darkye y cols., 1991), incluso se ha cuestionado la capacidad de CAR-bacillus para desarrollar traqueobronquitis y neumonía en esta especie (Cundiff y cols., 1994). Las lesiones observadas por Hastie y cols. (1993) en ganado vacuno con CAR-bacilli consistieron en ligeras infiltraciones de leucocitos en la submucosa traqueal, si bien no fue una observación constante. Finalmente, en la primera referencia de este microorganismo en cabritos y corderos (Fernández y cols., 1995) se describe la presencia de un moderado infiltrado linfoplasmocitario subepitelial a nivel traqueal y en los bronquios de mayores dimensiones de los cabritos, así como una neumonía crónica con intensa proliferación linfoide asociada a bronquios y bronquiolos e hiperplasia epitelial en los corderos.

Por lo tanto, las lesiones de neumonía enzoótica que hemos encontrado en los animales objeto de estudio son similares a las que origina la infección por CAR-bacillus en ratas, ratones y hámster (Ganaway y cols., 1985; Matsushita y cols., 1989; Shoji-Darkye y cols., 1991), así como las descritas por Fernández y cols. (1995) en la primera referencia de este microorganismo en caprino y ovino. El hecho de que en un 14% de los cabritos con neumonía enzoótica y en un 39% de las cabras adultas con esta misma lesión pulmonar haya sido CAR-bacillus el único microorganismo asociado con la lesión permite sospechar de la participación de esta bacteria en el desarrollo de este tipo de lesión.

Las lesiones en tráquea afectaron al 6% de los cabritos y al 28% de las cabras adultas, consistiendo en todos los casos en una traqueitis linfoplasmocitaria caracterizada por la presencia de un intenso infiltrado en áreas subepiteliales compuesto fundamentalmente por linfocitos y células plasmáticas, junto con una pérdida notable de cilios en determinados casos. Las tráqueas de los dos cabritos que presentaron traqueitis fueron Warthin-Starry positivas.

También en el caso de las cabras adultas con traqueitis, el porcentaje de animales con CAR-bacilli en tráquea se aproximó a la totalidad (92%). Ningún otro microorganismo fue aislado y/o demostrado inmunohistoquímicamente o ultraestructuralmente a partir de estas lesiones. Similares lesiones en tráquea asociadas a la presencia de CAR-bacillus han sido descritas previamente en ratas (van Zwieten y cols., 1980; MacKenzie y cols., 1981; Ganaway y cols., 1985; Matsushita y Joshima, 1989; Matsushita, 1989), ratones (Matsushita y cols., 1989), conejo (Kurusu y cols., 1990), hámster (Shoji-Darkye y cols., 1991), bovinos (Hastie y cols., 1993) y caprino (Fernández y cols., 1995). Estos datos permiten sugerir la capacidad de esta bacteria de originar traqueitis en el ganado caprino, si bien son necesarios estudios experimentales para demostrar su verdadero potencial patógeno.

Por otra parte, hay que destacar que el 85% de aquellos animales que presentaron traqueitis asociadas a la presencia de CAR-bacillus en el epitelio traqueal, también mostraron lesiones de neumonía enzoótica. La pérdida muy significativa de cilios descrita en bovinos (Hastie y cols., 1993) ya llevó a estos autores a sugerir que podría reducir la defensa mucociliar permitiendo así una infección más extensa. Creemos por tanto que la colonización del epitelio traqueal por esta bacteria en los animales objeto de estudio podría originar no sólo una traqueitis linfoplasmocitaria sino también una reducción del sistema ciliar de defensa inespecífica, lo que permitiría una infección más extensa hacia bronquios de estos bacilos y/o de otros microorganismos con tropismo respiratorio.

El carácter filamentoso de la inmunorreacción positiva observada en el borde epitelial de bronquios y tráquea Warthin-Starry positivos al utilizar un suero anti-Mmc desarrollado en conejo (cedido por el Dr. Poveda), y la falta de reacción en estas mismas localizaciones al utilizar otros sueros anti-M. mycoides, así como la demostración ultraestructural de la presencia de CAR-bacilli y el bajo o nulo número de micoplasmas observados mediante microscopía electrónica en estas áreas, permite sospechar la presencia de anticuerpos anti-CAR-bacillus en el citado suero anti-Mmc. Al no ser posible demostrar morfológicamente la presencia de CAR-bacillus en los conejos en los que se creó el citado antisuero, el hecho de que ya se ha descrito en conejos infectados naturalmente la presencia de anticuerpos anti-CAR-bacillus (Kurusu y cols., 1990), explicaría la contaminación del antisuero.

Sin embargo, no se observó inmunorreacción positiva con el suero anti-CAR bacillus de rata (cedido por el Dr. Matsushita) en ninguno de los animales inicialmente Warthin-Starry positivos. Muy recientemente se ha demostrado que CAR-bacillus de conejo está muy relacionado con el género Helicobacter (Cundiff y cols., 1995), mientras que CAR-bacillus de rata está más relacionado con el género Flavobacterium (Schoeb y cols., 1993). Nuestros resultados inmunohistoquímicos podrían sugerir por lo tanto que el CAR-bacillus presente en

cabra se aproximaría al CAR-bacillus descrito en conejo, si bien con diferencias morfológicas. En cualquier caso será necesario el aislamiento de este microorganismo para confirmar esta hipótesis.

El Comité Internacional de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE), reunido en su 62ª Asamblea General (1994), ya menciona en la Resolución nº XI "Infecciones por micoplasmas en los bovinos, ovinos y caprinos: métodos de diagnóstico y control sanitario", las dificultades que entraña el diagnóstico microbiológico de las micoplasmosis. A lo largo de este estudio hemos podido comprobar efectivamente la dificultad del aislamiento microbiológico que presentan algunos micoplasmas, siendo necesario un especial esmero a la hora de elaborar los apropiados medios de cultivo.

Como medio de cultivo artificial libre de células para el crecimiento de micoplasmas utilizamos el medio SP-4, tanto líquido como sólido, siguiendo la fórmula de Whitcomb (1983), modificada por Poveda (Poveda, 1994, comunicación personal). Los principales cambios en dicha fórmula consistieron en la sustitución de Yeastolate (DIFCO) por Yeast Extract (DIFCO), así como la eliminación de la glucosa, con la finalidad de que de esta forma tuviesen iguales probabilidades de crecimiento micoplasmas fermentativos y no fermentativos en caso de cultivos mixtos. Por otra parte, hay que destacar el efecto disgenésico que puede conllevar la adición de glucosa al medio, ya que no siendo imprescindible para el crecimiento de los micoplasmas, en el caso de especies fermentativas de rápido crecimiento, los metabolitos ácidos surgidos del catabolismo de este azúcar pueden provocar un manifiesto descenso del pH del medio, con la consiguiente inactivación del crecimiento (Poveda, 1988). Estas modificaciones han permitido el aislamiento de micoplasmas no fermentativos como M. agalactiae y M. arginini en cultivos mixtos con otros micoplasmas fermentativos.

El proceso de clonaje, normalizado por el Subcomité de Taxonomía de la Clase Mollicutes (1979), garantiza la obtención de cultivos puros, aunque existen algunas circunstancias que lo dificultan, como la asociación en la muestra de micoplasmas con similar velocidad de replicación, lo que dificulta en gran medida su aislamiento (Poveda, 1988). En nuestro estudio hemos podido comprobar que después del procesamiento de 28 aislamientos, 3 de ellos se encontraban mezclados, si bien fueron fácilmente clonados para su posterior identificación.

La técnica de inhibición del crecimiento, aunque es altamente específica, plantea en ocasiones problemas de interpretación, ya que como señala Clyde (1983), los efectos inhibitorios no consisten siempre en una zona definida alrededor del disco con el antisuero. Aunque algunos factores que afectan directamente a esta técnica pueden ser estandarizados, como el tamaño y título del inóculo o la calidad del antisuero empleado, hay que tener en cuenta el factor de variación existente entre las cepas de una misma especie de micoplasma, lo

que puede originar diferencias significativas en los halos de inhibición (Poveda, 1988). En nuestro estudio, hemos observado frecuentemente una zona de clarificación del crecimiento, manifiesta incluso a simple vista, pero en la cual podían apreciarse algunas colonias. Todos los autores que han descrito el fenómeno coinciden en señalar que las colonias que crecen en las cercanías del disco son resistentes al efecto inhibitorio del antisuero (Stanbridge y Hayflick, 1967; Hayflick, 1969; Clyde, 1983; Poveda, 1988). Por todo ello, los datos aportados por el perfil bioquímico, constituyen un elemento complementario a la hora de establecer una identificación definitiva.

Atendiendo únicamente a los micoplasmas aislados de pulmón, en el 49% de los cabritos necropsiados se aislaron micoplasmas, lo que supone un elevado porcentaje si se compara con los resultados obtenidos en el caso de las cabras adultas, con sólo un 6% de animales positivos al aislamiento de micoplasmas. Estos resultados confirman la importancia de la edad de los animales como factor predisponente en las infecciones micoplásmicas, hecho ya apuntado por otros autores (Lefèvre y cols., 1987b; Jones, 1989; Damassa y cols., 1992).

Se aislaron micoplasmas pertenecientes al grupo M. mycoides en un 12% de los cabritos necropsiados (MmmLC 3% y Mmc 9%), corroborando por tanto estudios previos realizados sobre esta misma explotación a raíz del brote de pleuroneumonía caprina de 1990, en los que se referenció por primera vez el aislamiento de Mmc en España en un brote de pleuroneumonía caprina y el aislamiento de MmmLC en las Islas Canarias (Villalba y cols., 1992).

El aislamiento de M. putrefaciens de pulmón del 21% de los cabritos estudiados es un dato de especial relevancia, dado que ningún autor ha referenciado un porcentaje similar en muestras de pulmón. En un brote de mamitis y artritis que requirió la destrucción de todo un rebaño de 700 cabras en California, sólomente dos animales (una cabra adulta y un cabrito de 2 semanas de edad) fueron positivos al aislamiento de M. putrefaciens de muestras pulmonares (Damassa y cols., 1987a). En un brote de poliartritis en cabritos descrito por Rodríguez y cols. (1994) se aisló M. putrefaciens de sangre, tráquea y líquido sinovial, siendo negativas las muestras de pulmón. En cuanto a las lesiones observadas en nuestro estudio, todos los cabritos de cuyo pulmón se aisló M. putrefaciens presentaron lesiones histológicas a nivel pulmonar, consistentes en neumonía enzoótica (96%) y bronconeumonía purulenta (4%). No existen en la bibliografía referencias de lesiones pulmonares en ganado caprino asociadas al aislamiento de M. putrefaciens. Así, en el brote descrito por Damassa y cols. (1987), el cabrito de cuyo pulmón fue aislado este micoplasma no mostró lesiones histológicas a nivel pulmonar. Otros autores atribuyen la falta de lesiones pulmonares en infecciones por M. putrefaciens a una falta de tropismo de éste por el pulmón (Adler y cols., 1980; Gaillard-Perrin y cols., 1985; Damassa y cols., 1987a; Rodríguez y cols., 1994). Aunque en algunos de los cabritos de los que se aisló M. putrefaciens también se aislaron otros microorganismos asociados como M. agalactiae, M.

spp., P. multocida y Moraxella spp., en casi la mitad de ellos (43%) el único aislamiento a partir de pulmón fue M. putrefaciens. Si bien son necesarios por tanto estudios experimentales que demuestren el posible tropismo de este microorganismo por el pulmón, así como su potencial patógeno, nuestros resultados permiten asociar por primera vez el aislamiento de M. putrefaciens con lesiones pulmonares encuadradas dentro de lo que hemos llamado neumonía enzoótica de los cabritos y/o a bronconeumonía purulenta.

En el 9% de los cabritos necropsiados se aisló M. agalactiae de pulmón. Este micoplasma también ha sido aislado de pulmón por otros autores (Gupta y cols., 1984; Guha y Verma, 1987a; Cottew, 1984) y algunos estudios experimentales han demostrado que M. agalactiae puede provocar, por vía intratraqueal, neumonías en cabritos de 2-4 meses de edad (Guha y Verma, 1987a). En dos de los cabritos de cuyos pulmones se aisló M. agalactiae se observaron lesiones de neumonía enzoótica, si bien también se aislaron en estos casos P. multocida y M. putrefaciens respectivamente. El único cabrito con M. agalactiae como único aislamiento a nivel pulmonar no mostró cambios histológicos significativos en este órgano. Estos datos no permiten por tanto asociar a este micoplasma con las lesiones neumónicas observadas en nuestro estudio, si bien según nuestra experiencia no deben descartarse (Fernández, 1995, comunicación personal).

M. arginini fue aislado del pulmón en uno de los cabritos estudiados. Clásicamente se ha considerado a M. arginini como un micoplasma apatógeno para el ganado caprino, pero recientemente ha sido descrito un brote de neumonía caprina en Brasil con una mortalidad del 20% en el que se aislaron M. arginini y M. ovipneumoniae de pulmón, siendo según los autores el primer caso de neumonía caprina debida a M. arginini en Brasil (Gomes y cols., 1994). Creemos que las lesiones observadas en nuestro caso (neumonía enzoótica y bronconeumonía purulenta) pueden deberse al sinergismo con otros microorganismos como P. multocida y CAR-bacillus, que fueron demostrados mediante técnicas inmunohistológicas e histoquímicas respectivamente.

En un 15% de los cabritos estudiados se aisló de pulmón un micoplasma que mostró un crecimiento muy lento en los medios de cultivo utilizados, hidrolizó la arginina siendo negativas el resto de las pruebas de identificación bioquímica, así como también lo fue a las pruebas serológicas de identificación, después de emplear todos los sueros anti-micoplasmas caprinos de que disponíamos. Este micoplasma ha quedado referenciado en nuestro trabajo como M. spp., siendo necesario el empleo de otros métodos de identificación que nos permitan finalmente caracterizarlo.

Todos los cabritos que mostraron artritis (21%) fueron positivos al aislamiento de micoplasmas en pulmón y/o bazo. A partir del pulmón de estos animales se aislaron MmmLC, M. putrefaciens y M. agalactiae, mientras que M. capricolum subsp. capricolum fue aislado a

partir del bazo de uno de ellos. No se cultivaron muestras de las articulaciones, con lo que nos es imposible determinar con certeza si estos micoplasmas participaron en la lesión, si bien es lo más probable dado el tropismo de estos microorganismos por esta región anatómica (DaMassa y cols., 1987b). Por otra parte, el no aislamiento de micoplasmas a partir de la sangre de estos animales, impide establecer con certeza la posibilidad de una septicemia como causa de la artritis, mecanismo patogénico ya señalado por otros autores (DaMassa y cols., 1987b; Blood y cols., 1988; DaMassa y cols., 1992; Rodríguez y cols., 1994). Sin embargo, podría deberse a una fase septicémica transitoria (Howard y Taylor, 1985), lo que justifica la importancia de este tipo de mecanismo patogénico en las micoplasmosis caprinas.

En el caso de las cabras adultas, sólo un 6% fueron positivas al aislamiento de micoplasmas en pulmón, no pudiendo determinar la especie en ninguno de los casos, quedando referenciado como M. spp. Este micoplasma presentó en todos los casos idénticas características de crecimiento y perfil bioquímico que las descritas anteriormente para el M. spp. aislado en cabritos, resultando igualmente negativas las pruebas serológicas de identificación.

También se aislaron a partir de otros órganos M. agalactiae (bazo y ganglio), Ureaplasma spp. (bazo) y M. putrefaciens (bazo y útero). En un brote de pleuroneumonía y artritis en un rebaño de 700 cabras en California, M. putrefaciens fue aislado del bazo de una hembra adulta (DaMassa y cols., 1987a). Estos mismos autores también describieron el aislamiento de M. putrefaciens a partir de otros tejidos y fluidos por primera vez, tales como cerebro, riñón, pulmón, ganglios linfáticos y orina. Rodríguez y cols. (1994) describieron el aislamiento de M. putrefaciens a partir de sangre, tráquea y líquido sinovial de cabritos con poliartritis. Sin embargo, no existe en la bibliografía ninguna referencia sobre el aislamiento de este micoplasma en bazo, lo que indica su llegada sanguínea (septicemia transitoria), poniendo de manifiesto la necesidad de estudios complementarios que permitan establecer la patogenicidad real de M. putrefaciens en el ganado caprino.

No se aislaron micoplasmas a partir de la sangre de ninguno de los 83 animales estudiados. Diversos autores hacen referencia al curso agudo de algunas de las infecciones producidas por micoplasmas pertenecientes al grupo M. mycoides. Se detecta en estos casos una fase septicémica generalmente de corta duración (DaMassa y cols., 1983a; Jones, 1989; DaMassa y cols., 1992; Rodríguez, 1993). Las formas crónicas de estas infecciones micoplásmicas suelen ser aseptícemicas, no detectándose micoplasmas en sangre (Perreau, 1979b; DaMassa y cols., 1986). El último brote de pleuroneumonía en esta explotación había tenido lugar siete meses antes del sacrificio, realizándose éste en un período en el que no observamos enfermedad micoplásmica aguda en ninguno de los animales necropsiados. En los animales adultos, el bajo número de micoplasmas patógenos aislados, así como la menor intensidad de las lesiones observadas, justifican estos resultados. En los

cabritos, dado el mayor número de aislamientos de micoplasmas junto con el alto porcentaje de animales con lesiones pulmonares, los resultados microbiológicos negativos en sangre podrían justificarse por la septicemia de carácter transitorio descrita por Howard y Taylor (1985), siendo en estos animales en los que persistieron los micoplasmas patógenos Mmc y MmmLC causantes de los brotes previos de pleuroneumonía descritos en esta explotación.

En el 15% de los cabritos estudiados se aisló Pasteurella multocida a partir de muestras del parénquima pulmonar. Aunque se cita en la bibliografía una mayor prevalencia de P. haemolytica en los pequeños rumiantes (Carter, 1967; Gilmour, 1980; Baysal y Guler, 1992; Sanchís y Abadie, 1992), todos los aislamientos que obtuvimos fueron identificados como P. multocida. En estudios llevados a cabo por otros autores también se señalan un mayor número de aislamientos de P. multocida (Sharma y cols., 1989; Upadhyaya y Rahman, 1993; Viera y cols., 1993). En todos los cabritos de nuestro trabajo P. multocida estuvo asociada con el aislamiento de otros microorganismos, como M. putrefaciens, M. agalactiae, Mmc, M. spp., o con la demostración histoquímica de CAR-bacillus en bronquios. Las infecciones dobles, Mycoplasma spp. más Pasteurella spp. han sido descritas por otros autores (Jones y cols., 1978; Davies y cols., 1981; Doutre y Perreau, 1983a; Rodríguez, 1993), no habiendo sido referenciada hasta el momento una infección doble Pasteurella spp. más CAR-bacillus. Jones y cols. (1978) describen una infección conjunta de M. ovipneumoniae y P. haemolytica en ganado ovino que indujo una neumonía crónica acompañada, en algunos casos, de pleuritis. Nuestros resultados parecen indicar, al igual que lo señalado por otros autores (Doutre y Perreau, 1983a) que las neumonías en las que se aísla Pasteurella spp. se deben a la complicación por otros microorganismos. El no aislamiento de Pasteurella spp. en los animales adultos necropsiados, en los que sólo fue aislado M. spp. en un bajo porcentaje (6%) parece confirmar esta hipótesis.

Numerosos autores han empleado técnicas inmunocitoquímicas en tejidos fijados con el fin de detectar antígenos micoplásmicos (Hill, 1978; Polak-Vogelzang y cols., 1978; Martín de las Mulas y cols., 1990; Rodríguez, 1993; Scanziani y cols., 1994), llegando a hipotetizar, en algunos casos, la posibilidad de diferenciar micoplasmas "in situ", lo que obviaría problemas en el clonaje cuando coexisten micoplasmas con diferente velocidad de crecimiento (Martín de las Mulas, 1990). En nuestro estudio, un 27% de los cabritos mostraron inmunorreacción positiva frente a M. mycoides, caracterizada por su aspecto puntiforme, generalmente en el citoplasma de neutrófilos y macrófagos, y también en el borde apical de células epiteliales descamadas al igual que lo descrito por otros autores (Rodríguez, 1993; Scanziani y cols., 1994). Sólo una cabra adulta presentó inmunorreacción positiva frente a M. mycoides.

Todos los animales de los que se aisló M. mycoides mostraron inmunorreacción positiva frente a estos micoplasmas en pulmón, con las características morfológicas señaladas

anteriormente. En otros 5 animales con inmunorreacción positiva frente a M. mycoides se aislaron diferentes especies de micoplasmas, como M. putrefaciens, M. agalactiae y M. spp., mientras que en un animal inmunohistoquímicamente positivo no fue aislado ningún micoplasma. Estos resultados se asemejan en algunos aspectos a los descritos por Scanziani y cols. (1994) en un estudio sobre la utilidad de las técnicas inmunohistoquímicas en el diagnóstico de la Perineumonía Contagiosa Bovina (PNCB). Estos autores señalan que sobre un total de 82 animales con PNCB se detectó antígeno de M. mycoides en 16 casos microbiológicamente negativos, mientras que M. mycoides nunca se aisló de pulmones inmunohistoquímicamente negativos, destacando por tanto la mayor sensibilidad de estos métodos frente al aislamiento microbiológico (Scanziani y cols., 1994). Nuestros resultados indican también una mayor sensibilidad de las técnicas de detección inmunohistológica de antígenos micoplásmicos frente al aislamiento microbiológico.

Por otro lado, los 2 animales inmunohistoquímicamente positivos frente a M. mycoides en los que se había aislado M. putrefaciens mostraron una inmunorreacción muy intensa al utilizar el suero anti-M. putrefaciens. La inmunorreacción frente a M. mycoides en estos casos podría deberse por tanto a reacciones cruzadas entre estos dos micoplasmas. Sin embargo no se han descrito reacciones cruzadas entre M. mycoides y M. putrefaciens. Otra posibilidad, pensamos que más probable, es que en estos animales las dificultades intrínsecas del aislamiento microbiológico hubieran impedido el aislamiento de MmmLC lo que confirmaría la mayor sensibilidad de los métodos inmunohistológicos (Scanziani y cols., 1994).

La detección de antígeno de P. multocida en tejidos fijados ha demostrado, en base a nuestros resultados, una mayor sensibilidad que el aislamiento microbiológico ya que un 21% de los cabritos y un 8% de las cabras adultas mostraron inmunorreacción positiva, frente a los porcentajes de aislamiento del 15% y 0% respectivamente.

Jones y Wood (1988), en un estudio serológico sobre 422 cabras adultas, mediante hemoaglutinación indirecta, encontraron que el 7% de los sueros tenían anticuerpos frente a Mmc, el 2,6% frente a M. biotipo F-38 (actual M. capricolum subsp. capripneumoniae) y el 3,6% frente a ambos microorganismos. Ghosh y cols. (1989) detectaron anticuerpos frente a Mmc en el 26% de las 135 cabras adultas estudiadas. Bloch y Diallo (1991) hallaron en un estudio similar que el 2,3% de los 704 animales estudiados mediante el test de fijación del complemento poseían anticuerpos frente a M. F-38. Nuestro estudio serológico frente a MmmLC llevado a cabo en 192 sueros (33 cabritos y 159 cabras adultas) demostró la escasa respuesta humoral por parte de los animales más jóvenes (0%) mientras que un 12% de las cabras adultas presentaron títulos significativos de anticuerpos frente a este microorganismo, lo que contrasta con un considerable número de aislamientos. Esto indica el interés de los mecanismos de persistencia de estos micoplasmas con un importante potencial patógeno, como se venía demostrando en esta explotación (Rodríguez, 1993).

Numerosos autores han señalado la variabilidad del poder inmunógeno entre las diferentes especies y cepas de micoplasmas (Cassel y cols., 1985; Howard y Taylor, 1985; Poveda, 1988; Ross y Young, 1993). Por otra parte, los micoplasmas más patógenos eluden la respuesta inmunitaria del hospedador mediante fenómenos de tolerancia al estimularse preferentemente los linfocitos T supresores (Cassel y cols., 1985). Este hecho podría considerarse en los animales adultos, así como en los jóvenes la edad y sus condiciones de manejo para explicar los resultados serológicos encontrados. En el caso particular de las cabras adultas, dado que la mayoría de los animales serológicamente positivos no fueron necropsiados, nos resulta difícil establecer con certeza una relación seropositividad/infección, si bien cabría esperar una baja tasa de infección en base a los resultados obtenidos en el resto del rebaño necropsiado, teniendo en cuenta que el último brote de la enfermedad tuvo lugar 7 meses antes del momento del sacrificio. Todo ello indica una protección escasa en el ganado adulto, predisponiéndolo a la infección por cepas de micoplasmas reactivadas o nuevas que entren en la granja.

En cuanto a la metodología empleada y con el fin de explicar el bajo número de animales positivos hallado mediante la técnica de Blocking ELISA, se realizaron algunas pruebas control mediante Western Blot, llegando a la conclusión de que, o bien el epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 4F10B2 frente a MmmLC no es inmunodominante, o bien no pertenece al repertorio inmunológico de todos los animales. Estos resultados limitarían, por tanto, el uso de este anticuerpo monoclonal en cualquier test serológico, aunque podría ser usado para la detección de antígeno (Thiaucourt, 1994, comunicación personal).

En cuanto a los datos hematológicos del colectivo de animales necropsiados no observamos cambios significativos con respecto a la normalidad en los distintos parámetros analizados. Los datos hematológicos aportados por otros autores en el caso de infecciones micoplásmicas han sido muy variables. Así, en una inoculación experimental con Mmc desarrollada por Alafiatayo y cols. (1990) se demostró durante la fase aguda una significativa leucocitosis debida a una neutrofilia con regeneración a la izquierda, mientras que las cabras que sobrevivieron presentaron valores normales después de la segunda semana tras la infección. Tampoco observaron cambios significativos en el recuento eritrocitario, concentración de hemoglobina y volumen corpuscular medio. En el caso de infecciones por MmmLC, East y cols. (1983) y Nayak y Bhowmik (1983) también describen una neutrofilia en la fase aguda y una leucopenia y neutropenia en la fase crónica de la enfermedad. Finalmente, en infecciones mixtas por Mmc y MmmLC no se hallaron cambios significativos en la fórmula leucocitaria (Ojo, 1976b). El carácter eminentemente crónico-subclínico de la infección micoplásmica en la explotación objeto de estudio justifica por tanto los resultados hematológicos obtenidos no confiriendo un valor indicador de la infección.

Conclusiones

PRIMERA.- Un 82% de los animales jóvenes y un 35% de los adultos presentaron lesiones pulmonares. Estas lesiones consistieron fundamentalmente en una neumonía broncointersticial con linfoproliferaciones a nivel peribronquial y peribronquiolar, lesiones que encuadramos dentro de la denominación de neumonía enzoótica.

SEGUNDA.- En los cabritos estudiados se aislaron de pulmón M. mycoides (MmmLC y Mmc) (12%), M. putrefaciens (21%), M. agalactiae (9%), M. arginini (3%), M. spp. (15%) y Pasteurella multocida (15%). Los aislamientos microbiológicos (o demostración histoquímica en el caso de CAR-bacillus) a partir de los pulmones de cabritos con lesiones de neumonía enzoótica demuestran que son los micoplasmas los microorganismos más frecuentemente aislados de este tipo de lesión (46%), solos o en asociación con otros microorganismos tales como Pasteurella multocida (18%) y/o CAR-bacillus (25%).

TERCERA.- En el 6% de las cabras adultas estudiadas se aisló de pulmón M. spp. Los aislamientos microbiológicos (o demostración histoquímica en el caso de CAR-bacillus) a partir de los pulmones de cabras adultas afectadas de neumonía enzoótica demuestran que M. spp. estuvo asociado con estas lesiones en un 12% de los casos, mientras que CAR-bacillus estuvo presente en el 45% de los pulmones con neumonía enzoótica.

CUARTA.- El estudio inmunohistológico demostró una mayor sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas frente al aislamiento microbiológico. Así, un 27% de los cabritos estudiados y un 2% de las cabras adultas mostraron inmunorreacción positiva frente a M. mycoides. Un 21% de los cabritos y un 8% de los animales adultos evidenciaron positividad frente a Pasteurella multocida.

QUINTA.- CAR-bacillus estuvo presente en el epitelio respiratorio ciliado de los cabritos (24%) y cabras adultas (28%). En el 14% de los cabritos con neumonía enzoótica y en el 39% de las cabras adultas con esta misma lesión pulmonar CAR-bacillus fue el único microorganismo asociado con la lesión.

SEXTA.- Los resultados microbiológicos, inmunohistológicos y serológicos indican la pasajera protección humoral y la predisposición de este rebaño a padecer infecciones virulentas por MmmLC y Mmc persistentes en los animales más jóvenes del colectivo.

Resumen

En el presente trabajo se ha realizado un estudio histológico, inmunohistológico y microbiológico del aparato respiratorio de 83 animales sacrificados (33 cabritos y 50 cabras adultas) pertenecientes a un rebaño con antecedentes de pleuroneumonía caprina causada por micoplasmas del grupo M. mycoides y que fue sacrificado en su totalidad.

Un 82% de los animales jóvenes y un 35% de los adultos presentaron lesiones pulmonares. Estas lesiones consistieron fundamentalmente en una neumonía broncointersticial con linfoproliferaciones a nivel peribronquial y peribronquiolar, lesiones que encuadramos dentro de la denominación de neumonía enzoótica.

En los cabritos estudiados se aislaron de pulmón M. mycoides (MmmLC y Mmc) (12%), M. putrefaciens (21%), M. agalactiae (9%), M. arginini (3%), M. spp. (15%) y Pasteurella multocida (15%), siendo los micoplasmas los microorganismos asociados en un mayor porcentaje con las lesiones de neumonía enzoótica. M. spp. fue aislado de un 6% de animales adultos. Por otra parte, este trabajo constituye la primera referencia de M. putrefaciens asociado a lesiones pulmonares. Los resultados del estudio microbiológico demuestran que los cabritos constituyeron la principal fuente de MmmLC y Mmc, micoplasmas causantes de los brotes previos de pleuroneumonía caprina en este rebaño.

El estudio inmunohistológico demostró una mayor sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas frente al aislamiento microbiológico. Así, un 27% de los cabritos y un 2% de las cabras adultas mostraron inmunorreacción positiva frente a M. mycoides. Un 21% de los cabritos y un 8% de los animales adultos evidenciaron positividad frente a Pasteurella multocida.

Por otra parte, se demostró la presencia de CAR-bacillus en el epitelio respiratorio ciliado de cabritos (24%) y cabras adultas (28%), constituyendo la primera referencia de este

microorganismo en el aparato respiratorio de estas últimas. También se asocia, por primera vez, la presencia de CAR-bacillus a nivel del epitelio bronquial con lesiones de neumonía enzoótica en caprino, así como la asociación de CAR-bacillus a una traqueitis linfoplasmocitaria de moderada a grave muy característica.

El estudio serológico frente a MmmLC llevado a cabo en 192 animales (33 cabritos y 159 cabras adultas) demostró la escasa respuesta humoral por parte de los animales más jóvenes (0%), mientras que el 12% de las cabras adultas presentaron títulos significativos de anticuerpos, no habiéndose aislado de estos animales ningún micoplasma del grupo M. mycoides.

Summary

In the present work we have carried out a histological, immunohistological and microbiological study on the respiratory system of 83 goats (33 kids and 50 adults) belonging to a herd with a background of caprine pleuropneumoniae caused by mycoplasmas belonging to the M. mycoides cluster. All animals of the herd were euthanized.

Pulmonary lesions were observed in 82% of the kids studied and 20% of the adult goats. These lesions were characterized by a bronchointerstitial pneumonia accompanied by peribronchial and peribronchiolar lymphoid cuffing, being included under the denomination of enzootic pneumonia.

The percentage frequency of isolation of different microorganisms from the lungs of the kids was as follows: M. mycoides (MmmLC and Mmc) (12%), M. putrefaciens (21%), M. agalactiae (9%), M. arginini (3%), M. spp. (15%) and Pasteurella multocida (15%). Mycoplasmas were highest associated to the lesions of enzootic pneumonia. M. spp. was isolated from 6% of adult goats. This work is the first reference of M. putrefaciens associated with pulmonary lesions. Microbiological results showed that the kids were the main source of MmmLC and Mmc, mycoplasmas causing of the previous outbreaks of caprine pleuropneumonia in this herd.

Compared with the microbiological culture, sensitivity of the immunohistochemical techniques was higher, detecting M. mycoides antigen in 27% of the kids studied and 2% of the adult goats, and Pasteurella multocida antigen in 21% of the kids and 8% of the goats.

On the other hand, CAR-bacillus was detected between the cilia on respiratory epithelium, being the first reference of this microorganism in the respiratory tract of adult goats. It is described for the first time the association between CAR-bacillus on the bronchial epithelium and lesions of enzootic pneumonia. Also, the association of CAR-bacillus with a very characteristic mild to severe lymphoplasmocytic tracheitis.

The serological study for MmmLC included 192 animals (33 kids and 159 adult goats) and showed a weak humoral response of the kids (0%). Antibody titres against MmmLC were detected in 12% of the goats, but no mycoplasmas belonging to the M. mycoides cluster were isolated from these animals.

Agradecimientos

Expreso mi agradecimiento a todas las personas, compañeros y amigos, que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo y, en especial, a los directores de esta Tesis, los Dres. D. Antonio Fernández Rodríguez y D. José B. Poveda Guerrero por su entusiasmo y apoyo constante, así como por imbuirme su espíritu investigador y rigurosidad científica.

Igualmente expreso mi gratitud al Dr. F. Thiaucourt por su inestimable colaboración en el estudio serológico.

Bibliografía

Adesotoye, A.I. and Ojo M.O. (1990). Failure to induce experimental arthritis in Nigerian goats by Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (LC Type). IOM letters, program and Abstracts, 8th Int. Congr. IOM, July 8-12, Istanbul, Turkey. 1:343-344.

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(10): 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. (1971). The practical application of immunofluorescence (agar block technique) for the identification of mycoplasma. Avian Diseases. 3: 519-542.

Al-Aubaidi, J.M., Dardiri, A.H. and Fabricant, J. (1972). Biochemical characterization and antigenic relationship of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (Freundt) and Mycoplasma mycoides subsp. capri (Edward) Freundt. International Journal of Systemic Bacteriology. 22: 155-164.

Al-Darraji, A.M., Cutlip, R.C., Lehmkuhl, H.D., Graham, D.L., Kluge, J.P. and Frank, G.H. (1982). Experimental infection of lambs with bovine respiratory syncytial virus and Pasteurella haemolytica: Clinical and microbiologic studies. Am. J. Vet. Res. 42: 236-240.

Aluotto, B.B., Wittler, R.G., Williams, C.O. and Faber, J.E. (1970). Standardized bacteriologic techniques for the characterization of Mycoplasma species. International Journal of Systematic Bacteriology, 20: 35-38.

Alley, M.R. and Clarke, J.K. (1979). The experimental transmission of ovine chronic non-progressive pneumonia. New Zealand Veterinary Journal. 27: 217-220.

Amanfu, W., Weng, C.N., Ross, R.F. and Barness, H.J. (1984). Diagnosis of mycoplasmal pneumonia of swine: sequential study by direct immunofluorescence. Am. J. Vet. Res. 45: 1349-1352.

- Barber, T.L. and Yedloutschnig, R.J.** (1969). Mycoplasma infections of goats. Cornell Vet. 60: 297-308.
- Barile, M.F.** (1981). Mycoplasma infection of cell cultures. Isr. J. Med. Sci. 17: 555-558.
- Barile, M.F.** (1983). Arginine Hydrolysis. In Methods in Mycoplasmaology Vol. I. Razin, S. and J.G. Tully eds., New York, Academic Press, pp 345-349.
- Bar-Moshe, B. and Rapapport, E.** (1979). An outbreak of contagious caprine pleuropneumonia caused by Mycoplasma mycoides subspecies mycoides (ovine/caprine serogroup 8). Refuati veterinarith. 36: 53-54.
- Bar-Moshe, B. and Rapapport, E.** (1981). Observations on Mycoplasma mycoides subsp. mycoides infection in Saanen goats. Isr. J. Med. Sci. 17: 537-539.
- Bascunana, C.R., Mattsson, J.G., Bölske, G. and Johansson, K.E.** (1994). Characterization of the 16rRNA genes from Mycoplasma sp. Strain F-38 and development of an identification system based on PCR. Journal of Bacteriology 176 (9): 2577-2586.
- Bashiruddin, J.B., Nicholas, R.A.J., Santini, F.G., Ready, R.A., Woodward, M.J. and Taylor, T.K.** (1994). Use of the Polymerase Chain Reaction to detect Mycoplasma DNA in cattle with Contagious Bovine Pleuropneumonia. The Veterinary Record 134: 240-241.
- Baysal, T. and Guler, L.** (1992). Isolation of bacteria from enzootic pneumonia in lambs and kids in the Konya region. Veterinarium, 3 (1): 1-5.
- Belton, D., Leach, R.H., Mitchelmore, D.L. and Rurangirwa, F.R.** (1994). Serological specificity of a monoclonal antibody to Mycoplasma capricolum strain F-38, the agent of contagious caprine pleuropneumonia. Veterinary Record, 134 (25): 643-646.
- Bergemann, A.D., Whitley, J.C. and Fichh, L.R.** (1990). Taxonomic significance of differences in DNA methylation within the Mycoplasma mycoides cluster detected with restriction endonucleases MboI and DpnI. Letters in Applied Microbiology 11: 48-51.
- Bloch, N. and Diallo, I.** (1991). Serological survey on sheep and goats in four departments of Niger. Rev. Elev. Med Vet. Pays Trop., 44 (4): 397-404.
- Blood, D.C., Radostitis, O.M. and Henderson, J.A.** (1988). Enfermedades causadas por especies de Mycoplasma. Medicina Veterinaria. 756-771.
- Bölske, G., Wierup, M., Renstrom, L.A., Humlesjö N.E. and Hammarberg K.** (1982). Utbrott i Sverige av elakartad lungsjuka hos get. (Outbreak in Sweden of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP)). Svensk Veterinartidning 34, 15: 673-676.
- Bölske, G., Msami, H., Humlesjö, N.E., Erno, H. and Jönsson, L.** (1988). Mycoplasma capricolum in an Outbreak of Polyarthritis and Pneumonia in Goats. Acta vet. scand. 29: 331-338.
- Bölske, G., Engvall, A., Renström, L.H.M. and Wierup, M.** (1989). Experimental infections of goats with

Mycoplasma mycoides subspecies mycoides, LC type. Research in Veterinary Science. 46: 247-252.

Bonnet, F., Saillard, C., Bove, J.M., Leach, R.H., Rose, D.L., Cottew, G.S. and Tully, J.G. (1993). DNA relatedness between field isolates of mycoplasma F38 group, the agent of contagious caprine pleuropneumonia, and strains of Mycoplasma capricolum. International Journal of Systematic Bacteriology. 43 (3): 597-602.

Brandao, E., Botelho, A., Bashiruddin, J., Nicholas, R. (1994). Use of Polymerase Chain Reaction for identification of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides S.C. isolated from sheep and goats. IOM Letters 3, 24 (Abstract).

Brodgen, K.A., Cutlip, R.C. and Lehmkuhl, H.D. (1993). Cilia-associated Respiratory Bacillus in Wild Rats in Central Iowa. Journal of Wildlife Diseases. 29 (1): 123-126.

Brooks, D.L., Damassa, A.J. and Adler, H.E. (1981). Caprine mycoplasmosis: immune response in goats to Mycoplasma putrefaciens after intramammary inoculation. American Vet. Med. Assoc. 42 (11): 1898-1900.

Brooks, D.L., Damassa, A.J. and Adler, H.E. (1984). Caprine Mycoplasma mycoides subspecies mycoides infections. 3rd International conference on Goat Production and Disease. 1371, Jan 10-15, Tucson, Arizona.

Bruggmann, S., Engberg, B., and Ehrensperger, F. (1977). Demonstration of M. capripneumoniae in pig lungs by the enzyme-linked immunoperoxidase technique. The Veterinary Record. 100: 237.

Brunner, M., Feldner, J. and Brecht, W. (1985). Effect of monoclonal antibodies to the attachment on experimental Mycoplasma pneumoniae infection of hamsters: A preliminary report. Israel. J. Med. Sci. 17: 599-603.

Buddle, B.M., Herceg, M. and Davies. (1984). Experimental infection of sheep with Mycoplasma ovipneumoniae and Pasteurella haemolytica. Veterinary Microbiology. 9: 543-548.

Carson, J.L., Collien, A.M. and Clyde, W.A. (1979). Ciliary membrana alterations occurring in experimental Mycoplasma pneumoniae infection. Science 206: 34951.

Carter, G.R. (1967). Pasteurellosis: Pasteurella multocida and Pasteurella haemolytica. In Advances in Veterinary Science. Ed. Brandly, C.A. and Cornelius, C. Academic Press, New York. 11: 321-379.

Cassel, G.H., Clyde, W.A.Jr., and Davis, J.K. (1985). Mycoplasmal respiratory infections. In The Mycoplasmas. Vol. IV. Razin, S. and Barile, M.F. (eds). London and New York. Academic Press. pp: 65-105.

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

Clyde, W.A. (1983). Growth inhibition tests. In Methods in Mycoplasmaology. Vol. I. Razin, S. and J.G. Tully, eds. New York. Academic Press. pp 405-410.

Cordy, D.R. (1984). Septicaemia and pneumonia in Mycoplasma capricolum infections of young goats. Australian

Veterinary Journal. 61 (6): 201-202.

Costas, M., Leach R.H. and Mitchelmore, D.L. (1987). Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the "Mycoplasma mycoides cluster". J.Gen. Microbiol. 133: 3319-3329.

Cottew, G.S., Watson, W.A., Erdag, O. and Arisoy, F. (1969). Mycoplasmas of caprine pleuropneumonia in Turkey and their relationship to other mycoplasmas of goats and Mycoplasmas mycoides var. mycoides Journal of Comparative Pathology. 79: 541-551.

Cottew, G.S. and Yeats, F.R. (1978). Subdivision of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides from cattle and goats into two types. Aust. Vet. J. 54: 293-296.

Cottew, G.S. (1979). Pathogenicity of the subspecies mycoides of Mycoplasma mycoides for cattle, sheep and goats. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A. 245: 164-170.

Cottew, G.S. and Lloyd, L.C. (1980). Mycoplasmosis in goats. In: Cooper, M.G. (ed) "Australia Advances in Veterinary Science" p.26. Australia Veterinary Association, Artamos, N.S.W.

Cottew, G.S. and Yeats, F.R. (1981). Occurrence of mycoplasmas in clinically normal goats. Australian Veterinary Journal. 57: 52-53.

Cottew, G.S. (1982). Significance of mycoplasmoses in goats. Proc. 3rd Int. Conference on Goat Production and Diseases, Tucson (Arizona). 221-225.

Cottew, G.S. and Yeats F.R. (1982). Mycoplasmas and mites in the ears of clinically normal goats. Australian Veterinary Journal. 59: 77-81.

Cottew, G.S. (1984). Overview of mycoplasmoses in sheep and goats. Isr. J. Med. Sci. 20: 962-964.

Cottew, G.S., Bréard, A., DaMassa, A.J., Erno, H., Leach, R.H., Lefèvre, P.C., Rodwell, A.W. and Smith, G.R. (1987). Taxonomy of the Mycoplasma mycoides cluster. Isr. J. Med. Sci. 23: 632-635.

Cundiff, D.D., Besch-Williford, C.L., Hook, R.R., Franklin, C.L. and Riley, L.K. (1994). Characterization of Cilia-Associated Respiratory Bacillus Isolates from Rats and Rabbits. Laboratory Animal Science. 44 (4): 305-312.

Christiansen, C. and Erno, H. (1982). Classification of the F38 group of caprine mycoplasma strains by DNA hybridization. Journal of General Microbiology. 128: 2523-2526.

Damassa, A.J. (1983). Prevalence of Mycoplasmas and Mites in the external auditory meatus of goats. California Veterinarian. 12: 10-13.

DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Adler, H.E. (1983a). Caprine mycoplasmosis: Widespread infection in goats with Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (large-colony type). Am. J. Vet. Res. 44 (2): 322-325.

Damassa, A.J., Brooks, D.L., Adler, H.E. and Watt, D.E. (1983b). Caprine mycoplasmosis: acute pulmonary disease in newborn kids given Mycoplasma capricolum orally. Aust. Vet. J. 60: 125-126.

- DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Holmberg, C.A. (1984). Pathogenicity of Mycoplasma capricolum and Mycoplasma putrefaciens. Isr. J. M. S. 20(10): 975-978.
- DaMassa, A.J., Brooks, D.L. and Holmberg, C.A. (1986). Induction of mycoplasmosis in goats kids by oral inoculation with Mycoplasma mycoides subspecies mycoides. Am. J. Vet. Res. 47 (9): 2084-2089.
- 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., Wakenell, P.S. and Brooks, D.L. (1992). Mycoplasmas of goats and sheep. Review Article. J. Vet. Diagn. Invest. 4: 101-113.
- DaMassa, A.J., Tully, J.G., Rose, D.L., Pitcher, D., Leach, R.H. and Cottew, G.S. (1994). Mycoplasma auris sp. nov., Mycoplasma cottewii sp. nov., and Mycoplasma yeatsii sp. nov., new sterol-requiring Mollicutes from the external ear canals of goats. International Journal of Systematic Bacteriology 44 (3): 479-484.
- Davies, D.H., Dungworth, D.L., Humphreys, S. and Johnson, A.J. (1977). Concurrent infection of lambs with parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica. N.Z. Vet. J. 25: 262-265.
- Davies, D.H., Jones, B.A.H. and Thurley, D.C. (1981). Infection of specific pathogen-free lambs with parainfluenza virus type 3, Pasteurella haemolytica and Mycoplasma ovipneumoniae. Vet. Microbiol. 6: 295-308.
- Davies, D.H., Herceg, M. and Thurley, D.C. (1982). Experimental infection of lambs with an adenovirus followed by Pasteurella haemolytica. Vet. Microbiol. 7: 369-381.
- Dedieu, L., Breard, A. and Lefèvre, P.C. (1992). Development of a species-specific DNA probe for Mycoplasma capricolum. Veterinary Microbiology 32: 189-197.
- Dedieu, L., Mady, V. and Lefèvre, P.C. (1994a). Development of a selective Polymerase Chain Reaction Assay for the detection of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides S.C. IOM Letters 3, 17 (Abstract).
- Dedieu, L., Mady, V. and Lefèvre, P.C. (1994b). Development of two Polymerase Chain Reaction Assays for the identification of Contagious Agalactia related Mycoplasmas. IOM Letters 3, 31 (Abstract).
- Del Giudice, R.A., Robillard, N.F. and Carsky, T.R. (1967). Immunofluorescence identification of mycoplasma on agar by use of incident illumination. J. Bacteriol., 93: 1205-1209.
- Del Giudice, R.A., Rose, D.L. and Tully, J.G. (1995). Mycoplasma adleri sp. nov., an isolate from a goat. International Journal of Systematic Bacteriology. 45 (1): 29-31.
- Doster, A.R. and Lin, B.C. (1988). Identificación of Mycoplasma hyopneumoniae in formalin-fixed porcine lung, using an indirect immunoperoxidase method. Am. J. Vet. Res. 49: 1719-1721.

- Doutre, M.P. and Perreau, P. (1983a).** Le portage de Pasteurella sp. et de Mycoplasma arginini chez la chèvre au Sénégal. Rev. Elev. Med. Vét. Pays Trop. 36(1): 11-14.
- Doutre, M.P. and Perreau, P. (1983b).** Le portage de Pasteurella sp. et de Mycoplasma arginini chez les moutons sains au Sénégal. Rev. Elev. Med. Vét. Pays Trop. 34(4): 365-368.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. (1986).** Veterinary Laboratory Medicine. 2ª Edición. Iowa State University Press.
- 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 comercial goat dairy. JAVMA. 182 (12): 1338-1341.
- Edward, D.G. and Moore, W.B. (1973).** A method for determining utilization of glucose by mycoplasmas. J. Med. Microbiol. 8: 451-454.
- Egwu, G.O. (1992).** Outbreak of ovine infectious kerato-conjunctivitis caused by Mycoplasma conjunctivae. Small Ruminant Research, 9 (2): 189-196.
- Erno, H. and Stipkovits, L. (1973).** Bovine mycoplasmas: Cultural and biochemical studies. Acta Vet. Scand., 14: 450-463.
- Erno, H. (1977).** Mycoplasmas: use of polyvalent antisera for identification by indirect immunofluorescence. Acta vet. scand. 18: 176-186.
- 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., Leach, R.H., Salih, M.M. and MacOwan, K.J. (1983).** The F38-like group, a new group of caprine mycoplasmas?. Acta vet. scand. 24: 275-286.
- Erno, H. (1987).** Mycoplasmosis of ruminants: a general introduction. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 6: 553-563.
- Fernández, A., Rodríguez, J.L., Espinosa de los Monteros, A., Rodríguez, F., Orós, J., Herráez, P. and Poveda, J.B. (1995).** Descripción del CAR bacillus (Cilia Associated Respiratory bacillus) en ovino y caprino. Medicina Veterinaria, 12 (1): 45-47.
- Ferronha, M.H., Nunes Petisca, Y.L., Sansa Ferreira, H., Machado, M. and Regalla, J. (1988).** Localizacao de antigenos Mycoplasma Mycoides subespecie mycoides das lesoes do pulmao de bovinos con peripneumonia. Repositorio de trabalhos do laboratorio nacional de investigacao veterinaria ISSN 0870-1067. 25-36.
- Firke, Y. (1984).** La pathologie des caprins en Ethiopie, In "Colloque de l'INRA". Les maladies de la chèvre. Ed. Yvôre et perrin. 28: 674-676.
- Freundt, E.A., Andrews, B.E., Erno, H., Kunze, M. and Black, F.T. (1973).** The sensitivity of Mycoplasmatales to sodium-polyanethol-sulfonate and digitonin. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg., 1 Abt. orig. A 225: 104-112.

Freundt, E.A., Erno, H. and Lemcke, R.M. (1979). Identification of Mycoplasmas. In Methods of Microbiology. Vol. 13. T. Bergan and J.R. Norris, eds. London and New York. Academic Press. pp 377-434.

Freundt, E.A. (1983). Film and spoot production. In Methods in Mycoplasmology. Vol. I. Razin, S. and J.G. Tully eds., New York. Academic Press. pp 323-374.

Gaillard-Perrin, G., Picavet, D.P. et Perrin, G. (1985). Isolement de Mycoplasma putrefaciens dans deux troupeaux de chèvres presentant des Symptômes D'agalactiae. Revue Méd. Vét. 137 (1): 67-70.

Ganaway, J.R., Spencer, T.H., Moore, T.D. and Allen, A.M. (1985). Isolation, Propagation and Characterization of a Newly Recognized Pathogen, Cilia-Associated Respiratory Bacillus of Rats, an Ethiological Agent of Chronic Respiratory Disease. Infection and Immunity. 47 (2): 472-479.

Ghosh, S.S., Srivastava, N.C., Sikdar, A. and Gupta, B.R. (1989). Seroprevalence of caprine mycoplasma in Tripura. Indian Veterinary Journal, 66 (6): 577.

Gilmour, J.S., Jones, G.E. and Rae A.G. (1979). Experimental studies of chronic pneumonia of sheep. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 1: 285-293.

Gilmour, N.J.L. (1980). Pasteurella haemolytica infections in sheep. Vet. Quart. 2: 191-198.

Gilmour, N.J.L., Jones, G.E. and Rae, A.G. (1982). Long-term pathological and microbiological progress in sheep of experimental disease resembling atypical pneumonia. Journal of Comparative Pathology. 92: 229-238.

Gois, M. and Kuksa, F. (1974). Intranasal infection of gnotobiotic piglets with Mycoplasma hyorhinis: differences in virulence of the strains and influence of age and the development of infection. Zentralbl. Veterinärmed. B. 21: 352-361.

Goltz, J.P., Rosendal, S., McCraw, B.M. and Ruhnke, H.L. (1986). Experimental studies on the pathogenicity of Mycoplasma ovipneumoniae and Mycoplasma arginini for the respiratory tract of goats. Can. J. Vet. Res. 50: 59-67.

Gomes, M.J.P., Feitosa, M.H., Khral, M., Fernandes, R.E. and Nascimento, E.R. (1994). Caprine mycoplasmosis: pneumonia. First report in Brazil of Mycoplasma arginini. Higiene Alimentar., 8 (29): 18-20.

Goncer Coca, A. and Rodríguez Ferri, E.F. (1990). Neumonías por mycoplasmas en ovejas y cabras. Medicina Veterinaria. 7 (11): 619-624.

Gourlay, R.N. (1981). Mycoplasmosis in cattle, sheep and goats. Israel Journal of Medical Sciences. 17 (7): 531-536.

Gourlay, R.N. and Howard, C.J. (1982). Respiratory mycoplasmosis. Advances in veterinary science and comparative medicine. 26: 289-332.

Gourlay, R.N., Thomas, L.H. and Wyld, S.G. (1989). Increased severity of calf pneumonia associated with the

appearance of Mycoplasma bovis in a rearing herd. The Veterinary Record. 124: 420-422.

Gracia, J.L., León-Vizcaíno, L., Mercado, M., and Garrido, F. (1987). Neumonía atípica asociada a M. ovipneumoniae en corderos mantenidos en cebaderos. Medicina Veterinaria, 4 (7/8): 357-361.

Guerin, C., Thiaucourt, F., Mady, V., Breard, A. and Lefèvre, P.C. (1993). Rapid diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia in pleural fluids by immunobinding assay. Small Ruminant Research, 12 (2): 193-200.

Guha, C. and Verma, B.B. (1987a). Contagious caprine pleuropneumonia: experimental infection of kids with local strain of Mycoplasma agalactiae. Indian J. Vet. Med. 7 (1): 10-13.

Guha, C. and Verma, B.B. (1987b). Studies on pathogenicity of a local strain of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (LC) in kids. Indian Journal of Animal Health. 23-26.

Gupta, M.M., Verma, B.R. and Chauhan, H.V.S. (1984). Contagious caprine pleuropneumonia: studies on etiopathology. Indian Vet. J. 61: 733-737.

Harbi, M.S.M.A., El Tahir, M.S., MacOwan, K.J. and Nayil, A.A. (1981). Mycoplasma strain F38 and contagious pleuropneumonia in the Sudan. Veterinary Record. 108: 261

Harbi, M.S.M.A., Mageed, I.A. and El Tahir, M.S. (1983). Experimental contact transmission of contagious pleuropneumonia of goats (Abu Nini) in the Sudan. Vet. Res. Comm. 6: 139-143.

Haritani, M., Ishino, S., Oka, M., Nakazawa, M., Kobayashi, M., Narita, M. and Takizawa, T. (1989a). Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions in calves naturally infected with Pasteurella haemolytica. Pneumonic Pasteurellosis in Calves. 1137-1141.

Haritani, M., Narita, H., Hashimoto, K. and Takizawa, T. (1989b). Immunoperoxidase evaluation of pneumonic lesions induced by Pasteurella multocida in calves. Am. J. Vet. Res. 50: 2161-2167.

Haritani, M., Nakazawa, M.F., Hashimoto, K., Narita, M., Tagawa, Y. and Nakagawa, M. (1990). Immunoperoxidase evaluation of the relationship between necrotic lesions and causative bacteria in lungs of calves with naturally acquired pneumonia. Am. J. Vet. Res. 51: 1975-1979.

Hastie, A.T., Evans, L.P. and Allen, A.M. (1993). Two Types of Bacteria Adherent to Bovine Respiratory Tract Ciliated Epithelium. Veterinary Pathology. 30: 12-19.

Hayashidani, H., Honda, E., Nakamura, T., Mori, Y., Sawada, T. and Ogawa, M. (1988) Outbreak of pneumonia caused by Pasteurella haemolytica infection in Shiba goats in Japan, Jpn. J. Vet. Sci. 50: 960-962.

Hayflick, L. (1969). Fundamental biology of the class Mollicutes, Order Mycoplasmatales. In The Mycoplasmatales and The L-Phase of Bacteria. Hayflick, L. (ed). North-Holland Publishing Company. Amsterdam. pp: 15-47.

Hazell, S.L., Carrigan, M.J. and Cockram, F.A. (1985). Mycoplasma mycoides subsp. mycoides in the ears of goats associated with an outbreak of systemic mycoplasmosis. Australian Veterinary Journal. 62 (12): 421-422.

Hill, A.C. (1978). Demonstration of Mycoplasmas in Tissue by the Immunoperoxidase Technique. Journal of Infectious Diseases. 137: 152-154.

Hotzel, H., Sachse, K. and Pfützner, H. (1994). Diferentiation of the members of the "Mycoides Cluster" using PCR. IOM Letters 3, 28 (Abstract).

Howard, C.J. and Gourlay, R.N. (1974). An electron-microscopic examination of certain bovine mycoplasmas stained with ruthenium red and the demonstration of a capsule on M. dispar. J. of Gen. Microbiol. 83: 393-398.

Howard, C.J. and Taylor, G. (1985). Immune responses to Mycoplasma infections of the respiratory tract. Veterinary Immunology and Immunopathology. 10: 3-32.

Hutcheon, D. (1881). Contagious pleuropneumonia in Angora goats. Veterinary Journal. 13: 171-180.

Johansson, K. E., Mattsson, J. G., Ros Bascuñana, C. and Bölske, G. (1994). Detection of Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae and diagnosis of Contagious Caprine Pleuropneumonia by PCR and restriction enzyme analysis of the 16S rRNA gene. IOM Letters 3, 26 (Abstract).

Jonas, A.M. and Barber, T.L. (1969). Mycoplasma mycoides var. capri isolated from a goat in Connecticut. J. Infect. Dis. 119: 126-131.

Jones, G.E., Gilmour, J.S. and Rae, A. (1978). Endobronchial inoculation of sheep with pneumonic lung-tissue suspensions and with the bacteria and mycoplasma isolated from them. J. Comp. Path. 88: 85-96.

Jones, G.E., Buxton, D. and Harker, D.B. (1979). Respiratory infections in housed sheep, with particular reference to mycoplasmas. Veterinary Microbiology, 4: 47-59.

Jones, G.E., Gilmour, J.S. and Rae, A. (1982a). The effect of Mycoplasma ovipneumoniae and Pasteurella haemolytica on specific pathogen-free lambs. J. Comp. Path. 92: 261-271.

Jones, G.E., Field, A.C., Gilmour, J.S., Rae, A.G., Nettleton, P.F. and McLauchlan, M. (1982b). The effects of experimental chronic pneumonia on body weight, feed intake and carcass composition of lambs. Veterinary Record, 110: 168-173.

Jones, G.E. (1983). Mycoplasmas of sheep and goats: A synopsis. The Veterinary Record. 113: 619-620.

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. (1989). Pleuroneumonia contagiosa caprina. Office International des Épizooties. Serie Técnica Nº 9.

Jones, G.E., and Gilmour, J.S. (1991). Non-progressive (atypical) pneumonia. In Diseases of sheep. Martin, W.B. and Aitken, I.D. eds. pp: 150-157.

Jubb, K.V.F., Kennedy, P.C. and Palmer, N. (1993). Pathology of Domestic Animals. Fourth Edition. Vol II. Academic Press, Inc. pp: 661-676.

- Kahane, I.** (1984). In vitro studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasma. Israel. J. Med. Sci. 9: 210-216.
- Kaliner, G. and MacOwan, K.J.** (1976). The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. Zbl. Vet. Med. B. 23: 652-661.
- Kasali, D.B. and Ojo, M.O.** (1981). Pathogenicity al Mycoplasma mycoides subspecies mycoides for goats. International Goats and Sheep Research. 1: 269-273.
- Kurusu, K., Kyo, S., Shiimoto, Y. and Matsushita, S.** (1990). Cilia-associated Respiratory Bacillus Infection in Rabbits. Laboratory Animal Science. 40 (4): 413-415.
- Larsen, G. L., McCarthy, K., Webster, R.O., Henson, J. and Henson, P.** (1980). A differential effect of C5a des Arg in the induction of pulmonary inflammation. Am. J. Pathol. 100: 179-92.
- Leach, R.H., Erno, H. and MacOwan, K.J.** (1993). Proposal for designation of F-38 Type caprine Mycoplasmas as Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as M. capricolum (Tully, Barille, Edward, Theodore, and Erno 1974) to an additional new subspecies, M. capricolum subsp. capricolum subsp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 43 (3): 603-605.
- Lefèvre, P.C., Bréard, A., Al Farouk, I. and Buron, S.** (1987a). Mycoplasma species F38 isolated in Chad. Veterinary Record. 121: 575-576.
- Lefèvre, P.C., Jones, G.E. and Ojo, M.O.** (1987b). Pulmonary mycoplasmoses of small ruminants. Revis. Science Technique. Office International Epizootiology. 6 (3): 759-799.
- Lindsey, J.R., Cassell, G.H. and Baker, H.L.** (1978). Diseases due to mycoplasmas and rickettsias. In Pathology of Laboratory Animals Vol II. K. Benirschke, F. Garner and C. Jones (ed). Springer-Verlag, Berlin. pp: 1482-1500.
- Litamoi, K.J., Lijodi, F.K. and Nandokha, E.** (1989). Contagious caprine pleuropneumonia: some observations in a field vaccination trial using inactivated Mycoplasma strain F-38. Tropical Animal Health and Production, 21(2): 146-150.
- Littlejohns, I.R. and Cottew, G.S.** (1977). The isolation and identification of Mycoplasma Mycoides subsp. capri. Australian Veterinary Journal. 53: 297-298.
- Longley, H.O.** (1951). Contagious caprine pleuropneumonia: a study of the disease in Nigeria. HMSO, London (England). 7: 4.
- Lloyd, L.C., BATTERY, S.H. and Hudson J.R.** (1971). The effect of the galactan and other antigens of Mycoplasma mycoides var. mycoides on experimental infection with that organism in cattle. J. Med. Mic. 4 : 425-439.
- Luna, L.G.** (1968). Methods for Bacteria, Fungi and Inclusion bodies. In Manual of Histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Third edition. McGraw-Hill Book Company pp: 238-240.

MacKenzie, W.F., Magill, L.S. and Hulse, M. (1981). A Filamentous Bacterium Associated with Respiratory Disease in Wild Rats. Veterinary Pathology. 18: 836-839.

MacOwan, K.J. (1976). A Mycoplasma from chronic caprine pleuropneumonia in Kenya. Trop. Anim. Hlth. Prod. 8: 28-36.

MacOwan, K.J. and Minette, J.E. (1977a). Contact transmission of experimental contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Trop. Anim. Hlth. Prod. 9: 185-188.

MacOwan, K.J. and Minette, J.E. (1977b). The role of Mycoplasma strain F38 in contagious caprine pleuropneumonia (CCPP) in Kenya. Veterinary Record. 101: 380-381.

MacOwan, K.J. (1984). Infections in ruminants: the current situation. Isr. J. Med. Sci. 20: 854-858.

Martín de las Mulas, J., Fernández, A., Sierra, M.A., Poveda, J.B. and Carranza, J. (1990). Immunohistochemical demonstration of Mycoplasma gallinarum and Mycoplasma gallinaceum in naturally infected hen oviducts. Research in Veterinary Science. 49: 339-345.

Matsushita, S., Kashima, M. and Joshima, H. (1987). Serodiagnosis of cilia-associated respiratory bacillus infection by the indirect immunofluorescence assay technique. Laboratory Animals. 21: 356-359.

Matsushita, S. and Joshima, H. (1989). Pathology of rats intranasally inoculated with the cilia-associated respiratory bacillus. Laboratory Animals. 23: 89-95.

Matsushita, S., Joshima, H., Matsumoto, T. and Fukutsu, K. (1989). Transmission experiments of cilia-associated respiratory bacillus in mice, rabbits and guineapigs. Laboratory Animals. 23: 96-102.

Matsushita, S. (1991). Ultrastructure of Respiratory Tract Epithelium of Rats Experimentally Infected with the CAR-Bacillus. J.Vet. Med. Sci. 53 (2): 361-363.

McMartin, D.A., McOwan, K.J. and Swift, L.L. (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. British Veterinary Journal. 136: 507-515.

Meyling, A. (1971). Mycoplasma suis pneumoniae and Mycoplasma hyorhinis demonstrated in pneumonic pig lungs by the fluorescent antibody technique. Acta Vet. Scand. 12: 137-141.

Misri, J., Gupta, P.P. and Sood, N. (1988). Experimental Mycoplasma capri mastitis in goats. Australian Veterinary Journal. 65: 33-35.

Mohan, K. and Obwolo, M.J. (1990). Mycoplasma ovipneumoniae pathogenesis in experimentally infected sheep and goats. IOM Letters, Program and Abstracts, 8th Int. Congr. IOM, July 8-12, Istanbul, Turkey. 1: 355-356.

Morin, P. (1987). Les pleuropneumonies contagieuses caprines á Mycoplasmes. Revue bibliographique. Thèse méd. Vét.: Nantes. N° 67.

Moulton, W.M. (1980). Contagious caprine pleuropneumonia in the United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 176: 354-355.

Mugera, G.M. and Kramer, T.T. (1967). Pasteurellosis in Kenya goats due to Pasteurella haemolytica. Bull. epizoot. Dis. Afr. 15: 125-131.

Nakagawa, M., Taylor W.D. and Yedloutschnig. (1976). Pathology of Goats and Sheep experimentally infected with Mycoplasma mycoides var. capri. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 16: 65-77.

Nascimento, 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. British Veterinary Journal. 142 (3): 246-257.

Nayak, N.C. and Bhowmik, M.K. (1983). Mycoplasmal septicaemic polyarthritis in goat kids: epizootiological studies. Indian Vet. Med. J., 14: 43-46.

Ngatia, T.A., Kimberling, C.V., Johnson, L.W., Whiteman, C.E. and Lauermann, L.H., Jr. (1986). Pneumonia in goats following administration of live and heat-killed Pasteurella haemolytica. J. comp. Path. 96: 557-564.

Nicol, C.S. and Edward, D.G. (1953). Role of organisms of the pleuropneumonia group in human genital infections. Br. J. Vener. Dis., 29: 141-150.

Nicholas, R.A.J., Bashiruddin, J.B., Santini, F.G., Regalla, J. and Taylor, T.K. (1994). Evaluation of a Polymerase Chain Reaction for Contagious Bovine Pleuropneumonia in naturally infected cattle. IOM Letters 3, 15 (Abstract).

OIE (1994). Resoluciones adoptadas el 20 de Mayo de 1994 por el Comité Internacional de la OIE durante la 62ª Sesión General (París, 16-20 de Mayo de 1994). Resolución Nº XI. Infecciones por micoplasmas en los bovinos, ovinos y caprinos: métodos de diagnóstico y control sanitario. OIE Bulletin Mayo 1994, Vol 106, nº 5: 367-368.

Ojo, M.O. (1975). Caprine pneumonia. III. Biochemical characterization and serological types of pasteurellae. Nigerian J. Anim. prod. 2: 216-221.

Ojo, M.O. (1976a). Caprine pneumonia IV: Pathogenicity of Mycoplasma mycoides subspecies capri and caprine strains of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides for goats. J. Comp. Path. 86: 519-529.

Ojo, M.O. (1976b). Caprine pneumonia II: Biochemical characterization and serological identification of Mycoplasmas. Trop. Anima. Health Prod., 8: 137-146.

Okoh, A.E. and Ocholi, R.A. (1986). Disease associated with Mycoplasma mycoides, subspecies mycoides in sheep in Nigeria. Vet. Rec. 118: 212.

Onoviran, O., Majiyaghe, K.A. and Molokwu, J.U. (1984). Experimental infection of goats with Mmc and peste ruminants virus. Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop. 37 (1): 16-18.

Pearson, J.E., Rokey, N.W., Harrison, R., Proctor, S.J. and Cassidy, K.R. (1972). Contagious caprine

pleuropneumonia in Arizona. J. Am. Vet. Med. Assoc. 161: 1536-1538.

Pegram, R.G. (1974). Serological types of Pasteurella haemolytica isolates from sheep and goats in the Somali Democratic Republic. Trop. Anim. Hlth. Prod. 6: 189-191.

Perreau, P., Cuong, T. and Vallée, A. (1972). Isolement d'un mycoplasme du groupe Mycoplasma mycoides var. capri à partir d'un lait de mammite chez la chèvre. (Isolation of a mycoplasma strain of the group Mycoplasma mycoides var. capri from mastitic goat milk). Bull. Acad. Vet. France. 45: 109-116.

Perreau, P. (1979a). Mycoplasmoses caprine à Mycoplasma mycoides subsp. mycoides en France. Bull. Acad. Vét. Fr. 52: 575-581.

Perreau, P. (1979b). Les mycoplasmoses de la chèvre. Cah. Méd. Vét. 48: 71-85.

Perreau, P. (1980-1982). Rapports de mission de consultation dans le Sud Tunisien: 1. Sur une épidémie de pleuropneumonie contagieuse caprine. 2. Pleuropneumonie contagieuse de la chèvre et programme d'enquête sanitaire globale. IEMVT. Maisons-Alfort, Francia.

Perreau, P. and Bind, J.L. (1981). Infection naturelle du veau par Mycoplasma mycoides subspecies mycoides (biotype cheure). Bulletin Academie Veterinaire France. 54: 491-496.

Perreau, P. (1984). Les mycoplasmoses de la chèvre in "Les maladies de la chèvre", Niort (France). Colloque de l'INRA N° 28. Uvpre et érom Ed. 245-256.

Perreau, P., Breard, A. and Goff C. (1984). Infection Expérimentale de la chèvre par les souches de mycoplasmes de type F38. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 135 A: 119-124.

Picavet, D.P. (1991). La pleuropneumonie contagieuse de la chèvre (PPCC). Revue Méd. Vét. 142 (5): 377-387.

Polak-Vogelzang, A.A., Hagenaars, R. and Nagel, J. (1978). Evaluation of an Indirect Immunoperoxidase Test for Identification of Acholeplasma and Mycoplasma. Journal of General Microbiology. 106: 241-249.

Poumarat, F., Perrin, B. and Longchambom, D. (1991). Identification of ruminant mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF dot). Vet. Microbiol. 29: 329-338.

Poumarat, F., Longchambom, D. and Martel, J.L. (1992). Application of dot immunobinding on membrane filtration (MF dot) to the study of relationships within "M.Mycoides cluster" and within "glucose and arginine-negative cluster" of ruminant mycoplasmas. Veterinary Microbiology. 32: 375-390.

Poveda, J.B. (1988). Estudio Epizootiológico de Infecciones por Microorganismos del Género Mycoplasma en Aves. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

Purcell, R.H., Taylor-Robinson, D., Wong, D.C. and Chanock, R.M. (1966). Color test for the measurement of antibody of T-strain mycoplasmas. J. Bacteriol. 92: 6-12.

Rapaport, E. and Bar-Moshe, B. (1979). Experimental infection with Mycoplasmas mycoides subsp. mycoides

in young goats. Refuah Vet. 36: 117-118.

Rapaport, E. and Bar-Moshe, B. (1984). Mycoplasma mycoides in goats in Israël: clinical epidemiology and preventive aspects. Les maladies de la chèvre. Niort (France), 9-11 octobre. Ed. INRA Publ., (Les Colloques de l'INRA, N° 28). 257-262.

Razin, S. and Barile, M.F. (1985). The Mycoplasmas Vol IV Mycoplasma Pathogenicity. Ed: ACADEMIC PRESS, INC. 69-70.

Real, F., Deniz, S., Acosta, B., Ferrer, O. and Poveda, J.B. (1994). Caprine contagious agalactia caused by Mycoplasma agalactiae in the Canary Islands. Veterinary Record, 135 (1): 15-16.

Rodríguez, J.L. (1993). Estudio estructural y ultraestructural de las lesiones pulmonares inducidas por la infección natural y experimental de micoplasmas del grupo "M. Mycoides" (Aislados en Gran Canaria). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

Rodríguez, J.L., Poveda, J.B., Gutiérrez, C., Acosta, B. and Fernández, A. (1994). Polyarthrititis in kids associated with Mycoplasma putrefaciens. The Veterinary Record, 135: 406-407.

Rodríguez, M.D. and Quesada, M.J. (1993). La impregnación argéntica. In: Laboratorio de Anatomía Patológica. Raimundo García del Moral (ed.). Interamericana-McGraw-Hill. p: 203.

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 polyarthrititis in goats. JAVMA. 175 (4): 378-380.

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. (1984a). Effect of the caprine variant of Mycoplasma mycoides subsp mycoides on endothelium, monocytes, and complement of guinea pig, calf, sheep and goat serum. Ann. N. Y. Acad. Sci. 45: 2396-2402.

Rosendal, S. (1984b). Pathogenetic mechanisms of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides septicemia in goats. Isr. J. Med. Sci. 20: 970-971.

Rosendal, S. (1988). Mycoplasma. Pathogenesis of bacterial infections in animals. 205-215.

Ross, R.F., and Young, T.F. (1993). The nature and detection of mycoplasmal immunogens. Veterinary microbiology, 37: 369-380.

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.

Sainte-Marie, G. (1962). A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. 10: 250-256.

Sanchis, R. and Abadie, G. (1992). Bacteriological study of 185 Pasteurella haemolytica strains of ovine and caprine origin. Rec. Med. Vet. 168 (2): 11-115.

Sanguinetti, V., Baldelli, R. and Semproni, G. (1982). Mycoplasma mycoides subsp. mycoides, LC type, from goats in Italy. Veterinary Research Communications. 5: 327-335.

Scanziani, E., Grieco, V., Bolidini, M., Giusti, A.M., and Monaci, C. (1994). Use of Immunohistochemistry for diagnosis of Contagious Bovine Pleuropneumonia (CBPP). IOM Letters 3, 83 (Abstract).

Schimke, R.T., Berlin, C.M., Sweeney, W.E. and Carrol, W.R. (1966). The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in Mycoplasma hominis. J. Biol. Chem., 241: 2228

Schoeb, T.R., Dybvig, K., Davidson, M.K. and Davis, J.K. (1993). Cultivation of Campylobacterium and Respiratory Bacillus in Artificial Medium and Determination of the 16S rRNA Gene Sequence. Journal of Clinical Microbiology. 31 (10): 2751-2757.

Senterfit, L.B. and Jensen, K.E. (1966). Antimetabolic antibodies to Mycoplasma pneumoniae measured by tetrazolium reduction inhibition. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122: 786-790.

Senterfit, L.B. (1983). Tetrazolium reduction. In Methods in Mycoplasmaology. Vol. I. Razin, S. and J.G. Tully eds. New York. Academic Press. pp 377-378.

Sharma, R.K., Boro, B.R., Sarmah, K., and Borah, P. (1989). Serotyping of Pasteurella multocida associated with caprine pneumonia. Indian Journal of Animal Health, 28 (1): 81-82.

Sharp, J.M., Gilmuor, N.J.L., Thompson, D.A. and Rushton, B. (1978). Experimental infection of specific pathogen-free lambs with Parainfluenza virus type 3 and Pasteurella haemolytica. J. comp. Path. 88. 237- 243.

Shoji-Darkye, Y., Itoh, T. and Kagiya, N. (1991). Pathogenesis of CAR-Bacillus in rabbits, guineapigs, syrian hamsters, and mice. Laboratory Animal Science. 41 (6): 567-571.

Shoji, Y., Itoh, T. and Kagiya, N. (1992). Propagation of CAR-Bacillus in Artificial Media. Exp. Anim. 41 (2): 231-234.

Sreelamulu, P., Krishnaswamy, S., Gopalakrishna, D. and Rama P. (1987). Histopathological changes in natural and experimental mycoplasmal pneumonias of sheep. Indian Vet. J. 452-455.

Stamp, J.T. and Nisbet, D.I. (1963). Pneumonia of sheep. Journal of Comparative Pathology and Therapeutics 73: 319-328.

Stanbridge, E.J., and Hayflick, L. (1967). Growth Inhibition test for identification of Mycoplasma species

utilizing dried antiserum impregnated paper discs. J. Bacteriol., 93: 1392-1396.

Subcomité de Taxonomía de Mollicutes. (1979). Proposal of minimal standards for descriptions of new species of the class Mollicutes. International Journal of Systematic Bacteriology, 29: 172-180.

Switzer, W.P. (1955). Studies on infectious atrophic rhinitis: IV Characterization of a pleuropneumonia-like organism isolate from the nasal cavities of swine. Am. J. Vet. Res. 16: 540-544.

Switzer, W.P. (1967). Swine mycoplasma. J. Am. Vet. Med. Assoc. 151: 1656-1661.

Taylor, T.K., Bashiruddin, J.B. and Gould, A.R. (1992). Relationships between members of the Mycoplasma mycoides cluster as shown by DNA probes and sequence analysis. International Journal of Systematic Bacteriology. 42 (4): 593-601.

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.

Taylor-Robinson, D., Furr, P.M., Davies, H.A., Manchec, R.J. Mouches, C. and Bove, J.M. (1981). Mycoplasma adherence with particular reference to the pathogenicity of Mycoplasma pulmonis. Israel J. Med. Sci. 17: 599-603.

Taylor-Robinson, D. (1983). Metabolism inhibition tests. In Methods in Mycoplasmaology, Vol.I. Razin, S. and J.G. Tully, eds. New York. Academic Press. pp. 411-417.

Tessler, J. and Yedloutschnig, R.J. (1972). Immunofluorescence for identifying Mycoplasma mycoides var. mycoides and M. mycoides var. capri strains. Can. J. comp. Med. 36: 403-405.

Tessler, J. (1973). Incident Light Immunofluorescence of Alcohol-fixed Colonies of Ruminant Mycoplasma. Can. J. comp. Med. 37: 207-209.

Thiaucourt, F., Breard, A., Lefèvre, P.C. and Mebratu, G.Y. (1992). Contagious caprine pleuropneumonia in Ethiopia. Veterinary Record 131 (25/26): 585.

Thiaucourt, F., Bölske, G., Libeau, G., Le Goff, C. and Lefèvre, P.C. (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). Veterinary Microbiology 41: 191-203.

Thigpen, J.E., Kornegay, R.W., Chang, J., McGhee, C.E. and Thierry, V.L. (1981). Pneumonia in goats caused by Mycoplasma mycoides subspecies mycoides. JAVMA. 178 (7): 711-712.

Thomas, L.H., Howard, C.J., Stott, E.J. and Parsons, K.R. (1986) Mycoplasma bovis infection in gnotobiotic calves and combined infection with respiratory syncytial virus. Vet. Pathol. 23: 571-578.

Topley and Wilson's. (1990). The Mycoplasmatales: Mycoplasma, Ureaplasma, Achleplasma, Spiroplasma and Anaeroplasmata. Principles of bacteriology, virology and immunity. Eighth Edition. Editor: Ton Parker, M. and Duerden B.I. 2: 663-681.

Traore, M.L. (1989). Enzootic pneumonia of sheep and goats in Mali. Inaugural -Dissertation, Tierärztliche Hochschule, Hannover. German Federal Republic.

Trichard, C.J.V., Basson, P.A., Van Der Lugt, J.J. and Jacobsz, E.P. (1989). An outbreak of contagious bovine pleuropneumonia in the owambo mangetti area of south west Africa/Namibia: microbiological, immunofluorescent, pathological and serological findings. Onderstepoort J. vet. Res. 56: 277-284.

Truscott, R.B. and Finley, G.G. (1984) Studies on Mycoplasma mycoides subsp. mycoides (LC) in Lambs and Calves. Can J Comp Med. 49: 233-234.

Tully, J.G. (1983). Tests for digitonin sensitivity and sterol requirement. In Methods in Mycoplasmaology Vol I. Razin, S. and J.G. Tully eds. New York. Academic Press. pp 355-362.

Tully, J.G., Barile, M.F., Edward, D.G.ff., Theodore, 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., Bové, 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). International Journal of Systematic Bacteriology. 43 (2): 378-385.

Upadhayaya, T.N., and Rahman, T. (1993). Prevalence and pathology of caprine pneumonia in Assam. J. Assam Veterinary Council, 3: 47-50.

Valdivieso-García, A. and Rosendal, S. (1982a). Variation in colony size of Mycoplasma mycoides subspecies mycoides isolated from goats. The veterinary Record. 110: 470-471.

Valdivieso-García, A., Rosendal, S. and Maxie, M.G. (1982b). Biological effects of sonicated suspension and phenol-water extract of Mycoplasma mycoides subsp. mycoides in goats. Can. J. Comp. Med. 46: 190-197.

Van Zwieten, M.J., Solleveld, H.A., Lindsey, J.R., De Groot, F.G., Zurcher, C. and Hollander, C.F. (1980). Respiratory Disease in Rats Associated with a Filamentous Bacterium: A Preliminary Report. Laboratory Animal Science. 30 (2): 215-221.

Viera, F.J.B., Trigo, F.J., Meza, L.J., Romero, F.A., Pérez, G.T. , and Guemes, F. (1993). Serotipos de Pasteurella multocida y Pasteurella haemolytica aislados a partir de pulmones con lesiones inflamatorias en ovinos y caprinos. Veterinaria Mexico. 24 (2): 107-112.

Villalba, E., Poveda, J.B., Fernández, A., Rodríguez, J.L., Gutiérrez, C. and Gómez-Villamandos, J.C. (1992). An outbreak caused by Mycoplasma mycoides species in goats in the Canary Islands. Veterinary Record. 130: 330-331.

Waggie, K.S., Spencer, T.H. and Allen, A.M. (1987). Cilia associated respiratory (CAR) bacillus infection in New Zealand White rabbits. Laboratory Animal Science. 37: 533.

Wanson, J.C. and Drochman, P. (1988). Epoxi technique inclusion for electron microscopy. Cell. Biol 38:130.

Whitcomb, R.F. (1983). Culture media for spiroplasmas. Academic Press. New York, Pp: 159-162.

Whitley, L.O., Maheswaran, S.K., Weiss, D.J. and Ames, T.R. (1990). Immunohistochemical localization of Pasteurella haemolytica A1-derived Endotoxin, leukotoxin, and capsular polysaccharide in experimental bovine pasteurella pneumonia. Vet. Pathol. 27: 150-161.

World Health Organization. (1975). The Metabolism-Inhibition test. Working Doc. VPH/MIC/75.6. Working Group of the FAO/WHO. Programme on Comparative Mycoplasmaology, WHO, Geneva.

Yedloutschnig, R.J., Taylor, W.K. and Dardiri, A.H. (1971). Mycoplasma mycoides var. capri from goats in the United States. Proceedings 75th Annu. Meet. U.S. Anim. Health Assoc. 166-175.