

PLEURONEUMONÍA CONTAGIOSA CAPRINA

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La pleuroneumonía contagiosa caprina (PNCC) es una enfermedad que afecta a las cabras y a algunas especies de rumiantes salvajes, causada por *Mycoplasma capricolum* subespecie *capripneumoniae* (Mccp). En las cabras, se manifiesta con anorexia, fiebre y signos respiratorios, como disnea, polipnea, tos y rinorrea. Las formas aguda y subaguda de la enfermedad se caracterizan por una pleuroneumonía serofibrinosa unilateral con derrame pleural intenso. El diagnóstico se obtiene a partir de los signos clínicos y de los hallazgos de la necropsia, que deben confirmarse con pruebas de laboratorio. Como el aislamiento de Mccp es difícil, en la confirmación de laboratorio debe optarse por técnicas moleculares.

Detección del agente: Las muestras que deben tomarse de los animales vivos son lavados broncopulmonares o líquido pleural que se extraiga por punción, mientras que las muestras que deben tomarse en la necropsia son lesiones pulmonares, ganglios linfáticos y líquido pleural. Para el cultivo del agente patógeno, los tejidos se trituran en solución tamponada y se inoculan en caldo selectivo y medios sólidos, con antibióticos u otros inhibidores para prevenir el crecimiento de otras bacterias. El cultivo de Mccp requiere medios muy ricos que contengan porcentajes altos de suero. El aislamiento se ve dificultado porque Mccp crece muy lentamente, llegando a tardar hasta 15 días, y por la presencia de otras especies de micoplasmas, como *M. ovipneumoniae*.

En medios líquidos, el crecimiento es visible en un máximo de 4–15 días, generando siempre mucha turbidez. Mccp a veces produce “cometas” en cultivos líquidos no agitados. En medios sólidos, aparecen las típicas colonias en forma de “huevo frito”, muy pequeñas, de 0,1–0,5 mm, y distintas de las de *M. ovipneumoniae*, que no tienen un centro definido. Para una identificación rápida y específica de Mccp pueden utilizarse técnicas moleculares.

Pruebas serológicas: Las cabras que contraen esta enfermedad suelen resultar infectadas por otras especies de *Mycoplasma* que están estrechamente relacionadas con Mccp y que generarán reacciones cruzadas en pruebas inespecíficas. Se puede utilizar una aglutinación en látex para la detección de antígenos polisacáridos para la confirmación de brotes en condiciones de campo, y un enzimoimmunoanálisis específico para estudios de serovigilancia o para el seguimiento de campañas de vacunación.

Requisitos para las vacunas: Las vacunas contra la PNCC son inactivadas y adyuvantadas. El antígeno consiste en células enteras de Mccp que están concentradas y semi-purificadas, y el contenido mínimo es de 0,15 mg de proteína de Mccp por dosis. El adyuvante de elección es la saponina, con un contenido indicativo de 3 mg/dosis. La cantidad de adyuvante podría variar dependiendo del lote de saponina.

A. INTRODUCCIÓN

La pleuroneumonía contagiosa caprina (PNCC) es una enfermedad grave de las cabras que se presenta en muchos países de África y de Asia, causada por *Mycoplasma capricolum* subesp. *capripneumoniae* (Mccp). La forma aguda de la enfermedad se caracteriza por una pleuroneumonía serofibrinosa unilateral con derrame pleural intenso (Thiaucourt, 2018; Thiaucourt & Bolske, 1996). Algunas denominaciones equivalentes en otros idiomas son las siguientes: *pleuropneumonie contagieuse caprine* (Francia), *bou-frida* (Algeria), y *abu-nini* (Sudán).

Desde el punto de vista de la clasificación taxonómica, Mccp pertenece al denominado “grupo mycoides” (Manso-Silvan *et al.*, 2007), y se admitió como subespecie en 1993 (Leach *et al.*, 1993). Los microorganismos

más estrechamente relacionados con el mismo son *Mycoplasma capricolum* subesp. *capricolum* y *Mycoplasma leachii*, que puede generar reacción cruzada con *Mccp*, pero los demás miembros del grupo mycoides, como *Mycoplasma mycoides* subesp. *capri* o *Mycoplasma mycoides* subesp. *mycoides* también pueden tener en común alguna características. *Mccp* es muy exigente, y es posible que la turbidez del medio líquido o la aparición de colonias en los medios sólidos no se observen hasta los 5-15 días. El aislamiento no suele funcionar, y la detección puede ser más fácil con métodos moleculares específicos, como la PCR (Woubit *et al.*, 2004).

La primera descripción de la enfermedad se realizó en Argelia en 1873. Poco después, en 1881, la enfermedad se introdujo en Sudáfrica como consecuencia de un envío de cabras de Angora. La enfermedad se erradicó siguiendo una política de sacrificio de las cabras infectadas, junto a un programa de vacunación tradicional de las cabras que habían estado en contacto con las infectadas (Hutcheon, 1889). Este microorganismo se aisló por primera vez en Kenia, momento en el que se demostró que era la causa de la PNCC (MacMartin *et al.*, 1980; MacOwan & Minette, 1976); con posterioridad se ha aislado en Sudán, Túnez, Omán, Turquía, Chad, Uganda, Etiopía, Nigeria, Tanzania, Eritrea y los Emiratos Árabes Unidos, y más recientemente en las Islas Mauricio (Srivastava *et al.*, 2010), China (Rep. Pop. de) (Chu *et al.*, 2011), Tayikistán (Amirbekov *et al.*, 2010) y Arabia Saudita (El Deeb *et al.*, 2017). La PNCC se describió por primera vez en el continente europeo en 2004, cuando se confirmaron brotes en la región de Tracia, Turquía, con pérdidas de hasta el 25% de cabritos y adultos en algunas poblaciones (Ozdemir *et al.*, 2005). Sin embargo, no se conoce la distribución exacta de la enfermedad y puede estar mucho más distribuida que la zona integrada por los países donde se ha aislado *Mccp*, ya que la PNCC se confunde con frecuencia con otras infecciones respiratorias y también como consecuencia de que el aislamiento del microorganismo causante resulta difícil.

En brotes de PNCC donde hay rebaños mixtos de cabras y ovejas, las ovejas también pueden resultar infectadas, como se ha demostrado mediante el aislamiento de *Mccp* (Bölske *et al.*, 1995) o la detección de anticuerpos en ovejas clínicamente afectadas. También se ha aislado *Mccp* de ovejas sanas (Litamoi *et al.*, 1990) y debe tenerse en cuenta el papel de las ovejas como reservorio de la enfermedad.

PNCC se confirmó inicialmente en rumiantes salvajes dentro de una reserva de fauna salvaje de Qatar. Afectó a cabras salvajes (*Capra aegagrus*), cabras montesas nubias (*Capra ibex nubiana*), muflones (*Ovis orientalis laristanica*) y jirafas gacela (*Litocranius walleri*), con una morbilidad y mortalidad considerables en estas especies (Arif *et al.*, 2005). También se ha notificado en gacelas de Emiratos Árabes Unidos. Cada vez existen más pruebas de que varias especies de rumiantes salvajes son susceptibles, como el antílope tibetano (*Pantholops hodgsonii*) (Yu *et al.*, 2013) o el órix de Arabia (*Oryx leucoryx*) (Chaber *et al.*, 2014). En las gacelas de arena arábigas (*Gazella marica*), la tasa de mortalidad alcanzó el 70% y el número reproductivo básico se cifró en 2.3 (Lignereux *et al.*, 2018).

La PNCC no es una enfermedad zoonótica. Por lo que se sabe, no existe riesgo de infección para el ser humano por *Mccp*. Las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*.

En condiciones de campo, el diagnóstico diferencial puede resultar difícil porque las cabras pueden estar infectadas por varias especies de micoplasmas que podrían inducir signos similares. No obstante, puede sospecharse de CCPP cuando las lesiones se limitan al tracto respiratorio, cuando afectan solo a un pulmón o cuando los animales presentan una pleuresía manifiesta con derrame profuso de líquido pleural. La PNCC también podría confundirse con la peste de los pequeños rumiantes o con la pasteurelosis.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de los brotes de enfermedades respiratorias en cabras, y de PNCC en particular, es complicado, especialmente donde resulta enzoótica. Debe distinguirse de otros síndromes clínico-anatomopatológicos similares causados por otras especies de micoplasmas pertenecientes al clúster Mycoides, pero también de la peste de los pequeños rumiantes, a la que son susceptibles también las ovejas, de la pasteurelosis, que puede diferenciarse por la distribución de las lesiones pulmonares macroscópicas, y del síndrome de la agalaxia contagiosa (Nicholas & Churchward, 2011; Thiaucourt & Bolske, 1996). La enfermedad causada por *Mccp* es fácilmente contagiosa y mortal para cabras susceptibles de todas las edades y de ambos sexos, raramente afecta a las ovejas y no afecta al ganado bovino.

Otros micoplasmas, como *M. mycoides* subsp. *capri* (Mmc), pueden inducir lesiones pulmonares que en la exploración postmortem podrían confundirse con lesiones de la PNCC. No obstante, Mmc normalmente induce otras lesiones, como artritis, mastitis o queratitis. Mmc es un agente causal de agalaxia contagiosa (véase el capítulo 3.8.3) y su rápido crecimiento in vitro garantiza que no pueda confundirse con *Mccp*.

Tabla 1. Métodos de laboratorio que se utilizan actualmente para el diagnóstico de la PNCC y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar 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
Detección del agente¹						
Cultivo <i>in vitro</i>²	–	–	–	++	–	–
Pruebas moleculares (PCR)	–	–	–	+++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
CF	–	–	+	++	+	–
Aglutinación en látex	+	+	–	+++	+	–
C-ELISA	+++	++	–	++	+++	+++

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

1. Detección del agente

1.1. Microscopía de exudados pulmonares, de frotis de impronta o de cortes

Mccp se caracteriza histopatológicamente como una neumonía intersticial con edema intersticial intralobular en los pulmones (Kaliner & MacOwan, 1976). *In vivo* tiene una morfología filamentosamente ramificada que puede observarse por microscopía de fondo oscuro en exudados o suspensiones de tejido de las lesiones o en el líquido pleural. Alternativamente, los frotis de cortes de lesiones pulmonares se pueden teñir por el método de May–Grünwald–Giemsa y observar por microscopía de campo claro. Los otros micoplasmas caprinos tienen una morfología cocobacilar o de filamentos cortos. Ninguna de estas técnicas proporciona un diagnóstico definitivo.

1.2. Identificación molecular y tipificación: reacción en cadena de la polimerasa

Se han publicado las técnicas de dos pruebas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación específica de *Mccp*. La primera (Bascunana *et al.*, 1994) se basa en la amplificación de un segmento conservado del gen del ARNr 16 S del grupo mycoides. El producto de la PCR se analiza después con enzimas de restricción para la identificación del segmento amplificado del *Mccp*. La segunda prueba (Woubit *et al.*, 2004) se basa en una amplificación específica; las secuencias de los cebadores (*Mccp*-spe-F/R) se muestran a continuación.

Mccp-spe-Directo: 5'-ATC-ATT-TTT-AAT-CCC-TTC-AAG-3'

Mccp-spe-Inverso: 5'-TAC-TAT-GAG-TAA-TTA-TAA-TAT-ATG-CAA-3'

Las condiciones de la PCR consisten en un paso inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 15 segundos a 47°C y 15 segundos a 72°C, y un paso final de extensión de 5 minutos a 72°C. El producto amplificado se espera que tenga una longitud de 316 pb.

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

2 Los microorganismos aislados deben someterse a pruebas de confirmación moleculares, bioquímicas o inmunológicas, como se describe más adelante.

Los mismos cebadores pueden utilizarse en una PCR cuantitativa (Lorenzon *et al.*, 2008).

También pueden utilizarse una PCR con recombinasa aplicable en condiciones de campo (Liljander *et al.*, 2015) y una PCR múltiple en tiempo real con transcripción inversa de un solo paso que incluye la detección de *Mccp* (Settypalli *et al.*, 2016)

Estas técnicas de PCR se pueden utilizar directamente con muestras clínicas, como tejido pulmonar y líquido pleural (Bölske *et al.*, 1996), así como líquido pleural secado sobre papel de filtro. Debido a la dificultad del aislamiento de *Mccp*, la PCR es la técnica de elección para el diagnóstico de la PNCC. Sin embargo, el aislamiento de *Mccp* continúa siendo la prueba confirmativa. A todos los micoplasmas del grupo mycooides se les puede asignar una posición filogenética precisa mediante la tipificación de una secuencia multilocus (Manso-Silván *et al.*, 2007).

1.3. Pruebas de precipitación en gel para detectar antígeno en muestras de tejido

Mccp libera un polisacárido antigénico contra el que se ha producido un anticuerpo monoclonal específico (MAb) (WM-25) (Rurangirwa *et al.*, 1987c). Este MAb precipita en gel de agar con el polisacárido producido por *Mccp*, y se utiliza para identificar al agente causante en los casos de PNCC, en especial cuando las muestras no son ya adecuadas para cultivos debido a su deterioro durante el transporte. El MAb puede sustituirse por sueros de cabras que estén convalecientes tras una infección por PNCC, siempre que sean precipitantes. Esta prueba de precipitación podría no ser del todo específica y podría dar ciertas reacciones cruzadas, sobre todo con *M. leachii*. Mediante resonancia magnética nuclear se caracterizó exopolisacárido extraído y se logró la identificación de un homopolímero de $\beta(1\rightarrow2)$ -glucopiranososa (glucano) en *Mccp* y *M. leachii* (Bertin *et al.*, 2015).

1.4. Aislamiento de micoplasmas

1.4.1. Elección de las muestras

Las mejores muestras extraíbles en la necropsia son las lesiones pulmonares, particularmente de la interfase entre áreas consolidadas y no consolidadas, el líquido pleural y los ganglios linfáticos mediastínicos. Si no se puede realizar un examen microbiológico inmediatamente, las muestras o el pulmón completo se pueden guardar congeladas a -20°C durante períodos considerables (meses) sin pérdida aparente de la viabilidad de los micoplasmas. Durante el transporte las muestras se deben mantener siempre tan frías como sea posible, pues la viabilidad de los micoplasmas disminuye con rapidez si aumenta la temperatura. Las muestras de pulmón pueden enviarse a otros laboratorios en forma congelada.

1.4.2. Tratamiento de las muestras

Los frotis se suspenden en 2–3 ml de medio de cultivo. Las muestras de tejido se trocean mejor con tijeras y luego se agitan vigorosamente o se homogenizan en medio utilizando 1 g de tejido con 9 ml de medio. Los tejidos no deben triturarse. Por lo general, la suspensión se prepara con un medio para micoplasmas, pero si se va a realizar un examen bacteriológico en paralelo, se puede utilizar un medio bacteriológico de elevada calidad, como el caldo nutritivo, para disponer de una suspensión adecuada para ambos tipos de examen. El líquido pleural, o una suspensión de tejido o de frotis, se diluyen en serie en el medio seleccionado para micoplasmas al menos haciendo tres diluciones decimales (hasta una dilución nominal de 10^{-4}). Las diluciones también deben sembrarse en medio sólido.

1.4.3. Medios para micoplasmas

El medio utilizado por MacOwan y Minette para cultivar *Mccp* (MacOwan & Minette, 1976) se denomina “gota caldo carne-hígado de cabra” (*viande foie goat*, VFG) e incluye caldo de carne de cabra e hígado y suero de cabra. Otros medios alternativos adecuados son el WJ (Jones & Wood, 1988), el medio de Hayflick modificado, y la triptosa modificada de Newing (Kibor & Waiyaki, 1986). Los medios enriquecidos con 0,2% (o hasta el 0,8%) de piruvato sódico funcionan considerablemente mejor tanto para el aislamiento primario como para la producción antigénica de *Mccp* (Mohan *et al.*, 1990; Thiaucourt *et al.*, 1992).

i) Medio PNCC

a) Solución esterilizada en autoclave (121°C durante 15 minutos)

Caldo PPLO (microorganismos semejantes a los de la pleuroneumonía) sin cristal violeta (21 g); agua desionizada (700 ml).

b) Solución filtrada por membrana

Suero de caballo (o, alternativamente, de cerdo o de asno) inactivado a 56°C durante 30 minutos (200 ml); extracto fresco de levadura (100 ml); glucosa (solución estéril 0.5 g/ml) (2 ml); y piruvato sódico (solución estéril de 0,5 g/ml) (8 ml).

La solución B se añade asépticamente a la A. Para evitar contaminaciones en los aislamientos primarios se puede añadir ampicilina (0,1 g/litro) y acetato de talio (250 mg/litro). El pH final del medio debe ser 7,4–7,6.

ii) Medio PNCC modificado

a) Solución esterilizada en autoclave (121°C durante 15 minutos)

Caldo PPLO sin cristal violeta (17,5 g); agua destilada en destilador de vidrio (650 ml).

b) Solución filtrada por membrana

Suero de caballo (alternativamente de cerdo o asno) inactivado a 56°C durante 30 minutos (250 ml); extracto fresco de levadura (100 ml); 50% de glucosa (4 ml); 25% de piruvato sódico (8 ml); 5% de acetato de talio (4 ml); ampicilina (250 mg) y 0,5% de rojo fenol (4 ml). El pH se ajusta a 7,8 con hidróxido sódico o con ácido clorhídrico. La solución B se añade asépticamente a la A.

1.4.4. Producción, conservación y control de calidad del medio

Algunos componentes del medio, como el suero, el extracto de levadura y el agua desionizada deben controlarse regularmente antes de incorporarse a los medios para micoplasmas en cuanto a su capacidad para permitir el crecimiento. Para estos análisis se deben utilizar cepas naturales de pocos pases.

Los medios líquidos se pueden guardar antes de su uso a –25°C por lo menos durante 6 meses, pero no deben añadirse penicilina ni sus análogos hasta la distribución final. Los medios líquidos se dispensan en viales (1,8 ml o 2,7 ml) o tubos con tapón de rosca (4,5 ml) y se guardan hasta 3 semanas a 4°C. Los medios sólidos se hacen con agarosa (0,9% [p/v]), agar Noble (1,5% [p/v]) o agar purificado (0,6% [p/v]). Cuando se usan placas, que se llenan hasta 6–8 mm, deben ser tan recientes como sea posible y se pueden guardar antes de su uso a 4°C como máximo durante 2 semanas. Todos los medios de cultivo deben someterse a controles de calidad y favorecer el crecimiento de especies de *Mycoplasma* a partir de inóculos pequeños. La cepa de referencia debe cultivarse simultáneamente a las muestras sospechosas para comprobar que las pruebas funcionan correctamente.

1.4.5. Cultivo

Los cultivos se incuban a 37°C. Las placas se cultivan mejor en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, 95% de aire o N₂ o en una jarra de anaerobiosis con una fuente de humedad. Los cultivos también pueden incubarse en anaerobiosis.

Los cultivos líquidos se examinan diariamente para comprobar si presentan indicios de crecimiento, como cambios de color o la aparición de material floculento. Una turbidez macroscópica indica contaminación bacteriana; los cultivos que la presenten deben filtrarse por una membrana con poro de 0,45 µm antes de volver a cultivarlos. Los medios líquidos se vuelven a cultivar por inoculación de medio líquido fresco con una décima parte de su volumen o mediante siembra en estría en medio sólido con un asa de cultivo.

Los cultivos en placa se examinan cada 1–3 días con una lupa estereoscópica (5–50 aumentos) y con luz incidente y transmitida. Si son negativas, las placas se eliminan a los 15 días. El subcultivo se realiza por transferencia de bloques cortados del agar que lleven colonias aisladas a medio sólido (sobre el que se presionan los bloques, boca abajo) o a medios líquidos. Alternativamente, se toma con una pipeta Pasteur un trozo de agar con una colonia y se descarga en medio líquido fresco.

La clonación y purificación de los cultivos se lleva a cabo por transferencia repetida de colonias aisladas que representen cada tipo morfológico observado. La morfología colonial varía con el medio utilizado, la especie de micoplasma, el número de pases y la edad del cultivo.

En los primeros pases, muchas especies de micoplasmas producen colonias de morfología extraña, frecuentemente pequeñas, sin centro y de forma irregular: A menudo este efecto se asocia al empleo de un medio poco adecuado. Con los pases, tales cepas muestran la morfología colonial convencional en “huevo frito”, excepto *M. ovipneumoniae*, que mantiene la forma de colonias sin centro. Las colonias de *M. mycoides* subespecie *capri* pueden medir hasta 3 mm de diámetro.

La filtración de los cultivos líquidos por filtros de 0.45 µm, antes de los subcultivos, favorece la purificación al excluir agregados celulares.

Los cultivos que se sospecha que son formas L bacterianas deben examinarse para observar si revierten a la forma bacteriana mediante tres a cinco pases en medio sólido para micoplasmas del que se omiten los antibióticos y el acetato de talio.

Los medios líquidos utilizados para el aislamiento primario que no muestren indicios de crecimiento a los 7 días, deben subcultivarse.

Los cultivos líquidos de cada muestra, incluyendo un subcultivo ciego, deben examinarse durante 3 semanas como mínimo antes de eliminarse. Si las titulaciones en medio líquido son totales (hasta 10⁻¹⁰), también se leen a las 3–4 semanas y se expresan como unidades que cambian de color por volumen transferido. El crecimiento en las placas se expresa como unidades formadoras de colonias (UFC) por ml.

1.5. Identificación de micoplasmas

Antes de intentar la identificación de cepas naturales, estas deben pasarse tres veces, y preferiblemente clonarse.

1.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa

Una vez se ha cultivado el microorganismo, se puede verificar que es *Mccp* por PCR en 1 día. Véase el apartado B.1.2 de este capítulo.

Se ha usado PCR y posterior secuenciación para establecer la epidemiología molecular de la PNCC. También se dispone de un método de análisis de secuencia multilocus (MLSA) (Manso-Silvan *et al.*, 2011) que ha puesto de manifiesto dos linajes principales que comprenden cinco grupos de un conjunto representativo de cepas de *Mccp*.

Actualmente, la identificación de cepas de *Mccp* por PCR (y secuenciación) sustituye a todas las otras técnicas por su rapidez y fiabilidad. Sin embargo, las reacciones de PCR deben realizarse con gran cuidado para evitar contaminaciones (véase la Capítulo 2.2.1. *Biotecnología en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas*). La secuenciación de genomas completos de *Mccp* es la técnica más actual de tipificación. Algunos genomas de *Mccp* ya se han publicado (Chen *et al.*, 2017; Dupuy & Thiaucourt 2014; Falquet *et al.*, 2014), y lo esperable es que en los próximos años se publiquen otros (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/neighbors/521?&genome_assembly_id=300226)

1.5.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas no pueden identificar una cepa de modo inequívoco, lo cual actualmente solo puede hacerse por medios genéticos.

Las pruebas de uso más corriente son el uso de la glucosa (*Mccp*: positiva), la hidrólisis de arginina (*Mccp*: negativa), la formación de “velo y manchas” (*Mccp*: negativa), la reducción del cloruro de tetrazolio aeróbica y anaeróbicamente (*Mccp*: +/++), la actividad de la fosfatasa (*Mccp*: negativa), la digestión del suero (*Mccp*: negativa) y la sensibilidad a la digitonina (*Mccp*: positiva).

1.5.3. Identificación serológica

Los antígenos de micoplasmas utilizados en producción de suero hiperinmune están a menudo contaminados con constituyentes del medio. Los anticuerpos estimulados por estos contaminantes pueden causar falsos positivos en pruebas serológicas de identificación. Este problema se evita por absorción del antisuero con el medio utilizado para producir el antígeno (10 mg de medio liofilizado por ml de antisuero), o cultivando el micoplasma empleado como antígeno en medio que contenga componentes de animal homólogos, por ejemplo, crecimiento en medio VFG para inmunizar cabras.

1.5.3.1. Prueba de inhibición del crecimiento

De las pruebas disponibles, la prueba de la inhibición del crecimiento (GIT) es la más simple y específica, pero también la menos sensible. Se basa en la inhibición directa del crecimiento en medio sólido por suero específico hiperinmune y detecta sobre todo antígenos de superficie.

Mccp parece ser serológicamente muy homogéneo y se observan amplias zonas de inhibición sin colonias con antisuero contra la cepa tipo, sea cual sea el origen de la cepa problema (Jones & Wood, 1988). Cuando se emplean antisueros policlonales, *Mccp* presenta reacciones cruzadas en el GIT con *M. leachii* (PG50), *M. equigenitalium* y *M. primum*, pero se ha producido un MAb específico para *Mccp* en la GIT (Rurangirwa *et al.*, 1987c). El MAb reaccionante, WM25, se ha descrito como específico de cepas (de *Mccp*) por el método de inhibición del crecimiento en disco, que excluye *M. agalactiae*, *Mcc* y otros miembros del "grupo mycoides" asociados a cabras, pero no al grupo 7 bovino (que no se encuentra normalmente en cabras): el último, sin embargo, puede excluirse por pruebas de fluorescencia indirecta en las colonias. Una pequeña proporción de cepas de *Mccp* también genera reacción cruzada en la GIT con antisuero contra *Mcc*. A veces pueden hallarse cepas de *Mycoplasma leachii* en cabras, aunque es algo muy infrecuente. Los resultados deben interpretarse con cautela ya que se han identificado equivocadamente mediante GIT algunas cepas bovinas utilizando el antisuero "específico".

- **Procedimiento analítico**

- a) Se utilizan tres diluciones decimales de cultivo líquido en fase logarítmica media a avanzada, dependiendo del vigor del crecimiento de la cepa en el agar.
- b) Las placas con agar se secan durante 30 minutos a 37°C.
- c) Se impregnan discos estériles de papel de 6–7 mm de diámetro con una gota (10–20 µl) de antisuero sin diluir. Los discos se pueden usar húmedos, en cuya forma se pueden conservar a –20°C, o se pueden liofilizar (Dighero *et al.*, 1970), lo que permite su conservación a 4°C.
- d) Utilizando una placa por cada dilución de cultivo, se pipetea 1 ml ó 2,5 ml en placas de 5 o de 10 cm de diámetro, respectivamente. El inóculo se distribuye uniformemente sobre la placa y se retira el exceso.
- e) Las placas se secan a 20–30°C durante 15–20 minutos, a ser posible en una cabina de siembra, hasta que no quede líquido visible en la superficie. Debe quedar suficiente humedad para permitir que los discos liofilizados se adhieran a la superficie del medio sólido.
- f) Se colocan cuidadosamente varios discos, cada uno de ellos impregnado con un antisuero diferente (que se selecciona teniendo en cuenta el origen de la muestra, las reacciones bioquímicas y la morfología colonial de la cepa), sobre las placas con agar; las cepas aisladas de casos de PNCC deben analizarse con antisueros contra *Mccp*, *M. mycoides* subespecie *capri* y *M. ovipneumoniae*. También debe incluirse en las placas un disco con 1,5% de digitonina.
- g) Las placas se incuban a 37°C durante 2–6 días. Una incubación inicial a 27°C durante la noche puede aumentar la sensibilidad de la prueba. La inhibición por digitonina suele ser fácilmente aparente; sin embargo, la inhibición por antisuero puede ser más difícil de interpretar, presentándose supresión en vez de inhibición del crecimiento dependiendo de la especie de micoplasma, la densidad de la colonia y la potencia del antisuero. Se observan a menudo colonias "avanzadas" en las zonas de inhibición. Alrededor de los discos se observan ocasionalmente bandas circulares de precipitina. Una zona de 2 mm o superior se considera una inhibición positiva.

2. Pruebas serológicas

La serología no se ha aplicado mucho para identificar la causa de los brotes de pleuroneumonía en cabras y ovejas. Actualmente se dispone de tres métodos: la CF, la aglutinación en látex y el enzimoimmunoanálisis (ELISA) de competición (C-ELISA) con un MAb específico ("4.52" C-ELISA). Las cabras a menudo resultan infectadas por micoplasmas del grupo mycoides, que pueden generar reacciones cruzadas en pruebas como la CF, en las que se utilizan preparaciones de antígeno crudo. Además, la CF detecta principalmente IgM, que tienen una vida corta, motivo por el que esta técnica no se recomienda.

La CF demuestra que la seroconversión a *Mccp* en animales infectados experimentalmente comienza 7–9 días después de la aparición de los signos clínicos, alcanza su punto máximo entre los días 22 y 30 y disminuye rápidamente a partir de entonces. Estas diversas observaciones indican que la serología debe aplicarse en un rebaño, no de forma individual, y que, siempre que sea posible, se deben examinar muestras de suero emparejadas obtenidas con un intervalo de 3 a 8 semanas.

2.1. Fijación del complemento (MacOwan y Minette, 1976)

Para preparar el antígeno, se centrifugan 2 litros de cultivo de título superior a 10^9 UFC/ml a 12 000 **g** durante 1 hora a 5°C. El depósito se resuspende y se lava tres veces en solución salina fisiológica antes de la conservación en volúmenes de 0,5 a 1,0 ml a –20°C.

El caldo estéril tratado como antes constituye un antígeno control, y un caldo liofilizado reconstituido a 200 mg/ml constituye un segundo antígeno control. Antes de la prueba, el antígeno se diluye a 1/60 y se ultrasonica durante 3 minutos a baja potencia en un recipiente con agua helada. El sonicado se centrifuga a 1250 **g** durante 30 minutos para eliminar todo posible residuo y se conserva a –20°C. Si se conserva durante más de 2 a 3 semanas, el antígeno debe volver a centrifugarse.

2.1.1. Procedimiento analítico

Las pruebas de placa de microtitulación se realizan utilizando volúmenes de 0,025 ml, dos volúmenes que contengan tres dosis hemolíticas medias de complemento y una concentración final de glóbulos rojos ovinos (SRBC) al 1,5% (v/v) en placas de microtitulación con fondo en U, como se indica a continuación:

- i) Lo siguiente se mezcla e incuba a 37°C durante 45 minutos:
 - a) 25 μ l de diluciones a la mitad de suero problema (inactivado por calor a 56°C durante 30 minutos) empezando con una dilución a 1/2 ;
 - b) 25 μ l de antígeno que contenga dos unidades de antígeno (la dilución del antígeno debe determinarse en una titulación en tablero de ajedrez empleando un suero que se sepa que es positivo. Una unidad de antígeno corresponde a la dilución de antígeno más alta que dé el título más alto con el suero positivo de referencia;
 - c) 25 μ l de complemento (3 unidades hemolíticas).
- ii) 25 μ l de eritrocitos ovinos sensibilizados, a una concentración final de 1,5% (v/v), se mezclan y las placas se incuban a 37°C durante 45 minutos.
- iii) Las placas se incuban a 4°C durante 1 hora para que los eritrocitos ovinos intactos sedimenten.
- iv) Lectura de los resultados: El título será la dilución sérica máxima que fija un 50% del complemento, es decir, que da lugar a un 50% de hemólisis.

2.1.2. Controles

En todas las CF se precisan determinados controles:

- i) Sistemas indicadores (eritrocitos + hemolisina) solos, para garantizar que los eritrocitos no se lisen espontáneamente.
- ii) Sistema indicador con complemento solo, para mostrar que hay suficiente complemento para lisar las células.
- iii) Sistema indicador con antígeno solo y sin complemento, para mostrar que el antígeno solo no lisa las células.
- iv) Sistema indicador con suero solo y sin complemento, para mostrar que el suero solo no lisa las células.
- v) Sistema indicador con complemento y antígeno para detectar toda posible actividad anticomplemento del antígeno.
- vi) Sistema indicador con el complemento y el suero para detectar toda posible actividad anticomplemento del suero.

NB: Dado que se espera que muchos micoplasmas, en particular los que pertenecen al grupo de micoides, induzcan reacciones cruzadas en la CF, se deben realizar pruebas adicionales cuando se encuentren títulos positivos de CF en un país o zona libre de PNCC. Los sueros sospechosos deben

analizarse en paralelo con antígenos preparados con varias especies de micoplasmas y, en particular, *M. capricolum*, *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. leachii* y *M. mycoides* subsp. *capri*. El antígeno que produzca el título más alto indicará qué especie estaba infectando al animal/rebaño.

2.2. Aglutinación en látex

En una prueba de aglutinación en porta se han utilizado perlas de látex sensibilizadas con el polisacárido producido por *Mccp* y presente en el sobrenadante del cultivo (Rurangirwa *et al.*, 1987a). Esta prueba es muy útil en caso de brote porque puede realizarse a pie de explotación empleando una gota de sangre total.

Es una prueba sensible en las primeras etapas de la enfermedad siempre que la IgM persista en el suero. Su especificidad no está bien definida. Pueden tener lugar reacciones cruzadas porque los polisacáridos de *Mccp* son similares a los de *M. leachii* y a los de *M. capricolum* subsp. *capricolum* (Bertin *et al.*, 2015), y podrían hallarse también en otras bacterias.

2.3. Enzimoimmunoanálisis de competición

Se ha desarrollado un C-ELISA (Thiaucourt *et al.*, 1994) que se ha comprobado que es específico y sensible. Esta prueba se ha lanzado de nuevo recientemente en formato de kit que contiene placas ya recubiertas y reactivos listos para ser utilizados, incluido el MAb 4/52. Ahora se trata de una prueba estrictamente de competición en lugar de una prueba de semi-bloqueo, como en la versión inicial. El nuevo kit se ha vuelto a validar para establecer su valor de corte, una inhibición (PI) del 55%, con el fin de obtener una especificidad estricta del 99,9%. Permite la detección de sueros positivos en rebaños infectados por la PNCC, pero todavía no se ha determinado con exactitud cuál es su verdadera sensibilidad a nivel individual. Dado que es una prueba muy específica, puede utilizarse para evaluar el estado del rebaño respecto a la infección empleando un muestreo dirigido de animales que se hayan recuperado, lo cual debería mejorar en gran medida la sensibilidad sin ningún problema de especificidad. En el Laboratorio de Referencia de la OIE, en Francia, se ha determinado que la incertidumbre de la medición en este C-ELISA es de ± 8 PI.

Esta prueba se puede utilizar para evaluar la calidad de la vacuna contra la PNCC, ya que los valores de seroconversión medidos 1 y 2 meses post-vacunación son proporcionales al contenido de antígeno de *Mccp* o de saponina. No obstante, todavía no se ha establecido la correlación entre el título de C-ELISA y el grado de protección que confiere (Peyraud *et al.*, 2014).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Ya se logró erradicar con éxito la PNCC en el sur de África en 1889 aplicando una estrategia basada en el sacrificio de los animales afectados y en la inoculación de todas las cabras que hubieran contactado con aquellos. La inoculación consistió en la inyección subcutánea de preparaciones que contenían líquido pleural o homogenados de pulmón afectados. Contrariamente a lo que se observa en la pleuroneumonía contagiosa bovina, la inyección subcutánea de *Mccp* vivo en cabras nunca antes expuestas no genera ninguna reacción inflamatoria inesperada. Ello podría haber contribuido al éxito del programa de erradicación a pesar de que las preparaciones utilizadas fueran crudas. Sin embargo, no se evaluó en qué medida contribuyó el sacrificio al proceso de erradicación, y en qué medida lo hicieron las inoculaciones.

Se han llevado a cabo algunos estudios para desarrollar vacunas vivas y para evaluar su potencia. Dichos estudios se han centrado en preparaciones inactivadas que contenían saponina como agente inactivante, y adyuvante (Rurangirwa *et al.*, 1987b). La dosis óptima de antígeno se estableció en 0,15 mg de proteína de *Mccp* y 3 mg de saponina. En la primera versión, el antígeno concentrado estaba liofilizado y debía reconstituirse con un diluyente que contenía 3 mg de saponina por ml. Este procedimiento garantizó un periodo de validez muy largo para el antígeno concentrado (> 14 meses) y una protección de más de 12 meses de duración.

Debido al grado de exigencia de *Mccp*, la producción de vacunas contra la PNCC es cara. *Mccp* requiere medios muy ricos, el rendimiento es escaso, el procedimiento requiere un proceso de purificación, y las vacunas inactivadas también requieren cantidades más grandes de antígeno que en el caso de las vacunas vivas.

Las vacunas contra la PNCC deben ser seguras. El hecho de que las cepas vivas de *Mccp* no induzcan reacciones post-vacunales podría ser una ventaja para este tipo de vacuna. En el caso de las vacunas inactivadas que contienen saponina, el efecto pro-inflamatorio de la saponina debe verificarse, porque puede

variar en función del fabricante o del lote. No se recomienda vacunar a hembras gestantes debido a una posible reacción a la saponina. Dada la respuesta inmunitaria desencadenada por el adyuvante saponina, se puede utilizar la serología, y concretamente el C-ELISA específico, tanto para el control de calidad de los lotes como para un control serológico durante las campañas de vacunación (Peyraud *et al.*, 2014). Algunos productores de vacuna están comprometidos con el cumplimiento de estos protocolos. En 2018, se creó una nueva técnica de espectrometría de masas destinada a analizar la composición de la vacuna. Permite cuantificar los péptidos específicos de *Mccp* por comparación con los de otros orígenes, incluidos los que provienen de los componentes del medio (Thiaucourt *et al.*, 2018).

La vacuna contra la PNCC debe ser eficaz durante al menos 1 año y proteger a los animales vacunados de la enfermedad clínica.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices aquí indicadas y las del capítulo 1.1.8 son de carácter general y podrían tener que complementarse con requisitos nacionales o regionales.

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Puede utilizarse cualquier cepa local de *Mycoplasma capricolum* subesp. *capripneumoniae* debido a la homogeneidad de esta subespecie. La elección de la cepa dependerá principalmente de las características de crecimiento: rapidez de crecimiento, facilidad de concentración y purificación, etc.

2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

Debe comprobarse que los lotes de inóculo son:

i) Puros

La pureza puede comprobarse eligiendo aleatoriamente 10 clones de *Mccp* a partir del inóculo y verificando la identidad de dichos clones utilizando, por ejemplo, una técnica de PCR específica (otras pruebas pueden no ser lo bastante específicas). Debido a lo exigentes que son las cepas de *Mccp*, es probable que cualquier microorganismo contaminante crezca más que *Mccp* y que sea detectable mediante este procedimiento.

ii) Inocuos

Normalmente no se observa ninguna reacción inflamatoria cuando se inyectan cepas de *Mccp* por vía subcutánea a cabras susceptibles. Por lo tanto, es difícil (si es que es necesario) establecer la inocuidad del inóculo.

iii) Eficaces

Las vacunas que se producen a partir de la cepa escogida deben inducir protección cuando se producen de acuerdo con los procedimientos estándar y se inyectan a cabras susceptibles nunca antes expuestas.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Dado que no existe ningún modelo de animales de laboratorio para la PNCC, el inóculo tendrá que validarse como cepa vacunal adecuada con cabras susceptibles al menos una vez. La vacuna debe prepararse de acuerdo con los procedimientos estándar e inyectarse a cabras susceptibles. Las cabras vacunadas y nunca antes expuestas deben ponerse en contacto con animales infectados por la PNCC al menos 3 meses después de la vacunación. El nivel esperable de protección debe ser de al menos un 90% con un número de animales por grupo que dé resultados estadísticamente significativos.

Si el proceso de vacunación o la presentación de la vacuna final difieren de la presentación original con la que se ha comprobado la protección, deberán realizarse otras pruebas para comprobar la inmunogenicidad del nuevo producto final.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Para producir la vacuna, en primer lugar se establece un inóculo de trabajo amplificando una alícuota de inóculo primario liofilizado que se haya comprobado que induce protección. No existe ningún requisito específico en cuanto al tipo de medio que debe utilizarse siempre que asegure un crecimiento satisfactorio de la cepa de *Mccp*. El número de pases desde el banco de inóculo primario hasta la producción del lote debe ser inferior a 5 (un pase corresponde a una dilución del inóculo a 1/200).

Deben concentrarse y purificarse células de *Mccp*. Tampoco en este caso existe ningún requisito específico para este paso, y los productores podrían escoger cualquier método que se considere necesario, siempre que el producto final sea puro y esté libre de productos extraños procedentes del medio de cultivo. Por ejemplo, los cultivos pueden centrifugarse a alta velocidad (> 12.000 **g**) durante 20 minutos, el precipitado puede volver a suspenderse en un volumen suficiente de PBS estéril para el lavado, y puede precipitarse *Mccp* de nuevo.

El antígeno de *Mccp* concentrado lavado puede diluirse para ajustar el contenido en proteína, y liofilizarse. El contenido de cada vial se ajusta de tal manera que la cantidad final de proteína sea de 0,15 mg por dosis una vez la vacuna está reconstituida. En esta fase puede tener lugar una inactivación primaria del antígeno concentrado mediante saponina.

La vacuna final se obtiene reconstituyendo el producto liofilizado con el volumen necesario de diluyentes que contenga 3 mg de saponina por dosis. La saponina actúa como agente inactivante de la *Mccp* y como adyuvante.

NB: Cualquier procedimiento de producción que modifique el contenido en antígeno y sus características o el tipo de adyuvante justifica una nueva validación o verificación del registro.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

No existen requisitos específicos. Para conocer los requisitos generales, por favor consulte el capítulo 1.1.8, con especial atención a los productos de origen biológico procedentes de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles.

2.2.3. Controles durante el proceso

La pureza del crecimiento de *Mccp* puede evaluarse periódicamente con métodos rápidos como la observación de los cultivos en contraste de fases. Ello permitirá comprobar si hay contaminación por bacterias con pared celular (micoplasmas con aspecto de diminutos puntos grises visibles, mientras que las bacterias con pared celular son más grandes y brillantes).

La ausencia de contaminantes del medio en el producto final concentrado de *Mccp* puede evaluarse mediante técnicas como la SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) utilizando controles como antígeno de *Mccp* y medio de producción diluido. La ausencia de contaminantes del medio asegura que la proteína proviene del antígeno del micoplasma y no de posibles contaminantes.

La cantidad de antígeno de micoplasma en el producto concentrado se puede evaluar por su contenido en proteína siempre que el porcentaje de proteínas distintas de las esperables sea bajo. Toda técnica adecuada será aceptable, como por ejemplo, la técnica del ácido bicinconínico, siempre que se incluyan los controles apropiados en la prueba, por ejemplo, patrones de albúmina bovina o antígeno de referencia de *Mccp*.

Para evaluar la composición final del antígeno de *Mccp* concentrado se puede utilizar la espectrometría de masas (Thiaucourt *et al.*, 2018). Esta técnica permite detectar y cuantificar los contaminantes del medio que sigan presentes en el antígeno concentrado. Es responsabilidad del productor de la vacuna definir, en el expediente de registro/validación, qué nivel de proteína distinta de la esperable es aceptable sin arriesgar la inmunogenicidad de la vacuna.

Una vez el antígeno ha sido inactivado por saponina, la esterilidad se puede evaluar mediante siembra de una muestra en medios adecuados que permitan el crecimiento de *Mccp*.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Deben aplicarse procedimientos estándar para comprobar la esterilidad en un número representativo de viales (véase el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

ii) Inocuidad

Se pueden omitir las pruebas en lotes de producto final relativas a la inocuidad en especies de destino (TABST - *target animal batch safety tests*) si en pruebas realizadas con anterioridad a la autorización se ha comprobado la inocuidad del producto y se ha aprobado en el expediente de registro, y si se ha aprobado la congruencia respecto al proceso de producción.

Cuando sea necesario, se realizará una TABST para detectar posibles reacciones adversas anómalas locales o sistémicas. A los efectos de la liberación del lote, se inocula a un mínimo de tres cabras seronegativas sanas, por la vía de administración recomendada, al menos el doble de la dosis recomendada de la vacuna. Los animales se observan durante un mínimo de 14 días para comprobar si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación. Deben evaluarse todas las reacciones adversas atribuibles a la vacuna, que podrían impedir la aceptación del lote. Si la prueba de potencia se lleva a cabo en la especie de destino, la observación de la inocuidad durante esta prueba también puede considerarse una alternativa a la realización de la prueba de inocuidad en lotes de producto final que aquí se describe.

iii) Potencia del lote

No es viable comprobar la potencia de los lotes en hospedadores susceptibles debido a las dificultades de reproducir la PNCC. A los efectos de liberar el lote, pueden utilizarse pruebas indirectas por motivos de viabilidad y de bienestar animal.

Las tres cabras nunca antes expuestas que se vacunan para la prueba de seguridad deben presentar una seroconversión específica persistente y un título alto respecto al antígeno de *Mccp* durante al menos 2 meses tras la vacunación. Lamentablemente, no se ha determinado si la seroconversión detectada con las pruebas serológicas que se utilizan para la PNCC está correlacionada con la protección del animal. No obstante, la detección de una seroconversión específica adecuada asegura que el producto analizado contiene el antígeno correcto y que puede inducir una respuesta inmunitaria en animales vacunados. Por el momento, puede utilizarse una inmunoelectrotransferencia (Abdo *et al.*, 1998) para evaluar esta seroconversión. Algunas pruebas alternativas podrían ser la CF o el C-ELISA, que detecta anticuerpos contra un solo epítipo. La prueba de la aglutinación en látex podría no utilizarse debido a que detecta anticuerpos contra un polisacárido que puede hallarse en otros micoplasmas del grupo *mycoides*, además del hecho de que no existen requisitos en cuanto al contenido en polisacárido de la vacuna (todavía no se ha establecido el posible papel protector de la respuesta inmunitaria contra los polisacáridos).

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Proceso de fabricación

Para la aprobación de la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y C.2.2). Esta información debe corresponder a tres lotes consecutivos de vacuna de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

A los efectos de conseguir la autorización, debe someterse un lote provisional de vacuna a pruebas de toxicidad local y sistémica, administrando el producto por la vía recomendada a ocho cabras susceptibles, con el fin de realizar la evaluación *in vivo*. Los animales deberán observarse durante un mínimo de 14 días tras la inyección para

comprobar si presentan reacciones locales o sistémicas. Deberá evaluarse toda posible reacción adversa atribuible a la vacuna, que podría impedir la aceptación de la vacuna. Debido a la presencia de saponina en la vacuna, es posible observar una reacción febril transitoria, así como una tumefacción localizada.

ii) Precauciones (peligros)

Mccp no es patógena para el ser humano. La auto-inyección accidental puede inducir una irritación local debido a la presencia saponina en la vacuna.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, deben realizarse pruebas de eficacia (protección) en uno o más lotes producidos según el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno o el nivel de potencia mínimo; cada futuro lote comercial deberá analizarse antes de ser liberado para garantizar que tiene el mismo nivel de potencia que se ha observado en el/lote/s utilizados en la/s prueba/s de eficacia.

La eficacia (protección) se determina en animales vacunados evaluando directamente su resistencia al ser expuestos al agente patógeno vivo y en comparación con animales control no vacunados.

La eficacia se evaluará 3 meses después de la vacunación mediante un método de contacto por el cual se ponen en contacto cabras infectadas con animales vacunados y con animales nunca antes expuestos. La tasa de protección se determinará en función de la presencia de signos clínicos (días con fiebre) y de las lesiones que se observan al sacrificar a los animales 1 a 2 meses después de que la enfermedad se haya iniciado en el grupo control. La tasa de protección debe ser de al menos un 90% (± 10).

Debido a que las cepas de *Mccp* se conservan, para evaluar la protección que confiere la vacuna puede utilizarse cualquier cepa patógena natural, siempre que se demuestre que es patógena en el grupo control.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

No es aplicable a las vacunas actuales contra la PNCC.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Como parte del procedimiento de aprobación del registro, debe exigirse al fabricante que compruebe la duración de la inmunidad (DOI) de las vacunas mediante pruebas de exposición o de otro tipo al final del periodo de protección indicado. En el caso de la vacuna contra la PNCC inactivada por saponina, se estima que este periodo es de 1 año.

2.3.6. Estabilidad

Como parte del procedimiento de registro/licencia, debe exigirse al fabricante que compruebe la estabilidad de todas las propiedades de la vacuna al final del periodo de validez indicado. Deberá indicarse la temperatura de almacenamiento y advertir acerca de si el producto puede resultar dañado por la congelación o por dejarlo a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

ABDO EL M., NICOLET J., MISEREZ R., GONCALVES R., REGALLA J., GRIOT C., BENSALD A., KRAMPE M. & FREY J. (1998). Humoral and bronchial immune responses in cattle experimentally infected with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type. *Vet. Microbiol.*, **59**, 109–122.

AMIRBEKOV M., MURVATULLOEV S. & FERRARI G. (2010). Contagious caprine pleuropneumonia detected for the first time in Tajikistan. *EMPRES Transboundary Animal Diseases Bulletin*, **35**, 20–22.

ARIF A., SCHULZ J., THIAUCOURT F., TAHA A. & HAMMER S. (2005). An outbreak of contagious caprine pleuropneumonia at Al Wabra Wildlife Preservation, State of Qatar. *J. Zoo Wildl. Med.*, **38**, 93–96.

BASCUNANA C.R., MATTSSON J.G., BOLSKE G. & JOHANSSON K.E. (1994). Characterization of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma* sp. strain F38 and development of an identification system based on PCR. *J. Bacteriol.*, **176**, 2577–2586.

- BOLSKE G., JOHANSSON K.-E., HEINONEN R., PANVUGA P.A. & TWINAMASIKO E. (1995). Contagious caprine pleuropneumonia in Uganda and isolation *Mycoplasma capricolum* subspecies *capripneumoniae* from goats and sheep. *Vet. Rec.*, **137**, 594.
- BOLSKE G., MATSSON J.G., BASCUNANA C.R., BERGSTROM K., WESONGA H. & JOHANSSON K.E. (1996). Diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia by detection and identification by PCR and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 785–791.
- BERTIN C., PAU-ROBLOT C., COURTOIS J., MANSO-SILVÁN L., TARDY F., POUMARAT F., CITTI C., SIRAND-PUGNET P., GAURIVAUD P. & THIAUCOURT F. (2015). Highly dynamic genomic loci drive the synthesis of two types of capsular or secreted polysaccharides within the *Mycoplasma mycoides* cluster. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 676–687.
- CHABER A., LIGNEREUX L., QASSIMI M.A., SAEGERMAN C., MANSO-SILVAN L., DUPUY V. & THIAUCOURT F. (2014). Fatal transmission of contagious caprine pleuropneumonia to an Arabian oryx (*Oryx leucoryx*). *Vet. Microbiol.*, **173**, 156–159.
- CHEN S., HAO H., ZHAO P., THIAUCOURT F., HE Y., GAO P., GUO H., JI W., WANG Z., LU Z., CHU Y. & LIU Y. (2017). Genome-Wide Analysis of the First Sequenced *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain M1601. *G3 (Bethesda)*, **7**, 2899–2906.
- CHU Y., GAO P., ZHAO P., HE Y., LIAO N., JACKMAN S., ZHAO Y., BIROL I., DUAN X. & LU Z. (2011). Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* strain M1601. *J. Bacteriol.*, **193**, 6098–6099.
- DIGHERO M.W., BRADSTREET C.M.P. & ANDREWS B.E. (1970). Dried paper discs for serological identification of human mycoplasmas. *J. Appl. Bacteriol.*, **33**, 750–757.
- DUPUY V. & THIAUCOURT F. (2014). Complete Genome Sequence of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strain 9231-Abomsa. *Genome Announc.*, **2**. pii: e01067-14. doi: 10.1128/genomeA.01067-14
- EL DEEB W., ALMUJALLI A.A., ELJALII I., ELMOSLEMANY A. & FAYEZ M. (2017). Contagious caprine pleuropneumonia: The first isolation and molecular characterization of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* in the Kingdom of Saudi Arabia. *Acta Tropica*, **168**, 74–79.
- FALQUET L., LILJANDER A., SCHIECK E., GLUECKS I., FREY J. & JORES J. (2014). Complete Genome Sequences of Virulent *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* Strains F38 and ILRI181. *Genome Announc.*, **2**. pii: e01041-14. doi: 10.1128/genomeA.01041-14
- HUTCHEON D. (1889). Contagious pleuropneumonia in goats at Cape Colony, South Africa. *Vet. J.*, **29**, 399–404.
- JONES G.E. & WOOD A.R. (1988). Microbiological and serological studies on caprine pneumonia in Oman. *Res. Vet. Sci.*, **44**, 125–131.
- KALINER G. & MACOWAN K.J. (1976). The pathology of experimental and natural contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Vet. Med. [B]*, **2**, 652–661.
- KIBOR A.C. & WAIYAKI P.G. (1986). Growth of mycoplasma F38 in medium B (modified Hayflick) and Newing's typtose medium. *Bull. Anim. Health Prod. Afr.*, **34**, 157–159.
- LEACH R.H., ERNO H. & MACOWAN K.J. (1993). Proposal for designation of F38-type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. nov. and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Garile, Edward, Theodore & Erno, 1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **43**, 603–605.
- LIGNEREUX L., CHABER A.L., SAEGERMAN C., MANSO-SILVAN L., PEYRAUD A., APOLLONI A. & THIAUCOURT F. (2018). Unexpected field observations and transmission dynamics of contagious caprine pleuropneumonia in a sand gazelle herd. *Prev. Vet. Med.*, **157**, 70–77.
- LILJANDER A., YU M., O'BRIEN E., HELLER M., NEPPER J.F., WEIBEL D.B., GLUECKS I., YOUNAN M., FREY J., FALQUET L. & JORES J. (2015). Field-applicable Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 2810–2815.
- LITAMOI J.K., WANYANGU S.W. & SIMAM P.K. (1990). Isolation of *Mycoplasma* biotype F38 from sheep in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **22**, 260–262.

- LORENZON S., MANSO-SILVÁN L. & THIAUCOURT F. (2008). Specific real-time PCR assays for the detection and quantification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC and *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*. *Mol. Cell. Probes*, **22**, 324–328.
- MACMARTIN D.A., MACOWAN K.J. & SWIFT L.L. (1980). A century of classical contagious caprine pleuropneumonia: from original description to aetiology. *Br. Vet. J.*, **136**, 507–515.
- MACOWAN K.J. & MINETTE J.E. (1976). A mycoplasma from acute contagious caprine pleuropneumonia in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, **8**, 91–95.
- MANSO-SILVÁN L., DUPUY V., CHU Y. & THIAUCOURT F. (2011). Multi-locus sequence analysis of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* for the molecular epidemiology of contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Res.*, **42**, 86.
- MANSO-SILVÁN L., PERRIER X. & THIAUCOURT F. (2007). Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster based on analysis of five conserved protein-coding sequences and possible implications for the taxonomy of the group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **57**, 2247–2258.
- MOHAN K., MILES R.J. & WADHER B.J. (1990). Growth and biochemical characteristics of mycoplasmas isolated from the lungs of Nigerian goats. *Zentralbl. Bakteriol. (Suppl.)*, **20**, 841–843.
- NICHOLAS R. & CHURCHWARD C. (2011). Contagious caprine pleuropneumonia: new aspects of an old disease. *Transbound. Emerg. Dis.*, **59**, 189–196.
- OZDEMIR U., OZDEMIR S., MARCH J., CHURCHWOOD C. & NICHOLAS R.A.J. (2005). Outbreaks of CCPP in the Thrace region of Turkey. *Vet. Rec.*, **156**, 286–287.
- PEYRAUD A., POUMARAT F., TARDY F., MANSO-SILVAN L., HAMROEV K., TILLOEV T., AMIRBEKOV M., TOUNKARA K., BODJO C., WESONGA H., NKANDO I., JENBERIE S., YAMI M., CARDINALE E., MEENOWA D., JAUMALLY M., YAQUB T., SHABIR M., MUKHTAR N., HALIMI M., ZIAY G., SCHAUWERS W., NOORI H., RAJABI A., OSTROWSKI S. & THIAUCOURT F. (2014). An international collaborative study to determine the prevalence of contagious caprine pleuropneumonia by monoclonal antibody-based cELISA. *BMC Vet. Res.*, **10**, 48.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987a). A latex agglutination test for field diagnosis of caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 191–193.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., KIBOR A. & CHEMA S. (1987b). An inactive vaccine for contagious caprine pleuropneumonia. *Vet. Rec.*, **121**, 397–402.
- RURANGIRWA F.R., MCGUIRE T.C., MUSOKE A.J. & KIBOR A. (1987c). Differentiation of F38 mycoplasmas causing contagious caprine pleuropneumonia with a growth-inhibiting monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, **55**, 3219–3220.
- SETTYPALLI T.B.K., LAMIEN C.E., SPERGSE J., LELENTA M., WADE A., GELAYE E., LOITSCH, A., MINOUNGOU G., THIAUCOURT F. & DIALLO A. (2016). One-Step Multiplex RT-qPCR Assay for the Detection of *Peste des petits ruminants virus*, *Capripoxvirus*, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma capricolum* subspecies (ssp.) *capripneumoniae*. *PLoS one*, **11**, e0153688.
- SRIVASTAVA A.K., MEENOWA D., BARDEN G., CHURCHWARD C., AYLING R.D., SALGUERO F.J. & NICHOLAS R.A.J. (2010). Contagious caprine pleuropneumonia in Mauritius. *Vet. Rec.*, **167**, 304–305.
- THIAUCOURT F. (2018). Contagious caprine pleuropneumonia, update. In: *Infectious Diseases of Livestock*, Coetzer J.A.W., Thomson G.R., MacLachlan J., Michel A. & Botha C., eds. Anipedia, Gauteng, South Africa. <http://www.anipedia.org/resources/contagious-caprine-pleuropneumonia/985>
- THIAUCOURT F. & BOLSKE G. (1996). Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 1397–1414.
- THIAUCOURT F., BOLSKE G., LIBEAU G., LE GOFF C. & LEFEVRE P.-C. (1994). The use of monoclonal antibodies in the diagnosis of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **41**, 191–203.
- THIAUCOURT F., GUERIN C., MADY V. & LEFEVRE P.-C. (1992). Diagnostic de la pleuropneumonie contagieuse caprine: améliorations récentes. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **11**, 859–865.
- THIAUCOURT F., PIBLE O., MIOTELLO G., NWANKPA N. & ARMENGAUD J. (2018). Improving Quality Control of Contagious Caprine Pleuropneumonia Vaccine with Tandem Mass Spectrometry. *Proteomics*, **18**(17): e1800088.

WOUBIT S., LORENZON S., PEYRAUD A., MANSO-SILVAN L. & THIAUCOURT F. (2004). A specific PCR for the identification of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae*, the causative agent of contagious caprine pleuropneumonia (CCPP). *Vet. Microbiol.*, **104**, 125–132.

YU Z., WANG T., SUN H., XIA Z., ZHANG K., CHU D., XU Y., XIN Y., XU W., CHENG K., ZHENG X., HUANG G., ZHAO Y., YANG S., GAO Y. & XIA X. (2013). Contagious caprine pleuropneumonia in endangered tibetan antelope, China, 2012. *Emerg. Infect. Dis.*, **19**, 2051–2053.

*
* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la pleuroneumonía contagiosa caprina
(puede consultarse la

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

Por favor, contacte con el Laboratorio de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la pleuroneumonía contagiosa caprina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.