

AGALAXIA CONTAGIOSA

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La agalaxia contagiosa es una enfermedad grave de las ovejas y las cabras que se caracteriza por mastitis, artritis, queratoconjuntivitis y, en ocasiones, aborto. En las ovejas y cabras la causa principal de la enfermedad es *Mycoplasma agalactiae* (Ma), pero *M. capricolum* subespecie *capricolum* (Mcc), *M. mycoides* subespecie *capri* (Mmc) y *M. putrefaciens* (Mp) producen una enfermedad clínicamente similar, más frecuente en las cabras, que puede acompañarse de neumonía. Ma y Mcc se han aislado de pequeños rumiantes salvajes, como el íbice o la cabra montesa. Se han detectado anticuerpos contra Mmc y Mcc en camélidos sudamericanos (alpacas, llamas y vicuñas) pero no se han aislado micoplasmas.

Identificación del agente: El diagnóstico definitivo requiere el aislamiento de los micoplasmas causantes a partir de los animales afectados, que se identifican mediante pruebas bioquímicas, serológicas y, cada vez más, moleculares, del tipo de la reacción en cadena de la polimerasa. Las muestras más adecuadas son la leche, los hisopos conjuntivales y de oído, y los líquidos articulares. El muestreo de leche de tanque común constituye una forma cómoda de comprobar a nivel de todo el rebaño la presencia de micoplasmas causantes de la enfermedad. Los cuatro micoplasmas crecen relativamente bien en la mayor parte de los medios para micoplasmas, aunque Ma muestra una preferencia por los ácidos orgánicos como sustratos, tales como el ácido pirúvico.

Pruebas serológicas: La detección de anticuerpos en el suero mediante el enzoinmunoanálisis (ELISA) proporciona un diagnóstico rápido de la enfermedad, pero pueden resultar poco sensibles en rebaños con una infección crónica. Para examinar a los rebaños se han utilizado con frecuencia pruebas ELISA indirectas en programas de control de Ma. Para confirmar la infección en áreas consideradas libres de agalaxia contagiosa, generalmente resulta necesario el aislamiento y la identificación o la detección mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Las pruebas serológicas para *M. putrefaciens* no están muy extendidas.

Requisitos para las vacunas: En Europa meridional se utilizan con frecuencia vacunas comerciales inactivadas con formalina contra Ma, pero no se consideran muy eficaces. En condiciones experimentales, las vacunas contra Ma inactivadas con saponina resultan más protectoras que las inactivadas con formalina. En Turquía se utilizan vacunas vivas contra Ma, y se ha descrito que confieren más protección que las vacunas inactivadas. Está disponible una vacuna que contiene Ma, Mmc y Mcc. En algunos países se emplean vacunas autógenas contra Mmc y, en ocasiones, contra Mcc. No existen vacunas contra *M. putrefaciens* debido a que la enfermedad que causa no se considera suficientemente grave o extendida.

A. INTRODUCCIÓN

La agalaxia contagiosa es una enfermedad conocida desde hace casi 200 años que se caracteriza por mastitis, artritis y queratoconjuntivitis. Se presenta en todos los lugares en los que se practica el pastoralismo y la producción lechera de pequeños rumiantes, en concreto en Europa, sobre todo en la región mediterránea, Asia y el norte de África, y esporádicamente en EE.UU. Está causada sobre todo por *Mycoplasma agalactiae* (Ma) (revisado por Bergonier *et al.*, 1997). En ovejas de España y Francia recientemente se ha observado un resurgimiento de la agalaxia contagiosa, causada por Ma, con aumento del número de casos notificados en los Pirineos y alrededores, y comunicación de nuevos brotes en Córcega (Chazel *et al.*, 2010). Italia sigue

registrando más de 50 brotes al año, principalmente de dos de sus islas¹. En Irán y Mongolia tienen lugar brotes frecuentes y numerosos (Nicholas *et al.*, 2008). En los últimos años, en muchos países, como Italia, donde la enfermedad se está propagando (Marogna *et al.*, 2015), también se han aislado a partir de ovejas y cabras con mamitis y artritis *M. capricolum* subespecie *capricolum* (*Mcc*) y *M. mycoides* subespecie *capri* (anteriormente denominada *M. mycoides* subespecie *mycoides* [LC = colonias grandes]), así como en países de América del Sur (Nascimento *et al.*, 1986) y Australasia (Cottew 1971).

Los signos clínicos de las infecciones causadas por *Mcc*, *Mmc* y *M. putrefaciens* (*Mp*) son lo bastante similares para ser considerados como indistinguibles de la agalaxia contagiosa causada por *Ma*. Además, *Mp* también causa en las cabras una mamitis y una artritis muy similares a las causadas por *Ma*, *Mmc* y *Mcc* (Rodríguez *et al.*, 1994). Además, el acuerdo del grupo de trabajo sobre la agalaxia contagiosa de la Acción COST² 826 de la Comunidad Europea sobre la micoplasmosis de los rumiantes, que se reunió en Tolouse, Francia, en 1999, estableció que los cuatro micoplasmas deben considerarse como agentes etiológicos de la agalaxia contagiosa. En Francia, *Mmc*, *Mcc* y *Mp* constituyen más del 80% de las cepas de micoplasmas aisladas de cabras, y *Ma* supone menos de un 2% del total. *Ma* y *Mcc* se han aislado de pequeños rumiantes salvajes como el íbice y cabras montesas en los Pirineos y los Alpes (Chazel *et al.*, 2010; Verbsick *et al.*, 2008). Existen informes puntuales del aislamiento de *Ma* de ganado vacuno aparentemente sano (Chazel *et al.*, 2010) y *Mcc* de ganado bovino aparentemente sano (Pinho *et al.*, 2009), aunque Catania *et al.* (2016) aislaron *Ma* de los ojos, los oídos y el líquido cefalorraquídeo de toros.

La enfermedad causada por *Ma* se reconoce clínicamente por una temperatura elevada, inapetencia y alteraciones en la consistencia de la leche en las ovejas productoras, con descenso y ulterior desaparición de la producción láctea, generalmente a los 2–3 días, como resultado de una mamitis intersticial (Bergonier *et al.*, 1997) y, en algunos animales, la cojera y la queratoconjuntivitis afectan a un 5-10% de los animales infectados. La fiebre es frecuente en casos agudos y puede cursar con signos nerviosos, pero ambos signos son raros en las infecciones crónicas y subagudas más frecuentemente observadas cuando la enfermedad es endémica. Las hembras gestantes pueden abortar. En ocasiones, se puede encontrar *Ma* en las lesiones pulmonares (Loria *et al.*, 1999), pero la presencia de neumonía no es un signo constante. La aparición de una bacteriemia es frecuente, sobre todo en el caso de *Mmc* y *Mcc*, y podría explicar el aislamiento del microorganismo en sitios donde se presenta solo esporádicamente.

Como resultado de la infección por *Mmc* pueden aparecer artritis, pleuresía, neumonía, mastitis y queratoconjuntivitis. *Mmc* presenta una de las distribuciones geográficas más amplias de los micoplasmas de los rumiantes, encontrándose en todos los continentes donde se crían pequeños rumiantes y donde se describe la agalaxia contagiosa y la pleuroneumonía caprina (DaMassa *et al.*, 1983; Nicholas, 200); no obstante, la falta en muchos países de servicios de diagnóstico para las enfermedades producidas por micoplasmas hace que probablemente su presencia pase casi inadvertida. *Mmc* está fundamentalmente restringido a las cabras, pero en ocasiones se ha aislado de ovejas con enfermedad reproductiva y del ganado bovino con enfermedad respiratoria o artritis. Por lo general, los casos son esporádicos y la enfermedad puede persistir y propagarse lentamente dentro de un rebaño; sin embargo, en las zonas libres, la enfermedad presenta una alta morbilidad y mortalidad en los cabritos. En Sicilia, un brote documentado cursó con más de un 40% de mortalidad (Agnello *et al.*, 2012). Después del parto, aumenta la oportunidad de diseminación en animales lactantes, pues los cabritos que toman el calostro y la leche infectada resultan afectados. La septicemia que se origina, con artritis y neumonía, causa una elevada mortalidad en los cabritos (Bergonier *et al.*, 1997; DaMassa *et al.*, 1983).

Mcc está distribuido ampliamente y es muy patógeno, sobre todo en el norte de África, pero la frecuencia de su aparición es baja (Bergonier *et al.*, 1997). Por lo general, las cabras resultan más afectadas que las ovejas, y los signos clínicos de fiebre, septicemia, mastitis y artritis grave pueden conducir con rapidez a la muerte (Bergonier *et al.*, 1997; Bolske *et al.*, 1988). En las necropsias se puede observar neumonía. Las lesiones articulares graves que se ven en infecciones experimentales por este microorganismo cursan con un edema periarticular subcutáneo que afecta a tejidos situados a cierta distancia de la articulación (Bolske *et al.*, 1988). En 2015, se registró la primera cepa de *Mcc* aislada de una persona en un hombre con septicemia (Seersholm *et al.*, 2015).

Mp es corriente en los rebaños de cabras de leche en el oeste de Francia, donde puede aislarse de animales con signos clínicos o sin ellos (Mercier *et al.*, 2001). En California, EE. UU., también se asoció con un brote extenso de mastitis y de agalaxia, que condujo a artritis grave en cabras y que cursó con abortos y muertes (sin pirexia) (Bergonier *et al.*, 1997). En España, *Mp* fue el causante principal de un brote de poliartitis en cabritos (Rodríguez *et al.*, 1994).

En camélidos de Sudamérica, como llamas, alpacas y vicuñas, se han detectado anticuerpos contra *Mmc* y *Mcc*, pero no contra *Ma*, aunque todavía no se han aislado micoplasmas (Nicholas, 1998). Estos camélidos se presentan afectados por una serie de enfermedades semejantes a las producidas por los micoplasmas, como la

1 Datos del Sistema de Información Zoonosaria Mundial de la OIE: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/el-sistema-mundial-de-informacion-sanitaria/sistema-mundial-de-informacion-sanitaria/>

2 Cooperación Europea en el área de Investigación Científica y Técnica

poliartritis y la neumonía, de modo que es probable que en el futuro se detecten micoplasmas que incluyan *Mmc* y *Mcc*.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la agalaxia contagiosa y su propósito.

Método	Propósito					
	Determinar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente³						
Cultivo e identificación del microorganismo	++	+++	+++	+++	–	–
PCR convencional	++	+++	–	+++	++	–
PCR en tiempo real	++	+++	–	+++	++	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
CF	+++*	+	+++	+++*	+++*	+++*
ELISA	+++**	+	+++	+++**	+++**	+++**
Inmunoelctro-transferencia	+	++	+	++	+	++

Clave: +++ = método recomendado para este propósito; ++ = método recomendado pero tiene limitaciones; + = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito. *solo para *Mcc* y *Mmc*; **solo para *Ma*. PCR = reacción en cadena de la polimerasa; CF = fijación del complemento; ELISA = enzimoimmunoanálisis

1. Identificación de los agentes

1.1. Selección de las muestras

Las muestras preferidas a partir de animales vivos son: leche de hembras con mastitis o de hembras aparentemente sanas; hisopos nasales y secreciones cuando haya una alta mortalidad o morbilidad en las crías; líquido articular en casos de artritis; hisopos conjuntivales en casos de enfermedad ocular; y sangre para detección de anticuerpos de animales afectados y no afectados (Nicholas & Baker, 1998). El muestreo de leche de tanque constituye una forma cómoda de realizar un seguimiento de los micoplasmas causantes de la enfermedad a nivel del rebaño. El canal auricular también es una fuente muy rica de micoplasmas patógenos, aunque, en la práctica, la presencia en esta zona de micoplasmas no patógenos puede hacer difícil la confirmación (Nicholas & Baker, 1998). Los micoplasmas se pueden aislar en sangre durante la fase aguda de la enfermedad cuando hay micoplasmemia. En el caso de los animales muertos, las muestras deben incluir: ganglios linfáticos de la ubre y otros ganglios linfáticos asociados, líquido articular, tejido pulmonar (de la zona situada entre el tejido afectado y el sano) y líquido pleural/pericárdico. Las muestras deben enviarse con rapidez al laboratorio de diagnóstico, acondicionadas con humedad y refrigeradas. Los cuatro micoplasmas responsables son relativamente fáciles de aislar en los órganos internos, las articulaciones y la leche, y crecen bien en la mayoría de los medios de cultivo para micoplasmas, originando en 3–4 días colonias de tamaño mediano a grande.

3 Se recomienda una combinación de métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

1.2. Aislamiento de *Mycoplasma*

Las técnicas habitualmente empleadas en el aislamiento de los micoplasmas es válida para los cuatro micoplasmas responsables (Nicholas & Baker, 1998). Se han descrito muchos medios para cultivar estos micoplasmas. Se ha comprobado una mejora en las tasas de crecimiento de *Ma* en medios de cultivo que contienen ácidos orgánicos tales como el ácido pirúvico e isopropanol (Khan *et al.*, 2004). La composición del medio de PRM (Khan *et al.*, 2004) es la siguiente:

Se calientan 100 ml/litro de suero porcino inactivado, 20 g/litro de peptona especial, 5 g/litro de extracto de levadura, 5 g/litro de glicerol, 5 g/litro de cloruro sódico, 9 g/litro de HEPES, 100 ml/litro de extracto de levadura fresco, 5 g/litro de piruvato sódico, 12,5 ml de rojo fenol al 0,2% y ampicilina (200.000 Unidades Internacionales/ml). Se completa hasta un litro en agua destilada y se esteriliza mediante filtración. Se ajusta el pH del medio líquido a 7,6. Para preparar el medio sólido, se añaden 10 g de agar LabM No.1 (Bury, Reino Unido), o de un agar de calidad equivalente, y se distribuye en placas de Petri estériles.

Para reducir la contaminación bacteriana de las muestras clínicas, puede ser necesario añadir como componente del medio de transporte acetato de talio (250 mg/litro), que es tóxico e inhibidor para algunos micoplasmas, pero no para los que causan la agalaxia contagiosa, aunque debe omitirse una vez que los micoplasmas comiencen a crecer *in vitro*. Una alternativa adecuada al acetato de talio puede ser el sulfato de colistina (37,5 mg/ml).

1.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se hacen diluciones decimales (10^{-1} – 10^{-6}) de la muestra líquida (leche, líquido sinovial, hisopos conjuntivales y del oído) o del homogenado tisular en medio líquido apropiado.
- ii) Se extienden unas cuantas gotas de cada muestra en el medio sólido y se distribuye un inóculo del 10% (v/v) en el medio líquido.
- iii) Se siembran directamente los hisopos en el medio sólido.
- iv) Se incuban los medios líquidos inoculados (preferiblemente con una agitación suave) y los medios sólidos a 37°C en una atmósfera con humedad y con un 5% de dióxido de carbono.
- v) Se examinan diariamente los caldos de cultivo para comprobar si aparecen signos de crecimiento (que se manifiestan por una turbidez fina u opalescencia) o para detectar variaciones en el pH, que se manifiestan por los cambios de color, y se examinan los medios sólidos a aumentos de $\times 35$ para comprobar si presentan las típicas colonias con aspecto de "huevo frito".
- vi) Si no se observa un crecimiento de micoplasmas después de 7 días, se vuelve a cultivar un inóculo del 10% (v/v) del cultivo en medio líquido fresco y se extienden 50 μ l de este en medio sólido.
- vii) Se repite el paso (v). Si no se observan micoplasmas después de 21 días de incubación, los resultados se consideran negativos.
- viii) Si aparece una contaminación bacteriana (detectable por una turbidez excesiva), se esteriliza por filtración pasando 1 ml del caldo contaminado por un filtro de 0,45 μ m y se lleva a un medio líquido fresco.

Con frecuencia, las muestras clínicas contienen más de una especie de micoplasma, por lo que se considera necesario purificar las colonias por clonación antes de realizar la identificación serológica, en particular cuando se trata de las pruebas de inhibición del crecimiento y de formación de láminas (GIT y FIT, respectivamente). Sin embargo, la clonación es un proceso largo que dura al menos 2 semanas. La prueba de inmunofluorescencia (Bradbury, 1998), las de inmunounión puntual (Poumarat, 1998) y, más recientemente, las basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (véase la sección B.1.5) no requieren la clonación, ya que estas pruebas pueden detectar los micoplasmas patógenos en cultivos mixtos, con el consiguiente ahorro de tiempo.

1.3. Pruebas bioquímicas

La primera prueba que debe realizarse en las cepas aisladas clonadas es la de la susceptibilidad a la digitonina, que permite separar a los micoplasmas de los acoleplasmas; estos últimos son contaminantes comunes cuyo crecimiento puede encubrir los micoplasmas de interés. Entre las pruebas más útiles para diferenciar los cuatro micoplasmas está el cultivo en medio líquido con glucosa (1%), arginina (0,2%) y difosfato de fenofaleína (0,01%), el cultivo en medio sólido con suero

de caballo o yema de huevo para la demostración de la formación de membranas o manchas, y el cultivo sobre caseína o suero coagulado en agar para la prueba de proteólisis (Poveda, 1998). Sin embargo, cada vez con mayor frecuencia, se ha visto que estas características bioquímicas pueden ser variables para los micoplasmas individuales y por tanto tienen poco valor diagnóstico. La característica bioquímica más destacable que diferencia *M. putrefaciens* de los otros micoplasmas es el olor a putrefacción que produce en medio líquido. Otras características que pueden ser útiles incluyen: la producción de películas transparentes y manchas en la superficie del caldo y en medios sólidos causada por *Ma*, y en menor medida por *Mp*; y la actividad proteolítica de *Mcc* y *MmmLC* sobre caseína y suero coagulado.

1.4. Identificación serológica

La identificación de las cepas utilizando antisueros específicos se suele realizar mediante las pruebas GIT, FIT (Poveda & Nicholas, 1998) o mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Bradbury, 1998). Una prueba de inmunounión puntual recientemente desarrollada, que se realiza en placas de microtitulación, ofrece muchas mejoras respecto a otras pruebas, como la rapidez y un rendimiento más alto (Poumarat, 1998) pero requiere un criterio subjetivo sobre la intensidad de la tinción. En el caso de *Ma*, la inhibición de la formación de películas transparentes puede ser a menudo más fiable, ya que la inhibición del crecimiento no se observa en todas las cepas; también puede utilizarse para el serodiagnóstico. La producción de películas transparentes por los micoplasmas puede inducirse incorporando una suspensión de yema de huevo al 10% en los medios sólidos.

1.4.1. Procedimiento analítico

- i) Se inoculan al menos dos diluciones de cultivos líquidos clonados (10^{-1} y 10^{-2}) de 48 horas en medios sólidos pre-secados, permitiendo que 50 μ l de los cultivos recorran la placa inclinada utilizando la técnica de la "gota pendiente" (Poveda & Nicholas, 1998). Se extrae el líquido sobrante con una pipeta.
- ii) Se dejan secar las placas. Es posible aplicar dos o tres gotas pendientes bien separadas en cada placa de 90 mm.
- iii) Se aplican al cultivo discos de papel de filtro, secados con anterioridad, que contengan 30 μ l de antisuero específico; debe asegurarse una adecuada separación entre los discos (al menos 30 mm).
- iv) Se incuban las placas como si se tratara de cultivos de micoplasmas y se examinan ocularmente cada día contra un fondo luminoso.

1.4.2. Interpretación de los resultados

Una zona de inhibición superior a 2 mm, medida desde el disco de papel al borde del crecimiento del micoplasma, se considera significativa. Puede ocurrir una inhibición parcial con antisuero débil o en condiciones de cultivo mixto. Se obtienen reacciones más fuertes si se añaden 60 μ l de antisuero a pocillos de 6 mm de diámetro realizados en el agar con un sacabocados o un instrumento similar (Poveda & Nicholas, 1998).

En la prueba IFI, se aplican antisueros específicos a colonias en medio sólido. El antisuero homólogo permanece unido después de los lavados y se pone de manifiesto añadiendo una antiglobulina conjugada con fluoresceína, lavando a continuación, y observando las colonias con un microscopio de epifluorescencia (Bradbury, 1998). Deben incluirse microorganismos conocidos como controles positivos y negativos, y un suero control negativo. Sin embargo, igual que en las pruebas de inmunounión, se requieren criterios subjetivos para evaluar la intensidad de tinción.

Tradicionalmente los antisueros para estas pruebas serológicas se han preparado contra las cepas tipo de las diversas especies de *Mycoplasma*, y la mayoría de las cepas de campo se identifican fácilmente utilizando estos antisueros. Sin embargo, a medida que se van examinando más cepas, se han encontrado algunas que reaccionan muy débilmente con estos antisueros, aunque reaccionan bien con antisueros contra otras cepas representativas de la especie. En *Mp* no se ha descrito la variación intraespecífica en composición antigénica, pero ocurre en cierta medida con cepas de *Ma* y de *Mcc*. Por tanto, puede resultar necesario que los laboratorios de diagnóstico dispongan de varios antisueros capaces de identificar todas las cepas de las especies.

1.5. Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos

1.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa

En muchos laboratorios se utilizan PCR, y son muy sensibles. Cuando se utilizan con muestras clínicas, pueden suponer un sistema rápido de alerta que permite una investigación más completa en el caso de que los resultados sean positivos. No obstante, los resultados negativos no deben considerarse definitivos, puesto que el cultivo de muestras de leche de tanque puede ser más sensible (Tatay-Dualde *et al.*, 2015). Se han desarrollado varias pruebas de tipo PCR que son específicas de *Ma* y que muestran unos niveles similares de sensibilidad, aunque se basan en secuencias genómicas diferentes (Dedieu *et al.*, 1995; Subrahmaniam *et al.*, 1998; Tola *et al.*, 1997a). Pueden utilizarse directamente con muestras nasales, conjuntivales, sinoviales o tisulares; se han utilizado con muestras lácteas y según se ha descrito, resultan más sensibles que el cultivo (Tola *et al.*, 1997a), aunque, en ocasiones, la presencia de inhibidores indefinidos puede interferir con la prueba. Las PCR también se pueden utilizar, con más fiabilidad, sobre micoplasmas creciendo en un cultivo; un enriquecimiento del micoplasma durante 24 horas en un medio apropiado facilita enormemente la detección de la PCR incluso en presencia de una contaminación bacteriana (Nicholas, 2002). Para la detección de *Ma* a partir de muestras de leche, el uso de métodos de PCR de captura inmunomagnética podría ser más rápido que el enriquecimiento del cultivo (Sanna *et al.*, 2014). Mediante un método basado en la PCR en el que se emplea la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE) y cebadores específicos de micoplasma, se puede identificar por su patrón migratorio la mayoría de los micoplasmas de los pequeños rumiantes, incluyendo todos los agentes causales de la agalaxia contagiosa (McAuliffe *et al.*, 2005). Un resultado positivo de la PCR, especialmente en las áreas previamente libres de la agalaxia contagiosa, debe confirmarse mediante el aislamiento y la identificación del micoplasma utilizando procedimientos estándar. Pueden ser aplicables los métodos de PCR isotérmica, que se han descrito para la detección de *Ma* (Rekha *et al.*, 2015).

Un resultado positivo en la PCR, en concreto en una zona que previamente estaba libre de agalaxia contagiosa, debe confirmarse mediante el aislamiento e identificación del micoplasma utilizando los procedimientos estándar.

Se han descrito PCR particulares para *Mmc* (Bashiruddin, 1998) y *Mcc* (Monnerat *et al.*, 1999), y para *Mp* (Peyraud *et al.*, 2003; Nicholas *et al.*, 2008) respectivamente. Además se ha descrito una prueba múltiple con las que se pueden detectar simultáneamente *Ma*, *Mcc* y *Mmc* (Greco *et al.*, 2001). Cillara *et al.* (2015) describen una PCR y una PCR del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción basada en el gen *lpdA* para diferenciar entre *Mmc* y *Mcc*.

1.5.2. PCR en tiempo real

Se han documentado varias PCR en tiempo real rápidas para la detección de *Ma* que tienen las ventajas de la rapidez, la sensibilidad y el manejo de la muestra (Lorusso *et al.*, 2007). Más recientemente, se ha descrito una prueba en tiempo real múltiple que detecta los cuatro micoplasmas simultáneamente (Becker *et al.*, 2012).

1.5.3. Análisis por microchips

Los análisis por microchip se han aplicado a la detección de micoplasmas. Empleando sondas derivadas de los genes de las regiones diana que constituyen los genes ARNr 23 y el gen *tuf*, Schnee *et al.* (2012) han descrito la identificación de 37 especies de micoplasmas, incluidos los cuatro agentes patógenos de la agalaxia contagiosa. En el momento de la publicación, se había observado cierta reacción cruzada entre *Ma* y el agente patógeno bovino estrechamente relacionado *M. bovis*. Las ventajas de esta prueba respecto a la PCR son la facilidad de funcionamiento, el alto contenido en información y su relación coste-eficacia.

1.5.4. Desorción/ionización láser asistida por matriz-espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF)

La técnica de la ionización/desorción láser asistida por matriz-espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se ha utilizado para identificar bacterias (Randall *et al.*, 2015), incluidas especies de *Mycoplasma* y los microorganismos causantes de la agalaxia contagiosa (Péreyre *et al.*, 2013). Los microorganismos deben ser cultivados primero, y algunas veces en cultivos mixtos solo se identifica la especie predominante.

1.5.5. Procedimiento analítico

La PCR detallada para *Mycoplasma agalactiae* se ha evaluado en varios laboratorios (Bashiruddin *et al.*, 2005), mientras que otros métodos moleculares a los que se hace referencia en este capítulo para *M. agalactiae* y otras especies contagiosas causantes de agalaxia no se han evaluado en la misma medida y, por lo tanto, no se detallan. Los siguientes cebadores, que se basan en el gen *uvrC*, son específicos de *Ma* (Subrahmaniam *et al.*, 1998). Cada laboratorio puede necesitar optimizar las condiciones de la PCR. En cada prueba deben incluirse ADN control positivos y negativos.

MAGAUVRC1-L CTC-AAA-AAT-ACA-TCA-ACA-AGC

MAGAUVRC1-R CTT-CAA-CTG-ATG-CAT-CAT-AA

- i) Se extrae el ADN de las cepas de *Mycoplasma* aisladas o del material clínico utilizando el método apropiado (Bolske *et al.*, 1988).
- ii) Se realizan los métodos de PCR en mezclas de reacción de 50 µl que contienen: 1 µl de ADN muestra, 20 pmoles de cada cebador (véase más arriba), cada una de las dNTP a una concentración de 1 mM, Tris/HCl 10 mM, pH 8,3, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM y 1,25 mU de ADN polimerasa *Taq*.
- iii) Se somete la muestra a 35 ciclos de amplificación en un termociclador con los parámetros siguientes: 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C de temperatura de enfriamiento y 1 minuto a 72°C.
- iv) Se analizan los productos de la PCR por electroforesis en agarosa al 0,7%, a 110 V durante 2 horas, y se visualiza tiñendo con bromuro de etidio. Un fragmento de 1,7 kb indica la presencia de *Ma*.

2. Pruebas serológicas

2.1. Enzimoimmunoanálisis

Se ha observado que los ELISA en los que se emplean antígenos sonicados o tratados con Tween 20 son más sensibles que la FC para la detección de anticuerpos contra *Ma* en el suero (Bergonier *et al.*, 1997). Los problemas de falta de especificidad se han resuelto utilizando la conjugación a anticuerpos monoclonales o a la proteína G en el ELISA (Lambert *et al.*, 1998). El uso de estos conjugados permite analizar sueros de gran variedad de especies de mamíferos, incluidos camélidos.

Se dispone de dos kits comerciales de ELISA para *Ma*, en uno se emplea una proteína de fusión (sensibilidad del 54% y especificidad del 100%), y en el otro se utilizan células enteras como antígenos diana (sensibilidad del 84% y especificidad del 96% en ovejas o del 90% en cabras) (Poumarat *et al.*, 2012). También pareció haber diferencias en la capacidad de las pruebas de detectar las respuestas a distintas cepas por igual. La elección de la prueba depende de los objetivos del estudio propuesto, es decir, una prueba menos sensible sería suficiente para un estudio de prevalencia en el que la enfermedad fuera endémica, mientras que se requeriría una prueba más sensible para detectar enfermedad en una región libre de la enfermedad.

No se dispone de ELISA fácilmente para los otros tres micoplasmas causantes de la enfermedad.

2.2. Fijación del complemento

Se ha aplicado también una prueba estándar de fijación del complemento (CF) para *Ma* a otros micoplasmas relacionados con el síndrome de la agalaxia contagiosa (Bergonier *et al.*, 1997). Los antígenos se preparan a partir de microorganismos lavados, estandarizados mediante opacidad, que se lisan por ultrasonidos o mediante lauril sulfato sódico y que a continuación se dializan. Los sueros se inactivan a 60°C durante 1 hora, y la prueba se realiza en placas de microtitulación con fijación durante toda la noche en frío o a 37°C durante 3 horas. Se añade el sistema hemolítico y se lee la prueba después de que aparezca en el control de antígeno la lisis completa. Un resultado positivo es la fijación completa a una dilución del suero de 1/40 o superior para los micoplasmas siguientes: *Ma*, *Mcc* y *Mmc*. La prueba de fijación de complemento se considera como una prueba poblacional y se prueban al menos diez sueros de cada rebaño, con preferencia de casos agudos y de animales convalecientes.

Utilizando *Ma*, algunos sueros de rebaños sanos reaccionan en esta prueba hasta una dilución de 1/20, pero raramente reaccionan con los otros dos antígenos. Sin embargo, en los rebaños infectados con *Ma*, los sueros que dan una reacción homóloga a 1/80 pueden presentar una reacción cruzada

con los otros dos antígenos hasta 1/40, que es el umbral positivo. A menudo es difícil realizar la prueba de fijación del complemento si la calidad de los sueros problema es baja; cuando es posible, se prefiere la realización de enzimoimmunoanálisis (ELISA).

2.3. Prueba de inmunoelectrotransferencia

También se han descrito pruebas de inmunoelectrotransferencia para *Ma*, y en Italia se consideran pruebas confirmativas de los brotes (Nicholas, 1998; Tola *et al.*, 1997b). Se observaron bandas notables de aproximadamente 80 y 55 kDa con sueros con anticuerpos frente a *Ma*, mientras que con los sueros de rebaños sanos no se apreciaron bandas o fueron muy débiles y de diferentes tamaños. La dilución de los sueros a 1/50 contribuye a mejorar la diferenciación entre sueros positivos y negativos (Nicholas, 1998). Por otra parte, Poumarat *et al.* (2012), utilizando una dilución de suero a 1/5, consideraron que un suero procedente de un rebaño de Francia era positivo para *Ma* si contenía 4 bandas: 80, 48, 40 y 30 kDa, lo cual sugiere que puede haber ciertas diferencias en las respuestas humorales en función de la ubicación geográfica.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

En los países mediterráneos europeos y en el oeste asiático se emplean mucho las vacunas para prevenir la agalaxia contagiosa debida a *Ma*. No se ha adoptado universalmente ninguna vacuna concreta y no se han desarrollado métodos estándar de preparación y evaluación.

1. Vacunas para la infección por *Mycoplasma agalactiae*

1.1. Vacunas inactivadas para la infección por *Mycoplasma agalactiae*

En Europa, donde no se aceptan las vacunas vivas para *Ma*, se ha centrado la atención en el uso de microorganismos muertos, fundamentalmente empleando formalina y un adyuvante como el hidróxido de aluminio en una emulsión con aceite. Los títulos de las preparaciones antes de la inactivación son muy altos (10^8 – 10^{10} unidades formadoras de colonias por ml) y derivan de cepas de laboratorio. Existen algunos productos comerciales, como una preparación trivalente que contiene *Ma*, *Mcc* y *Mmc* pero existen pocos datos sobre su eficacia. Se demostró que una vacuna de formalina inactiva en una emulsión oleosa fue inmunogénica y protectora en una pequeña prueba en corderos lactantes y también previno la transmisión de *Ma* (Greco *et al.*, 2002). No obstante, en un estudio pequeño, en un producto comercial similar no se evidenció potencia tras el contacto con un microorganismo de desafío (Agnone *et al.*, 2013).

En algunos casos, es posible que la aparente falta de protección por las vacunas pueda ser el resultado de la infección con uno de los otros cuatro micoplasmas implicados en el síndrome de la agalaxia contagiosa (Gil *et al.*, 1999). En las pruebas preliminares, pareció resultar beneficiosa una vacuna de formalina multivalente inactivada que incorpora los cuatro micoplasmas causantes y tiene saponina e hidróxido de aluminio como adyuvantes. (Ramirez *et al.*, 2001).

Más recientemente, las vacunas inactivadas con fenol o con saponina han permitido una protección superior en las infecciones experimentales en comparación con las vacunas tratadas con formalina, hipoclorito sódico o inactivadas por calor (Tola *et al.*, 1999).

1.2. Vacunas vivas atenuadas para la infección por *Mycoplasma agalactiae*

En Turquía, se han utilizado durante muchos años vacunas vivas atenuadas *contra Ma* y se ha descrito que proporcionan una mejor protección en las ovejas y los corderos que las vacunas inactivadas (Nicholas, 2002). Sin embargo, pueden producir una infección transitoria, con excreción de micoplasmas. Las vacunas vivas no deben utilizarse en animales lactantes y deben formar parte de un plan regional en el que se vacunen simultáneamente todos los rebaños cuyos animales con probabilidad de que entren en contacto.

2. Vacunas contra la infección por *Mycoplasma mycoides subsp. capri*

Existe poca información reciente y publicada sobre la disponibilidad de vacunas contra *Mmc* (Marogna *et al.*, 2015), aunque se cree que se están utilizando ampliamente vacunas inactivadas en muchos países mediterráneos y en Asia, lo que sugiere que su producción y empleo están localizados (Bergonier *et al.*, 1997).

En la India se han descrito vacunas saponizadas que causan una respuesta inmunitaria intensa y muestran una cierta protección (Sunder *et al.*, 2002).

3. *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* y *M. putrefaciens*

Aunque las infecciones por *Mcc* y *Mp* pueden ser graves, su prevalencia es relativamente baja y, como es previsible, se han realizado muy pocos trabajos relacionados con la vacunación preventiva de estas infecciones.

BIBLIOGRAFÍA

AGNELLO S., CHETTA M., VICARI D., MANCUSO R., MANNO C., PULEIO R., CONSOLE A., NICHOLAS R.A. & LORIA G.R. (2012). Severe outbreaks of polyarthritis in kids caused by *Mycoplasma mycoides* subspecies *capri* in Sicily. *Vet. Rec.*, **170**, 416.

AGNONE A., LA MANNA M., SIRECI G., PULEIO R., USTICANO A., OZDEMIR U., NICHOLAS R.A.J., CHIARACANE V., DIELI, F., DI MARCO V. & LORIA G.R. (2013). A comparison of the efficacy of commercial and experimental vaccines for contagious agalactia in sheep. *Small Rumin. Res.*, **112**, 230–234.

BASHIRUDDIN J. (1998). PCR and RFLP methods for the specific detection of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. In: *Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, pp 167–178.

BASHIRUDDIN J.B., FREY J., HELTANDER KÖNIGSSON M., JOHANSSON K.E., HOTZEL H., DILLER R., DE SANTIS P., BOTHELLO A., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J., THIAUCOURT F. & SACHSE K. (2005). Evaluation of PCR systems for the identification and differentiation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis*: A collaborative trial. *Vet. J.*, **169**, 268–275.

BECKER C.A., RAMOS F., SELLAL E., MOINE S., POUMARAT F. & TARDY F. (2012). Development of a multiplex real-time PCR for contagious agalactia diagnosis in small ruminants. *J. Microbiol. Methods*, **90**, 73–79.

BERGONIER D., BERTHOLET X. & POUMARAT F. (1997). Contagious agalactia of small ruminants: current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **16**, 848–873.

BOLSKE G., MSAMI H., HUMLESLO N.E., ERNO H. & JOHNSON L. (1988). *Mycoplasma capricolum* in an outbreak of polyarthritis and pneumonia in goats. *Acta Vet. Scand.*, **29**, 331–338.

BRADBURY J.M. (1998). Identification of mycoplasmas by immunofluorescence. In: *Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 119–125.

CATANIA S., GOBBO F., ZCHIAVON E. & NICHOLAS R. (2016). Severe otitis and pneumonia in adult cattle with mixed infection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. *Vet. Rec. Case Rep.*, **4**, e000366 doi:10.1136/vetreccr-2016-000366.

CHAZEL M., TARDY F., LE GRAND D., CALAVAS D. & POUMARAT F. (2010). Mycoplasmoses of ruminants in France: recent data from the national surveillance network. *BMC Vet. Res.*, **6**, 32.

CILLARA G., MANCA M.G., LONGHEU C. & TOLA S. (2015). Discrimination between *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* using PCR-FLP and PCR. *Vet. J.*, **205**, 421–423.

COTTEW G.S. (1971). Characterisation of mycoplasmas isolated from sheep with pneumonia. *Aust. Vet. J.* **47**, 591–596.

DAMASSA A.J., BROOKS D.L. & ADLER H.E. (1983). Caprine mycoplasmosis: widespread infection in goats with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* (large-colony type). *Am. J. Vet. Res.*, **44**, 322–325.

DEDIEU L., MADY V. & LEFEVRE P. C. (1995). Development of two PCRs for the identification of mycoplasmas causing contagious agalactia. *FEMS Microbiol. Lett.*, **129**, 243–250.

- GIL M.C., HERMOSA DE MENDOZA M., REY J., ALONSO J.M. POVEDA J.B. & HERMOSA DE MENDOZA J. (1999). Aetiology of caprine contagious agalactia syndrome in Extramadura, Spain. *Vet. Rec.*, **144**, 24–25.
- GRECO G., CORRENTE M., BUONOVOLIA D., ALIBERTI A. & FASANELLA A. (2002). Inactivated vaccine induces protection against *Mycoplasma agalactiae* infection in sheep. *Microbiologica*, **25**, 17–20.
- GRECO G., CORRENTE M., MARTELLA V., PRATELLI A. & BUONOVOLIA D. (2001). A multiplex PCR for the diagnosis of contagious agalactia of sheep and goats. *Mol. Cell. Probes*, **15**, 21–25.
- KHAN L.A., LORIA G.R., RAMIREZ A.S., NICHOLAS R.A.J., MILES R.J. & FIELDER M.D. (2004). Biochemical characterisation of some non-fermenting, non-arginine hydrolysing mycoplasmas of ruminants. *Vet. Microbiol.*, **109**, 129–134.
- LAMBERT M., CALAMEL M., DUFOUR P., CABASSE E., VITU C. & PEPIN V. (1998). Detection of false-positive sera in contagious agalactia with a multiantigen ELISA and their elimination with a protein G conjugate. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **10**, 326–330.
- LORIA G.R., SAMMARTINO C., NICHOLAS R.A.J. & AYLING R.D. (1999). *In vitro* susceptibility of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincomycin-spectinomycin. *Res. Vet. Sci.*, **75**, 3–7.
- LORUSSO A., DECARO N., GRECO G., FASANELLA A. & BUONOVOLIA D. (2007). A real-time PCR assay for detection and quantification of *Mycoplasma agalactiae*. *J. Appl. Microbiol.*, **103**, 918–923.
- MAROGNA G., BARBATO A., FIORI A. & SCHIANCHI G. (2015). Produzione, uso ed efficacia sul campo di un vaccino stabulogeno contro *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* nelle capre. *Large Anim. Rev. Suppl* 1., 5, Anno 19, 104–106.
- MCAULIFFE L., ELLIS R., LAWES J., AYLING R.D. & NICHOLAS R.A.J. (2005). 16S rDNA and DGGE: a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.*, **54**, 1–9.
- MERCIER P., LENFANT D., POUMARAT F. & PERRIN G. (2001). Prevalence of mycoplasma infection within French milking caprine herds. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 130–133.
- MONNERAT M.P., THIAUCOURT F., POVEDA J.B., DE LA FE C., NICOLET J. & FREY J. (1999). Genetic and serological analysis of lipoprotein lppA in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC and *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 224–230.
- NASCIMENTO E.R., NASCIMENTO M.G.F., FREUNDT E.A. & ANDERSEN H. (1986). Isolation of *Mycoplasma mycoides* from outbreaks of caprine mycoplasmosis in Brazil. *Brit. Vet. J.*, **142**, 246–257
- NICHOLAS R.A.J. (1998). Surveillance for contagious agalactia in Great Britain. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 2, Leori G., Santini F., Scanziani E. & Frey J., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 95–97.
- NICHOLAS R.A.J. (2002). Improvements in the diagnosis and control of diseases of small ruminants caused by mycoplasmas. *Small Rumin. Res.*, **45**, 145–149.
- NICHOLAS R., AYLING R. & MCAULIFFE L. (2008). Contagious agalactia. *In: Mycoplasma Diseases of Ruminants*. CABI, Wallingford, UK, pp 98–113.
- NICHOLAS R.A.J. & BAKER S.E. (1998). Recovery of mycoplasmas from animals. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J. eds. Humana Press, Totowa, USA, 37–44.
- PÉREYRE S., TARDY F., RENAUDIN H., CAUVIN E., DEL PRÁ NETTO MACHADO L., TRICOT A., BENOIT F., TREILLES M. & BÉBÉAR C. (2013). Identification and subtyping of clinically relevant human and ruminant mycoplasmas by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.*, **51**, 3314–3323.

- PEYRAUD A., WOUBIT S., POVEDA J.B., DE LA FE C., MERCIER P. & THIAUCOURT F. (2003). A specific PCR for the detection of *Mycoplasma putrefaciens*, one of the agents of the contagious agalactia syndrome of goats. *Mol. Cell. Probes*, **17**, 289–294.
- PINHO L.A., THOMPSON G.B., MACHADO M.A., SILVA E.P., SANTOS A.G., GONZÁLEZ R.N. & CARVALHEIRA J.G. (2009). Isolation of *Mycoplasma capricolum* subspecies *capricolum* from a dairy calf. *Vet. Rec.*, **164**, 216–217.
- POUMARAT F. (1998). Identification of mycoplasmas by dot immunobinding on membrane filtration (MF Dot). *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 113–118.
- POUMARAT F., LE GRAND D., GAURIVAUD P., GAY E., CHAZEL M. & BERGONIER F. (2012). Comparative assessment of two commonly used commercial ELISAs for the serological diagnosis of contagious agalactia of small ruminants caused by *Mycoplasma agalactiae*. *BMC Vet. Res.*, **8**, 109.
- POVEDA J.B. (1998). Biochemical characteristics in mycoplasma identification. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 69–78.
- POVEDA J.B. & NICHOLAS R.A.J. (1998). Serological identification of mycoplasmas by growth and metabolic inhibition tests. *In: Mycoplasma Protocols*, Miles R.J. & Nicholas R.A.J., eds. Humana Press, Totowa, USA, 105–111.
- RAMIREZ A.S., DE LA FE C., ASSUNCAO P., GONZALEZ M. & POVEDA J.B. (2001). Preparation and evaluation of an inactivated polyvalent vaccine against *Mycoplasma* spp on infected goats. *In: Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*, Vol. 5, Poveda J.B., Fernandez A., Frey J. & Johansson K.-E., eds. European Commission, Brussels, Belgium, 154–157.
- RANDALL L.P., LEMMA F., KOYLASS M., ROGERS J., AYLING R.D., WORTH D., KLITA M., STEVENTON A., LINE K., WRAGG P., MUCHOWSKI J., KOSTRZEWA M. & WHATMORE A.M. (2015). Evaluation of MALDI-ToF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory. *Res. Vet. Sci.*, **101**, 42–49.
- REKHA V., RANA R., THOMAS P., VISWAS K.N., SINGH V.P., AGARWAL R.K., ARUN T.R., KARTHIK K. & SOPHIA I. (2015). Development of loop-mediated isothermal amplification test for the diagnosis of contagious agalactia in goats. *Trop. Anim. Health Prod.*, **47**, 581–587.
- RODRIGUEZ J.L., POVEDA J.B., GUTIERREZ C., ACOSTA B. & FERNANDEZ A. (1994). Polyarthritis in kids associated with *Mycoplasma putrefaciens*. *Vet. Rec.*, **135**, 406–407.
- SANNA G., LECCA V., FODDAI A. & TOLA S. (2014). Development of a specific immunomagnetic capture-PCR for rapid detection of viable *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples. *J. Appl. Microbiol.*, **117**, 1585–1591.
- SCHNEE C., SCHULSE S., HOTZEL H., AYLING R.D., NICHOLAS R.A.J., SCHUBERT E., HELLER M., ERICHT R. & SACHSE K. (2012). A novel rapid DNA microarray assay enables identification of 37 mycoplasma species and highlights multiple mycoplasma infections. *PLoS ONE*, **7**, e33237.
- SEERSHOLM F.V., FISCHER A., HELLER M., JORES, J. SACHSE K., MOURIER T. & HANSEN A.J. (2015). Draft genome Sequence of the First Human Isolate of the Ruminant Pathogen *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*. *Genome Announc.*, **3**, e00583-15.
- SUBRAHAMANIAM S., BERGONIER D., POUMARAT F., CAPUAL S., SCHLATTER Y., NICOLET J. & FREY J. (1998). Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* gene by PCR. *Mol. Cell. Probes*, **12**, 161–169.
- SUNDER J., SRIVASTAVA N.C. & SINGH V.P. (2002). Preliminary trials on development of vaccine against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* type LC infection in goats. *J. Appl. Anim. Res.*, **21**, 75–80.
- TATAY-DUALDE J., SÁNCHEZ A., PRATS-VAN DER HAM M., GÓMEZ-MARTIN A., CORRALES J.C., DE LA FE C., CONTRERAS A. & AMORES J. (2015). Sensitivity of two methods to detect *Mycoplasma agalactiae* in goat milk. *Ir. Vet. J.*, **68**, 21.
- TOLA S., ANGIOI A., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., MANUNTA D., GALLERI G. & LEORI G. (1997a). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Vet. Microbiol.*, **54**, 17–22.

TOLA S., MANUNTA D., COCCO M., TURRININ F., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., ANGIOI A. & LEORI G. (1997b). Characterisation of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, **154**, 355–362.

TOLA S., MANUNTA D., ROCCA S., ROCCHIGIANI A.M., IDINI G., ANGIOI P.P. & LEORI G. (1999). Experimental vaccination against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccines. *Vaccine*, **17**, 2764–2768.

VERBSICK G., GONZALEZ M., GALIAN J., CUBERO M.J., MARTIN P. & LEON-VIZCAINO L. (2008). Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* infection in free-ranging Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) in Andalusia, southern Spain. *J. Wildlife Dis.*, **44**, 369–380.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la agalaxia contagiosa
(puede consultarse la página web de la OIE:

<https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la agalaxia contagiosa, por favor contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.