

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

**DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**“ESTUDIO SEROLÓGICO DE *Mycoplasma*bovis POR LA TÉCNICA  
DE ELISA EN BOVINOS HOLSTEIN CON AISLAMIENTOS  
POSITIVOS A PARTIR DE LECHE”**

**POR**

**CITLALI AVENDAÑO TEJEDA**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL  
TÍTULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

Torreón, Coahuila, México

Octubre del 2012

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO  
UNIDAD LAGUNA  
DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



**TESIS**

**“ESTUDIO SEROLÓGICO DE *Mycoplasma bovis* POR LA  
TÉCNICA DE ELISA EN BOVINOS HOLSTEIN CON AISLAMIENTOS  
POSITIVOS A PARTIR DE LECHE”**

Aprobada por

**M.C.V. RAMON ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ**

**ASESOR PRINCIPAL**

**M.V.Z. RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO**

**COORDINADOR DE LA DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



Coordinación de la División  
Regional de Ciencia Animal

Torreón, Coahuila, México

Octubre del 2012

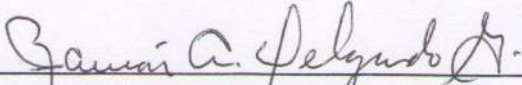
**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA  
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA

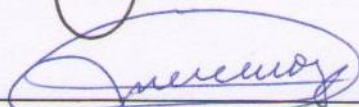
**DIVISION REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL**



  
M.V.Z. CARLOS RAMIREZ FERNANDEZ  
PRESIDENTE

  
M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ  
VOCAL

  
M.V.Z. GUADALUPE RODRÍGUEZ MARTÍNEZ  
VOCAL

  
M.C. JUAN JOSÉ MUÑOZ VARELA  
VOCAL SUPLENTE

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar mi tesis que fue un arduo trabajo y largo tiempo, quiero agradecer a las personas que estuvieron apoyándome durante la elaboración de lo que hoy forma parte de mi formación como Médico Veterinario Zootecnista.

Quiero extender un sincero agradecimiento a mi asesor M.C.V. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ, por su amabilidad y tiempo, además por ser buen maestro que a lo largo de la carrera pude observar, gracias por los retos que me puso en el camino, haciéndome saber que siempre hay motivos por los que uno puede aferrarse.

A laboratorista M.V.Z. OLIVIA GARCIA MORALES, quien me brindo siempre palabras de aliento para terminar mi tesis, enseñándome que en ocasiones es mejor ser paciente y astuto, que el enojo y la desesperación te llevan a tomar decisiones equivocadas.

Por aquellos mis amigos que estuvieron conmigo durante este proceso, a “Rigo” quien me ayudó mucho con la obtención de información para culminar lo que ahora es mi tesis, a mi paisa “Francisco” y mis amiga “Miriam” y “Malen” con quienes pase buenos momentos de mi estancia en torreón

## DEDICATORIA

En algún de los innumerables momentos de mi existencia, me cuestionaba si en realidad debía estudiar veterinaria, no solo yo si no mis padres quienes consideraba que es una excelente carrera, pero que era un largo camino que recorrer e infinidad de obstáculos, decidí correr el riesgo.

Hoy dedico a mis padres este logro a Silvia y Faustino, de quien heredé fortaleza para los grandes retos de la vida, dándome su apoyo incondicional, día tras día, repitiéndome que en esta vida hay que ser valientes que llorar no soluciona nada, que solo sobrevive el más fuerte. Gracias por brindarme la confianza de salir a recorrer nuevos horizontes.

También dedico esto a mi hermano Ricardo que no ser por el tal vez nunca habría ingresado a esta universidad.

# ÍNDICE

	Página
<i>AGRADECIMIENTOS</i> .....	<i>I</i>
<i>DEDICATORIA</i> .....	<i>II</i>
<i>ÍNDICE</i> .....	<i>III</i>
<i>Resumen</i> .....	<i>V</i>
<i>I. INTRODUCCION</i> .....	<i>1</i>
<i>II. ANTECEDENTES</i> .....	<i>2</i>
2.1. Historia .....	2
2.2. Clasificación taxonómica.....	3
2.3. Etiología.....	4
2.4. Característica morfológica .....	5
2.5. Epidemiología.....	7
2.6. Transmisión .....	8
2.7. Patogenia.....	9
2.8. Manifestaciones de clínicas.....	10
2.8.1. Formas de presentación de la mastitis .....	10
a) Mastitis clínica.....	11
b) Mastitis subclínica .....	11
2.9. Diagnóstico.....	13
2.9.1. Toma de muestras de leche .....	13
2.9.2. Prueba de ELISA.....	13
2.9.3. Prueba de leche en tanque .....	14
2.10. Tratamiento.....	15
2.11. Prevención y control .....	18
2.11.1 Control de la mastitis por Mycoplasma .....	18
2.11.2. Prevención.....	19
2.11.3. Vacunación .....	19
<i>III. JUSTIFICACION</i> .....	<i>21</i>

<i>IV. OBJETIVOS</i> .....	22
<i>V. MATERIAL Y METODOS</i> .....	22
5.1 Lugar de estudio .....	22
5.2 Toma de muestras .....	22
5.3 Procesamiento de las muestras .....	23
5.3.1 Prueba de ELISA .....	23
5.3.2. Precauciones .....	24
5.4 Técnica .....	24
5.4.1 Ejecución .....	24
5.5. Interpretación .....	26
5.1.1 Control de calidad e interpretación de los resultados .....	26
5.6. Criterios de validación .....	26
<i>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i> .....	26
<i>VII. CONCLUSIONES</i> .....	28
<i>VIII. LITERATURA CITADA</i> .....	29
<i>IX. ANEXO</i> .....	35

## Resumen

La mastitis es una de las enfermedades más costosa de la industria lechera que puede manifestarse por diferentes agentes etiológicos dentro de los cuales uno de los más importantes es *Mycoplasma bovis*. En la Comarca Lagunera es común encontrar brotes de mastitis debido a micoplasmosis, sin embargo es posible que haya aislamientos de la bacteria a partir de leche de animales aparentemente sanos por lo cual la presente investigación se realizó a partir de vacas con aislamientos positivos a *Mycoplasmaspp* sin signos de mastitis. Se obtuvieron 33 muestras de suero de vacas con aislamientos positivos de micoplasmosis, de un establo lechero en el estado de Coahuila. Se realizó la técnica de ELISA para determinar la presencia de anticuerpos específicos contra *Mycoplasma bovis*. Se encontraron 94% sueros positivos a anticuerpos específicos contra *M. bovis*. Se describen los estudios y se discute la problemática de las infecciones en glándula mamaria debido a *M. bovis*.

Palabras claves: *Mycoplasma bovis*, Bovinos, Holstein, Mastitis, ELISA



## I. INTRODUCCION

La vaca lechera es criada y alimentada para producir grandes volúmenes de leche. Con el estrés metabólico de alto rendimiento y los efectos de ser ordeñada con un manejo de dos o tres veces al día, no es de extrañar que la ubre y los pezones están sujetos a una amplia variedad de trastornos. La causa primaria es la mastitis, enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras.

La mastitis es una enfermedad compleja se dice que es una reacción inflamatoria dentro de la glándula mamaria, generalmente es causada por patógenos como bacterias (Boutetet *al.*, 2007), el término deriva del griego “mastos”, ubre e “itis inflamación (Saran y Chaffer, 2000); esta enfermedad se debe a un sin fin de agente patógenos de los cuales *Mycoplasma* *bovis* es con frecuencia el tipo de patógeno que no se reconoce en los hatos lecheros y se extiende en gran parte por la venta de vacas infectadas a los compradores incautos (González, 1996).

La mastitis por *Mycoplasma* suele tener las siguientes características, estas no responden a terapia por antibióticos y drogas anti inflamatorias, hay disminución de la producción de leche. Se ve asociada con una dolorosa artritis que frecuentemente la desarrolla en animales de un mes de introducción. El número de células somáticas es alto (mayor a 160 mil), atrofia de los cuartos(Nicholas *et al.*, 2008).

*M. bovis* una causa primaria de la neumonía bovina, artritis y mastitis y también se ha asociado con queratoconjuntivitis, infertilidad, salpingitis, otitis, meningitis y el aborto (Pfützner y Sachse, 1996; Nicholas, 1998).

De acuerdo a estos antecedentes el objetivo de la presente investigación es determinar anticuerpos de *Mycoplasma* *bovis* por la técnica de *ELISA* a partir de sueros de vacaspositivas a aislamientos de *Mycoplasmaspp* de leche.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Historia

En México la presencia de la mastitis produce pérdidas económicas de aproximadamente \$2'500,000.00 pesos, pero esto representa sólo del 20 al 30% de las mastitis clínicas la otra parte que no presenta signos externos perceptibles, que son las mastitis subclínicas, representan entre el 70% y el 80% (Romero, 2004).

*M. bovis* fue aislado por primera vez en los EE.UU. de un caso con mastitis severa en vacas en el año de 1961 (Hale *et al.*, 1962). En primer lugar, recibió el nombre *Mycoplasmaagalactiaesubsp. bovis*, debido a la similitud con la serología e imagen clínica similar a la agalaxia contagiosa de las ovejas causada por *M. agalactiae*. Más tarde, tras el examen del 16S ARN ribosomal fue elevada al rango de especie y recibió el nombre de *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) (Askaa y Erno, 1976). Durante las últimas décadas se ha extendido a numerosos países con el transporte mundial de animales así como pajillas de esperma contaminadas (Tenk, 2005).

Posteriormente en el año 1963 se observaron los primeros casos de mastitis por *Mycoplasma* en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA). A partir de 1970 y muchos hatos de diferentes estados de EUA han diagnosticado mastitis por *M. bovis* (González y Merrill, 1992; Hotze *et al.*, 1993).

En Gran Bretaña se presentó *Mycoplasma bovis*, en mastitis severa a menudo con artritis antes de asumir la forma neumónica. En el presente milenio el número de casos de mastitis con artritis incrementó de manera espectacular con la participación de *M. bovis*. Sin embargo, los casos de mastitis por

*M. bovis* aún representan una fracción de los cerca de 5,000 casos de diagnósticos de mastitis (Robin *et al.*, 2008).

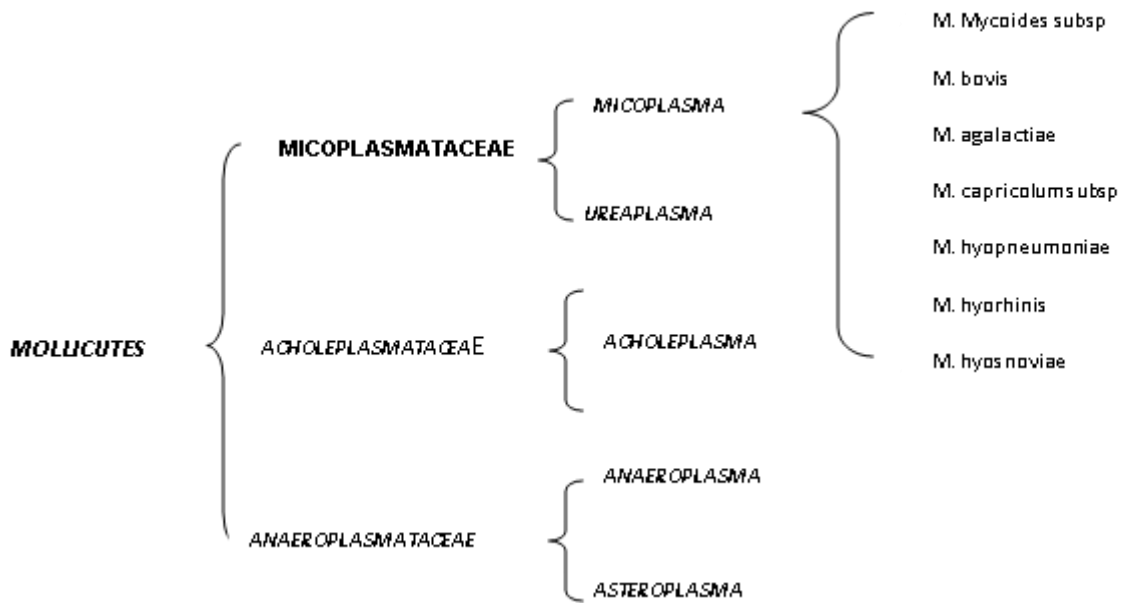
Por mencionar un estudio en México en el estado de Hidalgo en el año 2000 donde se muestrearon 112 animales detectando en primer lugar mayor cantidad a *Mycoplasma bovis* con 55% además de encontrar *Staphylococcus aureus* en un 37% y *Streptococcus agalactiae* con un 37.5% (Miranda Morales *et al.*, 2008).

## 2.2. Clasificación taxonómica

Los *Mycoplasmas* pertenecen a la clase *Mollicutes*, se encuentran entre los microorganismos más pequeños de vida libre capaz de auto replicación y son muy exigentes, siendo difíciles de cultivar y de crecimiento lento.

Muchas especies son importantes para los patólogos veterinarios, incluyendo *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*, el agente causal de pleuroneumonía contagiosa bovina (Nicholas, 1998).

Según la taxonomía de las procariontes, los *Mollicutes* pertenecen al *Phylum Firmicutes* que contienen bacterias Gram positivas que también comprende a los bacilos del género *Clostridium* de donde los *Mollicutes* han derivado por un proceso de evolución degenerativo, se caracterizan por un genoma de talla pequeña (0.58 – 1.38 Mbp) y falta de pared celular. Hay más de 200 especies reconocidas a la fecha (Nicholas *et al.*, 2008).



### 2.3. Etiología

Los *Mycoplasmas* son microorganismos pleomórficos, carecen de pared celular rígida y en vez de esto están recubiertos por una membrana unitaria de tres capas, que contiene un esteroide, miden de 200 a 500 nm, aunque algunos autores (Pérez *et al.*, 2001) mencionan que su tamaño es de 125 a 250 nm además de tener un genoma por debajo de 580 kb. Crecen en medios sólidos y líquidos, y utilizan glucosa como fuente de energía. Para su crecimiento en medios de cultivo se utilizan complejos nutritivos, medios adicionados de proteínas, componentes de colesterol, una fuente de dinucleótido de Adenina y también se utiliza penicilina y acetato de talio como inhibidores de bacterias contaminantes (Núñez *et al.*, 2008; Quinn, *et al.*, 2002).

Debido a su potencial genético limitado, los *Mycoplasmas* suelen requerir una asociación íntima con la superficie de las células de los mamíferos y un medio enriquecido que contiene peptona, extracto de levadura y suero animal para el crecimiento *in vitro* (Lysnyansky *et al.*, 1999).

Las colonias son de crecimiento lento, con un típico crecimiento con aspecto de “huevo frito” (Radostitset *al.*, 2002). La falta de pared celular es la razón de la morfología de las colonias (Rosenbusch, 1994). Los *Mycoplasmas* son los procariontes más pequeños que poseen una réplica autónoma. Son parásitos extracelulares con afinidad por las membranas mucosas, donde existen como comensales patógenos (Radostitset *al.*, 2002).

Los *Mycoplasmas* se encuentran en las superficies de las mucosas, conjuntiva, cavidad nasal, orofaringe, intestinal y tracto genital de los animales así como de otros mamíferos (Quinnet *al.*, 2002).

#### 2.4. Característica morfológica

Los micoplasmas carecen de la capacidad para producir una pared celular, poseen menos código genético que la mayoría de las bacterias y pueden vivir libres, saprófitos o como parásitos de plantas y de animales, algunos son patógenos (Razinet *al.*, 1998).

Puesto que no pueden sintetizar peptidoglucano ni sus precursores, ellos no poseen una pared celular rígida si no una triple membrana externa flexible. Su flexibilidad le permite pasar a través de la membrana bacteriana y el tamaño de cada poro que es de 0.22 a 0.45  $\mu\text{m}$  (Quinnet *al.*, 2002).

Basado en el análisis de secuencia de 5s rRNA, se demostró que los *Mycoplasmas* que están vinculados filogenéticamente a bacterias Gram positivas como especies del *Clostridium*, que tienen un bajo contenido de guanina-citosina en su ADN (Quinnet *al.*, 2002).

La ausencia de las paredes celulares está asociada a proteínas que hace a los *Mycoplasmas* resistentes a la acción de los antibióticos que interactúan con estas proteínas (Rosenbusch, 1994).

Los *Mycoplasmas* tienen una superficie variable distinta de lipoproteínas (VSP) en la cara externa de la membrana de plasma que son estimulantes potentes de la respuesta inmune del hospedero (Razin, 1992). Pueden desempeñar un papel crítico como mediadores para la adhesión a las células epiteliales (Razin *et al.*, 1998).

Los *Mycoplasmas* parecen a los protoplastos (bacterias tratadas para eliminar sus paredes celulares), pero son más resistentes a la lisis osmótica. Esta capacidad para resistir la lisis osmótica es al menos determinada por los esteroides que hacen que la membrana citoplasmática del *Mycoplasma* sea más estable que la de otras bacterias (Madiagan, *et al.*, 2011).

Son resistentes a la penicilina puesto que carecen de estructuras en la pared celular sobre las cuales actúa la penicilina, pero son inhibidas por tetraciclina o eritromicina (Pérez *et al.*, 2001). El hábitat de los *Mycoplasmas* es en mucosas de conjuntiva, cavidad nasal, orofaringe, tracto intestinal tanto en humanos como animales (Browning *et al.*, 2010).

La replicación de genoma ocurre esencialmente como en otros procariontes, aunque se multiplican de una forma más lenta que el resto de las bacterias. La medida del tiempo de generación para la mayoría de los *Mycoplasmas* es de 1-3 y otros 6-9. El proceso de división celular se observa que ocurre de tres formas: por fisión binaria, por fragmentación de filamento o por gemación (Vadillo y Piriz, 2002).

Dado que las células de los *Mycoplasmas* son delimitadas por solo una membrana celular plástica, su forma dominante es una esfera. Sin embargo, muchos *Mollicutes* exhiben una variedad de entidades morfológicas, incluyendo células en forma de pera, células en forma de jarra con un extremo terminal, filamentos de diferentes longitudes y filamentos helicoidales. La capacidad de

mantener su forma con la ausencia de una pared celular rígida indica desde hace tiempo un citoesqueleto en los *Mycoplasmas* (Rázinet *al.*, 1998).

Tiene forma de huevo frito debido a que una de las características de su crecimiento en medio enriquecidos es la formación de microcolonias cuando se iluminan las microcolonias de forma oblicua. La forma central es debido a la formación de microcolonias en el Agar (Quinnet *al.*, 2002).

Todos los *Mycoplasmas* son muy sensibles a los cambios de pH en leche (González, 1996).

## 2.5. Epidemiología

La mastitis es un problema de salud que causa baja de producción de leche y, combinado con el costo de la medicación para controlar esta infección, provoca grandes pérdidas económicas en las explotaciones lecheras.

Los patógenos causantes de la mastitis se han clasificado en los siguientes tres grupos, de acuerdo a su origen y forma de transmisión en el rebaño: Patógenos contagiosos, *Streptococcusagalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *M.bovis* y *Corynebacteriumbovis*; patógenos ambientales, *Streptococcusuberis*, *Escherichiacoli*, *Enterococcusfaecalis*, *Enterococcusfaecium*, *Arcanobacteriumpyogenes* y muchos otros agentes y patógenos oportunistas, *Staphylococcusshycus*, *Staphylococcusepidermidis*, *Staphylococcushominis*, *Staphylococcusintermedius* y muchas otras especies de estafilococos, que forman parte de la flora normal de piel (Scaramelli y González, 2005).

*M.bovis* y otras especies de *Mycoplasmas* causan agalactia y un desmejoramiento general en los animales afectados; suele afectar las cuatro glándulas y diseminarse rápidamente en el rebaño. En general, el pronóstico es

malo y suele requerir la eliminación de los animales afectados (Scaramelli y González, 2005).

A medida que la prevalencia de *M. bovis* varía en todo el mundo, hay importantes implicaciones comerciales y la necesidad urgente de vigilar el ganado para *M. bovis*. Sin embargo, hasta la fecha, no hay régimen de tipificación molecular en el uso rutinario para rastrear *M. bovis* a cabo se rompe el ciclo con los animales importados (Laura, *et al.*, 2004).

La glándula mamaria con mastitis aguda se observa hinchada con secreción de leche escasa, con depósitos de fibrina y suero claro (Browning *et al.*, 2010).

## 2.6. Transmisión

Los *Mycoplasmas* patógenos pueden transmitirse por secreciones del aparato reproductor así como respiratorias, son susceptibles al desecamiento de desinfectantes y solo unos cuantos sobreviven en el ambiente por periodos largos (Browning *et al.*, 2010).

*M. bovis* puede transmitirse directamente de alimento, agua, del corral u otros fómites, en los fómites por secreciones respiratorias este es factor importante para la transmisión de mastitis (Justice-Allen, *et al.*, 2010).

Los *Mycoplasmas* son susceptibles a la desecación y la luz del sol, pero puede sobrevivir mucho tiempo en ambientes protegidos en condiciones húmedas y frescas. *M. bovis* ha demostrado que puede persistir durante meses en las camas de arena reciclada, y en tanques de enfriamiento (Bray *et al.*, 1997).

Las épocas de condiciones frías y húmedas aumentan la incidencia de la infección, ya que los *Mycoplasmas* pueden sobrevivir más tiempo en esas condiciones (Núñez *et al.*, 2008).



Pfutzer y Sachse (1996), en un informe sobre estudio de campo de *M. bovis* en terneros y vacas. Los terneros fueron descendientes de vacas con mastitis. Ellos reportan infecciones en las vías respiratorias en los terneros como lo demuestra el aislamiento de la agente y los anticuerpos contra el agente. Lo que sugiere que esa transmisión se produjo entre los terneros por aerosoles. Más tarde se infectaron vaquillas preñadas y en el parto el agente se difunde ampliamente en la vaquilla y sus crías recién nacidas. Estos autores no solo sospechan sobre la diseminación hematológica en el ganado infectado, sino también de la propagación vertical al feto.

## 2.7. Patogenia

Los *Mycoplasmas* carecen de pared celular, y se expone la membrana de proteínas, así forman la interfaz principal con el huésped. Estas proteínas de la membrana facilitan la adherencia a las superficies de las mucosas, aunque las adhesiones no están aún muy bien caracterizadas, *M. bovis* tiene una gran familia de lipoproteínas inmunodominantes de superficie variable (Vsps) y variación en el tamaño; *in vitro* presentan una variación amplia en la codificación de las secuencias (Maunsell, 2010 y Buchenau *et al.*, 2010).

Las múltiples vías de interacción con las células del hospedador y mecanismos sofisticados genéticos se cree que desempeñan un papel esencial en las infecciones por *Mycoplasma* (Cittiet *al.*, 1997). Los *Mycoplasmas* tienen una Vsps en la parte externa de la membrana que son estimulantes potentes de la respuesta inmune del hospedador (Chambaud, 1999).

*M. bovis* tiene otras propiedades que participan en la patogénesis. Después de la adhesión, muchos *Mycoplasmas*, incluyendo *M. bovis*, generan productos tales como las fosfolipasas, peróxido de hidrógeno y radicales libres que dañan las células del hospedador. *M. bovis* también puede

formar una biopelícula *in vitro* que incrementa la resistencia a la desecación, calor y estrés (McAuliffe *et al.*, 2006).

El estrecho contacto facilita el daño tóxico a las células del hospedador por factores solubles, productos del patógeno. Los *Mycoplasmas* se adhieren a los neutrófilos y macrófagos así como afecta las funciones fagocíticas, además los daños individuales causados por las células activas de penetración. La modulación o la activación de la respuesta inmunes es crítica en la patogénesis de las enfermedades por *Mycoplasma* (Quinnet *et al.*, 2002).

Algunos *Mycoplasmas* patógenos participan en enfermedades pulmonares, son mitógenos de los linfocitos B y T (Muhlradt y Schade, 1991). La activación de macrófagos y de los monocitos lleva a la liberación de citocinas como el factor de la necrosis tumoral e interleucinas, dando la iniciación de la inflamación (Quinnet *et al.*, 2002).

## 2.8. Manifestaciones de clínicas

### 2.8.1. Formas de presentación de la mastitis

Existe una gran variación en las formas de presentación de la mastitis y la sintomatología depende del grado de reacción de los tejidos de la glándula mamaria a la infección o lesión traumática y a la condición general de salud del animal afectado (Saran y Chaffer 2000).

La presentación de la mastitis es subclínica y clínica, la cual es la más grave. Muchas de las mastitis con infección subclínica no tienen un aumento marcado de células somáticas ni baja de producción. Todas las vacas de cualquier edad son afectadas, incluyendo vaquillas y vacas en periodo seco (Virtala *et al.*, 2000).

Durante la primera semana de infección, hay una marcada degeneración del epitelio alveolar y una exudación masiva de leucocitos, incluyendo neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Seffner W, *et al.*1980).

#### a) Mastitis clínica

Cuando la enfermedad es clínica los signos no son específicos, clásicamente se ve afectado más de un cuarto, hay una drástica disminución de la producción y signos de la enfermedad sistémica que son visibles. La glándula mamaria puede estar hinchada pero no suele ser dolorosa, las secreciones varía de la anormal a la arenosa o purulenta y en ocasiones de un color marrón (González *et al.*, 2003).

La mastitis causada por especies de *Mycoplasma* se presenta en toda la glándula mamaria. Tiene un exudado purulento intersticial resultando en la degeneración del epitelio alveolar, es seguido por una hiperplasia epitelial con fibrosis y atrofia en las últimas etapas de la enfermedad. La secreción de leche se ve normal pero cuando está de pie, un depósito de arena como floculante, el material se instala dejando un sobrenadante de suero, más adelante en la enfermedad, la secreción puede ser escasa y densamente o como con suero que contiene leche cuajada(Quinn, *et al.*, 2002).

La historia de la mastitis que es resistente al tratamiento de antimicrobianos es común, y clínica la enfermedad puede persistir por varis semanas. Volver a la producción es posible (González yWilson, 2003). Cuando los signos no son visibles, la presencia de patógenos y las modificaciones citológicas de la leche traen como una mastitis subclínica (Djabriet *al.*, 2002).

#### b) Mastitis subclínica

La mastitis subclínica es definida como la presencia de un microorganismo en combinación con un conteo elevado de células somáticas en la leche (Tollersrud *et al.*, 2000). Esto debido a la influencia de leucocitos; el recuento de células somáticas proporciona una buena estimación cuantitativa del grado de inflamación (Sears y McCarthy, 2003).

Este tipo de mastitis no presenta cambio visible en la leche o ubre. Se caracteriza por el reducido rendimiento de leche, composición alterada de la leche, la presencia de componentes inflamatorios y bacterias en la leche (Heringstad *et al.*, 2000).

Cuando los signos no son visibles, la presencia de modificaciones citológicas de la leche traen como resultado una mastitis subclínica (Djabriet *et al.*, 2002).

Los signos clínicos de una mastitis por *Mycoplasma* aparecen días después de una infección la cual se puede dar en la fase de lactancia, el antecedente es una mastitis aguda en uno o más cuartos, a la palpación se perciben calientes, hinchados, edematosos o duros, las secreciones varían en su aspecto. Por lo regular, la primera secreción puede ser acuosa y puede tener “copos” de un material arenoso. Transcurridos varios días, las secreciones se pueden convertir en un exudado purulento. Si la enfermedad progresa, los conductos galactóforos desarrollan metaplasia escamosa, y algunos conductos y acinis se llenan de exudado granulomatoso (Núñez *et al.*, 2008).

Los subproductos de crecimiento y el metabolismo de los *Mycoplasmas* irritan el tejido de la glándula mamaria que resulta en una marcada respuesta inflamatoria que se caracteriza por la inflamación aguda y agalactia. La mastitis causada por *Mycoplasma* puede ser subclínica, clínica o crónica. La vaca afectada carece de signos sistémicos de enfermedad y continúa para comer y beber normalmente (González, 1996).

## 2.9. Diagnóstico

El mejor método para identificar a este grupo de patógenos es por medio de cultivo directo en Agar *Mycoplasma*. Sin embargo, las limitaciones de este método de cultivo son la duración de hasta 19 días, las condiciones especiales requeridas y en consecuencia los gastos, y la falta de especificidad para distinguir entre los verdadero patógenos y organismos comensales (Fox y Britten 2005).

### 2.9.1. Toma de muestras de leche

Los pezones deben ser sumergidos en sellador comercial antes de la recolección de muestra. Los pezones deben ser completamente limpiados con una toalla de papel, y los pezones se limpian con alcohol al 70%. Los pezones deben estar secos antes de tomar la muestra. Uno o dos fluidos deben ser descartados antes de tomar la muestra. Se toma la muestra. Los pezones deben ser sumergidos de nuevo con sellador.

Se deben usar guantes y una solución desinfectante entre cada vaca por algún agente patógeno sospechoso (Sears *et al* 1991).

### 2.9.2. Prueba de ELISA

Byne *et al.*, (2000), reportaron que el método de ELISA para detectar anticuerpos de *M. bovis* en leche, para el diagnóstico de mastitis debido a *M. bovis* tiene el 92% de especificidad y una sensibilidad del 100%. También reconocen que la inmunoglobulina anti-*Mycoplasma* en la leche puede ser el resultado local de una respuesta humoral a una infección intramamaria o también es el resultado de la influencia no-específica del sistema periférico en respuesta a la mastitis. La situación después podría resultar en problemas con

la especificidad de la prueba. Así que se recomienda que semejante prueba de anticuerpos en leche se use como prueba, pero confirmando con el cultivo de leche.

La prueba detecta anticuerpos de los 13 a los 720 días post infección. La técnica de ELISA para detectar anticuerpos es rápida, requiere de uno a dos días para obtener resultados, su alta especificidad y sensibilidad es mayor a otros métodos como la inhibición de la hemoaglutinación (Sachse *et al.*, 1993).

Con reactivos comerciales de ELISA para detectar anticuerpos en contra de otras especies de *Mycoplasma*, se ha observado sensibilidad de 96% y especificidad de 98% (Núñez *et al.*, 2008).

### 2.9.3. Prueba de leche en tanque

Las bacterias causantes de mastitis en prueba de leche en tanque (BTM) se pueden clasificar en dos grupos: contagiosos y ambientales. Microorganismos contagiosos son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* y *Mycoplasma* spp. Microorganismos ambientales no coliformes, estafilococos y estreptococos, y bacterias coliformes (Jayarao y Wolfgang, 2003). El cultivo de la leche en tanque que se realiza es una limitante para la detección de *Mycoplasma* spp (Miranda *et al.*, 2008).

Las células somáticas se componen de células blancas de la sangre y ocasionalmente células de descamación. Las células que se encuentran en la leche de glándulas no infectadas, constituyen del 1 al 11%, macrófagos 66 al 88%, linfocitos del 0 al 27% y las células epiteliales del 0 al 7% (Harmon, 2001).

El método convencional de diagnóstico de mastitis por *Mycoplasma* es un cultivo microbiológico de muestras individuales de leche tomadas de la

vaca o del tanque de leche del hato, directo al Agar para el cultivo de las muestras(González y Wilson, 2003).

En un estudio realizado en el estado de Hidalgo (México), con bovinos Holstein, se encontró que el 62% de las mastitis fueron debido a *Mycoplasmas* spp. el otro 38% fue positivo a otras bacterias(Miranda *et al.*, 2008).

En la actualidad, los métodos de diagnóstico en México no incluyen las pruebas de detección de *Mycoplasma* u otros protocolos de rutina bacteriológica para evaluar las muestras clínicas. Esta situación dificulta la detección de *Mycoplasma* en la práctica. El cultivo de bacterias del tanque de leche ha sido identificado como el método más económico y útil para el control de infecciones de la glándula mamaria por potenciales de *Mycoplasmas* spp.

Además, se puede hacer con la frecuencia necesaria para obtener un mejor control preventivo de las nuevas mastitis causadas por *Mycoplasma* en los hatos.

El método de cultivo de leche de tanque se utiliza para la detección y vigilancia de la enfermedad, un resultado positivo por lo general indica que al menos una vaca este enferma de mastitis por *Mycoplasma* la prueba tiene el 60% de sensibilidad; aunque un resultado negativo no es indicativo de la ausencia de *Mycoplasma*(Miranda *et al.*, 2008). Para los resultados se deben tener muestras de leche fresca, o se puede refrigerar hasta tres días o congeladas si son más días (González, 1996).

## 2.10. Tratamiento

Los *Mycoplasmas* son generalmente considerados como altamente susceptibles a diversos factores ambientales tales como alta temperatura, sequedad, etc. A pesar de esto *M. bovis* puede sobrevivir a 4 °C durante 2 meses, aproximadamente, en esponjas y la leche; durante 20 días en madera y

durante 17 días en el agua. A 20 °C, la supervivencia puede ser de una o dos semanas ya 37 °C por una semana. En el semen congelado puede sobrevivir el agente infeccioso durante años (Martinet *et al.*, 1983).

Para dar un tratamiento adecuado, se debe conocer el tipo de microorganismo presente, se deben realizar tres cultivos consecutivos, todos con diferentes fechas de muestreo(Erskine *et al.*, 2003).

De acuerdo a la farmacocinética, se sugiere que el tratamiento práctico de la mastitis sea una terapia antibacteriana vía parenteral (Ziv, 1980).

El uso en forma sistémica de sulfonamidas, penicilinas, aminoglucósidos y cefalosporinas de primera generación, no es útil ya que estas no penetran fácilmente la glándula mamaria. Los macrólidos (eritromicina y tilmicosina), trimetoprin, tetraciclinas y fluoroquinolonas se distribuyen bien en la glándula mamaria, aunque solo las fluoroquinolonas tienen amplio espectro de actividad frente a muchas bacterias patógenas Gram negativas. (Owens *et al.*, 1988; SolJ, 1990).

Para la elección de un fármaco éste debe:

1. Tener una concentración mínima inhibitoria baja contra la mayoría de los agentes patógenos de la ubre.
2. Tener una alta biodisponibilidad en los sitios de aplicación intramuscular
3. Ser suficientemente soluble en lípidos.
4. Tener un bajo grado de unión de proteínas.
5. Tener una larga vida media en el cuerpo.
6. Retener actividad de las secreciones inflamatorias.
7. Se elimine fácilmente, es decir, que no se acumula en tejidos (Ziv, 1980).



Un régimen terapéutico para los casos graves de mastitis clínica debe de incluir:

1. La administración de cuidados médicos de apoyo especialmente para las vacas con descarga de fluidos.
2. La orientación antibacteriana para mantener concentraciones efectivas en plasma.
3. Seleccionar un antibacteriano con actividad de amplio espectro y fácil administración.
4. Aplicaciones de fármacos antibacterianos vía intramamaria para reducir los efectos de bacterias Gram positivas o a menos que los resultados indiquen infecciones por Gram negativas u hongos(Searset *al.*, 2003).

En el caso de tratamientos para mastitis subclínica, esta no presenta una pérdida potencial en cuanto a la función de la glándula mamaria o a la vida de la vaca, pero si en cuanto a los costos. Así mismo habrá pérdidas económicas como resultado de la prolongación de la iniciación de la terapia hasta el cultivo bacteriano(Owens *et al.*, 1997).

Es muy importante examinar a los animales procedentes de otros hatos para detectar a los excretores asintomáticos; se sugiere sacrificar a los animales enfermos, ya que son una fuente masiva de re-infección. Este proceso debe ser seguido por los procedimientos adecuados de higiene para prevenir la re-infección (Tenk, 2005).

Debido a que los *Mycoplasmas* carecen de pared celular, los antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos no son eficaces contra estos patógenos. Del mismo modo, los *Mycoplasmas* no sintetizan ácido fólico y por lo tanto, intrínsecamente son resistentes a las sulfonamidas. Los *Mycoplasmas* son una clase que generalmente es susceptible a fármacos que interfieren con las proteínas

(tetraciclinas, macrólidos, liconsamidas y florfenicol) o el ADN (fluoroquinolonas) y es resistente a eritromicina (Rosenbuschet *al.*, 2005).

## 2.11. Prevención y control

### 2.11.1 Control de la mastitis por *Mycoplasma*

El tema principal de las estrategias para el control de *Mycoplasma* por mastitis es la identificación de los animales infectados y aislar a aquellos animales a través de la segregación en las zonas que reduzcan al mínimo su exposición a las vacas infectadas. El cultivo del tanque de leche se ha utilizado para proteger los hatos, y vacas de corral para determinar la presencia de mastitis por *Mycoplasma*.

Después de que el cultivo de leche en tanque sea positivo, se necesita muestrear leche para identificar posibles vacas infectadas. A menudo las vacas con mastitis clínica y/o con leche con alto número de células somáticas son candidatas para la identificación de mastitis por *Mycoplasma* (Foxet *al.*, 2003).

La introducción de vaquillas con *Mycoplasmaspp*, es el origen de los brotes de mastitis, y se recomienda la vigilancia de las vaquillas para controlar la mastitis. Además de la identificación y el sacrificio de los animales infectados, una vez que ocurra un brote, se emplean prácticas de higiene estrictas en el ordeño donde incluye: desinfección de la ubre antes del ordeño, uso de guantes para la limpieza de la mano del ordeñador entre vacas y ordeños, asepsia en el pezón después del ordeño y en la unidad del ordeño (Pfützner y Sachse, 1996).

Se debe tener gran cuidado en la compra de novillas y vaquillas. La leche de todos los reemplazo debe ser cultivada principalmente para *Mycoplasma* así como para *Streptococcusgalactiae* y *Staphylococcus aureus*, antes de permitir que los reemplazos se mezclen con el ganado (González, 1995).

### 2.11.2. Prevención

La transmisión por *Mycoplasma* puede ocurrir internamente, en el corral de forma extramamaria, puede ser transmitida a la glándula mamaria, o viceversa. Este modo de transmisión, de portador asintomático al caso de mastitis, se vuelve cada vez más común.

Lo establecido en las prácticas de control de la mastitis empleando una estricta higiene de ordeño, que incluye la asepsia del pezón y la identificación de las personas que infectan a los animales y el aislamiento de los animales para el sacrificio, ha sido exitoso para el control de las mastitis por *Mycoplasma* (Fox *et al.*, 2003).

Se ha demostrado la eficacia del formaldehído para propósitos generales de desinfección. Los iodoforos también son eficaces, está permitido su uso para el sellado. Desafortunadamente los productos basados en hipocloritos de sodio son inadecuados para este fin, debido a las altas concentraciones y a los largos periodos de exposición necesaria para una eficacia adecuada (Jasper *et al.*, 1977).

La mejor manera de prevenir mastitis por *M. bovis* en el ganado lechero, es examinando la leche de tanque y que la mayor parte del hato sea muestreado, sobretodo en la compra de reemplazos. El tanque puede muestrearse dos o tres veces por día. En la compra de vacas en lactancia, las muestras de leche deben ser tomadas en varias ocasiones para la detección de *Mycoplasma*, teniendo en cuenta la baja sensibilidad de una sola muestra para determinar mastitis subclínica por *M. bovis*. (González y Wilson, 2002).

### 2.11.3. Vacunación

En general, los intentos por vacunar al ganado contra *M.bovis* asociada con mastitises poco gratificante. Sin embargo hay bacterianas que tienen licencia para la comercialización en Estados Unidos, para el control de enfermedades respiratorias y en todo caso mastitis. No se encuentran datos que demuestren la eficacia por lo que no están de venta en Europa(Maunsellet *al.*, 2010).

La inmunidad adaptativa que posee el animal en su momento puede, con la exposición del *Mycoplasma*, ayudar a controlar la infección y no es de extrañarse que la vacunación puede en algunos casos controlar la infección, y proteger al ganado de forma inducida experimentalmente(Nicholas *et al.*,1980).

En una serie de casos, las vacunas de *M. bovis* han aparecido prometedoras en estudios de desafíos, pero no han sido efectivas o dan como resultado el aumento de la gravedad de la enfermedad cuando se practica en campo. Un ejemplo es de una bacterina de *Mycoplasma bovis* para prevenir enfermedades respiratorias en terneros inoculados 3 semanas después de la vacunación. Sin embargo cuando se utilizó en un ensayo de campo, hubo un aumento de incidencia y gravedad de la enfermedad respiratoria en el grupo vacunado (Nicholas *et al.*, 2006).

En otras pruebas de campo controladas, una bacteriana de *M. bovis* no es diferente a un placebo en la prevención de *M. bovis* asociada con terneros lactantes (Maunsellet *al.*, 2009).

En ambos estudios una parte importante de los terneros fueron infectados con *M.bovis* antes de la vacunación. También se observó mayor gravedad de la enfermedad en los terneros vacunados pero infectados de forma experimental. Por ejemplo, la vacuna de proteínas de membrana de *M. bovis*, fue asociada con mayor gravedad a las enfermedades respiratorias por aerosoles en comparación con el grupo control de los becerros(Bryson *et al.*, 1999).

El aumento de la gravedad clínica de la mastitis, también se informó en vacas vacunadas con bacterina de *M. bovis* en comparación con los controles después de la inoculación intramamaria. Por lo tanto, la vacunación contra enfermedades asociadas a *M. bovis*, en algunas ocasiones es posible en un ambiente controlado, pero las vacunas tienen una evaluación crítica a la fecha ya que no son de protección en el campo y la temprana edad en la que los terneros se infectan también es un desafío para el desarrollo de una vacuna efectiva. La investigación se debe conducir a un mejor entendimiento con los antígenos de *M. bovis* (Maunsell, 2010).

Algunas bacterinas de *M. bovis* solo están disponibles en Estados Unidos. Esta se compone de múltiples cepas de *M. bovis* y se recomienda en novillas de primer parto o vacas multíparas para la prevención de mastitis por *M. bovis*. El producto está etiquetado para ser administrado en tres dosis, por vía subcutánea en el cuello en dos semanas a intervalos de 4 semanas antes del parto con la tercera dosis administrada de 2 a 3 semanas antes del parto. Los animales no deben ser vacunados 21 días antes del sacrificio (Sears y McCarthy, 2003).

### III. JUSTIFICACION

El efecto de la presencia de micoplasmosis en los hatos, tiene consecuencias negativas sobre la calidad de la leche, ya que en la mayoría de los casos, esta se presenta como mastitis subclínica, lo que incrementa la presencia de células somáticas y por tanto el precio bajo de la leche.

Debido al escaso éxito en el tratamiento de las vacas positivas al aislamiento de *Mycoplasma bovis*, se recomienda la eliminación de estas de los hatos como medida de control y erradicación, el motivo del presente estudio es conocer si existen anticuerpos contra *Mycoplasma bovis* en suero de vacas con aislamientos positivos a partir de leche.

#### IV. OBJETIVOS

4.1. Identificar la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma* *bovis* en sueros sanguíneos de vacas lecheras positivas a aislamientos de *Mycoplasmaspp*, en un hato lechero comercial de la Comarca Lagunera.

4.2. Utilizar un análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), para la detección de anticuerpos contra *Mycoplasma* *bovis*, a partir de sueros sanguíneos de vacas positivas al aislamiento de *Mycoplasmaspp* a partir de leche.

#### V. MATERIAL Y METODOS

##### 5.1 Lugar de estudio

Las muestras se obtuvieron de un hato lechero comercial en el Estado de Coahuila, en el cual se encontraron casos confirmados de mastitis por *Mycoplasmaspp* en medios de cultivo específicos, a partir de muestras de leche.

El estudio de confirmación se realizó con muestras de sangre, extrayendo el suero bovino y llevando a cabo la prueba de ELISA.

##### 5.2 Toma de muestras

Se tomaron muestras de sangre en tubos de ensaye al alto vacío sin anticoagulante, de 33 bovinos Holstein, hembras, positivos a *Mycoplasmaspp* por cultivo de Agar Mycoplasma. A partir de leche.

Las muestras se procesaron en la Unidad de Diagnóstico de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Unidad Regional Laguna, donde se realizó la prueba de ELISA.

### 5.3 Procesamiento de las muestras

#### Material:

- Agua purificada
- Micropipetas individuales de canales múltiples
- Puntas de un solo uso.
- Tubos de ensayo para dilución simple
- Lector de microplacas de ELISA para 96 pocillos con filtro de 450 nm
- Recipientes para la dilución de las soluciones de otros.

#### Reactivos:

- Placa de 96 pocillos de microtitulación recubiertas con Ag de *M. bovis*.
- Control positivo.
- Control negativo.
- Conjugado.
- Solución concentrada de lavado (10X)\*
- Sustrato.
- Solución de paro.

\*Se pueden formar cristales cuando la solución de lavado se mantiene a  $4 \pm 2$  °C. Esto no afecta la eficacia del producto. Para utilizar esta solución, basta con tenerla a temperatura ambiente y los cristales se disuelven.

#### 5.3.1 Prueba de ELISA

Prueba inmunoenzimática para la detección de anticuerpos contra *M. bovis* en suero bovino. Es una herramienta valiosa para diagnosticar las infecciones por *M. bovis* ya que la respuesta inmune es temprana e importante, estable y persistente en el tiempo. Las muestras de suero bovino son diluidas e incubadas en pocillos recubiertos con antígenos (Ags) de *M. bovis*. Los anticuerpos (Abs)

específicos a *M. bovis* en muestras de suero positivo se une a los Abs en los pozos. Después de varios lavados y de eliminar sustancias no unidas el conjugado se le añade a los Abs de la especie bovina. Después de la incubación el exceso de este conjugado se elimina por un segundo lavado y es revelado con el anexo del sustrato cromógeno. Después de esta incubación, la enzima, si está presente, reacciona con los sustratos y se desarrolla de color azul. La reacción se para (el color cambia de azul a amarillo) y la densidad óptica se lee. Esta intensidad del color permite determinar cuantitativamente a los Abs contra *M. bovis*. una muestra negativa presenta una reacción débil (amarillo pálido). Todos los tonos de amarillo entre claro y oscuro representan distintos grados de positividad.

### 5.3.2. Precauciones

- La prueba es únicamente para uso veterinaria *in vitro*.
- Los materiales usados en este Kit deben ser considerados infecciosos. Por lo que todos los materiales deben ser descontaminados antes de ser desechados.
- No se debe utilizar el kit después de la fecha de caducidad.
- No se deben mezclar los reactivos de diferentes lotes
- La sensibilidad y la especificidad de la prueba no se garantiza si los procedimientos no se llevaron correctamente.
- No se debe exponer el sustrato a algún agente oxidante.
- Se debe mantener en el recipiente de plástico. Esta solución puede causar irritación en los ojos.
- Mantener los reactivos a temperatura de  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y llevar a temperatura ambiente antes de usarla.

## 5.4 Técnica

### 5.4.1 Ejecución



a. **Preparación de la solución de lavado.** Después de la homogenización de la solución de lavado concentrada, que no evidencie cristales, se diluyen 1/10 con agua purificada (ejemplo 100mL de solución de lavado concentrado 10X en 900 mL de agua purificada por cada placa). Una vez diluida la solución almacenar (1X) at  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

b. **Procedimiento para preparación de muestras y controles.** Poner las muestras y controles por duplicado. Se diluyen las muestras del suero bovino en la solución de lavado 1X a 1/20 (por ejemplo 25 $\mu\text{L}$  de la muestra en 475 $\mu\text{L}$  1X de solución de lavado), utilizar una punta nueva para cada muestra. Cada dilución se debe mezclar adecuadamente antes de ser distribuida en los pozos.

**C. Procedimiento de la prueba.** Mantener los reactivos a temperatura ambiente y mezclar manualmente antes de usarse.

1. Realizar una representación esquemática de la placa con la distribución de los controles y la muestra.
2. Vierta 200  $\mu\text{L}$  del control positivo en los pocillos A1 y A2.
3. Vierta 200  $\mu\text{L}$  del control negativo en los pocillos A1 y A2.
4. Vierta 200  $\mu\text{L}$  de muestras diluidas en los pocillos C1/C2, D1/D2.
5. Incubar a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos.
6. Al término lavar bien cada pocillo 3 veces con 300  $\mu\text{L}$  de solución de lavado. Tirar todo el contenido de la placa después del último lavado, seque la placa contra el papel absorbente.
7. Vierta 100  $\mu\text{L}$  del conjugado por cada pocillo.
8. Incubar a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
9. Repetir el paso 6.
10. Vierta 100  $\mu\text{L}$  de sustrato listo para su uso en cada pocillo.
11. Incubar, de forma que no le de la luz, a  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos.
12. Verter 50  $\mu\text{L}$  de solución de paro en cada pocillo.
13. Medir la densidad óptica (OD) a 450 nm. La lectura no debe tardarse más de 15 minutos después de la adición de la solución de paro.
14. Calcular los datos.

## 5.5. Interpretación

### 5.1.1 Control de calidad e interpretación de los resultados

Para cada muestra y controles, se calcula la media (M) de las densidades ópticas (DO) obtenidas. Para obtener el nivel de positividad, multiplicar la media de las densidades.

Para cada una de las muestras (M) y los controles, se calcula la media (Me) de la densidad óptica (DO). Los resultados de las muestras se dividen sobre los resultados del control positivo, relación muestra / positivo (S/P):

$$\frac{Me\ OD\ M}{Me\ DO\ P} = Relación = (S/P)$$

## 5.6. Criterios de validación

De acuerdo a las especificaciones del producto de ELISA la prueba se considera válida si:

La relación obtenida para el control negativo es inferior a 0,500.

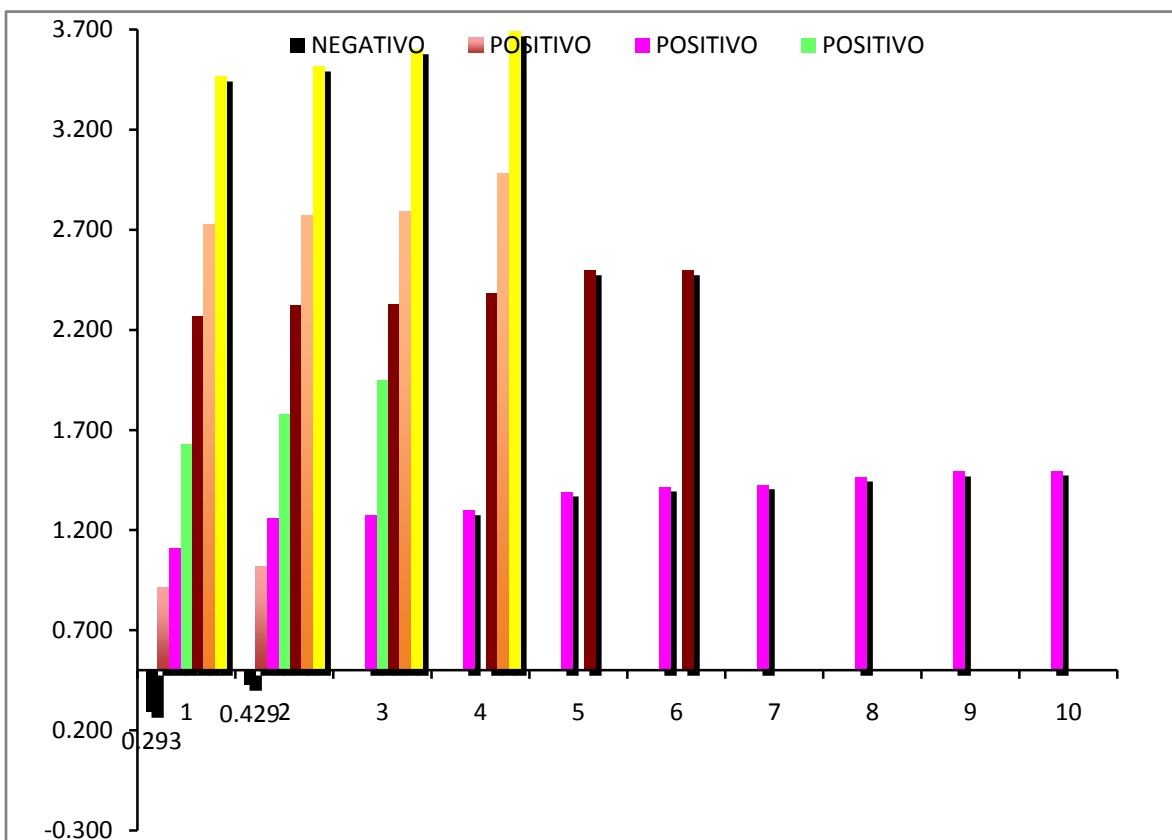
La absorbancia media obtenida para el control positivo debe ser mayor o igual a 1,000.

Si la proporción de la muestra es inferior a 0,500, se considera negativo

Si la proporción de la muestra es mayor o igual 0,500, se considera positivo a la presencia de anticuerpos contra *Mycoplasma bovis*.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuadro 1. Seropositividad a anticuerpos específicos de *Mycoplasma* *bovis*.



Nuestros resultados coinciden con los encontrados por Núñez, *et al.* (2008), ya que ellos encontraron un 32% de positividad, mientras nosotros un 94%, en ambos estudios se realizaron pruebas similares, pues se usaron animales con mastitis subclínica para la detección de *M. bovis*; los investigadores consideran a ELISA indirecta una prueba confiable, efectiva y económica. Barajas-Rojas (1993) observó una prevalencia del 50% un estudio realizado en Veracruz, sin embargo, el estudio realizado solo expresa el uso de ELISA indirecta pero no fue precisamente para buscar *Mycoplasma* en animales con mastitis subclínica.

Por el contrario, Gadhersohiet *al.* (2005) desarrollaron otra prueba de ELISA indirecta a base de anticuerpos monoclonales, para detectar anticuerpos de *M. bovis* en suero de animales con manifestaciones clínicas de mastitis y problemas respiratorios, y en animales infectados experimentalmente mediante esponjas

nasales encontraron alta especificidad y buena sensibilidad. Este método reveló una alta prevalencia de anticuerpos (60%) de *M. bovis* en el ganado lechero en el norte de Queensland.

En efecto, cuando Branket *al.* (1999) usaron una prueba de ELISA indirecta a base de anticuerpos monoclonales, pudieron detectar anticuerpos de *M. bovis* en suero de animales con manifestaciones clínicas de mastitis y problemas respiratorios, y en animales infectados experimentalmente mediante hisopados nasales encontrando una alta especificidad y buena sensibilidad.

En base a los resultados obtenidos en nuestra investigación se puede concluir que el uso de la prueba de ELISA indirecta es una herramienta de buena elección para la detección de anticuerpos contra *M. bovis* además de ser una prueba económicamente rentable.

## VII. CONCLUSIONES

*Mycoplasmabovis* está presente en vacas lecheras sin mastitis, pero con aislamientos positivos a *Mycoplasmaspp.* a partir de leche.

La *Micoplasmosis* en vacas lecheras tiene un comportamiento impredecible ya que puede estar presente en un hato lechero sin problemas de mastitis, o puede ocasionar grandes pérdidas económicas por mastitis clínica y subclínica.

La técnica de ELISA es una herramienta muy útil y rápida para identificar *M.bovis* en vacas lecheras, con mastitis clínica.

La ventaja de la prueba de ELISA con respecto a técnicas moleculares es que no es necesario que esté presente el antígeno ya que detecta anticuerpos y por lo tanto indica que la bacteria ha estado presente en la explotación.

## VIII. LITERATURA CITADA

Askaa, G. y Erno, H. 1976. Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to species rank *Mycoplasma bovis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 26:323–325.

Barajas-Rojas J.A., Riemann H. P. y Franti C. E. 1993. Application of enzyme linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of Mexico. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 12(3):717-732.

Bartlett, P. C, Van Wijk, J. Wilson, D. J. Green, C.D. Miller, G. Y. Majewski, G. A. y Heider, L. E. 1991. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large dairy herd. *J Dairy Sci.* 74:1561–1572.

Behrens, A. Heller, M. Kirchhoff, H. Yogev, D. y Rosengarten, R. 1994. A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect Immun.* 62:5075–5084.

Boothby, J. T. Jasper, D. E. y Thomas, C. B. 1987. Experimental intramammary inoculation with *Mycoplasma bovis* in vaccinated and unvaccinated cows: Effect on the mycoplasmal infection and cellular inflammatory response. *Can J Vet Res* 76:188–197.

Boutet, P. Saulon, J. Closset, R. Detilleux, J. Beckers, J. F. Bureau, F. Lekux, P. 2007. Prolactin-Induced Activation of Nuclear Factor  $\kappa$ B in Bovine Mammary. *J. Dairy Sci.* 90:155-164.

Bray, D.R. Shearer, J.K. Donovan, G.A. y Feed, P.A. 1997. Approaches to achieving and maintaining a herd free of *mycoplasma* mastitis. *National Mastitis Council* 30: 132-139.

Brank M, Grand DL, Poumarat F, Bezille P, Rosengarten R, Citti C. 1999. Development of a recombinant antigen of *Mycoplasma bovis* infection in cattle. *ClinDiagn Lab Immunol.* 6:861-867.

Browning, G. F. Marena, M. S. Markham, P.F. Noormohammadi, A.H. y Whithear, K. G. 2010. Cap 19:519 – 574 Tomado de: *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals* Gyles, C. L. Prescott, J. F. Songer, G. y Thoen, C. O. Wiley-Black Well, USA 1-651.

Bryson, D.G, Ball, H.J, y Brice, N. 1999. Pathology of induced *Mycoplasma bovis* calf pneumonia in experimentally vaccinated animals. Tomado de: Stipkovits, L. Rosengarten, R. Frey, J. Eds. *Mycoplasmas of Ruminants: Pathogenicity, Diagnostics, Epidemiology and Molecular Genetics*. Brussels: European Commission; 128–132

Buchenau, I. Poumarat, F. Grand, D.L. Linkner, H. Rosengarten, R. y Hewicker-Trautwein, M. 2010. Expression of *Mycoplasma bovis* variable surface membrane proteins in the respiratory tract of calves after experimental infection with a clonal variant of *Mycoplasma bovis* type strain PG45. *Res Vet Sci.* 89:223–229.

Byrne, W.J. Ball, H.J. Brice, N. McCormack, R. Baker, S.E. Ayling, R.D. y Nicholas, R. A 2000: Application of an indirect ELISA to milk samples to identify cows with *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.* 146: 368–369.

Chambaud, I. Wróblewski, H. y Blanchard, A. 1999. Interactions between mycoplasma lipoproteins and the host immune response. *Trends Microbiol.* 7:493–499.

Citti, C. y Rosengarten, E. 1997. Mycoplasma genetic variation and its implication for pathogenesis. *Wien Klin Wochenschr* 109:562–8.

Djabri, B. Barielle, N. Beaudou, F. y Seegers, H. 2002. Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res.* 33:335-257.

Erskine, J. R. Wagner, S. y DeGraves, F.J. 2003. Mastitis therapy and pharmacology *Vet Clin Food Anim* 19:109–138.

Fox, L. k. Kirk, J.H. y Britten, A. 2005. *Mycoplasma Mastitis: A Review of Transmission and Control.* *J. Vet. Med.* Vol. 52 153-160.

Ghadersohi A, Fayazi Z, Hirst RG. Development of a monoclonal blocking ELISA for the detection of antibody to Mycoplasma bovis in dairy cattle and comparison to detection by PCR. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; 104,183-193.

González, R. N. y Wilson, D. J. 2003. Mycoplasmal mastitis in dairy herds. *Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 19:199–221

Gonzalez, R.N. 1996. *Mycoplasma Mastitis in Dairy Cattle: If Ignored, It Can Be a Costly Drain On the Milk Producer.* Mastitis Council Regional Meeting Proceedings Cornell Vet pp. 37

González, R.N. Sears, P.M. y Wilson, D.J. 1995. Diagnosis of intramammary infections due to *Mycoplasma bovis* in dairy cattle. Proc. 3rd IDF International Mastitis Seminario, Book 1, Tel Aviv, Israel, 23-27

González, R.N. Sears, P.M. Merrill, R.A. y Hayes, G.L. 1992. Mastitis due to mycoplasma in the state of New York during the period of 1972 -1990. *Cornell Vet.* 82(1):29-40.

Gonzalez, R.N. Wilson, D.J. 2002 Realistic milk culture programs for herd expansion. En: Proceedings of the 41st Annual Meeting of the National Mastitis Council; Orlando, FL, February 3–6, 118–124.

Hale, H.H. Helmboldt, C.F. Plastridge, W.N. yStula, E.F. 1962. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinary* 52: 582–591.

Harmon R.J. 2001. Somatic cell counts: a primer. In: Proceedings of the 40th Annual Meeting of the National Mastitis Council. Madison (WI): National Mastitis Council. 3–9.

Heringstad, B. Klemetsdal, G. y Ruane, J. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Science*. 64:95- 106

Hoblet, K.H. Schnitkey, G.D. Arbaugh, D. Hogan, J.S. Smith, K.L. Schoenberger, P.S. Todhunter, D.A. Hueston W.D, Pritchard D.E. y Bowman G.L. 1991. Costs associated with selected preventive practices and episodes of clinical mastitis in nine herds with low somatic cell counts. *J Am Vet Med Assoc* 2:190–196.

Hotzel, H. K. Sachse, H. Pftzner, B. Demuth, y Pflitsch, A 1993. Detection of *Mycoplasma bovis* using in vitro deoxyribonucleic acid amplification. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 12:581-591.

Howard, C.J. Gourlay, R.N. y Taylor, G. 1980. Immunity to *Mycoplasma bovis* infections of the respiratory tract of calves. *Res Vet Sci* 28:242–249.

Jaramillo DC. Prevalencia de mastitis en un hato lechero y su relación con las prácticas de ordeño, manejo y medicina preventiva (tesis de licenciatura). México (DF) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1979.

Jasper, D. E. 1977. *Mycoplasma* and mycoplasma mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 170: 1167- 1172.

Justice-Allen, A. E. 2010. Survival of *Mycoplasma* Species in Recycled Bedding Sand and Possible Implications for Disease Transmission to Ruminants. Animal, Dairy and Veterinary Sciences. Utah State, Utah State University Pp 124.

Jayarao, B. M y Wolfgang, D. R. 2003. Bulk-tank milk analysis A useful tool for improving milk quality and herd udder health. *Vet Clin Food Anim* 16: 75-92.

Lysnyansky, I. Sachse, K. Rosenbusch, R. Levisohn, S. y Yogev, D. 1999. The *vsp* locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. *J Bacteriol* 181:5734–41.

Madiagan, T. Michael, M. Martinko, J. A. Stahl, D. y Clark, P. D. 2011. Brock Biology of Microorganisms, Tercera Edición Wageningen, Netherlands. pp 1155

Maunsell, F. P. Donovan G. A. Risco, C. y Brown, M. B. 2009. Field evaluation of a *Mycoplasma bovis* bacterin in young dairy calves. *Vaccine ELSEVIER* 27: 2781-2788.

McAuliffe, L. Ellis, R. J. Miles, K. Ayling, R. D. Nicholas R. A. 2006. Biofilm formation by *mycoplasma* species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology* 152:913–922.

McAuliffe, L. kokotovic, B. Ayling Roger, D. y Nicholas Robin, A. J. 2004. Molecular Epidemiological Analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom Shows Two Genetically Distinct Clusters. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 4556–4565

Miranda-Morales, R.E. Rojas-Trejo, V. Segura-Candela, R. Cariilo-Casas E.M. Sánchez-González, M.G. Castor, R.S. y Trigo-Tavera, F.J. 2008. Prevalence of Pathogens Associated with Bovine Mastitis in Bulk Tank Milk in Mexico. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases Veterinaria Mexico*. 1149: 300–302

Muhlradt, P.F. y Sachade, U. 1991. MDHM, a macrophage stimulatory product of *Mycoplasma fermentans*, leads to in vitro interleukin-1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor and prostaglandin production and is pyrogenic in rabbits. *Infection Immunology* 59:3969-3974.

Nicholas, R.A.J., Ayling, R.D., Woodger, N., Wessells, M. E. y Houlihan, M.G. 2006. *Mycoplasma* in adult cattle: Bugs worth bothering about? *Ir Vet J* 59: 568–572.

Nicholas, R. A. Ayling R. D. Stipkovits, L. P. An experimental vaccine for calf pneumonia caused by *Mycoplasma bovis*: Clinical, cultural, serological and pathological findings. *Vaccine* 2002;20: 3569–3575.

Núñez, D C, Morales, S. E, Martínez, M. J. J., Hernández A. L. 2008. Detección de mastitis bovina subclínica por micoplasmosis mediante ELISA indirecta y aislamiento. *Veterinaria México*. 39: 161-171

Owens W.E. Ray, C.H, Watts J.L. Yancey R.J. 1997. Comparison of success of antibiotic therapy during lactation and results of antibacterial susceptibility tests for bovine mastitis. *J Dairy Sci* 80:313–7.

Owens W.E. Watt, J. L. Boddie R.L. Nickerson, R. J. 1998. Antibiotic treatment of mastitis: comparison of intramammary and intramammary plus intramuscular therapies. *J Dairy Sci* 71: 3143–7.

Pérez, M. M. F. y Almanza, M. C. 2001. *Mycoplasmas y Ureaplasmas* Tomado de Microbiología y Parasitología Médicas. Llop, H. A. Valdés-Dapena, V. M. M. y Zuazo, S. J. Ciudad de la Habana, Ciencias Médicas. 1: 419-426.



Pfutzner, H. y Sachse, K. 1996. *Mycoplasma bovis* an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 15:1477–1494.

Quinn, P. J. Markey B. K. Carter, M. E. Donnelly, W. J. y Leonard F. C. 2002. *Veterinary microbiology y microbial disease*. Blackwell Science pp 478

Razin, S. 1992. *Mycoplasma* taxonomy and ecology. In: Maniloff J, McElhaney RN, Finch LR, et al, editors. *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. Washington, DC: American Society for Microbiology p. 3–22.

Razin, S. D. Yogev, Y. y Naot, Y. 1998. Molecular biology y pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62:1094-1156.

Robín, N. Roger, A. y McAuliffe, L. 2008. *Mycoplasma* diseases of ruminants. Veterinary laboratories agency, REINO UNIDO Robin Nicholas 1998. The veterinary significance of *mycoplasma* spp 17-23 Tomado de: Miles, R. y Nicholas, R. *Mycoplasmas* Protocols, Humana Press, Totowa NJ.

Romero, A. T. 2004. "Situación actual de la mastitis en México." *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria Producción Animal*, 9:122-134.

Rosenbusch R.F. 1994. Biology and taxonomy of the *Mycoplasmas*. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames (IA): Iowa State University Press; p. 3–11.

Rosenbusch RF, Peterson C. A. 2002. Use of diagnostic accessions to evaluate the usefulness of variable surface proteins of *Mycoplasma bovis* as diagnostic test antigens. Abstract book of the 14th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Vienna, Austria. Columbia (MO): International Organization for Mycoplasmaology. pp. 88

Rosenbusch R. F. 1994. Biology and taxonomy of the *Mycoplasmas*. In: Whitford HW, Rosenbusch RF, Lauerman LH, editors. *Mycoplasmosis in animals: laboratory diagnosis*. Ames (IA): Iowa State University Press; p. 3–11.

Rosenbusch, R. F. Kinyon, J. M. Apley, M. Funk, N. D. Smith, S. y Hoffman, L. J. 2005. In vitro antimicrobial inhibition profiles of *Mycoplasma bovis* isolates recovered from various regions of the United States from 2002 to 2003. *J Vet Diagn Invest* 17:436–441.

Saran, A. Chaffer, M. 2000. *Mastitis y Calidad de Leche*, Editorial Intermedica, Buenos Aires, 200, pp. 9, 11, 25

Sears P. M. y Wilson, D. J. 2003 *Mastitis Vet Clin Food Anim*. Del Department of Veterinary Science. 19: xi–xii

Sears P. My McCarthy, K.K. 2003. Diagnosis of mastitis for therapy decisions. *VetClinFood Anim.*19:93-108

Scaramelli, A. y González, Zuleima. 2005. Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. Tomado de: Manual de Ganadería Doble Propósito. C. González-Stagnaro and E. S. Belloso. Maracaibo-Venezuela.1: 328-333

Sears, P. M. Wilson, D. J. González, R. N. Hancock, D.D. 1991. Microbiological results from milk samples obtained premilking and post milking for the diagnosis of bovine intramammary infections. *J Dairy Sci*74:4183–4188.

Seffner, W. y Pfützner H. 1980. Mycoplasma mastitis of cattle. Pathological anatomy and histology of experimental Mycoplasma bovis mastitis. *Arch Exp Veterinarmed*34:817–26

Sol, J. Harink J, van Uum A. 1990. Factors affecting the result of dry cow treatment. In: Proceedings of the International Symposium on Bovine Mastitis. Madison (WI): *National Mastitis Council* p. 118–23.

Tenk, M. 2005. Examination of Mycoplasma bovis infection in cattle. Postgraduate school of veterinary science. Budapest, Szent István University pp1-70

Tollersrud, T. Kenny, K. Reitz Jr, A.J. y Lee, J. C. 2000. Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of Staphylococcus aureus and Other Staphylococcus spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 38:2998-3003.

Vadillo, S. Pirz, S. 2002. Manual de Microbiología Veterinaria, Editorial, Mc Graw-Hill, Internacional, España, pp. 423-230.

Virtala, A. M. K. Gröhn, Y. T. Mechor, G. D. Erb, H. N. y Dubovi, E. J. 2000. Association of seroconversion with isolation of agents in transtracheal wash fluids collected from pneumonic calves less than three months of age. *Bovine Practitioner*. 34:77–80

Ziv G. 1980. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy— 2. Practical and therapeutic applications. *AgriPractice*75(3) 469–76.

ZeMartin, J. Bocklisch, H. Pfützner Hpezauer, V. 1983. "Mycoplasma infection of calves. 3. The histological picture of Mycoplasma bovis-induced pneumonia." *Arch Exp Veterinarmed*37(3): 499-50

IX. ANEXO.

PUNTO DE CORTE 0.5

POSITIVO 0.70095

NEGATIVO 0.06255

NUM	MUESTRA	MEDIA	NIVEL DE POSITIVIDAD	
1	55	2.3285	0.69855	+++
2	235	1.494	0.4482	+
3	296	3.3195	0.99585	++++
4	296	3.517	1.0551	++++
5	374	0.29265	0.29265	+
6	408	2.724	0.8172	++
7	641	1.109	0.3327	+
8	776	3.4645	1.03935	++++
9	809	2.7905	0.83715	+++
10	930	1.2605	0.37815	+
11	945	1.4965	0.44895	+
12	961	3.689	1.1067	++++
13	1245	0.429	0.1377	+
14	1361	3.298	0.9894	++++
15	1729	3.6005	1.08015	++++
16	2749	1.465	0.4395	+
17	3140	1.298	0.3894	+

---

18	3743	2.7705	0.83115	+++
19	3800	1.3915	0.41745	+
20	3879	2.383	0.7149	+++
21	3955	1.7805	0.53415	++
22	4022	2.3245	0.69735	+++
23	4106	1.95	0.585	++
24	4129	0.912	0.2736	+
25	4233	1.415	0.4245	+
26	4301	2.4965	0.74895	+++
27	4321	1.6295	0.48885	+
28	4354	2.269	0.6807	++
20	4436	1.02	0.306	+
30	4590	1.426	0.4278	+
31	4607	2.8795	0.86385	+++
32	4923	1.277	0.4596	+
33	7839	2.979	0.8937	+++

---